UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêutico

Desenvolvimento e validação de método analítico indicativo de estabilidade por CLAE-DAD-CAD para besilato de anlodipino e seus produtos de degradação

Livia dos Santos Ichinose

Dissertação para obtenção do Título de Mestre
Orientadora: Profa. Dra. Erika Rosa Maria Kedor-Hackmann

São Paulo
2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêutico

Desenvolvimento e validação de método analítico indicativo de estabilidade por CLAE-DAD-CAD para besilato de anlodipino e seus produtos de degradação

Livia dos Santos Ichinose

Versão Original

Dissertação para obtenção do Título de Mestre
Orientadora: Profa. Dra. Erika Rosa Maria Kedor-Hackmann

São Paulo
2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

I16d

Ichinose, Livia dos Santos
Desenvolvimento e validação de método analitico indicativo de estabilidade por CLAE-DAD-CAD para besilato de anlodipino e seus produtos de degradação / Livia dos Santos Ichinose. - São Paulo, 2017.
97 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Kedor-Hackmann, Erika Rosa Maria

1. Amlodipine besylate. 2. LC. 3. Corona CAD. I. T. II. Kedor-Hackmann, Erika Rosa Maria, orientador.

Livia dos Santos Ichinose

Desenvolvimento e validação de método analítico indicativo de estabilidade por CLAE-DAD-CAD para besilato de anlodipino e seus produtos de degradação

Comissão Julgadora da Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Profa. Dra. Erika Rosa Maria Kedor-Hackmann
Orientadora / Presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

4º examinador

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Dedico esse trabalho aos meus pais **Luiz** e **Elizabete**,

que são meus alicerces e responsáveis pela pessoa que sou hoje.

À minha orientadora Profa. Dra. Erika, por confiar e acreditar em mim.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela oportunidade de mais uma realização e concretização de um sonho.

Aos meus pais por todo apoio, ensinamentos e disciplina repassados desde minha infância até hoje. São meus exemplos e meus ídolos. Hoje sou quem sou devido a eles, por acreditarem e confiarem em mim.

A minha orientadora pela oportunidade de desenvolver esse trabalho e pela confiança depositada em mim.

A profa. Maria Aurora pela ajuda e por ter aberto as portas de seu laboratório apara a realização dos experimentos no UHPLC-DAD-CAD.

Ao David, secretário do departamento de Fármacos e medicamentos, por toda a gentileza e ajuda disponibilizada ao longo desses anos no programa de pós-graduação.

A indústria farmacêutica Eurofarma pela disponibilização de materiais para o desenvolvimento desse trabalho.

A minha supervisora Fabiana Povêa pelo apoio na realização dessa parceria entre a Universidade e a Eurofarma.

RESUMO

ICHINOSE, L. S. **Desenvolvimento e validação de método analítico indicativo de estabilidade por CLAE-DAD-CAD para besilato de anlodipino e seus produtos de degradação**. 2017. 97f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

O presente estudo foi realizado com o objetivo de se desenvolver e validar uma metodologia analítica indicativa de estabilidade para separação e quantificação de anlodipino e seus produtos de degradação no medicamento besilato de anlodipino 5 mg por comprimido.

Para tanto, realizou-se um estudo de degradação forçada, como forma de identificar os principais produtos de degradação, que podem vir a formar num estudo de estabilidade, bem como estabelecer possíveis rotas de degradação.

Foi utilizada a técnica instrumental de separação, cromatografia a líquido (CL), com dois tipos de detectores: arranjo de diodos (DAD) e corona CAD (Detector de aerossol carregado), coluna cromatográfica Zorbax SB-Phenyl 1,8µm 4,6 x 50 mm Agilent® e fase móvel constituída por tampão pH3,0, metanol e acetonitrila sob condições de gradiente (75% de tampão pH 3,0, 15% de metanol e 10% de acetonitrila; no tempo de 10 minutos tem-se 20% de tampão pH3,0, 60% de metanol e 20% de acetonitrila; no tempo de 13 minutos tem-se 75% de tampão pH3,0, 15% de metanol e 10% de acetonitrila; e no tempo de 15 minutos tem-se 75% de tampão pH3,0, 15% de metanol e 10% de acetonitrila); fluxo de 1,0mL/min até 10 minutos; de 10,1 a 13 minutos tem-se fluxo de 0,5 mL/min; e de 13,1 a 15 minutos volta ao fluxo de 1,0 mL/min; e detecção em 238 nm. O método apresentou-se linear, preciso, exato, robusto e seletivo, e proporcionou resultados confiáveis, sem interferência de degradantes e impurezas.

Palavras chaves: Anlodipino, CL, corona CAD.

ABSTRACT

ICHINOSE, L. S. **Development and validation of analytical method indicative of stability by HPLC-DAD-CAD for amlodipine besylate and its degradation products**. 2017. 97f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

This study was conducted in order to develop an analytical methodology indicative of stability for separation and quantification of the antihypertensive amlodipine and its degradation products in the drug amlodipine besylate 5 mg per tablet.

For this development was performed a forced degradation study, in order to identify the main degradation products that may form in a stability study, as well as establish possible degradation routes.

It was used the instrumental separation technique, liquid chromatography (LC) with two types of detectors: diode array (DAD) and corona CAD (Charged Aerosol Detector), chromatographic column Zorbax SB-Phenyl 4.6 x 50 mm 1,8µm Agilent® and mobile phase of buffer pH3,0, methanol and acetonitrile under gradient conditions (75% buffer pH3,0, 15% methanol and 10% acetonitrile; 10 minutes has 20% buffer pH3,0, 60% methanol and 20% acetonitrile; 13 minutes has become 75% of buffer pH3,0, 15% methanol and 10% acetonitrile; and 15 minutes has become 75% of buffer pH3,0, 15% methanol and 10% acetonitrile); flow 1.0 mL/ min up to 10 minutes; a flow 0,5 mL/min is obtained from 10,1 to 13 minutes; and from 13,1 minutes the flows returns to 1,0 mL/min; and detection in 238 nm. The method is linear, precise, accurate, robust and selective, and provided reliable results without interference from degradation products and impurities.

Keywords: Amlodipine, LC, Corona CAD.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estutrura química do besilato de anlodipino.

.

Figura 2. Log D em função do pH para o besilato de anlodipino.

Figura 3. Ionização da molécula de anlodipino em diferentes pHs.

Figura 4. Mecanismo de ação dos bloqueadores de canais de cálcio.

Figura 5. Família das diidropiridinas.

Figura 6. Perfis de degradação potencial versus real.

Figura 7. Componentes do cromatógrafo líquido.

Figura 8. Esquema de funcionamento do DAD.

Figura 9. Funcionamento do CAD.

Figura 10. Impureza E da Galchimia®.

Figura 11. Impureza A da Farmacopeia Europeia.

Figura 12. Impureza B da Farmacopeia Europeia.

Figura 13. Impureza C da Farmacopeia Europeia.

Figura 14. Impureza D da Farmacopeia Europeia.

Figura 15. Impureza E da Farmacopeia Europeia.

Figura 16. Impureza G da Farmacopeia Europeia.

Figura 17. Espectro de absorção de besilato de anlodipino na região do infravermelho (IR).

Figura 18. Espectro de RMN ^{1}H do besilato de anlodipino.

Figura 19. Estrutura molecular do besilato de anlodipino referente ao espectro de RMN ^{1}H.

Figura 20. Espectro de RMN ^{13}C do besilato de anlodipino.

Figura 21. Estrutura molecular do besilato de anlodipino referente ao espectro de RMN ^{13}C.

Figura 22. A) Espectro de massas ESI (+) MS da solução de besilado de anlodipino na faixa de m/z 50 - 500 e B) ESI(+) MS/MS do íon de m/z 409 correspondente ao besilato de anlodipino protonado $[M+H]^+$.

Figura 23. Mecanismo de fragmentação proposto para a estrutura do besilato de anlodipino.

Figura 24. Curva DSC do besilato de anlodipino obtida em atmosfera inerte de nitrogênio (100 mL/min) e velocidade de 20ºC/min.

Figura 25. Curva de TGA para besilato de anlodipino.

Figura 26. Espectro de absorção no UV da solução padrão de besilato de anlodipino. Concentração 0,1 mg/mL.

Figura 27. Espectro de absorção no UV da solução amostra IFA de besilato de anlodipino. Concentração de 0,1 mg/mL.

Figura 28. Cromatograma da fase móvel. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2µL e temperatura do forno 20ºC.

Figura 29. Cromatograma referente a mistura de impurezas + IFA. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

Figura 30. Cromatograma referente ao IFA sob condição inicial – sem agentes estressantes. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de

1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

Figura 31. Cromatograma referente ao produto terminado sob condição inicial – sem agentes estressantes. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

Figura 32. Cromatograma referente ao placebo sob condição inicial – sem agentes estressantes. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

Figura 33. Cromatograma referente ao IFA sob condições de degradação ácida (HCl 0,1M por 2 horas a 70ºC). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

Figura 34. Cromatograma referente ao produto terminado sob condições de degradação ácida (HCl 0,1M por 2 horas a 70ºC). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

Figura 35. Cromatograma referente ao IFA sob condições de degradação alcalina (NaOH 0,05M por 4 dias em temperatura ambiente). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

Figura 36. Cromatograma referente ao produto terminado sob condições de degradação alcalina (NaOH 0,05M por 3 dias em temperatura ambiente). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

Figura 37. Cromatograma referente ao IFA sob condições de degradação fotolítica no estado sólido (por 5 dias sob exposição a 1,2 milhões de lux horas). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

Figura 38. Cromatograma referente ao produto terminado sob condições de degradação fotolítica no estado sólido (por 5 dias sob exposição a 1,2 milhões de lux horas). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

Figura 39. Cromatograma referente ao IFA sob condições de degradação por oxidação pelos íons metálicos ($CuSO_4$ 1mM por 5 dias a 40ºC). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

Figura 40. Cromatograma referente ao produto terminado sob condições de degradação por oxidação pelos íons metálicos ($CuSO_4$ 1mM por 5 dias a 40ºC). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

Figura 41. Cromatograma referente ao IFA sob condições de degradação por termólise (5 dias a 70ºC). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

Figura 42. Cromatograma referente ao produto terminado sob condições de degradação por termólise (por 5 dias a 70ºC). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

Figura 43. Cromatograma referente ao IFA sob condições de degradação por oxidação com peróxido de hidrogênio (H_2O_2 3% por 1 dia em temperatura ambiente). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

Figura 44. Cromatograma referente ao produto terminado sob condições de degradação por oxidação com peróxido de hidrogênio (H_2O_2 3% por 6 horas em temperatura ambiente). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

Figura 45. Cromatograma referente ao IFA sob condições de degradação por umidade (90%UR/ 70ºC por 10 dias). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

Figura 46. Cromatograma referente ao produto terminado sob condições de degradação por umidade (90%UR/70ºC por 10 dias). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min

0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

Figura 47. Cromatograma referente a fase móvel. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

Figura 48. Cromatograma referente a mistura de impurezas + IFA. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD com filtro 7 e ganho 100 pA, volume de injeção 2 µL e temperatura da coluna de 20ºC.

Figura 49. Cromatograma referente ao IFA sob condição inicial – sem agentes estressantes. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD com filtro 7 e ganho 100 pA, volume de injeção 2 µL e temperatura da coluna de 20ºC.

Figura 50. Cromatograma referente ao produto terminado sob condição inicial – sem agentes estressantes. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD com filtro 7 e ganho 100 pA, volume de injeção 2 µL e temperatura da coluna de 20ºC.

Figura 51. Cromatograma referente ao placebo sob condição inicial – sem agentes estressantes. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD com filtro 7 e ganho 100 pA, volume de injeção 2 µL e temperatura da coluna de 20ºC.

Figura 52. Cromatograma referente ao IFA sob condições de degradação ácida (HCl 0,1M por 2 horas a 70ºC). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD com filtro 7 e ganho 100 pA, volume de injeção 2 µL e temperatura da coluna de 20ºC.

Figura 53. Cromatograma referente ao produto terminado sob condições de degradação ácida (HCl 0,1M por 2 horas a 70ºC). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD com filtro 7 e ganho 100 pA, volume de injeção 2 µL e temperatura da coluna de 20ºC.

Figura 54. Cromatograma referente ao IFA sob condições de degradação alcalina (NaOH 0,05M por 4 dias em temperatura ambiente). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD com filtro 7 e ganho 100 pA, volume de injeção 2 µL e temperatura da coluna de 20ºC.

Figura 55. Cromatograma referente ao produto terminado sob condições de degradação alcalina (NaOH 0,05M por 3 dias em temperatura ambiente). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD com filtro 7 e ganho 100 pA, volume de injeção 2 µL e temperatura da coluna de 20ºC.

Figura 56. Cromatograma referente ao IFA sob condições de degradação fotolítica no estado sólido (por 5 dias sob exposição a 1,2 milhões de lux horas). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD com filtro 7 e ganho 100 pA, volume de injeção 2 µL e temperatura da coluna de 20ºC.

Figura 57. Cromatograma referente ao produto terminado sob condições de degradação fotolítica no estado sólido (por 5 dias sob exposição a 1,2 milhões de lux horas). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD com filtro 7 e ganho 100 pA, volume de injeção 2 µL e temperatura da coluna de 20ºC.

Figura 58. Cromatograma referente ao IFA sob condições de degradação por oxidação pelos íons metálicos ($CuSO_4$ 1mM por 5 dias a 40ºC). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD com filtro 7 e ganho 100 pA, volume de injeção 2 µL e temperatura da coluna de 20ºC.

Figura 59. Cromatograma referente ao produto terminado sob condições de degradação por oxidação pelos íons metálicos ($CuSO_4$ 1mM por 5 dias a 40ºC). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD com filtro 7 e ganho 100 pA, volume de injeção 2 µL e temperatura da coluna de 20ºC.

Figura 60. Cromatograma referente ao IFA sob condições de degradação por termólise (5 dias a 70ºC). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD com filtro 7 e ganho 100 pA, volume de injeção 2 µL e temperatura da coluna de 20ºC.

Figura 61. Cromatograma referente ao produto terminado sob condições de degradação por termólise (por 5 dias a 70ºC). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD com filtro 7 e ganho 100 pA, volume de injeção 2 µL e temperatura da coluna de 20ºC.

Figura 62. Cromatograma referente ao IFA sob condições de degradação por oxidação com peróxido de hidrogênio (H_2O_2 3% por 1 dia em temperatura ambiente). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD com filtro 7 e ganho 100 pA, volume de injeção 2 µL e temperatura da coluna de 20ºC.

Figura 63. Cromatograma referente ao produto terminado sob condições de degradação por oxidação com peróxido de hidrogênio (H2O2 3% por 6 horas em temperatura ambiente). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD com filtro 7 e ganho 100 pA, volume de injeção 2 µL e temperatura da coluna de 20ºC.

Figura 64. Cromatograma referente ao IFA sob condições de degradação por umidade (90%UR/ 70ºC por 10 dias). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD com filtro 7 e ganho 100 pA, volume de injeção 2 µL e temperatura da coluna de 20ºC.

Figura 65. Cromatograma referente ao produto terminado sob condições de degradação por umidade (90%UR/70ºC por 10 dias). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD com filtro 7 e ganho 100 pA, volume de injeção 2 µL e temperatura da coluna de 20ºC.

Figura 66. Exemplo de diferença de resposta da alanina com a adição de orgânico após a separação cromatográfica.

Figura 67. Curva analítica para avaliação do teor. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min

15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

Figura 68. Avaliação da dispersão dos resíduos da curva analítica para avaliação do teor. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

Figura 69. Curva analítica para avaliação da concentração das impurezas do limite de notificação ao limite de qualificação. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

Figura 70. Avaliação da dispersão dos resíduos da curva analítica para avaliação do teor. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

Figura 71. Curva analítica para avaliação da concentração das impurezas do limite de notificação ao limite de qualificação. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm, fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

Figura 72. Avaliação da dispersão dos resíduos da curva analítica para avaliação no nível das impurezas. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

Figura 73. Curva analítica para avaliação da concentração da impureza Composto Relacionado A (CRA) do limite de notificação ao limite de qualificação. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl

(1,8 µm 4,6 x 50 mm, fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

Figura 74. Avaliação da dispersão dos resíduos da curva analítica para a impureza Composto Relacionado A (CRA). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

Figura 75. Avaliação da robustez no nível do teor. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

Figura 76. Avaliação da robustez no nível das impurezas. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

Figura 77. Avaliação da robustez no nível do teor. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tipos de bloqueadores de canais de cálcio.

Tabela 2. Degradação forçada por hidrólise.

Tabela 3. Degradação forçada por termólise.

Tabela 4. Degradação forçada por fotólise.

Tabela 5. Degradação forçada por oxidação.

Tabela 6. Métodos de quantificação de anlodipino.

Tabela 7. Condição de degradação para o insumo farmacêutico ativo – besilato de anlodipino.

Tabela 8. Condições de degradação para produto terminado – besilato de anlodipino 5 mg.

Tabela 9. Linearidade para avaliação de teor de anlodipino.

Tabela 10. Linearidade para avaliação da concentração as impurezas no limite de notificação ao limite de qualificação.

Tabela 11. Gradiente de fase móvel.

Tabela 12. Deslocamento do RMN ^{1}H do besilato de anlodipino.

Tabela 13. Deslocamentos do RMN de ^{13}C.

Tabela 14. Limites de notificação, identificação e qualificação dos produtos de degradação utilizados nos estudos de estabilidade de medicamentos.

Tabela 15. Resultados da degradação forçada do insumo farmacêutico ativo – besilato de anlodipino.

Tabela 16. Resultados da degradação forçada do produto terminado – besilato de anlodipino.

Tabela 17. Avaliação da exatidão no nível do Teor – DAD λ 238 nm. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de

0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

Tabela 18. Avaliação da exatidão no nível das impurezas – Alvo 0,001 mg/mL– DAD λ 238 nm. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

Tabela 19. Avaliação da exatidão no nível das impurezas – Alvo 0,002 mg/mL– DAD λ 238 nm. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

Tabela 20. Avaliação da exatidão no nível do Teor. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

Tabela 21. Avaliação da precisão no nível do Teor – DAD λ 238 nm. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

Tabela 22. Avaliação da precisão no nível das impurezas – Alvo: 0,001 mg/mL – DAD λ 238 nm. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

Tabela 23. Avaliação da precisão no nível das impurezas – Alvo: 0,002 mg/mL – DAD λ 238 nm. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

Tabela 24. Avaliação da precisão no nível do Teor. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

LISTA DE ABREVIATURAS

AAPH: hidrocloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)

ACVA: 4,4’-azobis (ácido 4-cianovalérico)

AIBN: azobisisobutironitrila

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BCC: Bloqueadores de canal de cálcio

C: Átomo de carbono

CAD: Charged aerosol detector (Detector de aerossol carregado)

Cl: Átomo de cloro

CL: Cromatografia a líquido

DAD: Diode array detector (Detector de arranjo de diodos)

DMF: Drug master file (Arquivo Mestre do insumo farmacêutico ativo)

DSC: Differential scanning calorimetry

ESI(+): Ionização por eletrospray no modo positivo

FDA: Food and Drug Administration

H: Átomo de hidrogênio

HCl: ácido clorídrico

HPLC: High performance liquid chromatography

ICH: The International Conference on Harmonisation

IFA: Insumo farmacêutico ativo

IR: Infrared

m/z: Relação massa-carga

M: Massa molecular

MIE: Metodologia indicativa de estabilidade

Mol. Wt: Molecular weight (peso molecular)

MS: Mass spectrometry (Espectometria de massas)

NaOH: Hidróxido de sódio

O: Átomo de oxigênio

PDs: Produtos de degradação

RDC: Resolução da diretoria colegiada

RE: Resolução

RMN: Ressonância magnética nuclear

TGA: Thermogravimetry analysis

UR: Umidade relativa

UV: Ultravioleta

WHO: World Health Organization (Organização mundial da saúde)

Índice

1. INTRODUÇÃO 3
2. JUSTIFICATIVA 5
3. REVISÃO DA LITERATURA 6
3.1. Características físico-químicas do besilato de anlodipino 6
3.2. Ação terapêutica do besilato de anlodipino 8
3.3. Métodos indicativos de estabilidade 11
3.3.1. Estudo de degradação forçada 12
3.3.1.1. Degradação por hidrólise 14
3.3.1.2. Degradação por termólise 16
3.3.1.3. Degradação por fotólise 17
3.3.1.4. Degradação por umidade 18
3.3.1.5. Degradação por oxidação 18
3.4. Metodologias analíticas para quantificação do besilato de anlodipino comprimido 20
3.4.1. Metodologia analítica utilizada na pesquisa 23
3.4.1.1. Detector Arranjos de Diodos (DAD) 24
3.4.1.2. Detector corona CAD 25
4. OBJETIVOS 27
4.1. Objetivo Geral 27
4.2. Objetivos Específicos 27
5. MATERIAL E MÉTODOS 28
5.1. Material 28
5.1.1. Reagentes 28
5.1.2. Padrões analíticos 28
5.1.3. Amostras 32
5.1.4. Equipamentos 32
5.2. Métodos analíticos 33
5.2.1. Caracterização físico-química do insumo farmacêutico ativo 33
5.2.1.1. Espectroscopia de absorção nas regiões de infravermelho 33
5.2.1.2. Ressonância magnética nuclear de ^{1}H e ^{13}C 33
5.2.1.3. Identificação por Espectrometria de massas simples e sequencial (MS e MS/MS) 33
5.2.1.4. Calorimetria Exploratória Diferencial 33
5.2.1.5. Análise termogravimétrica 34
5.2.1.6. Espectrometria de absorção na região do Ultravioleta (UV) 34
5.2.2. Desenvolvimento da metodologia indicativa de estabilidade 34
5.2.2.1. Preparo das soluções para avaliação da fase móvel 34
5.2.2.2. Preparo das amostras para avaliação de seletividade 35
5.2.2.3. Preparo das amostras para avaliação da linearidade 37
5.2.2.4. Preparo das amostras para avaliação da exatidão 38
5.2.2.5. Preparo das amostras para avaliação da precisão 39
5.2.2.6. Preparo das amostras para avaliação da robustez 40
5.2.3. Condições cromatográficas finais 40
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO 42

6.1.1. Caracterização físico-química do insumo farmacêutico ativo 42
6.1.1.1. Espectroscopia de absorção nas regiões de infravermelho 42
6.1.1.2. Ressonância magnética nuclear de ^{1}H e ^{13}C 43
6.1.1.3. Identificação por Espectrometria de massas simples e sequencial (MS e MS/MS) 46
6.1.1.4. Calorimetria Exploratória Diferencial 48
6.1.1.5. Análise termogravimetrica 49
6.1.1.6. Espectrometria de absorção na região do Ultravioleta (UV) 50
6.1.2. Desenvolvimento da metodologia indicativa de estabilidade 51
6.1.2.1. Avaliação da seletividade – Estudo de degradação forçada 74
6.1.2.2. Avaliação da linearidade 76
6.1.2.3. Avaliação da exatidão 81
6.1.2.4. Avaliação da precisão 85
6.1.2.5. Avaliação da robustez 89
7. CONCLUSÃO FINAL 91
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 92

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2015) as doenças cardiovasculares são responsáveis por aproximadamente 17 milhões de mortes ao ano. A hipertensão arterial sistêmica é responsável por pelo menos 45% das mortes por doenças do coração, como insuficiência cardíaca e enfarte (PORTAL BRASIL, 2015).

No Brasil, de acordo com os dados do Ministério da Saúde, aproximadamente 30 milhões de brasileiros sofrem de hipertensão (PORTAL BRASIL, 2015). É uma doença silenciosa e crônica, determinada pelos níveis elevados da pressão sanguínea nas artérias, que raramente apresenta sintomas, e é causada pelo aumento da tensão nas paredes arteriais, sobrecarregando órgãos como o coração e os rins, aumentando a predisposição a entupimento de artérias, acidente vascular cerebral e infarto (OLIVEIRA, 2015; PINTO et al., 2015).

O besilato de anlodipino é uma diidropiridina de terceira geração, bloqueadora dos canais de cálcio, agindo primariamente nos músculos arteriais e a posteriori nos músculos cardíacos, causando relaxamento e dilatação, sendo muito utilizada para o tratamento de angina pectoris, arritmia cardíaca e hipertensão arterial, em monoterapia ou associado (PINHEIRO, 2015; JANKOVICS, 2008; GUMUSTAS; OZKAN, 2013; ERANKI et al., 2013).

Tendo por base a importância desse medicamento no tratamento de uma das doenças com maior morbimortalidade do mundo, o desenvolvimento de uma metodologia analítica indicativa de estabilidade (MIE) se faz necessário, uma vez que será possível detectar com precisão e exatidão o insumo farmacêutico ativo, de maneira seletiva frente a impurezas, produtos de degradação e excipientes durante o estudo de estabilidade (BRASIL, 2014).

Tal método analítico é indicado para a análise de amostras de estabilidade, uma vez que são capazes de detectar, ao longo do tempo, mudanças nas propriedades físico-químicas de uma substância. O estudo de estabilidade é um dos requisitos básicos para a obtenção e/ou renovação de registro de um medicamento, pois esse tem por objetivo definir o prazo de validade dos medicamentos, período de utilização em embalagem e condições de armazenamento especificadas, que garantem ao consumidor final qualidade e eficácia do medicamento (BRASIL, 2005).

Para o desenvolvimento de uma MIE deve-se submeter as amostras a condições de estresse, a fim de induzir perfis de degradação potenciais, que provavelmente gerarão produtos de degradação que levariam muito tempo para aparecer nas condições normais de armazenagem. Com isso, poderá se traçar uma prerrogativa do perfil de degradação real a ser obtido no estudo de estabilidade de longa duração e fornecerão informações acerca das possíveis rotas de degradação do fármaco e a estabilidade intrínseca da molécula (BRASIL, 2014; BRASIL (1), 2015).

De acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 53 de dezembro de 2015, o insumo farmacêutico ativo e o medicamento devem ser submetidos às condições de degradação forçada por aquecimento, umidade, hidrólise ácida, hidrólise básica, oxidação por peróxido de hidrogênio e por metais em transição e por exposição fotolítica para a elaboração

do perfil de degradação potencial de um medicamento, bem como o desenvolvimento de MIE com especificidade e seletividade adequados.

Atualmente a utilização de cromatografia a líquido (CL) em MIE tem sido altamente recomendada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para o acompanhamento de resultados provenientes de estudos de estabilidade de medicamentos (CIONE; TONHI; SILVA, 2015; BRASIL (1), 2015). Tal método instrumental de separação se tornou muito utilizado devido ter a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em amostras simples ou complexas, de maneira rápida, eficiente, sensível e com alta resolução (AGUILAR; FERREIRA; BONI, 2015).

A validação de um método indicativo de estabilidade, de acordo com a RE 899/2003, se classifica na categoria 2, métodos analíticos para determinação de impurezas e produtos de degradação do fármaco.

Para tanto, a presente pesquisa empregará, no desenvolvimento e validação da MIE, a CL acoplada aos detectores DAD e CAD para separar e quantificar o anlodipino e seus produtos de degradação, bem como avaliar o balanço de massas.

2. JUSTIFICATIVA

Atualmente, a prevalência da hipertensão no âmbito mundial é muito relevante, pois está associado as maiores mortalidades e morbidades mundiais (WHO, 2015). Logo, a utilização cada vez maior de medicamentos anti-hipertensivos no tratamento da pressão alta, se tornou um nicho muito atrativo para o mercado farmacêutico.

Para o desenvolvimento e fabricação desses medicamentos, as indústrias farmacêuticas precisam assegurar aos órgãos reguladores e para a população, que seu medicamento é seguro e eficaz, ao longo do seu prazo de validade.

E como forma de garantir tais premissas, as empresas necessitam desenvolver metodologias capazes de evidenciar, de forma precisa e exata, possíveis degradações que podem ocorrer ao longo do período do estudo de estabilidade, além de avaliar a qualidade do medicamento (STENGER, 2011; BRASIL, 2014).

A necessidade do desenvolvimento de metodologias analíticas indicativas de estabilidade é colocada como diretriz por órgãos internacionais como International Conference on Harmonization (ICH) e Food and Drug Administration (FDA), bem como recomendada pela Farmacopeia Americana para análises de amostras retiradas durante o processo de fabricação (U.S. PHARMACOPEIAL CONVENTION, 2016; ICH, 2016; FDA, 2008).

No Brasil, a Anvisa estabelece na RDC nº 53 de 4 de dezembro de 2015, os parâmetros para notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas. E no Guia nº 04 de 2015 - versão 01, uma orientação para obtenção de perfil de degradação, identificação e qualificação de degradação em medicamentos.

Até o momento, não se tem relatos na literatura do desenvolvimento e validação de uma metodologia indicativa de estabilidade para o besilato de amlodipino utilizando as técnicas analíticas de cromatografia acoplada à detecção de arranjo de diodos e CAD.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Características físico-químicas do besilato de anlodipino

O besilato de anlodipino é quimicamente conhecido como 3-etil 5-metil (4S)-2-[(2-aminoetoxi)metil]-4-(2-clorofenil)-6-metil- 1,4-diidropiridina-3,5- dicarboxilato benzenosulfonato (CHEMAXON, 2017). O fármaco apresenta um carbono quiral e é utilizado com uma mistura racêmica das formas enantioméricas, R e S, porém a atividade farmacológica é atribuída à forma S (LEITE, 2014; ANSARI, 2012). Sua fórmula molecular é $C_{20}H_{25}ClN_2O_5$. $C_6H_6O_3S$ com massa molecular de 408,88 g/mol (anlodipino) e 567,06 g/mol (besilato de anlodipino) (U.S. PHARMACOPEIAL CONVENTION, 2016). Na Figura 1 pode-se observar sua estrutura química.

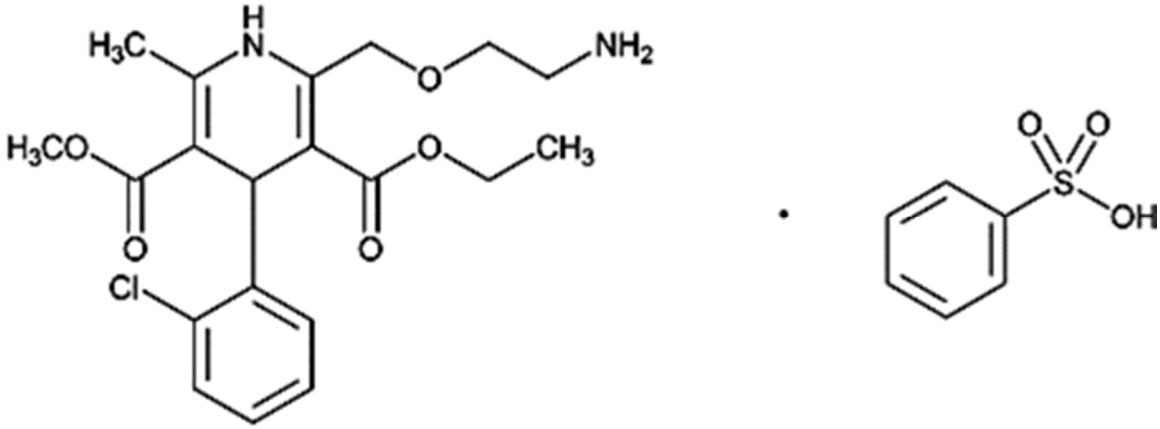

Figura 1. Estrutura química do besilato de anlodipino.
Fonte: U.S. PHARMACOPEIAL CONVENTION, 2016.

É um pó cristalino branco, parcialmente solúvel em água e etanol (CADILA HEALTHCARE LIMITED, 2015; GIORGETTI, 2012; WISHART RESEARCH GROUP, 2016). Apresenta ponto de fusão de 195 – 204ºC, e com coeficiente de distribuição (log D), como se observa na Figura 2, com valores negativos em pHs fisiológicos, o que sugere que a molécula é hidrofílica nesse intervalo de pH (CHEMAXON, 2017).

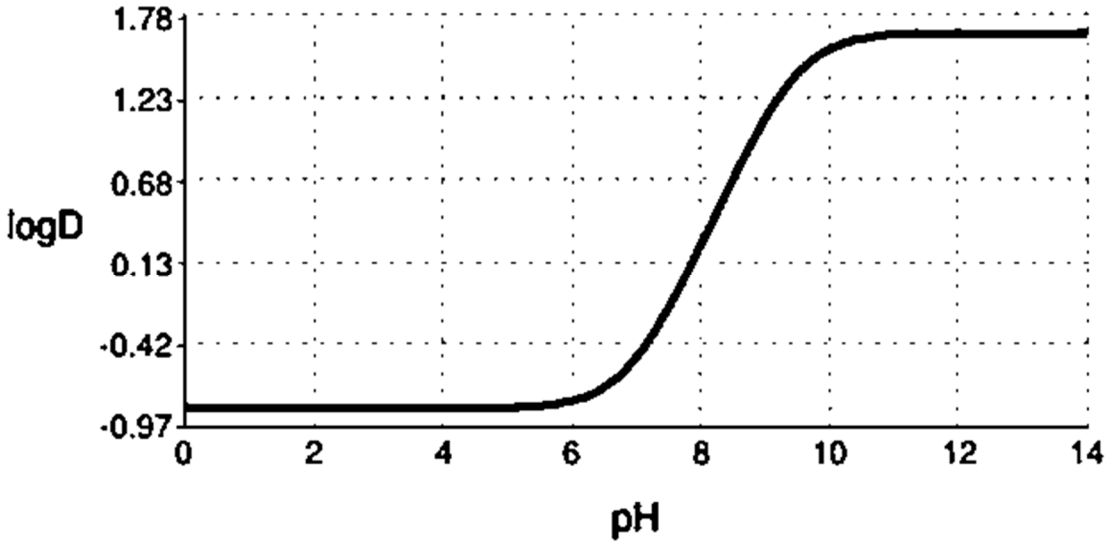

Figura 2. Log D em função do pH para o besilato de anlodipino.

Fonte: CHEMAXON, 2017.

O insumo farmacêutico ativo possui um valor de pKa de 9,45; como se observa na Figura 3, se apresentando majoritariamente na forma ionizada nos fluidos do trato gastrointestinal, sendo representada pela linha azul no gráfico presente na Figura 3 (WISHART RESEARCH GROUP, 2016; CHEMAXON, 2017).

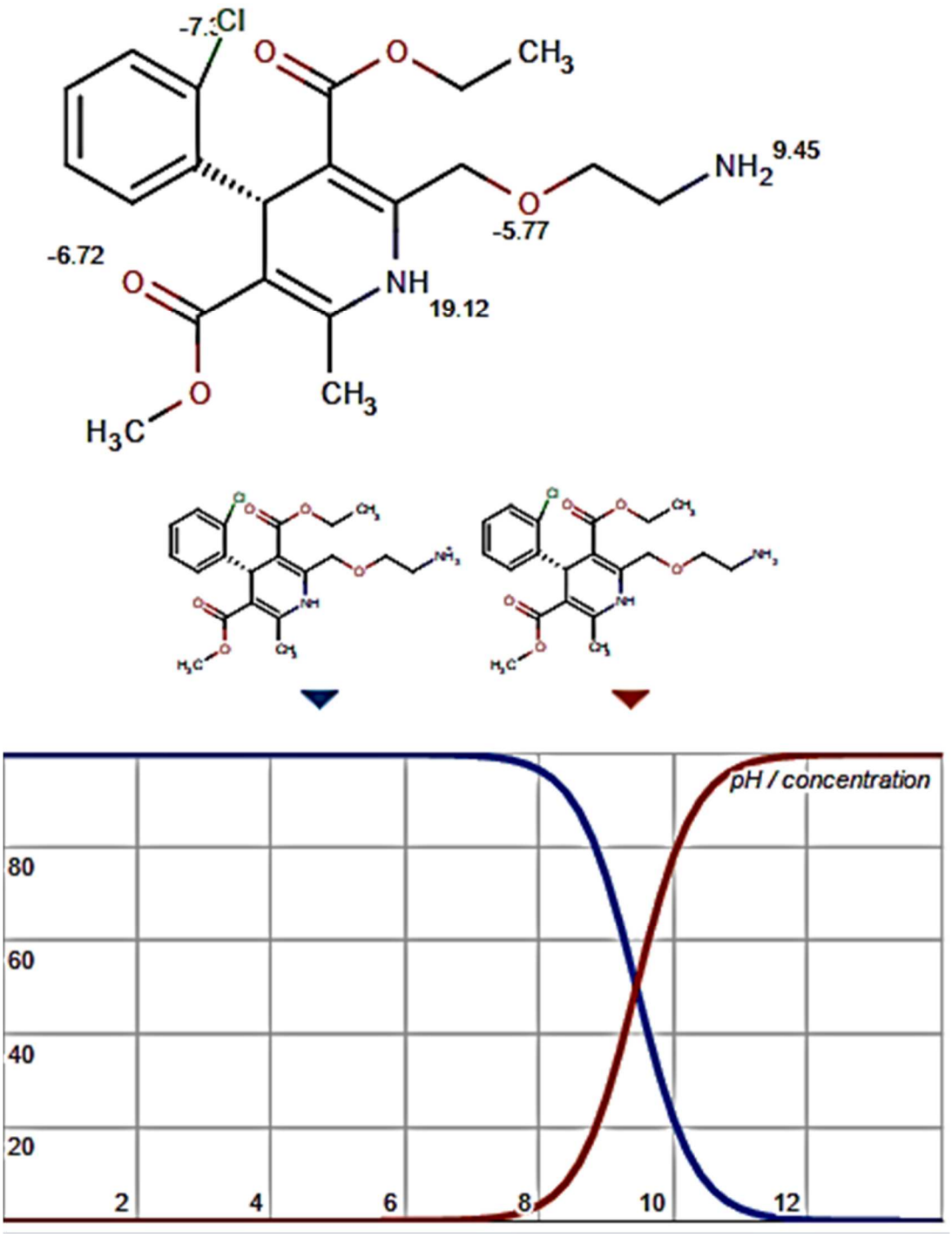

Figura 3. Ionização da molécula de anlodipino em diferentes pHs.

Fonte: CHEMAXON, 2017.

3.2. Ação terapêutica do besilato de anlodipino

O besilato de anlodipino pertence à classe dos bloqueadores de canais de cálcio, os quais são proteínas transmembranosas que permitem a passagem dos íons cálcio para o interior das células da musculatura lisa vascular e cardíaca. A ação terapêutica do insumo farmacêutico ativo, se resume, basicamente, na interrupção do fluxo de cálcio extracelular para

o interior da célula vascular, por meio da inibição do canal L dependente de voltagem (DONADUZZI, 2016; FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DO PORTO, 2016; GIORGETTI, 2012).

Com menor quantidade de íons cálcio no interior das células, ocorre o relaxamento da musculatura lisa vascular, e consecutivamente a diminuição da resistência periférica total e do trabalho cardíaco, como mostra a Figura 4. Tal efeito vasodilatador reduz a pressão sistêmica e aumenta a circulação de sangue rico em oxigênio que promove a estabilização da frequência cardíaca e a diminuição do consumo de energia miocárdica e a necessidade de oxigênio (DONADUZZI, 2016; GIORGETTI, 2012).

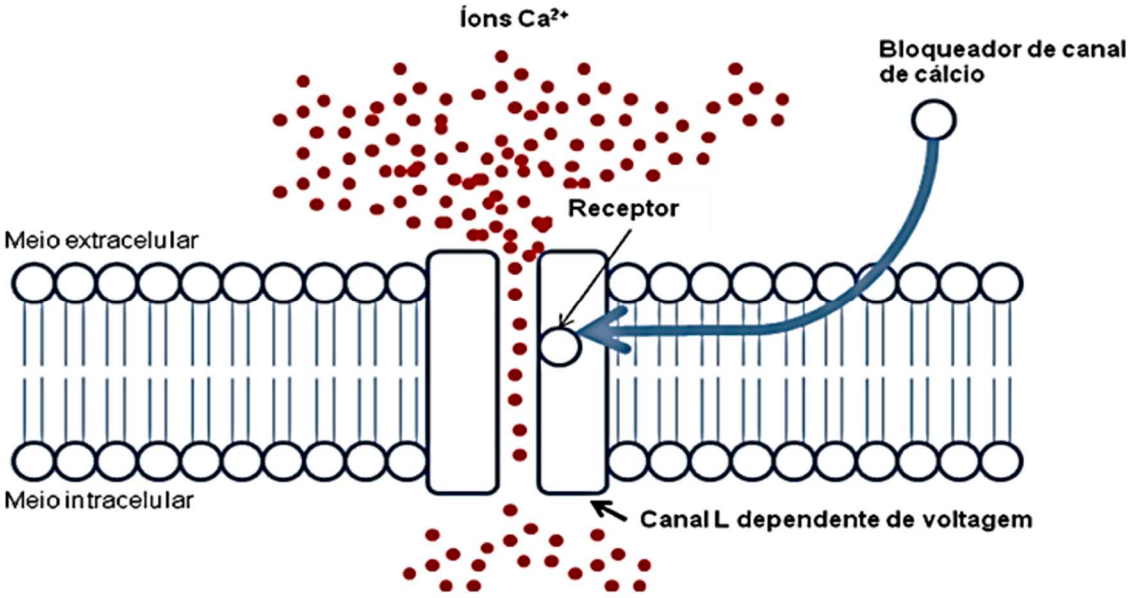

Figura 4. Mecanismo de ação dos bloqueadores de canais de cálcio.
Fonte: GIORGETTI, 2012.

Como pode-se observar na Tabela 1, há diversos tipos de bloqueadores de canais de cálcio, como fenilalquilaminas, benzotiazepinas e as diidropiridinas. Dentre as diidropiridinas, tem-se o besilato de anlodipino, o qual é seletivo para a musculatura lisa vascular, ligando-se à subunidade alfa 1 do canal L, que é a principal responsável pela polarização e despolarização do canal L.

Tabela 1. Tipos de bloqueadores de canais de cálcio.

Bloqueadores dos canais de cálcio			
	Posologia		Número de
Medicamentos	Mínima	Máxima	tomadas por dia
Fenilalquilaminas			
Verapamil Retard***	120	480	1-2
Benzotiazepinas			
Diltiazem AP, SR ou CD ***	180	480	1-2
Diidropiridinas			
Anlodipino	2,5	10	1
Felodipino	5	20	1-2
Irasdipina	2,5	20	2
Lacidipina	2	8	1
Lercarnidipino	10	30	1
Manidipino	10	20	1
Nifedipino Oros***	30	60	1
Nifedipino Retard***	20	60	2-3
Nisoldipino	5	40	1-2
Nitrendipino	10	40	2-3

*** Retard, SR, ZOK, Oros, XL, LA, AP, SR e CD: formas farmacêuticas de liberação prolongada ou controlada

Fonte: DANTE MARCELO A. GIORGI, 2015.

A família das diidropiridinas podem ser divididas em fármacos de primeira, segunda e terceira geração, como pode-se observar na Figura 5. Os de primeira geração foram introduzidos em 1970, sendo representada pelo nifedipino. Os de segunda geração são ativos derivados do nifedipino, sendo introduzidos entre as décadas de 1980 e 1990, como o nisoldipino e felodipino (GIORGETTI, 2012).

O besilato de anlodipino é uma diidripiridina de terceira geração, a qual possui uma diferença fundamental em relação às outras gerações, pois está na forma ionizada em pH fisiológico. O que permite explicar seu mecanismo de ação através da ligação iônica do grupo amino protonado com o oxigênio aniônico presente na membrana fisiológica, permitindo assim o início de ação lenta e com efeito prolongado de vasodilatação (GIORGETTI, 2012).

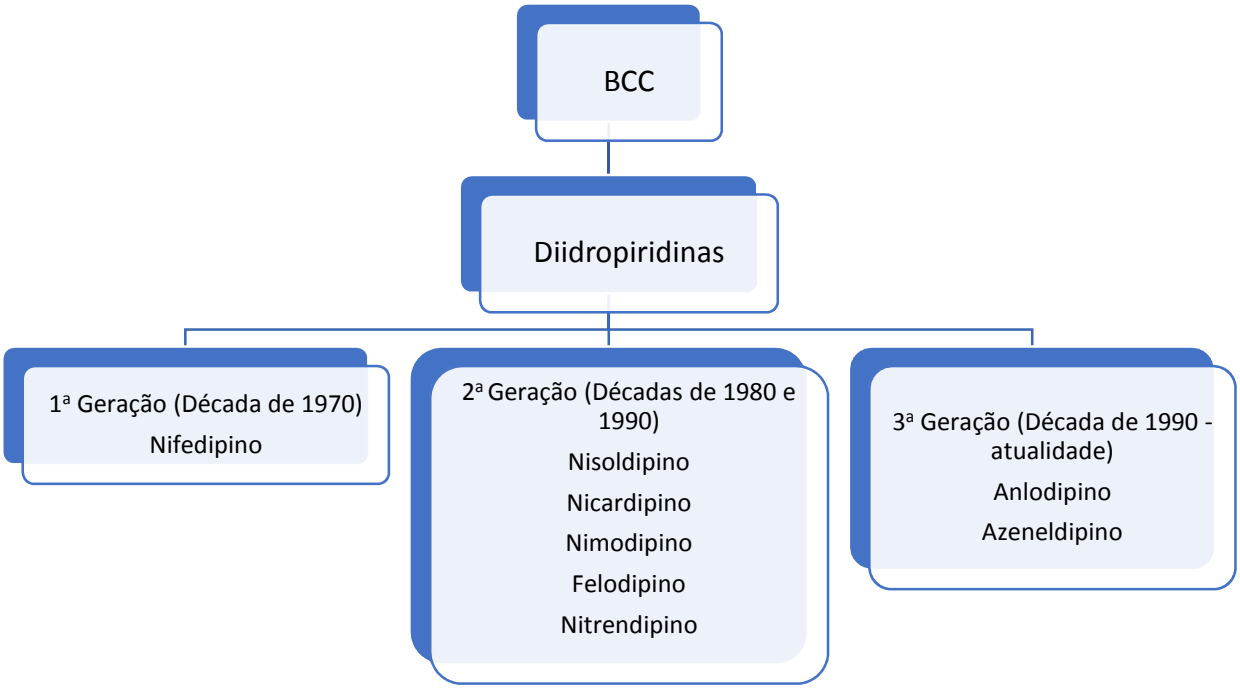

Figura 5. Família das diidropiridinas.

Fonte: GIORGETTI, 2012.

O besilato de anlodipino pode ser administrado na forma de comprimidos ou cápsulas, sendo absorvido de forma lenta, o qual não é alterado pela ingestão de alimentos, e atinge o máximo de concentração plasmática entre 6 a 12 horas. Sua biodisponibilidade absoluta seria aproximadamente de 64 a 80% (DONADUZZI, 2016; GIORGETTI, 2012).

Devido ao seu pka elevado, o fármaco se encontra ionizado e completamente dissolvido nos meios fisiológicos, logo ele se liga de forma estereoseletiva com as proteínas plasmáticas a uma razão de aproximadamente 95% (DONADUZZI, 2016; GIORGETTI, 2012).

O fármaco apresenta tempo de meia-vida de 35 a 50 horas, com níveis de estado de equilíbrio obtidos após 7 a 8 dias de doses consecutivas. É metabolizado amplamente no fígado e excretado pelas vias renais.

3.3. Métodos indicativos de estabilidade

O método indicativo de estabilidade é requisito fundamental para a avaliação do medicamento ao longo de um estudo de estabilidade, uma vez que ele é capaz de detectar e quantificar com exatidão e precisão possíveis produtos de degradação, que podem vir a se formar durante o estudo de longa duração ou acelerada (BRASIL, 2005), exigido pelos órgãos regulatórios seja no registro e no pós-registro do medicamento, já que tal estudo possibilita a concessão do prazo de validade e, consecutivamente, a garantia da qualidade ao consumidor e eficácia do medicamento ao longo de sua vida útil (BRASIL (1), 2015).

Sendo assim, para desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade é imprescindível a realização do estudo de degradação forçada, pois o mesmo submeterá o

insumo farmacêutico ativo (IFA), placebo e o medicamento às condições de hidrólise (ácida-básica), fotoestabilidade, oxidação por peróxido e metais em transição, temperatura e umidade, a fim de avaliar os subprodutos resultantes e suas possíveis vias de degradação (ALCÂNTARA et al., 2016).

Com isso, possibilitará o desenvolvimento de MIE mais seletivos, robustos, e confiáveis, sendo capazes de quantificar os produtos de degradação (PDs) individualmente e correlacionar a queda do teor do IFA com a presença dos PDs.

3.3.1. Estudo de degradação forçada

A realização do estudo de degradação forçada, tem como objetivo gerar produtos de degradação (PDs) que podem ser similares ou diferentes, tanto qualitativamente quanto quantitativamente, dos que aparecerão nos estudos de estabilidade, de longa duração ou acelerada (BRASIL (1), 2015).

Portanto trata-se de um perfil de degradação potencial que, de uma maneira geral, pode-se inferir o perfil de degradação real a ser obtido durante o estudo de estabilidade. Pois esse está contido no perfil de degradação potencial obtido no estudo de degradação forçada, como observa-se na Figura 6 (BRASIL (1), 2015).

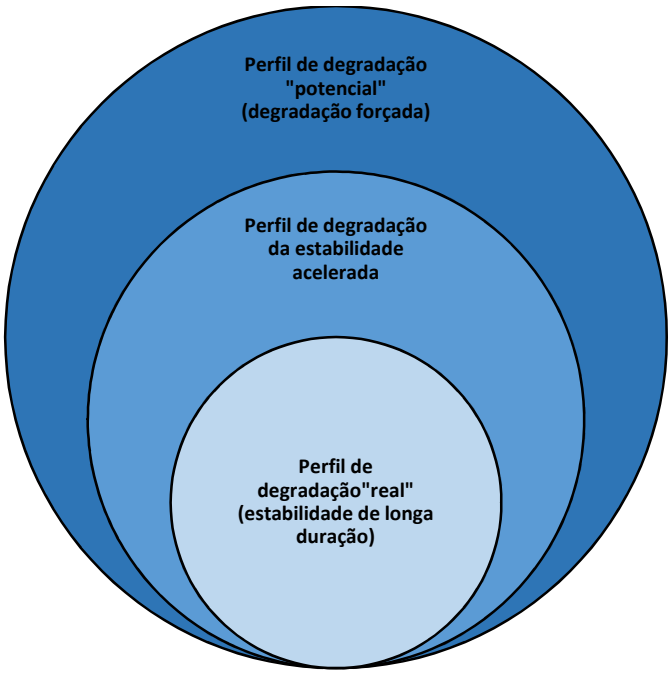

Figura 6. Perfis de degradação potencial versus real.

Fonte: BRASIL (1), 2015.

De acordo com o Guia nº 04/2015 versão 01 para obtenção de perfil de degradação, identificação e quantificação de produtos de degradação, propõe-se que o insumo farmacêutico ativo, preferencialmente, deve ser degradado numa faixa de 10 a 30% para evitar a formação de produtos de degradação de segunda geração, com a destruição do composto ou formação

de degradantes irrelevantes. Uma vez que geraria PDs muito aquém da realidade de um estudo de estabilidade, além de interferir no balanço de massas (ITO, 2012; BRASIL (2), 2015).

Com o estudo de degradação forçada pode-se inferir sobre diversas características de seu IFA e medicamento, tal como (ALCÂNTARA et al., 2016):

- Estabelecimento de vias de degradação;
- Diferenciação de PDs que estão relacionados ao fármaco daquele que são gerados a partir de excipientes e/ou adjuvantes na formulação;
- Elucidação da estrutura dos PDs relevantes;
- Determinação da estabilidade intrínseca do IFA na formulação;
- Elucidação dos mecanismos de degradação, tais como hidrólise, oxidação, termólise ou fotólise do IFA e do medicamento;
- Desenvolvimento de método analítico adequado para analisar amostras de estabilidade;
- Compreensão das propriedades físico-quimicas do IFA;
- Geração de formulações mais estáveis;
- Produção de perfil de degradação semelhante ao que seria observado em um estudo formal de estabilidade.

No estudo de degradação forçada, solventes são utilizados para solubilizar o IFA que não é solúvel em água, a fim de potencializar a degradação. Normalmente, se utiliza como solventes orgânicos, o metanol e a acetonitrila.

Porém deve-se tomar cuidado com a utilização do metanol, pois o mesmo pode atuar como nucleófilo e reagir nos sítios eletrófilos ou em vias de degradação intermediárias, o que gerará PDs irreais, que normalmente não seriam formados nas condições do estudo de estabilidade. Deve ser evitado, principalmente, se o IFA conter grupos funcionais como ácido carboxílico, éster ou amida que reagem facilmente com metanol (BAERTSCHI, 2005).

A acetonitrila em comparação ao metanol é inerte, e tipicamente preferida nos estudos de degradação por hidrólise, mas ela também pode participar de algumas degradações e gerar PDs fictícios. Portanto, uma análise crítica e ponderada deve ser feita durante o planejamento do estudo de degradação forçada com a utilização de solventes, já que ambos têm implicações analíticas e podem gerar resultados irreais.

Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada nº 53 de 04 dezembro de 2015, o estudo de degradação forçada deve ser conduzido em um lote em escala laboratorial, piloto ou industrial do medicamento e, para fins de comparação, a execução do estudo deve ser realizada com a formulação, placebo e IFA isolado e/ou associado em casos de associações em dose fixa. Tais amostras devem ser submetidas às condições de hidrólise ácida, hidrólise básica, termólise, fotólise, umidade, oxidação por peróxido de hidrogênio e por metais em transição.

3.3.1.1. Degradação por hidrólise

A água é considerada um dos principais catalizadores em reações de degradação, por estar presente em diversas quantidades nos medicamentos, seja o IFA na forma de hidratos ou presente nos excipientes do medicamento. Logo, a hidrólise é uma reação comum e esperada durante o estudo de degradação forçada (BAERTSCHI, 2005; GONÇALVES, 2014).

As reações de hidrólise são tipicamente ácidas ou básicas, e são importantes principalmente quando existe um grupo ionizável, que apresenta diferentes estados de ionização sob diferentes pHs (BAERTSCHI, 2005).

De acordo com o Guia nº 04, versão 01, de 04 de dezembro de 2015, a degradação por hidrólise ácida deve ser feita utilizando-se uma solução tampão em pH abaixo de 7,0 ou um ácido mineral, HCl. Na hidrólise básica pode ser utilizada uma solução tampão com pH acima de 7,0 ou um hidróxido de metal alcalino, como o NaOH.

Pelos dados encontrados na literatura, as recomendações gerais para a condução do estudo de degradação por hidrólise são variadas, como se observa na Tabela 2.

Tabela 2. Degradação forçada por hidrólise.

Tipo de degradação	**Referência**	**Recomendações**
Hidrólise ácida	ICH – Q1A (R2) (apud ITO, 2012)	Hidrólise em solução ou suspensão em uma larga faixa de pH.
	ALSANTE et al.; 2007 (apud ITO, 2012)	Utilizar solução de HCl ou H_2SO_4 em concentração de 0,1 a 1,0 M. Pode ser conduzido em solução ou suspensão. Para solubilização da substância, pode-se utilizar co-solventes apropriados ou ajustar o pH.
	BAERTSCHI, 2005 (apud ITO, 2012)	Utilizar solução de HCl 0,1N acima de 70ºC durante 1 a 7 dias.
	SEHRAWAT, MAITHANI, SINGH, 2010 (apud ITO, 2012)	Solução do fármaco de 1mg L^{-1} em HCl 0,1M a 1M em temperatura ambiente ou maior.
Hidrólise alcalina	ICH – Q1A (R2) (apud ITO, 2012)	Hidrólise em solução ou suspensão em uma larga faixa de pH.
	ALSANTE et al.; 2007 (apud ITO, 2012)	Utilizar solução de NaOH, LiOH ou KOH em concentração 0,1 M à 1,0 M. Pode ser conduzido em solução ou suspensão. Para solubilização da substância, pode-se utilizar co-solventes apropriados ou ajustar o pH.
	BAERTSCHI, 2005 (apud ITO, 2012)	Utilizar solução de NaOH 0,1N e outra de pH 8,0 acima de 70ºC durante 1 à 7 dias.
	SEHRAWAT, MAITHANI, SINGH, 2010 (apud ITO, 2012)	Solução do fármaco de 1mg L^{-1} em NaOH 0,1 M a 1M em temperatura ambiente ou maior.

Fonte: ITO, 2012.

De acordo com o relatório técnico série 929 de 2005 da Organização Mundial da Saúde, se nenhuma degradação for detectada após 10 dias ou for inferior a 10%, sob condições de HCl 0,1N e NaOH 0,1N, o IFA pode ser considerado estável (WHO EXPERT COMMITTEE, 2005).

Conforme o arquivo mestre do insumo farmacêutico ativo (DMF) do fornecedor Cadila Healthcare Limited®, o IFA se apresenta instável sob condições de hidrólise básica predominantemente e com degradação mais branda sob condições ácidas.

3.3.1.2. Degradação por termólise

A termólise consiste na exposição das amostras, IFA, produto terminado e placebo, a altas temperaturas, que induzem a quebra as ligações químicas (BAERTSCHI, 2005), chamada de pirólise.

Na literatura foram encontradas diversas condições sob as quais pode-se conduzir o estudo, como mostra a Tabela 3.

Tabela 3. Degradação forçada por termólise.

Tipo de degradação	Referência	Recomendações
Térmica	ICH – Q1A (R2) (apud ITO, 2012)	Incrementar 10ºC acima do estudo de estabilidade acelerado.
	ALSANTE et al.; 2007 (apud ITO, 2012)	Sólido: 50ºC ou mais e umidade maior que 75%. Utilizar cinética de Arrhenius para determinar a temperatura e duração adequadas para a substância
	REYNOLDS et al., 2002 (apud ITO, 2012)	Sólido: Verificar a energia de ativação necessária para conduzir um estudo com incrementos de temperatura que represente um ensaio relativo ao estudo acelerado.
	BAERTSCHI, 2005 (apud ITO, 2012)	Sólido: expor à 70ºC durante uma semana, pode-se utilizar umidade relativa de 75%. Solução aquosa: acima de 70ºC durante 1 à 7 dias.
	SEHRAWAT, MAITHANI, SINGH, 2010 (apud ITO, 2012)	70ºC e umidade 75% por mais de 2 semanas.

Fonte: ITO, 2012.

De acordo com o Guia nº 04, versão 01, de 04 de dezembro de 2015, a degradação por aquecimento deve ser realizada sem o aumento da umidade no ambiente e com a amostra no estado sólido (BRASIL (1), 2015).

De acordo com relatório técnico série 929 de 2005 da Organização Mundial da Saúde, se nenhuma degradação for detectada após 10 dias ou for inferior a 10%, sob condições de aquecimento no estado sólido de 60ºC a 120ºC ou 5ºC a 10ºC abaixo do ponto de fusão, o IFA pode ser considerado estável (WHO EXPERT COMMITTEE, 2005).

Conforme o arquivo mestre do insumo farmacêutico ativo (DMF) do fornecedor Cadila Healthcare Limited®, o IFA se apresenta estável sob condições de aquecimento.

3.3.1.3. Degradação por fotólise

É a degradação que resulta da exposição à luz ultravioleta ou visível num comprimento de onda de aproximadamente 300 a 800 nm. Na qual a molécula absorve a radiação eletromagnética, a qual pode propiciar a quebra de diversas ligações químicas (BAERTSCHI, 2005).

O estudo de fotoestabilidade pode ser realizado com a exposição do fármaco a fontes luminosas, por lâmpada fluorescente artificial, com saídas de luz visível e ultravioleta e lâmpadas de xenônios ou de haletos metálicos, sendo recomendados pelo ICH que a amostra tenha sido exposta a uma iluminação equivalente a 1,2 milhões de luz horas, como verifica-se na Tabela 4.

Tabela 4. Degradação forçada por fotólise.

Tipo de degradação	**Referência**	**Recomendações**
Fotolítica	ICH – Q1B (apud ITO, 2012)	Amostras devem ser expostas à luz totalizando não menos que 1,2 milhões de lux h e uma energia ultravioleta integrada de 200 watt h m^{-2}. Devem ser expostas lado a lado utilizando uma amostra controle (coberta com folha de alumínio). Realizar o teste apenas com o composto em solução simples ou suspensão. Utilizar recipientes inertes e transparentes. Para desenvolvimento e validação, limitar a exposição caso haja extensiva decomposição. Para substâncias fotoestáveis, pode-se conduzir estudos além do recomendado.
	ALSANTE et al.; 2007 (apud ITO, 2012)	Utilizar guia ICH. Para estudos de degradação forçada utilizar 2 vezes o recomendado pelo guia. Para estudos em solução, a acetonitrila é o solvente de escolha.
	BAERTSCHI, 2005 (apud ITO, 2012)	Expor as amostras sólida e aquosa 2 a 3 vezes mais do que o recomendado pelo ICH.

Fonte: ITO, 2012.

De acordo com o Guia nº 04, versão 01, de 04 de dezembro de 2015, a degradação por fotólise deve ser realizada variando a quantidade de lux horas e/ou watt hora por metro quadrado, sendo conduzida com as amostras no estado sólido (BRASIL (1), 2015).

De acordo com relatório técnico série 929 de 2005 da Organização Mundial da Saúde, se nenhuma degradação for detectada após 10 dias ou for inferior a 10%, sob condições de fotólise no estado sólido por irradiação luminosa com haletos metálicos, lâmpada de mercúrio, xenônio e por ultravioleta B, o IFA pode ser considerado estável (WHO EXPERT COMMITTEE, 2005).

Conforme o arquivo mestre do insumo farmacêutico ativo (DMF) do fornecedor Cadila Healthcare Limited®, o IFA se apresenta estável sob condições de fotólise.

3.3.1.4. Degradação por umidade

De acordo com o Guia nº 04, versão 01, de 04 de dezembro de 2015, a degradação por umidade deve ser realizada com as amostras no estado sólido, sob uma condição de umidade relativa superior a do ambiente (BRASIL (1), 2015).

Os PDs formados durante essa condição de estresse podem formar um perfil de degradação muito perto da realidade ao se comparar com um estudo de estabilidade, devido às amostras serem submetidas às condições de temperatura e umidade relativa, 30ºC/75%UR na estabilidade de longa duração e 40ºC/75% UR na estabilidade acelerada (BRASIL (1), 2015).

De acordo com relatório técnico série 929 de 2005 da Organização Mundial da Saúde, se nenhuma degradação for detectada após 10 dias ou for inferior a 10%, sob condições de umidade relativa de 75% ou mais, no estado sólido, o IFA pode ser considerado estável (WHO EXPERT COMMITTEE, 2005).

Conforme o arquivo mestre do insumo farmacêutico ativo (DMF) do fornecedor Cadila Healthcare Limited®, o IFA se apresenta estável sob condições de umidade.

3.3.1.5. Degradação por oxidação

As reações de degradação oxidativas são causadas por radicais livres ou pelo oxigênio molecular, sendo tais reações um dos mais comuns mecanismos de degradação de fármacos (BAERTSCHI, 2005).

O calor, luz e metais de transição atuam como indutores de catálise para esse tipo de reação, uma vez que podem promover tanto a perda de hidrogênio quanto o acréscimo de oxigênio na molécula (GONÇALVES, 2014).

A maioria das reações de decomposição oxidativa de fármacos são auto-oxidativas e necessitam de uma pequena quantidade de oxigênio molecular para iniciarem a formação de radicais livres com as reações em cadeia. O peróxido de hidrogênio é o mais amplamente utilizado no estudo de degradação forçada, mas outros agentes ditos como mais seletivos

podem ser utilizados para efeito confirmatório dos resultados com peróxido, tais como azobisisobutironitrila (AIBN), hidrocloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (AAPH) e 4,4'-azobis (ácido 4-cianovalérico) (ACVA) (GONÇALVES, 2014).

Algumas opções de degradação por oxidação podem ser observadas na Tabela 5.

De acordo com relatório técnico série 929 de 2005 da Organização Mundial da Saúde, se nenhuma degradação for detectada após 10 dias ou for inferior a 10%, sob condições de oxidação por peróxido de hidrogênio 3%, e por íons metálicos a 0,05M Fe III ou cobre II, o IFA pode ser considerado estável (WHO EXPERT COMMITTEE, 2005).

Conforme o arquivo mestre do insumo farmacêutico ativo (DMF) do fornecedor Cadila Healthcare Limited®, o IFA apresenta uma degradação branda sob condições de oxidação por peróxido de hidrogênio.

Baertschi, 2005, recomenda a degradação por oxidação por íons metálicos ser realizada com 1 a 5 mM de íons cobre II ou ferro III, a 40ºC de 1 a 3 dias de exposição.

Tabela 5. Degradação forçada por oxidação.

Tipo de degradação	Referência	Recomendações
Oxidativa	ICH – Q1A (R2) (apud ITO, 2012)	Apenas cita que quando apropriado, deve-se incluir o efeito da oxidação, no entanto, sem citar como conduzí-lo.
	ALSANTE et al.; 2007 (apud ITO, 2012)	Pode ser conduzido em atmosfera de O_2 ou na presença de peróxidos. Recomenda-se fortemente a utilização de iniciadores de radicais livres. Utilizar solução da substância em solvente adequado + 5 a 20% do iniciador de radical livre em pressão atmosférica. Pode-se aumentar a pressão atmosférica do teste com O_2 e aumentar a temperatura do sistema para estressar ainda mais a substância. Para sólidos utilizar uma comparação de ambiente de argônio versus ambiente de oxigênio em seu espaço vazio dentro de um recipiente fechado.
	BAERTSCHI, 2005 (apud ITO, 2012)	Utilizar solução de 0,3% de H_2O_2 em temperatura ambiente no escuro durante 1 a 7 dias.
	SEHRAWAT, MAITHANI, SINGH, 2010 (apud ITO, 2012)	O_{2+} agente iniciador em acetonitrila:água 80:20 (v/v) a 40ºC por 1 a 7 dias. 0,3 a 3% de H_2O_2 a temperatura ambiente por algumas horas até 7 dias protegido da luz.

Fonte: ITO, 2012.

3.4. Metodologias analíticas para quantificação do besilato de anlodipino comprimido

O besilato de anlodipino comprimido pode ser analisado por vários tipos de técnicas analíticas seja em amostras biológicas ou não, como por exemplo tem-se CL por detecção UV, por espectrometria de massas e por fluorescência, eletroforese capilar, espectrometria de massas, espectrofotometria ultravioleta e visível, Tabela 6.

De acordo com a monografia do besilato de anlodipino comprimido da Farmacopeia Americana, devem ser monitoradas as seguintes impurezas: anlodipino composto relacionado A, anlodipino aduto lactose e anlodipino aduto glucose/galactose, sendo que as duas últimas são dependentes da formulação do produto. Para medicamentos em associação com besilato

de anlodipino, como valsartana e anlodipino comprimidos; valsartana, anlodipino e hidroclorotiazida comprimidos; anlodipino e cloreto de benazepril cápsulas, apenas o composto relacionado A é monitorado (USP 39 - NF34, 2016).

Em ambas as monografias do insumo farmacêutico ativo, besilato de anlodipino, da Farmacopeia Americana e Europeia, é monitorado o composto relacionado A (Farmacopeia Americana) ou impureza D (Farmacopeia Europeia). Já as impurezas A, E e F apenas na Farmacopeia Europeia. Outras impurezas são descritas na Farmacopeia Europeia, como a impurezas B, G e H porém não tem valores de especificação (USP 39- NF34, 2016; EDQM, 2014).

Tabela 6. Métodos de quantificação de anlodipino.

Amostra	Método	Fase estacionária	Fase móvel	Referência
Anlodipino em comprimidos	Eletroforese capilar	Capilar de sílica 57 cm x 5 µm	Tampão citrato: metanol (80:20 v/v), pH7,0	(JANKOVICS et al., 2008) (apud GIORGETTI, 2012)
	Fluorescência	-	-	(ABDEL-WADOOD et al., 2008) (apud GIORGETTI, 2012)
	UV	-	-	(RAHMAN & HODA, 2003) (apud GIORGETTI, 2012)
	UV- Visível	-	-	(LAKSHMI ASWINI et al., 2012) (apud GIORGETTI, 2012)
Anlodipino em soro ou plasma humano	CL – fluorescência	Shimpack C18, 5 µm	Trietilamina : metanol (pH 2,5) – gradiente	(BAHRAMI & MIRZAEEI, 2004) (apud GIORGETTI, 2012)
	CL – EM	Zorbax 300 SB C18 5 µm	Água : acetonitrila (gradiente)	(MIROSHNICHENKO et al., 2008) (apud GIORGETTI, 2012)
	CL- UV	Nucleosil C8 4 µm	Tampão fosfato : acetonitrila (63:37 v/v)	(ZARGHI et al., 2005) (apud GIORGETTI, 2012)
Anlodipino e atenolol (associação em	CCDAE	Silica gel 60 F 254	Cloreto de metileno: metanol: solução de amônia (8,8:1,3:0,1 v/v)	(ARGERKAR & POWAR, 2000) (apud GIORGETTI,

comprimido)				2012)
Anlodipino e atorvastatina (associação em comprimido)	CL - UV	RP-C18 5 µm	Metanol: tampão fosfato : acetonitrila (60:30:10 v/v))	(SHAH et al., 2008) (apud GIORGETTI, 2012)
	UV	-	-	(DARWISH et al., 2011) (apud GIORGETTI, 2012)
	CL – EM/EM	Eclipse XDB C 18 3,5 µm	Ácido fórmico 0,1%: acetonitrila (gradiente)	(YU et al., 2011) (apud GIORGETTI, 2012)
	Eletroforese capilar	Silica capilar fundida (50 cm x 75 µm)	Tampão fosfato: metanol (80:20 v/v), pH 6,5	(HEFNAWY et al., 2009) (apud GIORGETTI, 2012)

Fonte: GIORGETTI, 2012.

3.4.1. Metodologia analítica utilizada na pesquisa

A cromatografia a líquido (CL) é uma técnica muito versátil, pois além de ser um método físico-quimico de separação, ela nos permite também a identificação de compostos com padrões previamente existentes, uma vez que consegue separar as substâncias desejáveis das indesejáveis, seja em amostras simples ou complexas, de forma rápida, eficiente, sensível e com alta resolução (AGUILAR; FERREIRA; BONI, 2015; DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

Tal técnica está fundamentada basicamente na migração diferencial dos componentes de uma mistura, devido as diversas interações que podem ocorrer entre a amostra e as fases estacionária e móvel, que dependendo da afinidade do(s) composto(s), ele pode ficar mais retido na coluna cromatográfica ou não (COLLINS, 2007).

As indústrias farmacêuticas utilizam-se massivamente essa técnica, em virtude da recomendação das agências reguladoras e estar presente em compêndios oficiais. Sendo uma técnica analítica de referência, devido sua diversificação e aplicabilidade nesse segmento de mercado (WATERS CORPORATION, 2012).

Como se observa na Figura 7, a instrumentação utilizada para CL é constituída basicamente por um reservatório para fase móvel, bomba de alta pressão, sistema de injeção, coluna cromatográfica e detector. O registro e o processamento dos dados são feitos por meio de programas específicos.

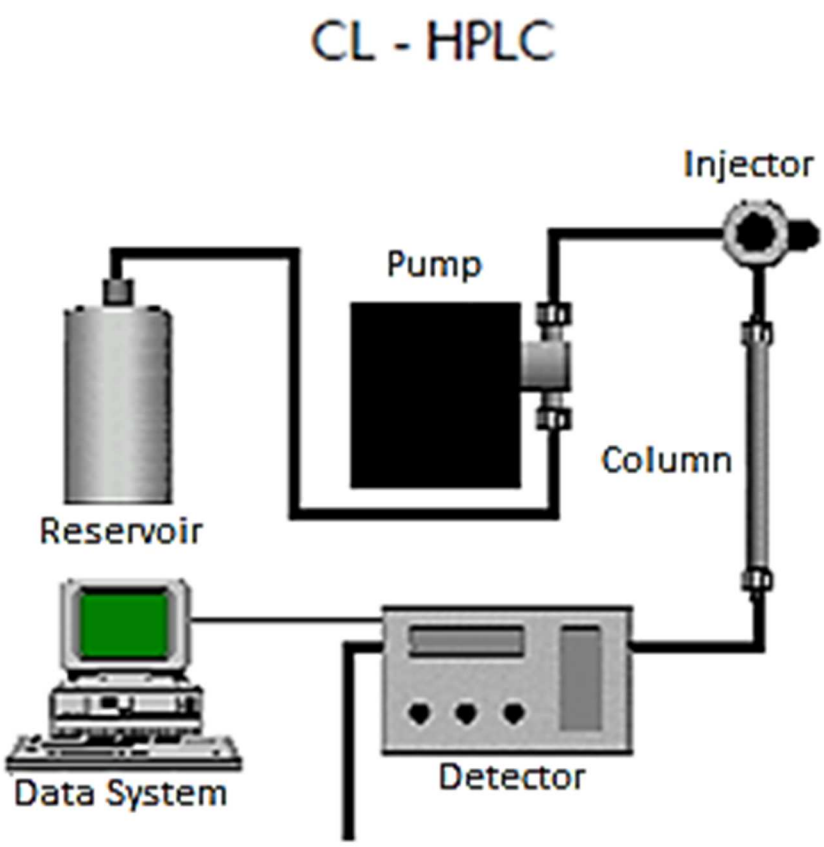

Figura 7. Componentes do cromatógrafo líquido.

Fonte: ARGENTON, 2010.

3.4.1.1. Detector Arranjos de Diodos (DAD)

O detector de arranjos de diodos é um dos mais utilizados para o desenvolvimento de metodologias indicativas de estabilidade, por ser capaz de realizar uma varredura num amplo intervalo de comprimentos de onda.

O arranjo de diodos consiste basicamente numa série de fotodiodos detectores posicionados um ao lado do outro num cristal de silício, de modo que toda a luz emergente da cela de amostra é dispersa em uma grade holográfica, sendo que cada comprimento de onda difratado pela grade atinja um ponto deste arranjo, e consequentemente o detector, como se observa na Figura 8 (ARGENTON, 2010).

Logo, esse tipo de detector permite a obtenção da absorbância de uma amostra em todos os comprimentos de onda seja determinada de modo simultâneo, porém ressalta-se que esses detectores apresentam sensibilidades diferentes para diferentes comprimentos de onda, devido às características inerentes de cada composto de interesse (ARGENTON, 2010).

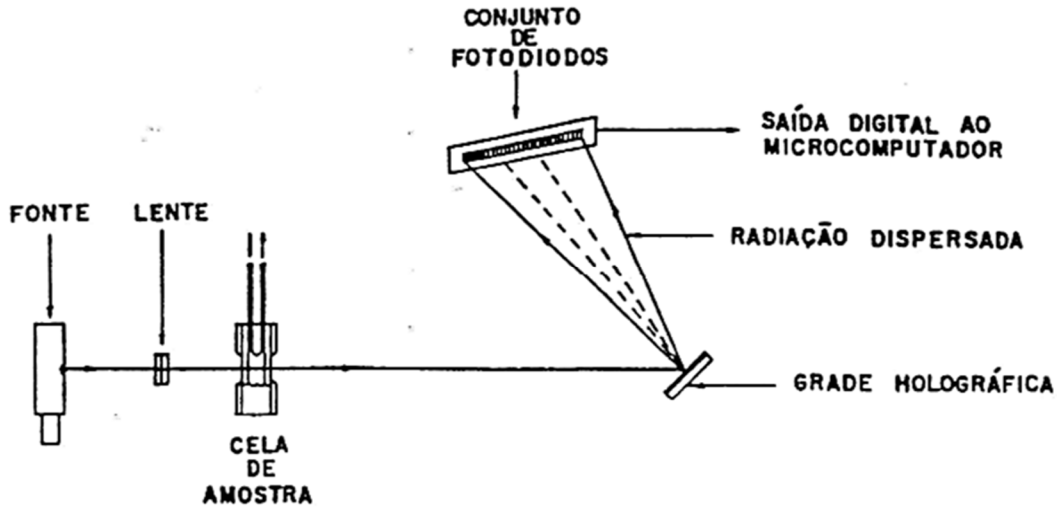

Figura 8. Esquema de funcionamento do DAD.

Fonte: ARGENTON,2010.

3.4.1.2. Detector corona CAD

O detector de aerossol carregado (CAD) é um detector universal que permite a detecção de compostos não voláteis ou semi-voláteis independente de suas características físico-químicas ou propriedades espectrais, pois ao contrário dos detectores ópticos, como o DAD, não há necessidade de grupos cromóforos para detectar os compostos de interesse. Sendo, portanto, uma técnica ortogonal no desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade, principalmente devido ao carácter universal da técnica (ALMELING; ILKO; HOLZGRABE, 2012).

Para um bom funcionamento do equipamento, alguns cuidados devem ser tomados com esse detector, a priori os analitos de interesse devem ser não-voláteis ou semi-voláteis, a fase móvel utilizada no sistema cromatográfico deve ser de fácil volatilização, como acetonitrila, metanol, ácido fórmico, ácido acético e outros, basicamente os mesmos modificadores que são utilizados na espectrometria de massas; a resposta do detector é dependente da composição do eluente, ou seja, quanto maior proporção de orgânico no eluente, melhor a detecção (ALMELING; ILKO; HOLZGRABE, 2012).

Após ocorrer a separação dos compostos de uma amostra pelo sistema cromatográfico, o eluente de saída é primeiramente nebulizado por um fluxo de nitrogênio, no qual criam-se gotas que são levadas pelo fluxo de nitrogênio para um tubo aquecido para a remoção da fase móvel, formando consecutivamente uma nuvem de partículas. Tais partículas são carregadas positivamente a partir de uma descarga de energia, e conduzidas para uma região coletora, onde um eletrômetro de alta sensibilidade produz um sinal, que é proporcional à massa do composto. Tal funcionamento pode ser observado na Figura 9 (ALMELING; ILKO; HOLZGRABE, 2012; NOVÁKOVÁ et al., 2009; RAGHAM; CHANDRASEKHAR, 2016; SQUIBB et al., 2008).

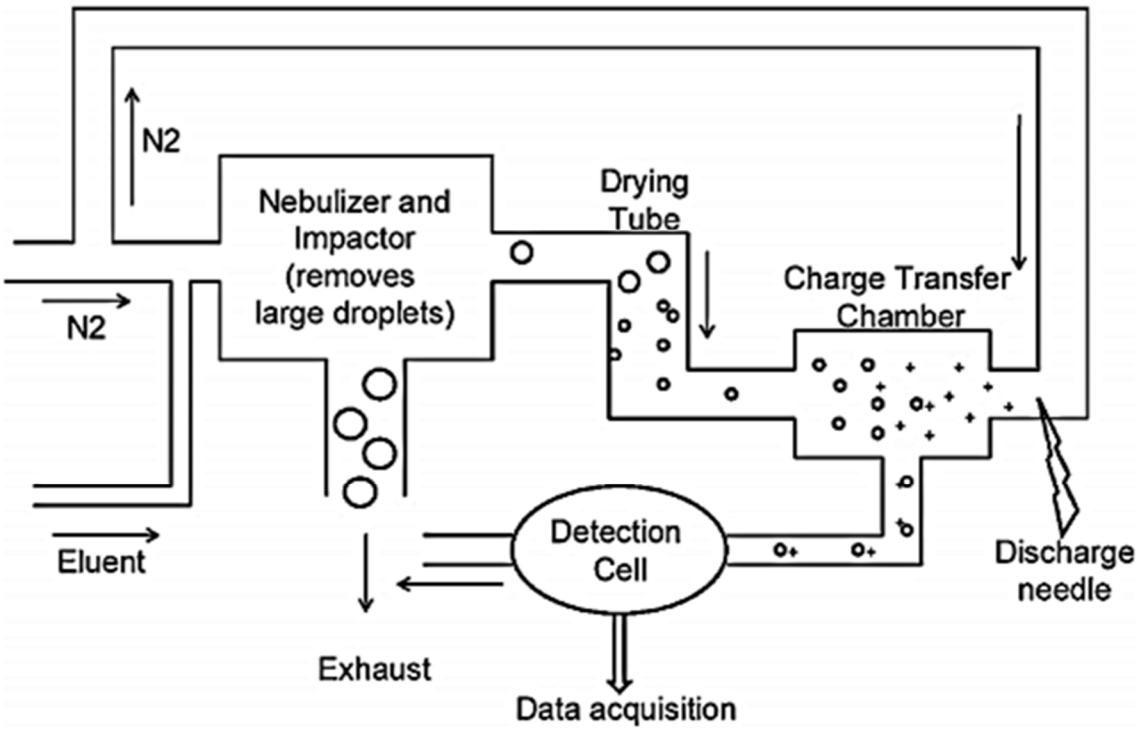

Figura 9. Funcionamento do CAD.

Fonte: ALMELING; ILKO; HOLZGRABE, 2012.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Desenvolver e validar um método analítico indicativo de estabilidade para quantificação do medicamento besilato de anlodipino 5 mg por comprimido.

4.2. Objetivos Específicos

Separar e quantificar impurezas e/ou produtos de degradação advindos do estudo de degradação forçada, conforme RDC 53/2015, por cromatografia líquida acoplada ao detector DAD e CAD.

Avaliação de balanço de massas durante o estudo de degradação forçada.

Identificar os possíveis produtos de degradação majoritários formados durante o estudo de degradação forçada por meio de padrões estabelecidos nos compêndios oficiais, caso disponíveis no laboratório ou por espectrometria de massas.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Material

5.1.1. Reagentes

- Água ultrapurificada pelo sistema MilliQ®;
- Acetonitrila grau cromatográfico (Merck®);
- Metanol grau cromatográfico (Merck®);
- Ácido acético grau analítico (Merck®);
- Ácido fórmico grau analítico (Merck®);
- Ácido trifluoracético grau analítico (Merck®);
- Acetato de amônio grau analítico (J. T. Backer®);
- Ácido clorídrico grau analítico (J. T. Backer®);
- Hidróxido de sódio grau analítico (Merck®);
- Peróxido de hidrogênio grau analítico (Merck®);
- Trietilamina grau analítico (Merck®).

5.1.2. Padrões analíticos

- Besilato de anlodipino (USP®) com 99,8% de pureza em base anidra;
- Besilato de anlodipino impureza E (Galchimia®) com 99,96% de pureza;

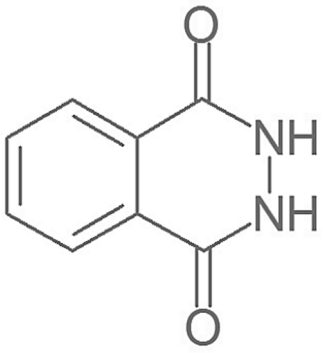

Figura 10. Impureza E da Galchimia®.

Fonte: GALCHIMIA, 2015.

- Besilato de anlodipino impureza A da Farmacopeia Europeia (é o mesmo que anlodipino composto relacionado D da Farmacopeia Americana (LGC®)) com 97,3% de pureza;

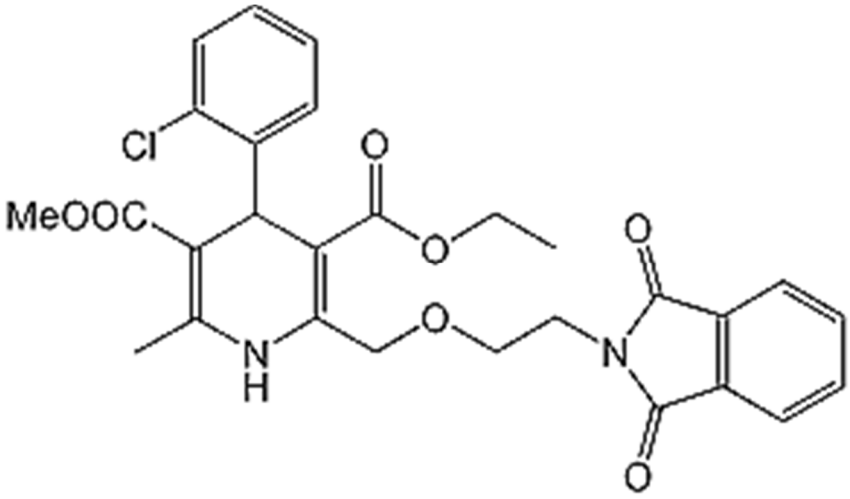

Figura 11. Impureza A da Farmacopeia Europeia.

Fonte: MOLCAN CORPORATION, 2014.

- Besilato de anlodipino impureza B da Farmacopeia Europeia (é o mesmo que a impureza anlodipino composto relacionado B da Farmacopeia Americana (LGC®)) com 97,9% de pureza;

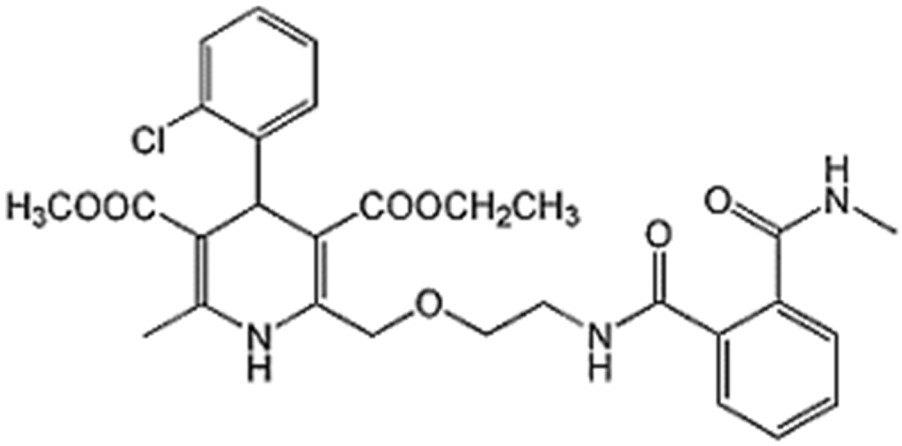

Figura 12. Impureza B da Farmacopeia Europeia.

Fonte: MOLCAN CORPORATION, 2014.

- Besiltato de anlodipino impureza C da Farmacopeia Europeia (LGC®) com 88,0% de pureza;

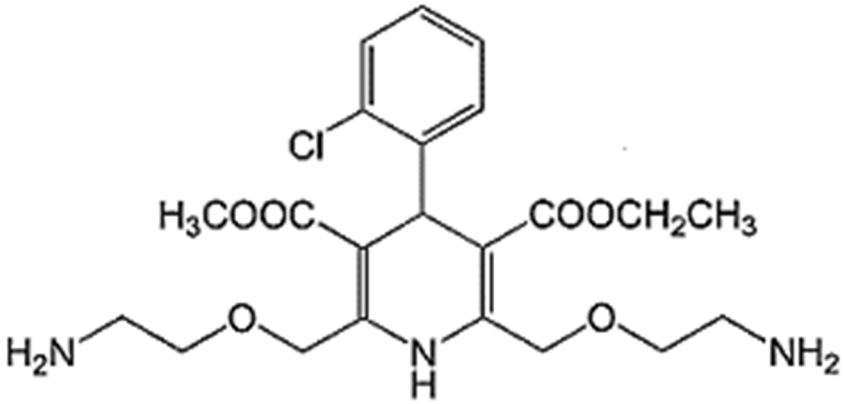

Figura 13. Impureza C da Farmacopeia Europeia.

Fonte: MOLCAN CORPORATION, 2014.

- Besilato de anlodipino impureza D da Farmacopeia Europeia é a mesma que a impureza anlodipino composto relacionado A da Farmacopeia Americana (USP®) com 100% de pureza;

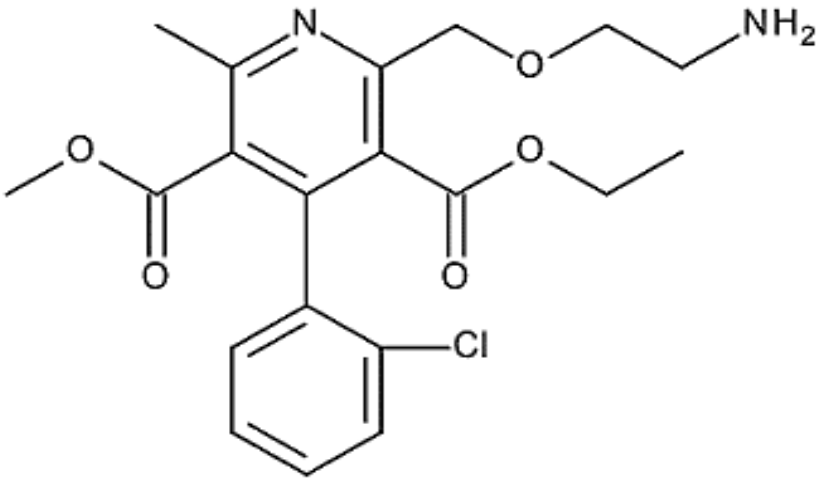

Figura 14. Impureza D da Farmacopeia Europeia.

Fonte: MOLCAN CORPORATION, 2014.

- Besilato de anlodipino impureza E da Farmacopeia Europeia é a mesma que a impureza anlodipino composto relacionado E da Farmacopeia Americana (USP®) com 100% de pureza;

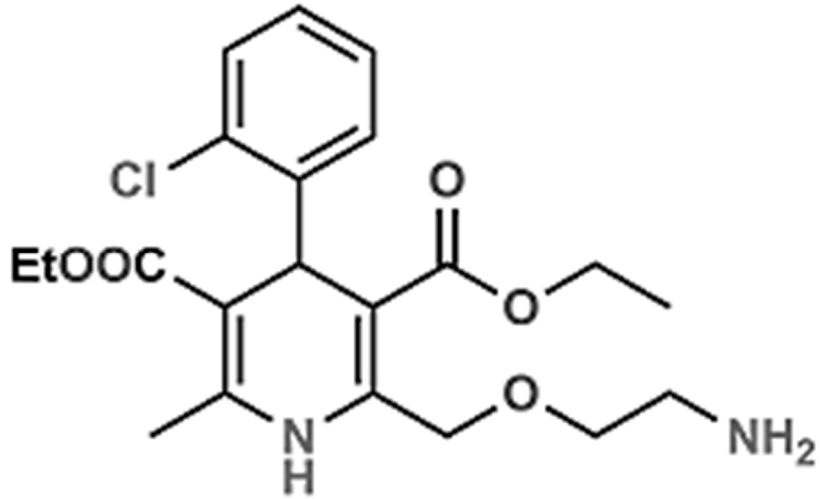

Figura 15. Impureza E da Farmacopeia Europeia.

Fonte: MOLCAN CORPORATION, 2014.

- Besilato de anlodipino impureza G da Farmacopeia Europeia é a mesma que a impureza anlodipino composto relacionado C da Farmacopeia Americana (USP®) com 99% de pureza;

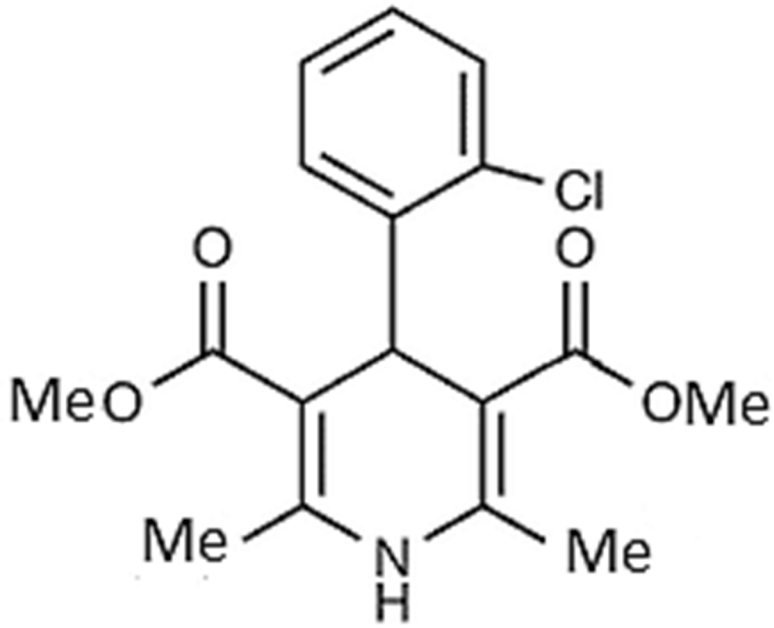

Figura 16. Impureza G da Farmacopeia Europeia.

Fonte: MOLCAN CORPORATION, 2014.

5.1.3. Amostras

- Besilato de anlodipino matéria-prima (Cadila Health Care®);
- Besilato de anlodpino 5 mg por comprimido (Eurofarma®);
- Placebo referente ao produto terminado besilato de anlodipino 5 mg por comprimido (Eurofarma®).

5.1.4. Equipamentos

- Cromatógrafo líquido acoplado aos detectores de arranjo de diodos (DAD) e corona CAD (Thermo Scientific®);
- Software Chromeleon 7.2 chromatography data system (Thermo Scientific®);
- Sistema de Espectroscopia de absorção por IR: MB 100 Bomem (MB-Series®);
- Sistema de RMN: INOVA 500MHZ 11,4 Tesla (Varian®);
- Espectrômetro de massas: QuattroMicro com fonte de eletrospray e analisador triploquadrupolo (Waters®);
- Sistema de calorimetria exploratória diferencial: modelo 60A (Shimadzu®);
- Sistema de calorimetria exploratória diferencial: modelo DSC-50 (Shimadzu®);
- Espectrômetro UV-Visível Agilent 8453 (Agilent®);
- pHmetro (Metrohm®);
- Balança microanalítica (Sartorius®);
- Balança analítica (Mettler Toledo®);
- Pipetador automático (Handy Step®);
- Banho de ultrassom (Branson®);
- Câmara de fotoestabilidade (Ethik®);
- Estufa (Ethik Technology®);
- Centrífuga (Hermle®);
- Coluna cromatográfica Zorbax SB-phenyl 1,8µm 4,6 x 50 mm (Agilent®);
- Coluna cromatográfica Zorbax Eclipse Plus C18 RRD 1,8µm 2,1 x 50 mm (Agilent®);
- Coluna cromatográfica Zorbax XDB C18 1,8µm 2,1 x 50 mm (Agilent®);
- Coluna cromatográfica Acquilty UPLC BEH C18 1,7µm 2,1 x 50 mm (Waters®);
- Coluna cromatográfica Poroshell 120 EC C18 2,7µm 4,6 x 50 mm (Agilent®);
- Coluna cromatográfica Cortecs C18 2,7µm 4,6 x 75 mm (Waters®);
- Coluna cromatográfica Zorbax XDB C18 3,5µm 4,6 x 50 mm (Agilent®);
- Coluna cromatográfica X-Terra MS C8 5µm 4,6 x 250 mm (Waters®);
- Coluna cromatográfica Spherisorb ODS1 5µm 4,6 x 150 mm (Waters®);
- Coluna cromatográfica X-Bridge C8 5µm 4,6 x 150 mm (Waters®);
- Coluna cromatográfica Acquilty UPLC BEH C8 1,7µm 2,1 x 100 mm (Waters®);
- Coluna cromatográfica Acquilty UPLC BEH phenyl C18 1,7µm 2,1 x 100 mm (Waters®);
- Coluna cromatográfica Luna Phenyl-Hexyl 3,0 µm 4,6 x 150 mm (Phenomenex®);
- Coluna cromatográfica X-Terra C8 5µm 4,6 x 150 mm (Waters®);

- Coluna cromatográfica Zorbax XDB phenyl 5µm 4,6 x 150 mm (Agilent®).

5.2. Métodos analíticos

5.2.1. Caracterização físico-química do insumo farmacêutico ativo

O insumo farmacêutico ativo (besilato de anlodipino) foi submetido a ensaios de caracterização físico-químicas como forma de identificar e garantir a qualidade do IFA empregado nessa pesquisa. Foram realizados os ensaios espectroscopia de absorção nas regiões de infravermelho (IR), ressonância nuclear magnética de ^{1}H e ^{13}C, espectrometria de massas simples e sequencial, calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria.

5.2.1.1. Espectroscopia de absorção nas regiões de infravermelho

Realizou-se o preparo de uma pastilha de brometo de potássio contendo aproximadamente 10 mg do IFA. Tal pastilha foi colocada no suporte do equipamento e realizada a leitura na faixa de 4000 a 400 cm^{-1}.

5.2.1.2. Ressonância magnética nuclear de ^{1}H e ^{13}C

Aproximadamente 10 mg de IFA foi transferido para a sonda e solubilizada em dimetilsulfóxido deuterado. Após solubilizada, a amostra foi levada ao equipamento para aquisição dos dados.

5.2.1.3. Identificação por Espectrometria de massas simples e sequencial (MS e MS/MS)

Aproximadamente 10 mg de IFA foi solubilizada numa solução metanol: água (7:3) e inserida por infusão direta no espectrômetro no modo positivo de íons. A partir do espectro obtido foi submetido a uma nova fragmentação sequencial.

5.2.1.4. Calorimetria Exploratória Diferencial

Cerca de 2 mg de IFA foram pesadas e acondicionadas em cadinho de alumínio selado, sendo submetidas a uma atmosfera de nitrogênio com fluxo de 100 $mL.min^{-1}$ e velocidade de aquecimento de 20ºC.min^{-1} até 350ºC.

5.2.1.5. Análise termogravimétrica

Cerca de 5 mg de IFA foram acondicionadas no cadinho de alumina e submetidas a uma atmosfera de ar sintético com fluxo de 50 $mL.min^{-1}$ e velocidade de aquecimento de $20ºC.min^{-1}$.

5.2.1.6. Espectrometria de absorção na região do Ultravioleta (UV)

A identificação espectrométrica foi realizada mediante uma varredura no intervalo de comprimento de onda de 190 a 400 nm. Os espectros foram obtidos mediante os preparos de uma solução de padrão primário e IFA, pesando separadamente, em balões volumétricos de 20 mL, cerca de 2 mg de cada substância, e sendo dissolvidas com 1 mL de metanol e completando-se o volume com água ultrapurificada.

5.2.2. Desenvolvimento da metodologia indicativa de estabilidade

Para o desenvolvimento do método cromatográfico por CL-DAD-CAD foram realizadas pesquisas bibliográficas a fim de direcionar os testes realizados em bancada, pois deve se ter uma atenção especial não apenas em relação às características físico-químicas do insumo farmacêutico ativo e de suas impurezas, mas também em relação a técnica analítica que será empregada, como por exemplo, a utilização do detector corona CAD, que apresenta peculiaridades e certas restrições de tipos de solventes a serem utilizados como fase móvel.

5.2.2.1. Preparo das soluções para avaliação da fase móvel

- Ácido fórmico 0,1%: transferiu-se 1 mL de ácido fórmico grau analítico para um balão volumétrico de 1000 mL com 900 mL de água ultrapurificada. Completou-se o volume com água ultrapurificada. Filtrou-se a solução em membrana de 0,22 µm.
- Ácido fórmico 0,5%: transferiu-se 5 mL de ácido fórmico grau analítico para um balão volumétrico de 1000 mL com 900 mL de água ultrapurificada. Completou-se o volume com água ultrapurificada. Filtrou-se a solução em membrana de 0,22 µm.
- Ácido acético 0,1%: transferiu-se 1 mL de ácido acético grau analítico para um balão volumétrico de 1000 mL com 900 mL de água ultrapurificada. Completou-se o volume com água ultrapurificada. Filtrou-se a solução em membrana de 0,22 µm.
- Ácido acético 0,5%: transferiu-se 5 mL de ácido acético grau analítico para um balão volumétrico de 1000 mL com 900 mL de água ultrapurificada. Completou-se o volume com água ultrapurificada. Filtrou-se a solução em membrana de 0,22 µm.

- Ácido trifluoracético 0,1%: transferiu-se 1 mL de ácido trifluoracético grau analítico para um balão volumétrico de 1000 mL com 900 mL de água ultrapurificada. Completou-se o volume com água ultrapurificada. Filtrou-se a solução em membrana de 0,22 µm.
- Tampão acetato de amônio 10 mM: dissolveu-se 770,8 mg de acetato de amônio grau analítico num béquer de 1000 mL com 900 mL de água ultrapurificada. Acertou-se o pH para 3,0 com ácido acético. Transferiu-se essa solução para balão volumétrico de 1000 mL e completou-se o volume com água ultrapurificada. Filtrou-se a solução em membrana de 0,22 µm.
- Tampão pH 3,0: transferiu-se 7 mL de trietilamina para béquer contendo 900 mL de água ultrapurificada, acertou-se o pH para 3,0 com ácido acético. Transferiu-se essa solução para um balão volumétrico de 1000 mL e completou-se o volume com água ultrapurificada. Filtrou-se a solução em membrana de 0,22 µm.

5.2.2.2. Preparo das amostras para avaliação de seletividade

A priori foram feitas soluções estoque das impurezas e do insumo farmacêutico ativo, sendo pesados aproximadamente 2 mg de cada substância de referência para balão volumétrico de 10 mL, adicionou-se 7 mL de diluente (acetonitrila grau cromatográfico:água ultrapurificada, v/v 1:1) e levou-se ao banho de ultrassom até total solubilização. Completou-se o volume com diluente e centrifugou-se a solução à 4000 rpm por 5 minutos, com concentração final de 0,2 mg/mL.

Foram transferidos 150 µL de cada solução preparada acima para o “vial”, sendo essa solução final injetada no cromatógrafo líquido acoplado a DAD e CAD.

Diversos testes foram realizados com o objetivo de separar todas as impurezas presentes no “vial”. Após a seleção do melhor método cromatográfico, foi realizado o estudo de degradação forçada como forma de avaliar o desempenho do mesmo, e a necessidade de possíveis otimizações no método analítico final.

O estudo de degradação forçada utilizou-se o insumo farmacêutico ativo, o produto terminado e o placebo para a avaliação da seletividade. Para o preparo da matéria-prima pesou-se 13,9 mg de besilato de anlodipino matéria-prima, correspondente a 10 mg de anlodipino, para um balão volumétrico de 10 mL, e prosseguiu o preparo conforme Tabela 7.

Tabela 7. Condição de degradação para o insumo farmacêutico ativo – besilato de anlodipino.

Condiçao de degradação	Adição de 1 mL acetonitrila	Ultrassom por 5 minutos	Adição de agente degradante	Condição de incubação
Hidrólise ácida	Sim	Sim	Sim - 1 mL HCl 0,2 M	Em solução por 2h à 70ºC
Hidrólise alcalina	Sim	Sim	Sim - 1 mL NaOH 0,1 M	Em solução por 4 dias em temperatura ambiente
Oxidação por metais em transição	Sim	Sim	Sim - 1 mL $CuSO_4$ 2mM	Em solução por 5 dias à 40ºC
Oxidação por peróxido de hidrogênio	Sim	Sim	Sim - 1 mL H_2O_2 6%	Em solução por 1 dia em temperatura ambiente
Fotólise	Não	Não	Não	Em estado sólido por 5 dias na câmara de fotoestabilidade
Termólise seca	Não	Não	Não	Em estado sólido por 5 dias na estufa à 70ºC
Termólise úmida	Não	Não	Não	Em estado sólido por 10 dias na estufa à 70ºC/90%UR

Para o preparo do produto terminado, transferiu-se 2 comprimidos de 5 mg de anlodipino para balão volumétrico de 10 mL e prosseguiu o preparo conforme Tabela 7.

Tabela 8. Condições de degradação para produto terminado – besilato de anlodipino 5 mg.

Condiçao de degradação	Adição de 1 mL água purificada + 1 mL acetonitrila	Ultrassom por 5 minutos	Adição de agente degradante	Condição de incubação
Hidrólise ácida	Sim	Sim	Sim - 2 mL HCl 0,2 M	Em solução por 2h à 70ºC
Hidrólise alcalina	Sim	Sim	Sim - 2 mL NaOH 0,1 M	Em solução por 3 dias em temperatura ambiente
Oxidação por metais em transição	Sim	Sim	Sim - 2 mL $CuSO_4$ 2mM	Em solução por 5 dias à 40ºC
Oxidação por peróxido de hidrogênio	Sim	Sim	Sim - 2 mL H_2O_2 6%	Em solução por 6h em temperatura ambiente
Fotólise	Não	Não	Não	Em estado sólido por 5 dias na câmara de fotoestabilidade
Termólise seca	Não	Não	Não	Em estado sólido por 5 dias na estufa à 70ºC
Termólise úmida	Não	Não	Não	Em estado sólido por 10 dias na estufa à 70ºC/90%UR

Para o preparo do placebo, pesou-se aproximadamente 294 mg de placebo correspondente ao produto terminado, para balão volumétrico de 10 mL, e prosseguiu o mesmo preparo do produto terminado, conforme tabela 8.

As amostras incubadas na câmara de fotoestabilidade, foram expostas a 1,2 milhões de lux horas.

Após o tempo de incubação, as amostras em solução foram completadas o volume do balão volumétrico com diluente (ver preparo no item 5.2.3), obtendo uma concentração teórica de 1 mg/mL de anlodipino. Foi preparada uma amostra controle, porém sem a adição de agente estressante, para avaliar a queda de teor. Já as amostras em estado sólido, adicionou-se 5 mL do diluente, levou-se ao ultrassom por 5 minutos, e completou-se o volume do balão volumétrico com diluente.

Todas as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos.

5.2.2.3. Preparo das amostras para avaliação da linearidade

Para a avaliação da linearidade foi feita uma solução estoque, pesando-se 69,5 mg de besilato de anlodpino padrão de referência para balão volumétrico de 25 mL, e solubilizou e completou-se com diluente (ver preparo no item 5.2.3). Obtendo uma concentração teórica de 2,0 mg/mL de anlodipino (a quantificação foi realizada em anlodipino base). A partir dessa solução foram feitas as seguintes diluições, conforme Tabela 9.

Tabela 9. Linearidade para avaliação de teor de anlodipino.

Linearidade	Alíquota da solução estoque	Balão volumétrico da diluição	Concentração Final mg/mL de anlodipino	Volume de injeção
5%	0,5 mL	20 mL	0,05 mg/mL	2 µL
8%	0,8 mL	20 mL	0,08 mg/mL	2 µL
10%	1,0 mL	20 mL	0,10 mg/mL	2 µL
50%	2,5 mL	10 mL	0,50 mg/mL	2 µL
80%	4,0 mL	10 mL	0,80 mg/mL	2 µL
100%	5,0 mL	10 mL	1,0 mg/mL	2 µL
120%	6,0 mL	10 mL	1,20 mg/mL	2 µL

A partir da solução estoque 2,0 mg/mL de anlodipino, fez-se uma diluição de 2 mL dessa solução para balão volumétrico de 200 mL e completou-se com diluente, obtendo uma concentração final de 0,01 mg/ mL. A partir dessa solução, foram realizadas outras diluições para avaliar a linearidade da concentração dos produtos de degradação do limite de notificação (0,1% da concentração do IFA na amostra que é 1,0 mg/mL) ao limite de qualificação (0,2% da concentração do IFA na amostra que é 1,0 mg/mL), ou seja de 0,001 mg/ mL a 0,002 mg/mL, conforme Tabela 10.

Realizou-se também a linearidade da impureza D (Composto relacionado A), pesando-se 5 mg da impureza para balão de 5 mL, solubilizou e completou-se com diluente. Após fez-se

uma diluição de 2 mL dessa solução para balão volumétrico de 200 mL, obtendo uma concentração final de 0,01 mg/mL, e realizou-se as diluições conforme Tabela 10.

Tabela 10. Linearidade para avaliação da concentração as impurezas no limite de notificação ao limite de qualificação.

Linearidade	Alíquota da solução 0,01 mg/mL para balão volumétrico de 10 mL	Concentração Final mg/mL de anlodipino	Volume de injeção
0,08%	0,8 mL	0,0008 mg/mL	2 µL
0,1%	1,0 mL	0,001 mg/mL	2 µL
0,12%	1,2 mL	0,0012 mg/mL	2 µL
0,14%	1,4 mL	0,0014 mg/mL	2 µL
0,16%	1,6 mL	0,0016 mg/mL	2 µL
0,18%	1,8 mL	0,0018 mg/mL	2 µL
0,20%	2,0 mL	0,0020 mg/mL	2 µL
0,22%	2,2 mL	0,0022 mg/mL	2 µL
0,24%	2,4 mL	0,0024 mg/mL	2 µL

Todas as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos.

5.2.2.4. Preparo das amostras para avaliação da exatidão

Foi realizada a exatidão em 80%, 100% e 120% nas concentrações alvo de trabalho, para o nível das impurezas, a 0,001 mg/mL e 0,002mg/mL, e para o nível do teor, a 1,0 mg/mL de anlodipino.

Preparo das amostras de exatidão, nível teor:

- Fez-se uma solução estoque (SE) de besilato de anlodipino, na qual pesou-se aproximadamente 69,5 mg de besilato de anlodipino matéria-prima e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL, adicionou-se 5 mL de diluente, levou-se ao ultrassom até total solubilização e completou-se com diluente. Realizou-se esse preparo em triplicata, SE1, SE2 e SE3.
- Nível 80%, com concentração teórica de 0,8 mg/mL: pesou-se 294 mg de placebo referente ao produto terminado para balão volumétrico de 10 mL, adicionou-se 1,6 mL da SE1. Realizou-se esse procedimento em triplicata.
- Nível 100%, com concentração teórica de 1,0 mg/mL: pesou-se 294 mg de placebo referente ao produto terminado para balão volumétrico de 10 mL, adicionou-se 2,0 mL da SE2. Realizou-se esse procedimento em triplicata.
- Nível 120%, com concentração teórica de 1,2 mg/mL: pesou-se 294 mg de placebo referente ao produto terminado para balão volumétrico de 10 mL, adicionou-se 2,4 mL da SE3. Realizou-se esse procedimento em triplicata.

Preparo das amostras de exatidão, nível impurezas a 0,001 mg/mL:

- Nível 80%, com concentração teórica de 0,0008 mg/mL: aliquotou-se 1 mL da solução nível 80% nível teor, para balão volumétrico de 100 mL, completou-se com diluente. Dessa solução diluiu-se 1 mL para balão volumétrico de 10 mL, e completou-se com diluente. Realizou-se esse procedimento em triplicata.
- Nível 100%, com concentração teórica de 0,001 mg/mL: aliquotou-se 1 mL da solução nível 100% nível teor, para balão volumétrico de 100 mL, completou-se com diluente. Dessa solução diluiu-se 1 mL para balão volumétrico de 10 mL, e completou-se com diluente. Realizou-se esse procedimento em triplicata.
- Nível 120%, com concentração teórica de 0,0012 mg/mL: aliquotou-se 1 mL da solução nível 120% nível teor, para balão volumétrico de 100 mL, completou-se com diluente. Dessa solução diluiu-se 1 mL para balão volumétrico de 10 mL, e completou-se com diluente. Realizou-se esse procedimento em triplicata.

Preparo das amostras de exatidão, nível impurezas a 0,002 mg/mL:

- Nível 80%, com concentração teórica de 0,0016 mg/mL: aliquotou-se 2 mL da solução nível 80% nível teor, para balão volumétrico de 100 mL, completou-se com diluente. Dessa solução diluiu-se 1 mL para balão volumétrico de 10 mL, e completou-se com diluente. Realizou-se esse procedimento em triplicata.
- Nível 100%, com concentração teórica de 0,002 mg/mL: aliquotou-se 2 mL da solução nível 100% nível teor, para balão volumétrico de 100 mL, completou-se com diluente. Dessa solução diluiu-se 1 mL para balão volumétrico de 10 mL, e completou-se com diluente. Realizou-se esse procedimento em triplicata.
- Nível 120%, com concentração teórica de 0,0024 mg/mL: aliquotou-se 2 mL da solução nível 120% nível teor, para balão volumétrico de 100 mL, completou-se com diluente. Dessa solução diluiu-se 1 mL para balão volumétrico de 10 mL, e completou-se com diluente. Realizou-se esse procedimento em triplicata.

Todas as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos.

5.2.2.5. Preparo das amostras para avaliação da precisão

Tal como a exatidão, preparou-se a precisão no nível das impurezas a 0,001 mg/mL e 0,002 mg/mL e, no nível teor a 1,0 mg/mL.

Preparo das amostras de precisão nível teor: transferiu-se 2 comprimidos de besilato de anlodipino 5 mg para balão volumétrico de 10 mL, adicionou-se 1 mL de água purificada, agitou-se até total desintegração, adicionou-se 5 mL de diluente, levou-se ao ultrassom por 5 minutos. Completou-se o volume com diluente. Realizou-se esse procedimento seis vezes.

Preparo das amostras de precisão nível impurezas a 0,001 mg/mL: diluiu-se 1 mL da amostra nível teor para balão volumétrico de 100 mL, completou-se com diluente. Dessa solução diluiu-se 1 mL para balão volumétrico de 10 mL e completou-se com diluente. Realizou-se esse procedimento para as seis amostras de precisão nível teor.

Preparo das amostras de precisão nível impurezas a 0,002 mg/mL: diluiu-se 2 mL da amostra nível teor para balão volumétrico de 100 mL, completou-se com diluente. Dessa solução diluiu-se 1 mL para balão volumétrico de 10 mL e completou-se com diluente. Realizou-se esse procedimento para as seis amostras de precisão nível teor.

Todas as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos. A precisão intermediária foi realizada após 48h em relação a primeira.

5.2.2.6. Preparo das amostras para avaliação da robustez

Realizou-se o teste de robustez, a partir de uma replicata da amostra de precisão, nível teor e nível impurezas, e um preparo de padrão à 0,002 mg/mL e 1,0 mg/mL de anlodipino.

Preparo do padrão, com concentração 1,0 mg/mL: pesou-se 13,9 mg de besilato de anlodipino matéria-prima para balão volumétrico de 10 mL, adicionou-se 5 mL de diluente, e deixou-se no ultrassom até total solubilização. Completou-se com diluente.

Preparo do padrão, com concentração 0,002 mg/mL: aliquotou-se 2 mL da solução preparada acima, de concentração 1,0 mg/mL, para balão volumétrico de 100 mL e completou-se com diluente. Dessa solução diluiu-se 1 mL para balão volumétrico de 10 mL e completou-se com diluente.

Todas as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos.

5.2.3. Condições cromatográficas finais

- Fase móvel A (tampão pH3,0): transferiu-se 7 mL de trietilamina para béquer contendo 900 mL de água ultrapurificada, acertou-se o pH para 3,0 com ácido acético. Transferiu-se essa solução para um balão volumétrico de 1000 mL e completou-se o volume com água ultrapurificada. Filtrou-se a solução em membrana de 0,22 µm.
- Fase móvel B: Metanol grau cromatográfico.
- Fase móvel C: Acetonitrila grau cromatográfico.

Tabela 11. Gradiente de fase móvel.

Tempo em minutos	Fase móvel A	Fase móvel B	Fase móvel C	Vazão em mL/minuto
0	75	15	10	1,0
10	20	60	20	1,0
10,1	20	60	20	0,5
13	75	15	10	0,5
13,1	75	15	10	1,0
15	75	15	10	1,0

Diluente: misturar 750 mL de tampão pH 3,0, com 150 mL de metanol grau cromatográfico e 100 mL de acetonitrila grau cromatográfico.

Coluna cromatográfica: Zorbax SB-phenyl 1,8µm 4,6 x 50 mm
Fluxo conforme Tabela 11.
Fase móvel: gradiente entre as fases móveis A, B e C conforme Tabela 11.
Temperatura da coluna: 20ºC
Temperatura do amostrador: 25ºC
Volume de injeção: 2 µL
Detector UV/Vis: 238 nm
Detector corona CAD: com temperatura de 35ºC, pressão de nitrogênio 35 psi, filtro 7 e ganho de 100 pA.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1.1. Caracterização físico-química do insumo farmacêutico ativo

6.1.1.1. Espectroscopia de absorção nas regiões de infravermelho

Na Figura 17 tem-se o espectro do IFA obtido na análise de IR com transformada de Fourier sendo comparado com o padrão primário da Farmacopeia Americana, lote H0I102 com validade vigente. Apresentando uma correlação de similaridade de 97,85%.

Pode-se identificar os principais grupos funcionais presentes na molécula, pois quando essa é exposta a uma radiação eletromagnética de comprimento de onda, na região do infravermelho, proporciona transições rotacionais e vibracionais (LEITE, 2014). A frequência obtida de 3100 a 2900 cm^{-1} é característica de vibrações de estiramento nos átomos de hidrogênios ligados a carbono (C-H) de aromáticos. Já nas frequências de 1700 e 1600 cm^{-1} são referentes às vibrações de deformação axial nos átomos de hidrogênio ligado a nitrogênio (N-H). Na frequência de 1300 cm^{-1} tem-se a deformação axial nos átomos de hidrogênio ligado a oxigênio (O-H). E na frequência de 750 cm^{-1} tem-se as vibrações de deformação axial nos átomos de cloro ligado a carbono (C-Cl) (LABMASS, 2015).

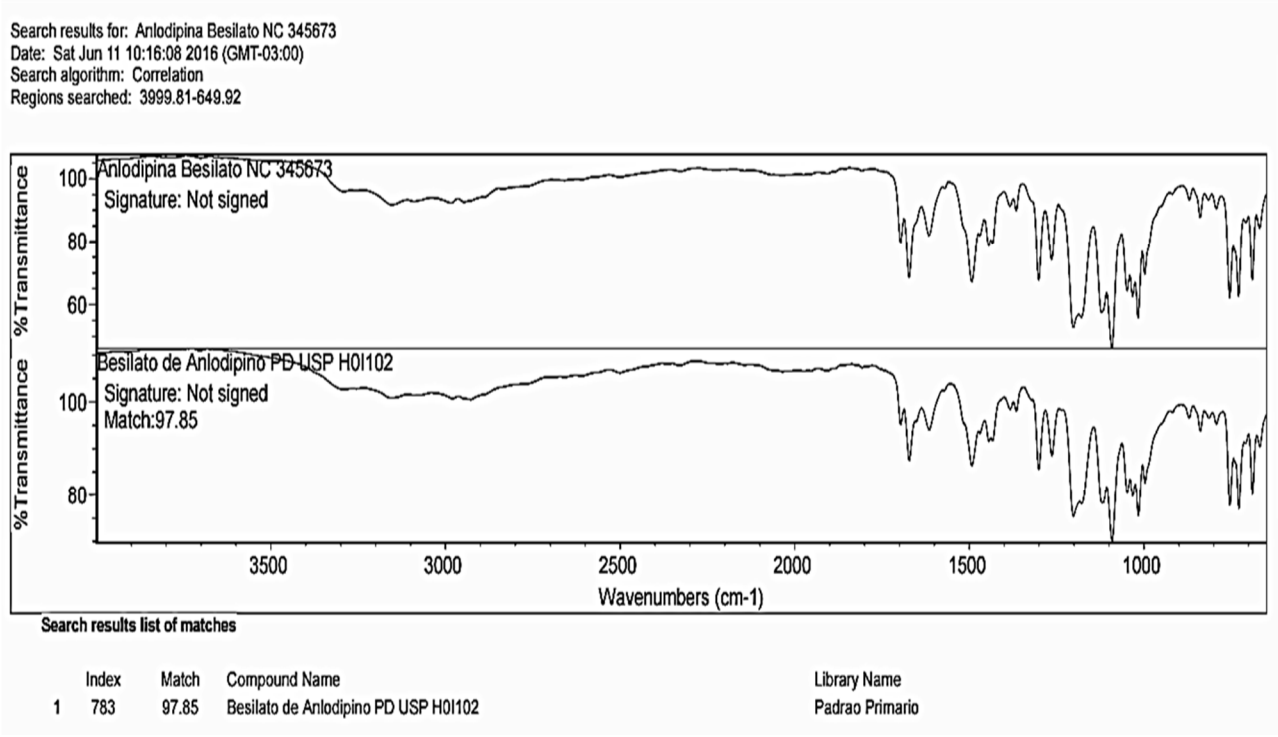

Figura 17. Espectro de absorção de besilato de anlodipino na região do infravermelho (IR)

6.1.1.2. Ressonância magnética nuclear de ^{1}H e ^{13}C

Na Figura 18 tem-se o espectro dos deslocamentos químicos de ^{1}H, que são detalhadas na Tabela 12 fazendo a correspondência entre o número de hidrogênios e a posição deles na molécula do IFA, conforme Figura 19.

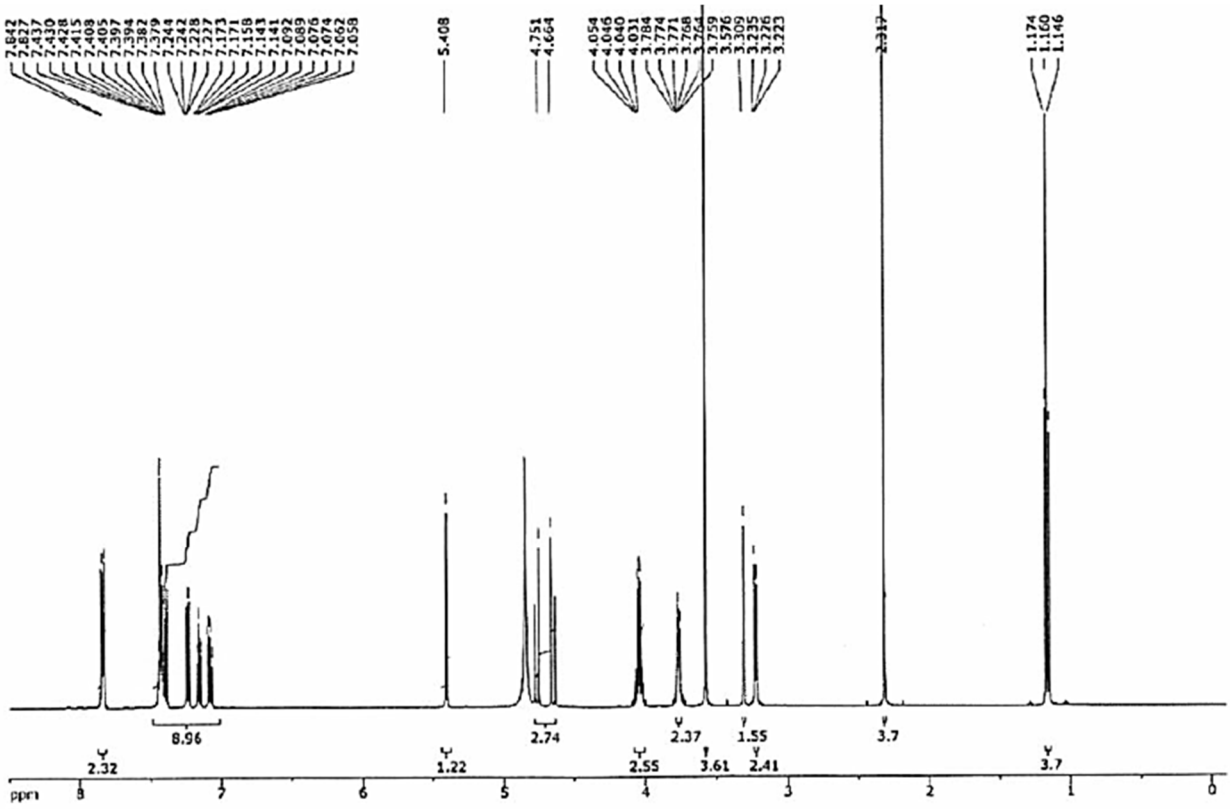

Figura 18. Espectro de RMN ^{1}H do besilato de anlodipino

Tabela 12. Deslocamento do RMN ^{1}H do besilato de anlodipino.

Deslocamento (ppm)	Posição	Número de hidrogênios
1,15 – 1,17	27	3
2,32	18	3
3,22 – 3,24	21	2
3,31	26	2
3,58 – 3,78	17	3
4,03 – 4,05	22	2
4,66 – 4,75	19	2
5,41	7	1
7,01 – 7,84	1, 2, 3, 4, 5, 6	9

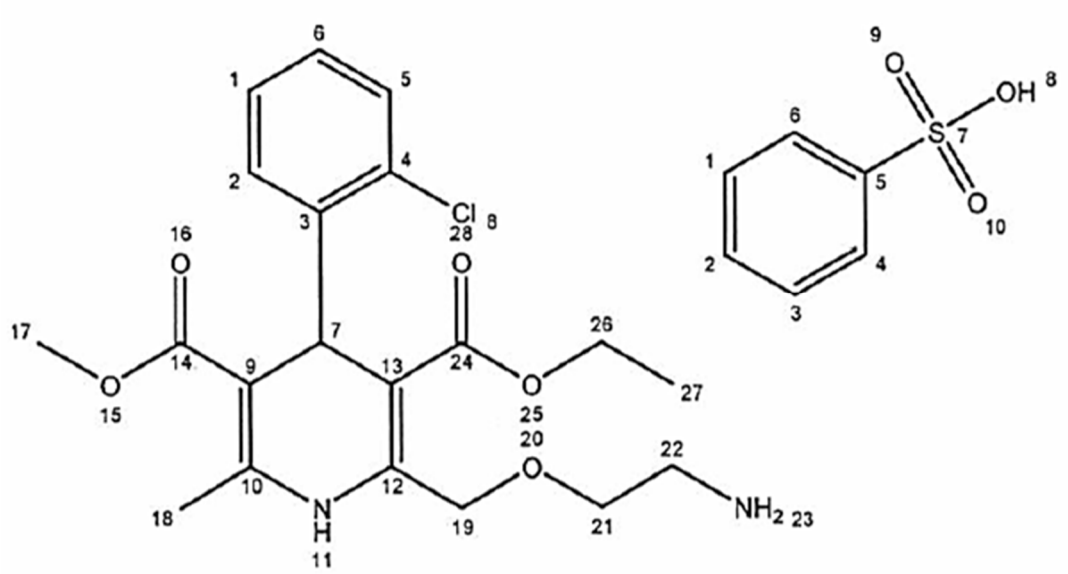

Figura 19. Estrutura molecular do besilato de anlodipino referente ao espectro de RMN ^{1}H
Fonte: LABMASS, 2015.

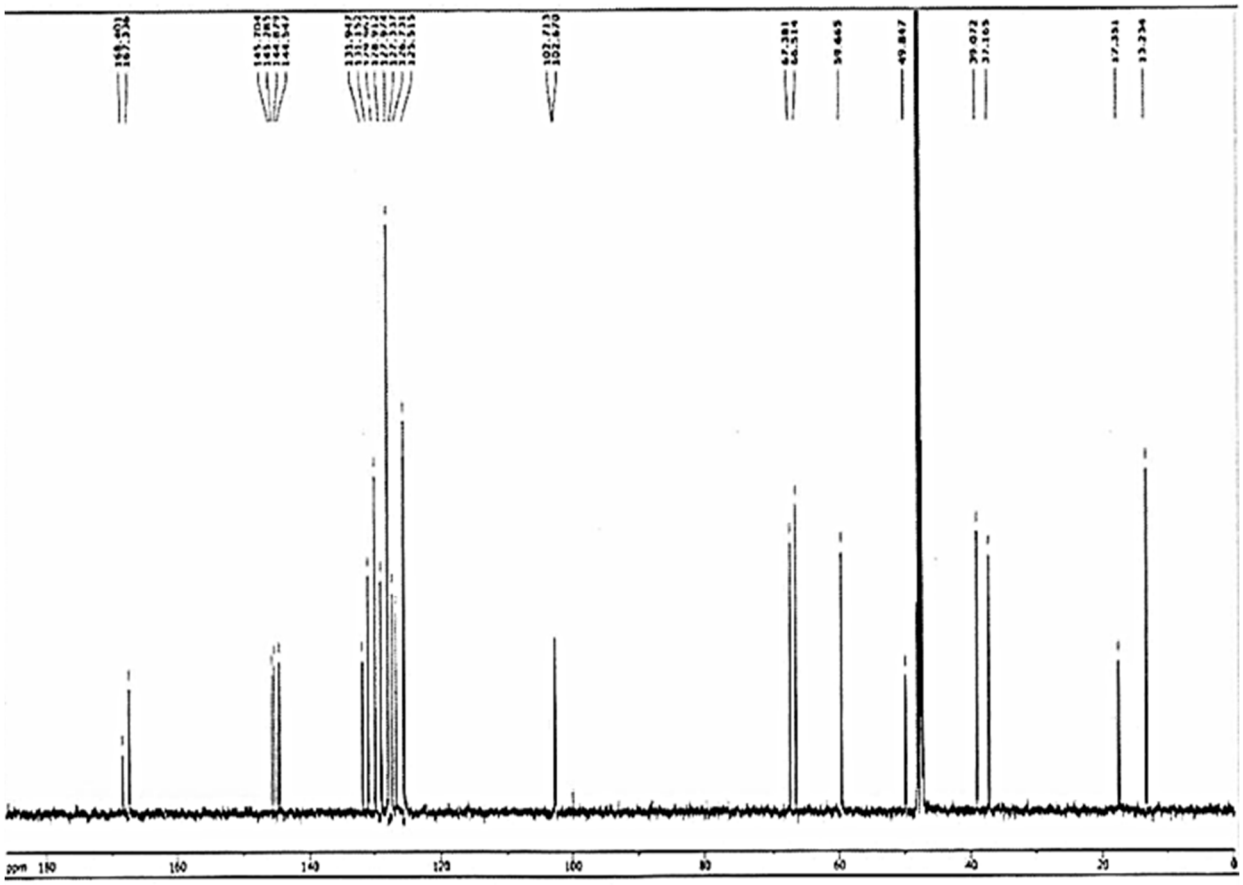

Figura 20. Espectro de RMN ^{13}C do besilato de anlodipino

Na Figura 20 tem-se o espectro dos deslocamentos químicos de ^{13}C, que são detalhadas na Tabela 13 fazendo a correspondência entre o número de carbonos e a posição deles na molécula do IFA, conforme Figura 21.

Tabela 13. Deslocamentos do RMN de ^{13}C.

Deslocamento (ppm)	Posição	Número de carbonos
13,2	27	1
17,3	18	1
37,1	7	1
39,0	22	1
49,8	17	1
59,7	26	1
66,5	19	1
67,4	21	1
102,6 a 102,7	9 e 13	2
125,5 a 131,9	1, 2, 4, 5, 6, 29, 30, 31, 32, 34	10
144,5 a 145,7	3, 10, 12, 33	4
167,3	14	1
168,4	24	1

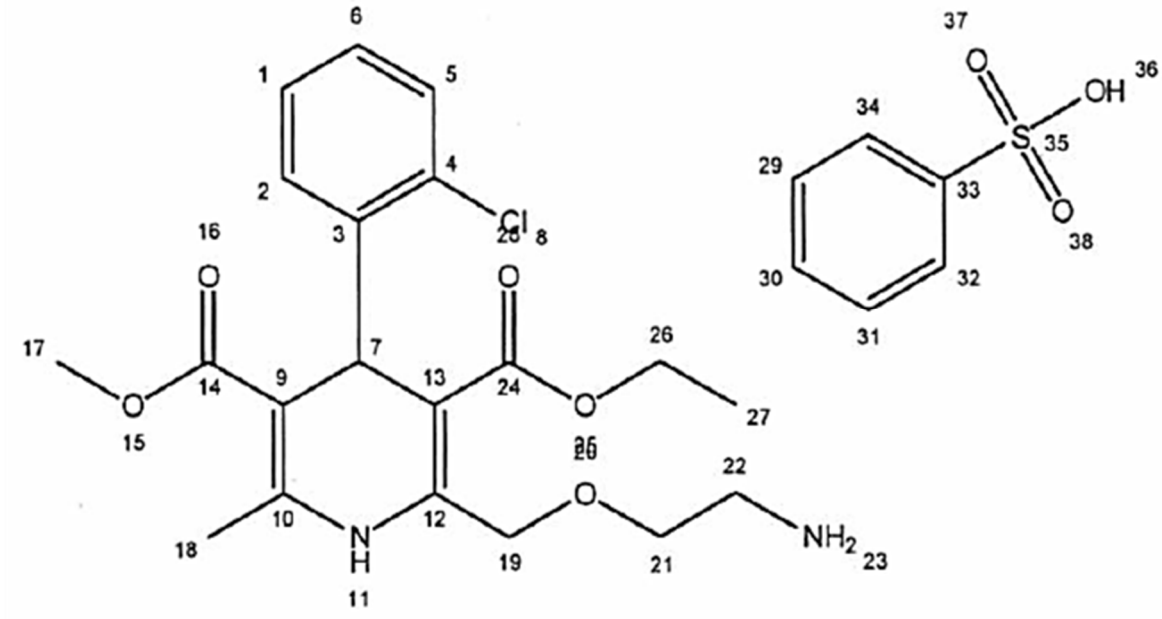

Figura 21. Estrutura molecular do besilato de anlodipino referente ao espectro de RMN ^{13}C
Fonte: LABMASS, 2015.

Os resultados obtidos nos ensaios de RMN concordam com a estrutura proposta para a molécula de besilato de anlodipino, de acordo com a interpretação de Szabó et al. (2009).

6.1.1.3. Identificação por Espectrometria de massas simples e sequencial (MS e MS/MS)

De acordo com a Figura 22, tem-se o espectro A de fragmentação ESI(+) MS apresenta o íon m/z 409 que confere com a massa teórica do besilato de anlodipino protonado. Já no espectro B tem-se a fragmentação ESI(+)MS/MS com a presença do íon m/z 409 correspondente ao besilato de anlodipino e os íons m/z 294 e 238, sendo referente a fragmentação característica da molécula, como mostra a Figura 23.

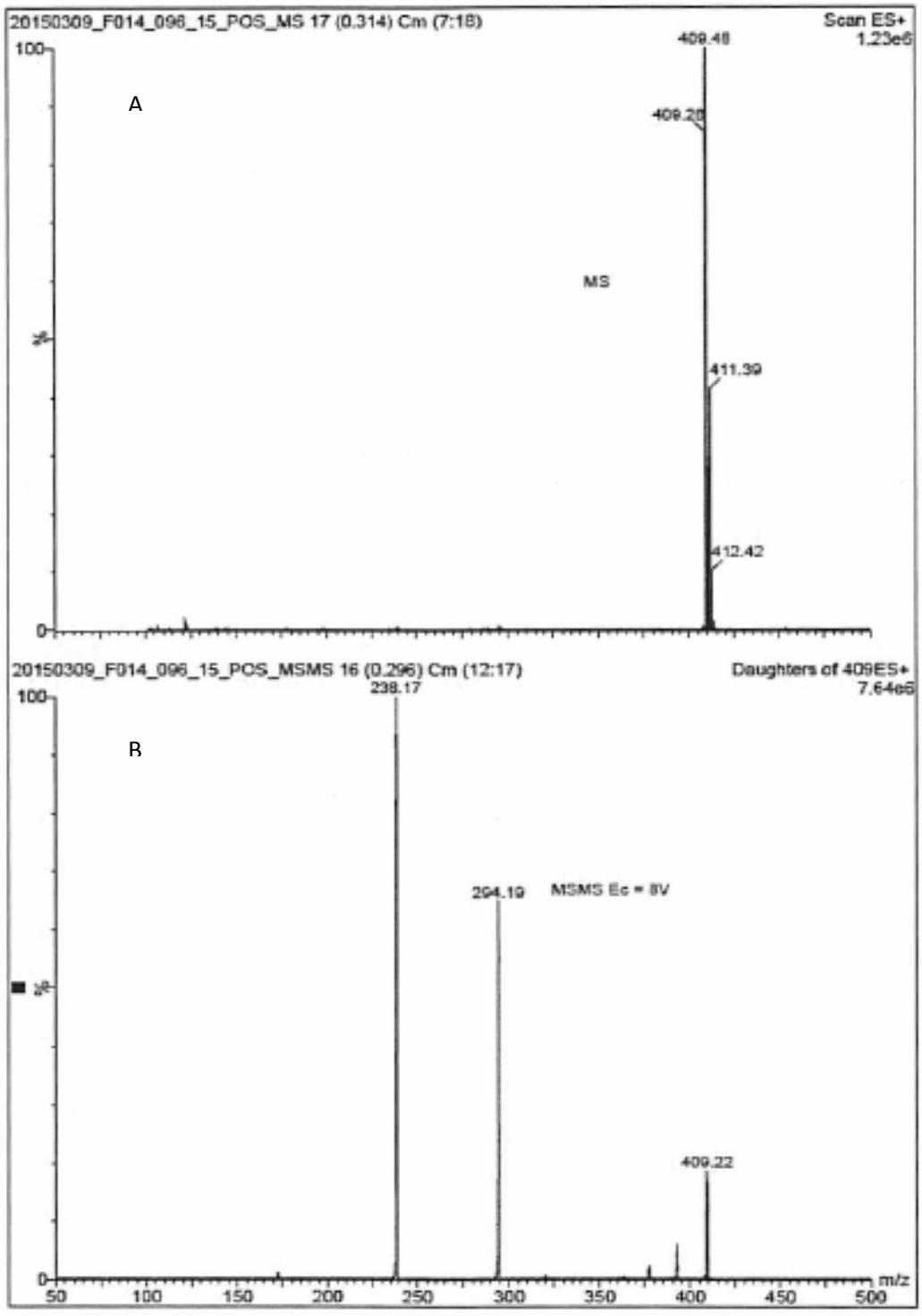

Figura 22. A) Espectro de massas ESI (+) MS da solução de besilado de anlodipino na faixa de m/z 50 - 500 e B) ESI(+) MS/MS do íon de m/z 409 correspondente ao besilato de anlodipino protonado $[M+H]^+$

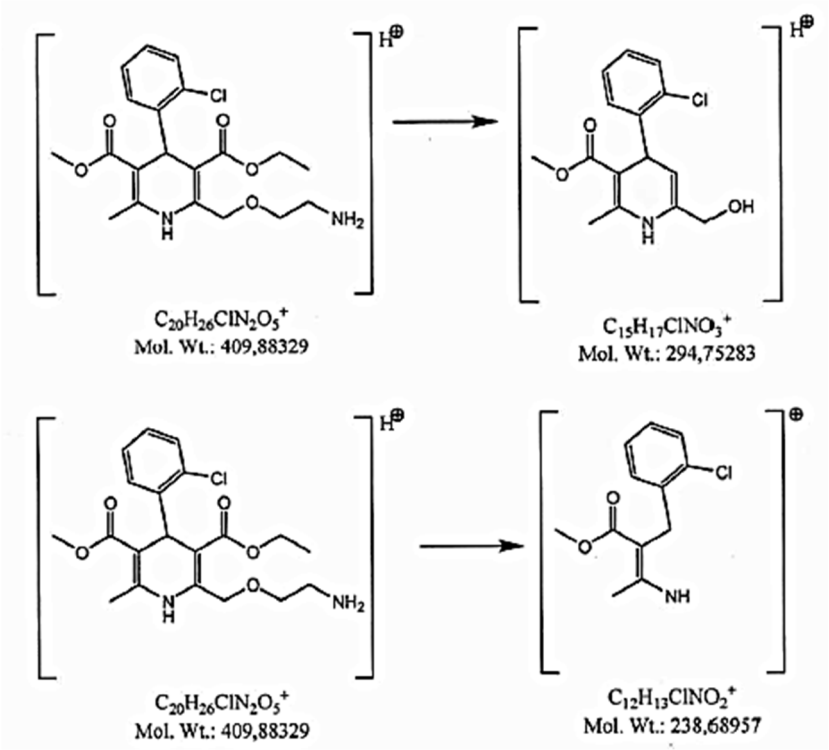

Figura 23. Mecanismo de fragmentação proposto para a estrutura do besilato de anlodipino
Fonte: LABMASS, 2015.

6.1.1.4. Calorimetria Exploratória Diferencial

De acordo com o Giorgetti, 2012 o besilato de anlodipino apresenta uma faixa de fusão de 195 a 204ºC. Na Figura 24 o termograma do DSC para IFA, apresenta um pico em aproximadamente 207,82ºC referente a um evento endotérmico relacionado a fusão do IFA, o que corrobora na identificação do besilato de anlodipino.

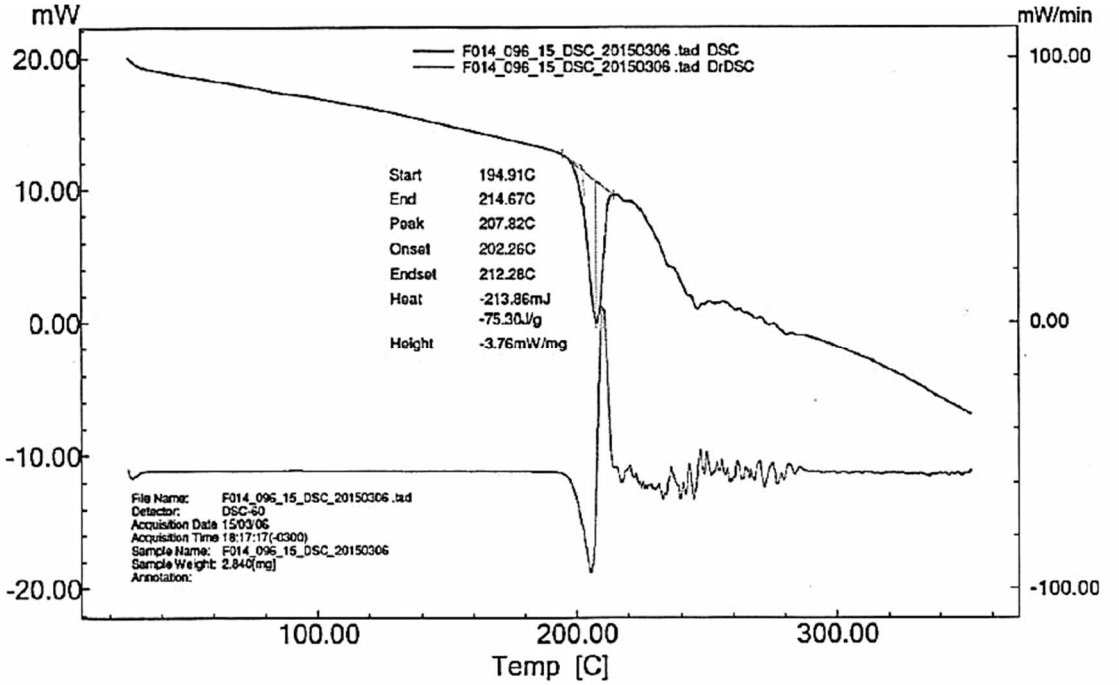

Figura 24. Curva DSC do besilato de anlodipino obtida em atmosfera inerte de nitrogênio (100 mL/min) e velocidade de 20ºC/min

6.1.1.5. Análise termogravimetrica

Na curva TG apresentada na Figura 25, observa-se no início da curva de TGA a perda de água e solvente voláteis, correspondente à 0,204%. Em torno de 200ºC se inicia a degradação do IFA em duas etapas. Ao final do processo foi observado a formação de 0,969% de impurezas inorgânicas.

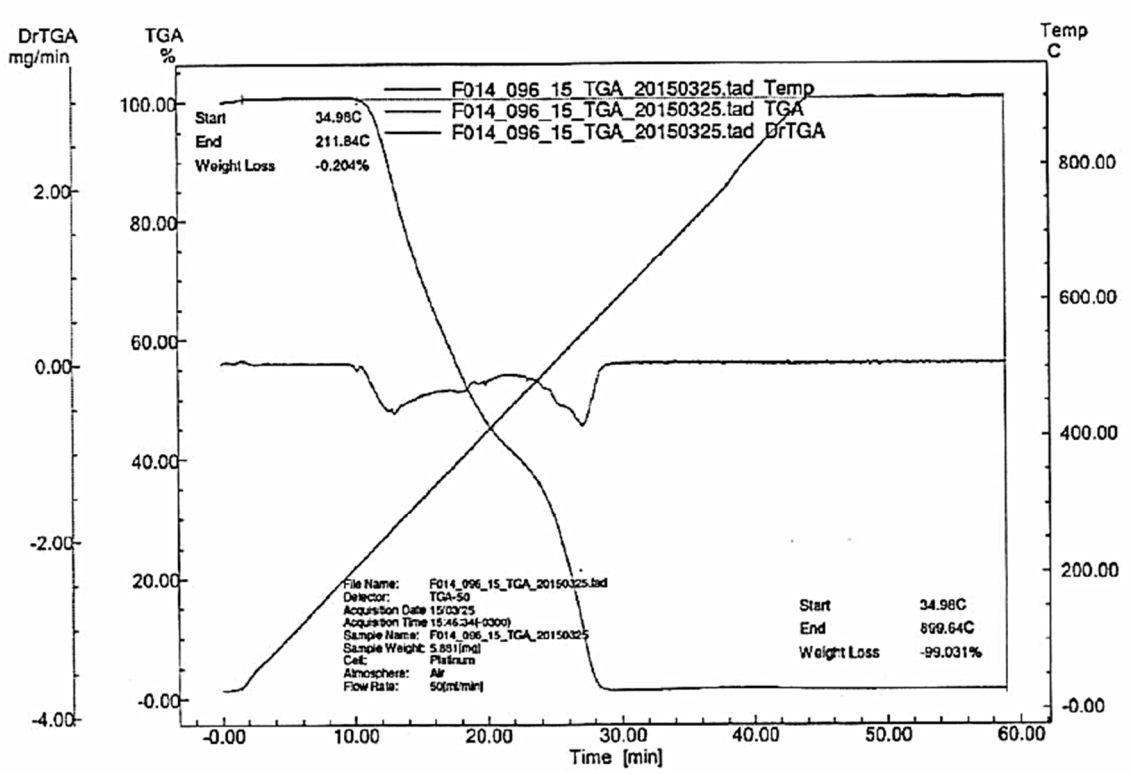

Figura 25. Curva de TGA para besilato de anlodipino.

6.1.1.6. Espectrometria de absorção na região do Ultravioleta (UV)

Nas Figuras 26 e 27 têm-se os espectros de absorção UV para anlodipino obtido para o padrão e IFA, respectivamente. Ambos são semelhantes, o que caracteriza a mesma substância.

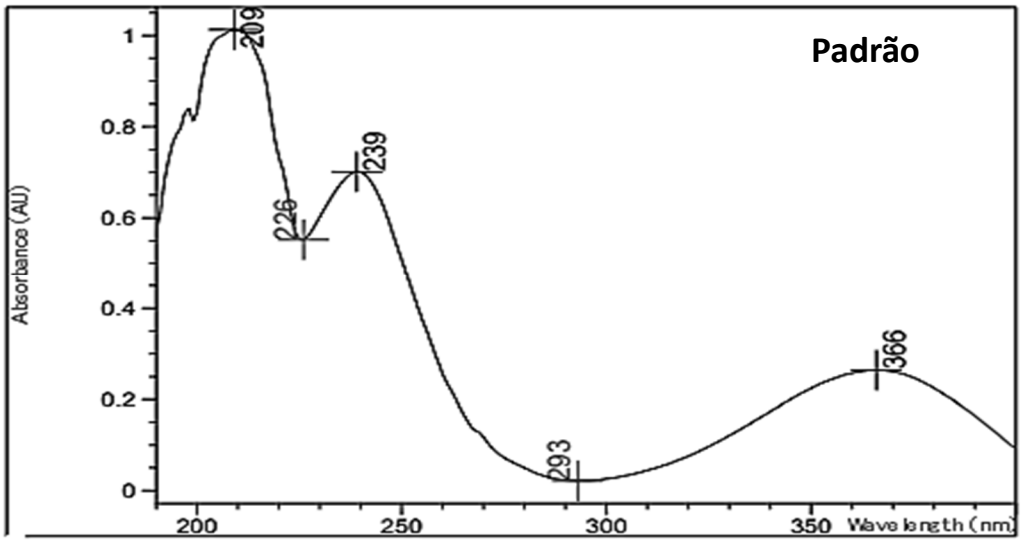

Figura 26. Espectro de absorção no UV da solução padrão de besilato de anlodipino. Concentração 0,1 mg/mL.

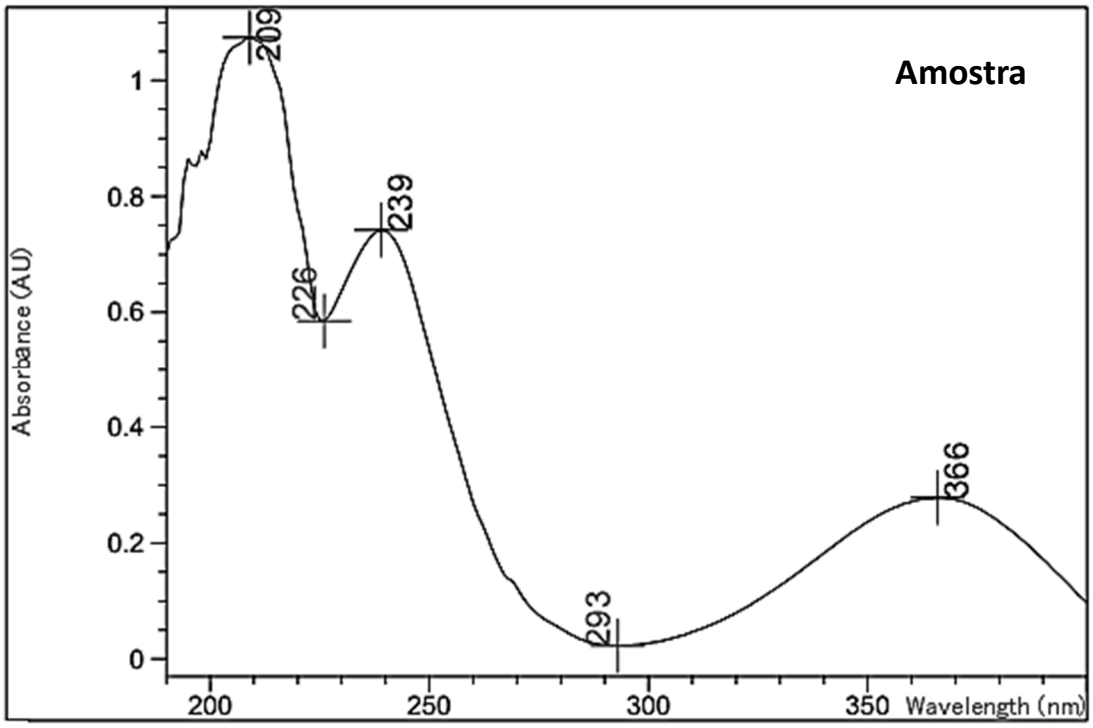

Figura 27. Espectro de absorção no UV da solução amostra IFA de besilato de anlodipino. Concentração de 0,1 mg/mL.

6.1.2. Desenvolvimento da metodologia indicativa de estabilidade

De acordo com a literatura, o besilato de anlodipino é um fármaco básico, com pKa de 9,4, sendo ionizado em pHs ácidos, além de ser uma molécula hidrofílica em todo o pH fisiológico. Porém, o uso de tampões com pH ácidos na fase móvel, é recomendado para a CL para evitar a ionização dos grupos silánois da coluna, suprimindo assim, as interações hidrofílicas e iônicas e, consecutivamente diminuindo as interações secundárias que podem ocorrer entre esses grupos e os compostos de interesse (SANTOS NETO, 2010; BORGES; GORAIEB; COLLINS, 2012).

Como o detector CAD não é compatível com alguns tipos de reagentes e sais, foram feitos diversos testes com vários tipos de tampões voláteis, como ácido fórmico 0,1% e 0,5%, ácido trifluoracético 0,1%, acetato de amônio 10 mM e ácido acético a 0,1% e 0,5%, porém obteve-se melhor resposta com o tampão pH3,0, devido um menor ruído na linha de base tanto no CAD como no DAD, e menor efeito de assimetria de pico. Uma vez que a trietilamina atua nos grupos silanóis da coluna, evitando as interações secundárias que acabam proporcionando picos assimétricos, principalmente para moléculas básicas.

Por meio da revisão bibliográfica, observa-se que a maioria das pesquisas foram realizadas numa coluna cromatográfica octadecil sob diferentes proporções de fases móveis, com a utilização dos modificadores orgânicos acetonitrila e metanol, e diversos tipos de soluções tampão.

As colunas C18 foram primariamente escolhidas, mas também se testou C8, fenil e fenil-hexil. Como o objetivo dessa pesquisa também é desenvolver um método simples e

rápido, teve-se uma preleção por testar colunas com diâmetro, comprimento e tamanho de partículas pequenos, para obtermos resultados mais rápidos, aumentar o poder de separação e diminuir o tempo de corrida. Dentre as diversos tipos de fase estacionárias testadas, a que apresentou melhor resolução entre a mistura de impurezas e IFA foi a Zorbax SB-phenyl (Agilent®).

Para a escolha da fase móvel, a priori foram realizados os testes com diversas proporções de soluções tampão e modificador orgânico metanol, devido a maior solubilidade do besilato de anlodipino nesse último, porém observou-se que sob condições de gradiente de fase móvel a separação da mistura de impurezas mais IFA era satisfatória, e com uma pequena adição da acetonitrila no gradiente, as respostas das impurezas melhoraram, bem como diminuiu o tempo de corrida.

A seletividade do método foi avaliada por meio do estudo de perfil de degradação forçada, conforme previsto na RDC 53/2015, nas amostras de produto terminado, IFA e placebo, sob as condições alcalinas, ácidas, oxidativas por peróxido de hidrogênio e íons metálicos, termólise, umidade e fotólise. Com isso, mostrou-se que o método é seletivo, pois apresentou valores de purezas de pico com match superior a 990 para as impurezas e IFA. Portanto, o gradiente final pode ser observado no item 5.2.3. e a seletividade do método nas Figuras de 28 a 65.

Conforme literatura, o comprimento de escolha normalmente utilizado para a detecção é 238 nm, e isso se confirmou nos testes empíricos dessa pesquisa para as análises em UV, devido a melhor absorbância.

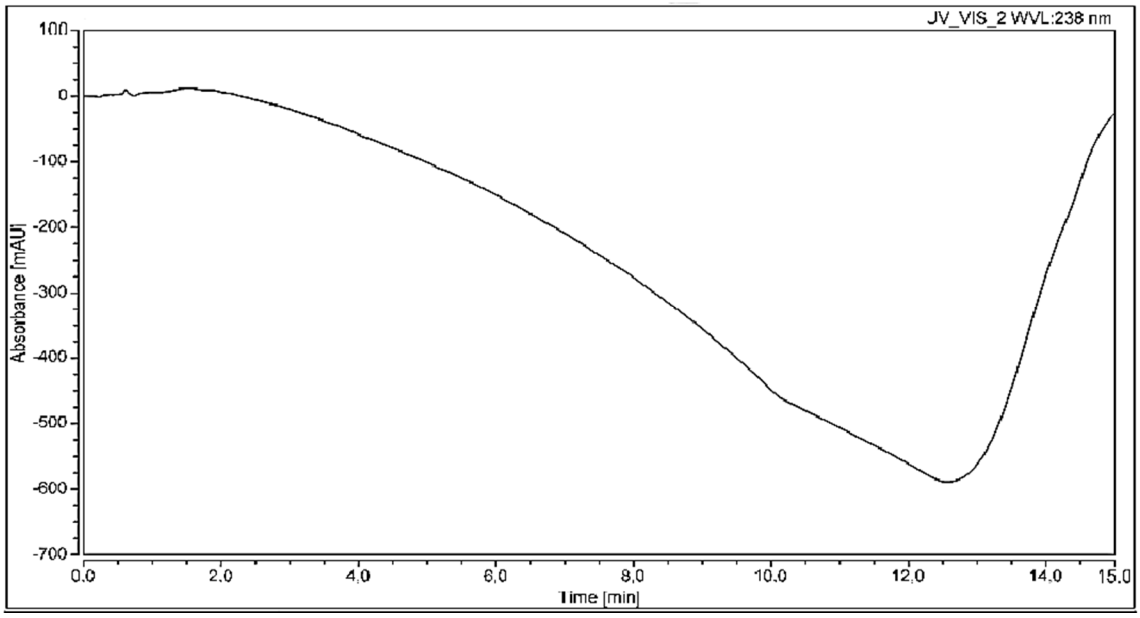

Figura 28. Cromatograma da fase móvel. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2µL e temperatura do forno 20ºC.

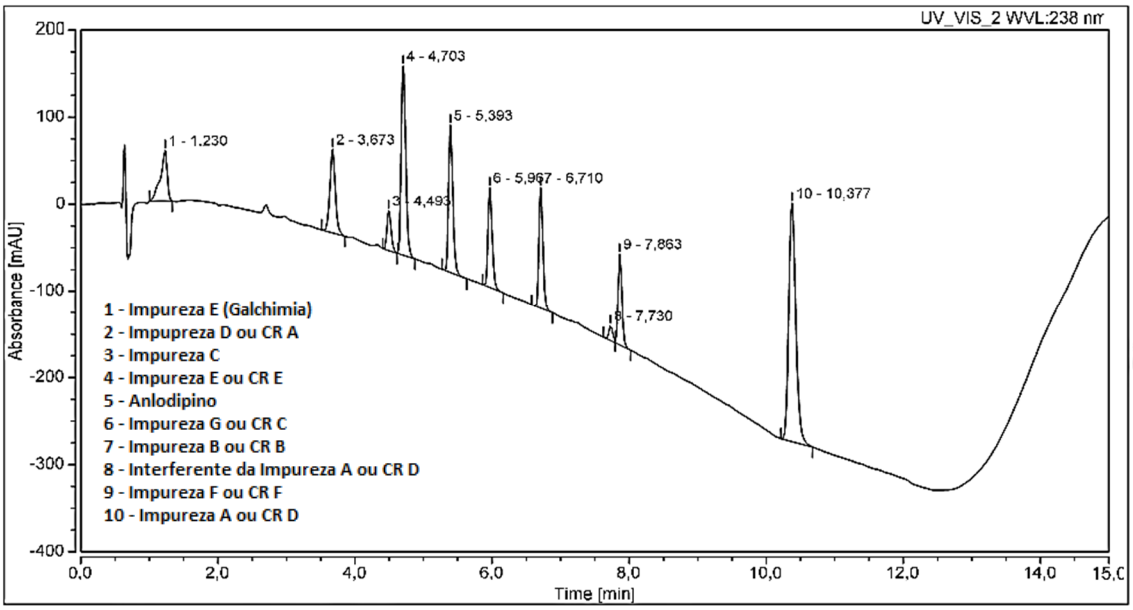

Figura 29. Cromatograma referente a mistura de impurezas + IFA. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

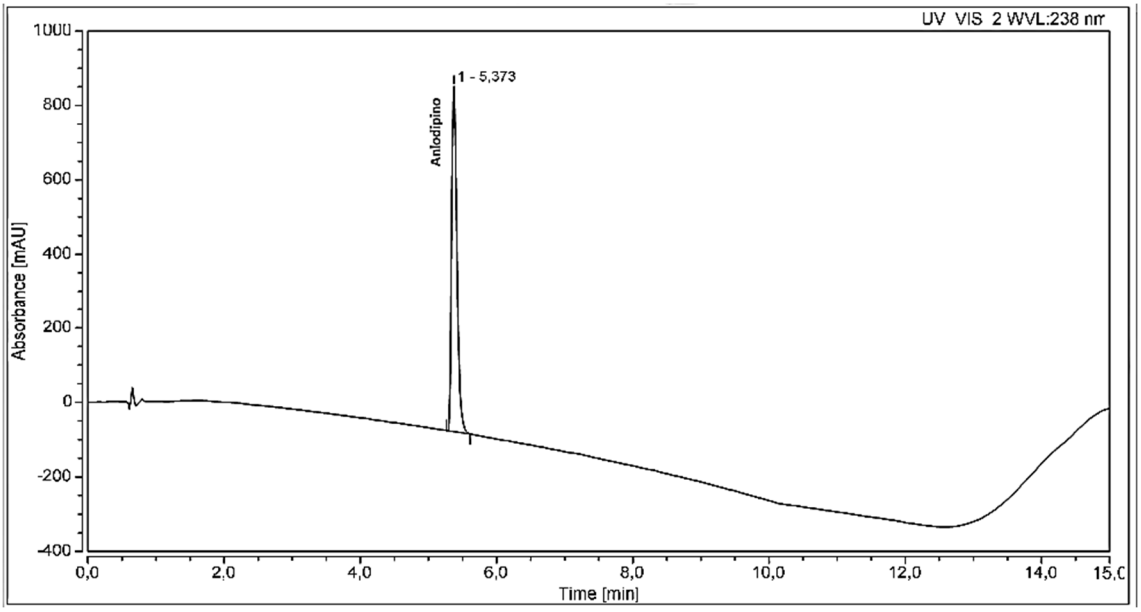

Figura 30. Cromatograma referente ao IFA sob condição inicial – sem agentes estressantes. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

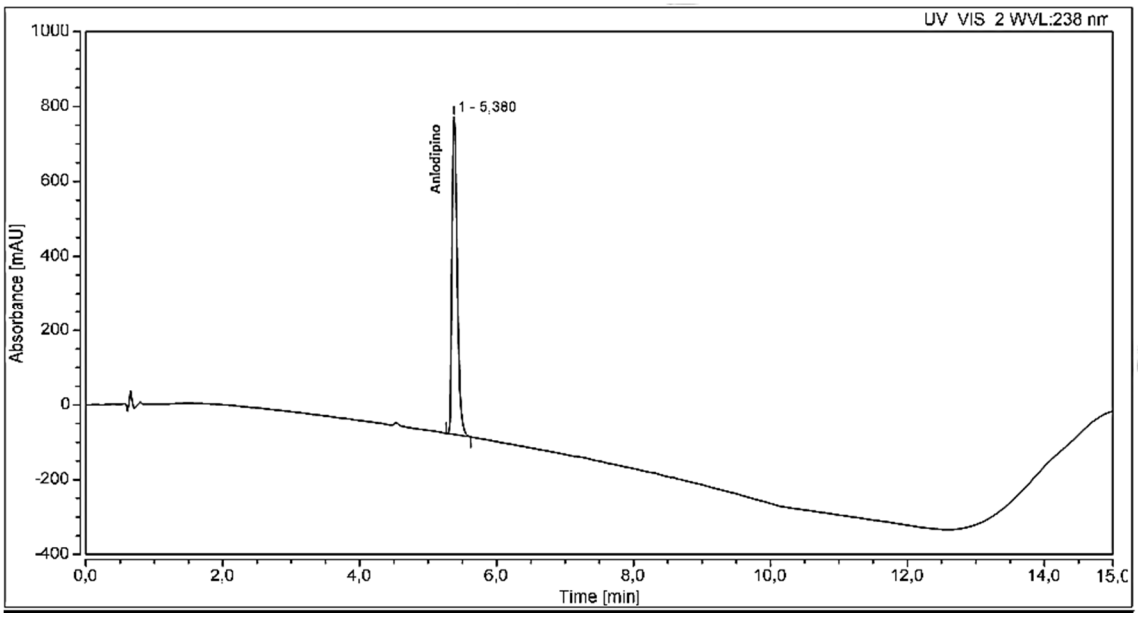

Figura 31. Cromatograma referente ao produto terminado sob condição inicial – sem agentes estressantes. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

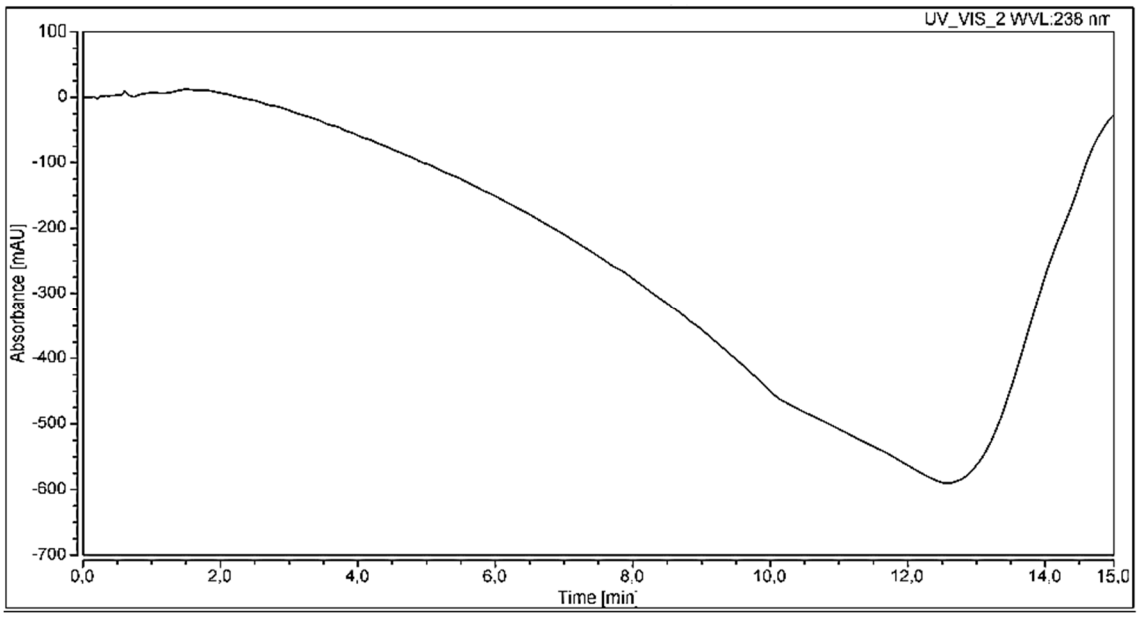

Figura 32. Cromatograma referente ao placebo sob condição inicial – sem agentes estressantes. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min

13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

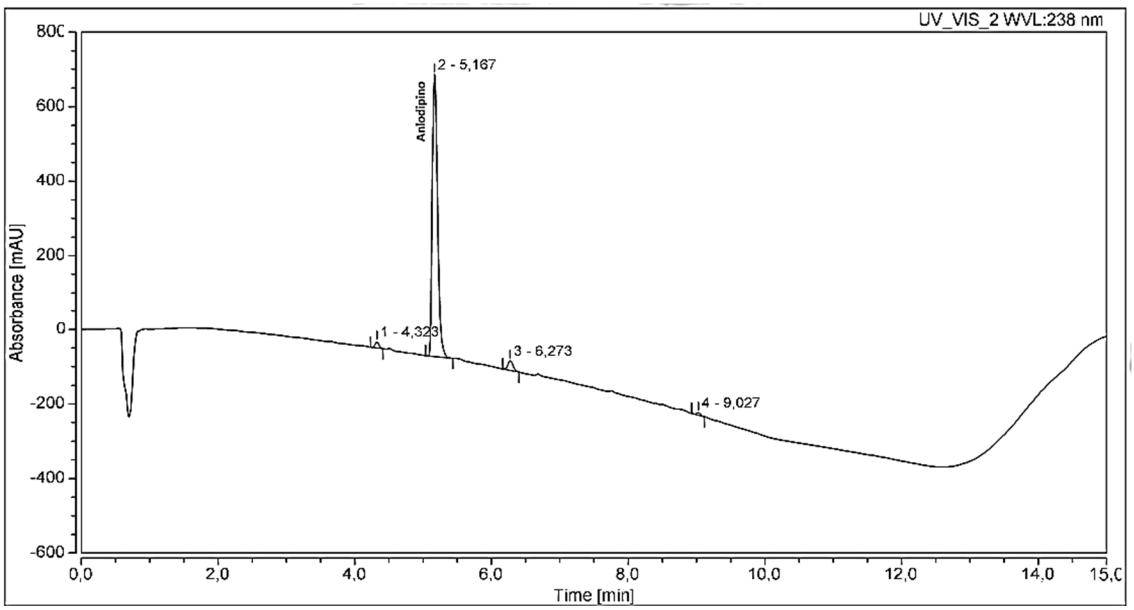

Figura 33. Cromatograma referente ao IFA sob condições de degradação ácida (HCl 0,1M por 2 horas a 70ºC). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

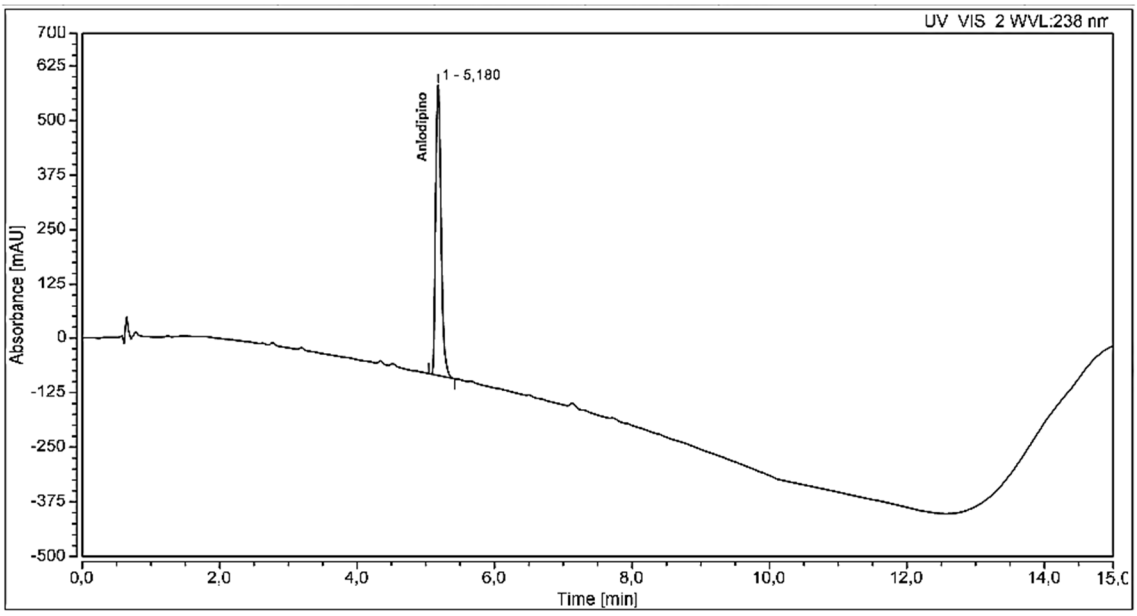

Figura 34. Cromatograma referente ao produto terminado sob condições de degradação ácida (HCl 0,1M por 2 horas a 70ºC). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de

0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

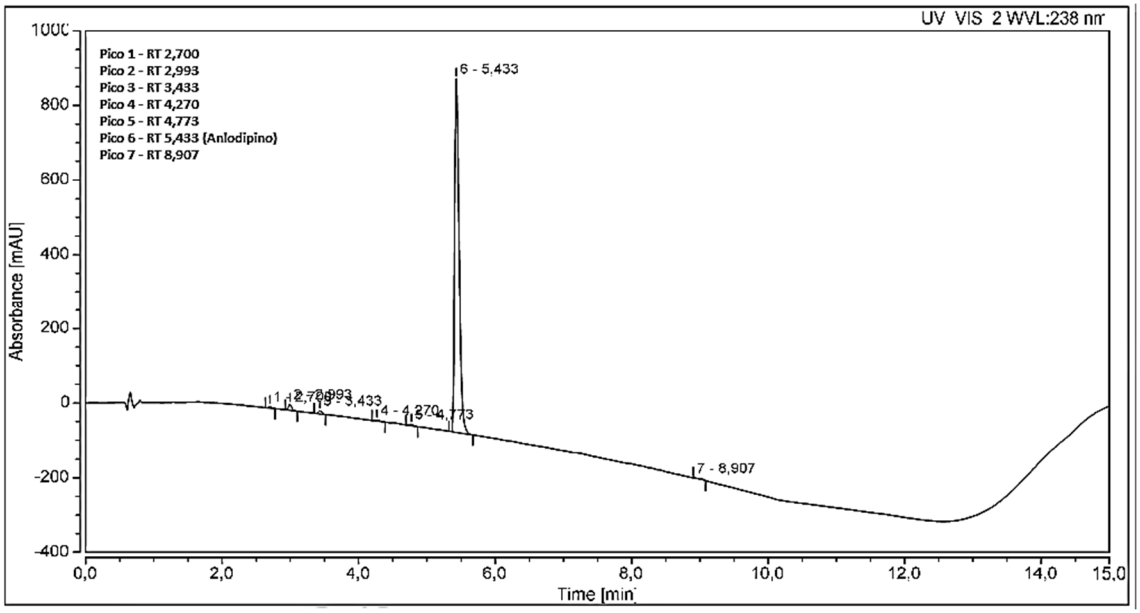

Figura 35. Cromatograma referente ao IFA sob condições de degradação alcalina (NaOH 0,05M por 4 dias em temperatura ambiente). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

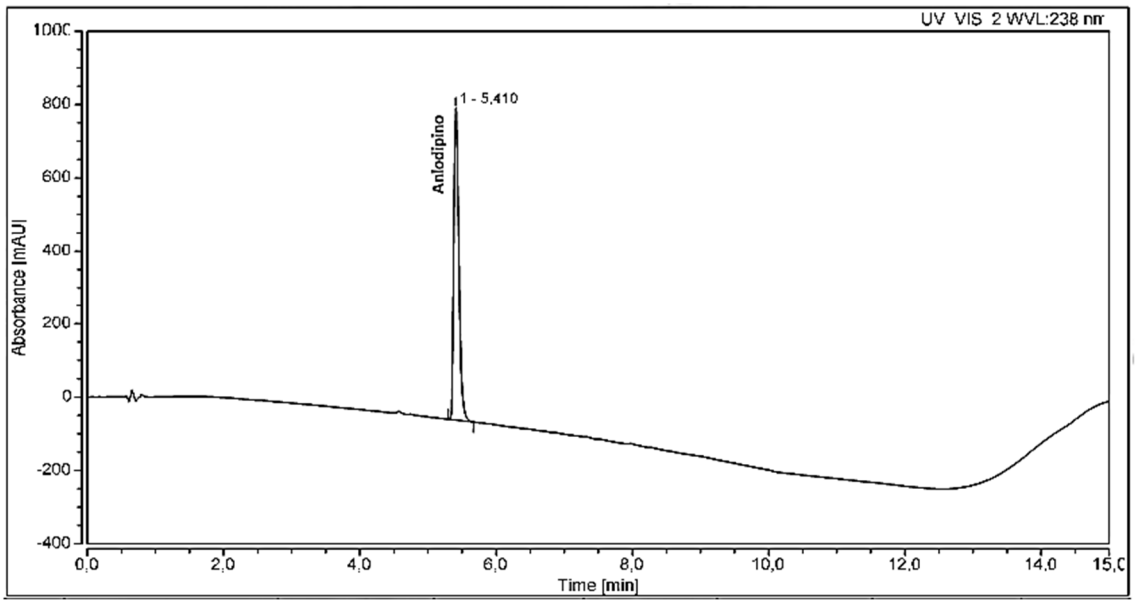

Figura 36. Cromatograma referente ao produto terminado sob condições de degradação alcalina (NaOH 0,05M por 3 dias em temperatura ambiente). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/

acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

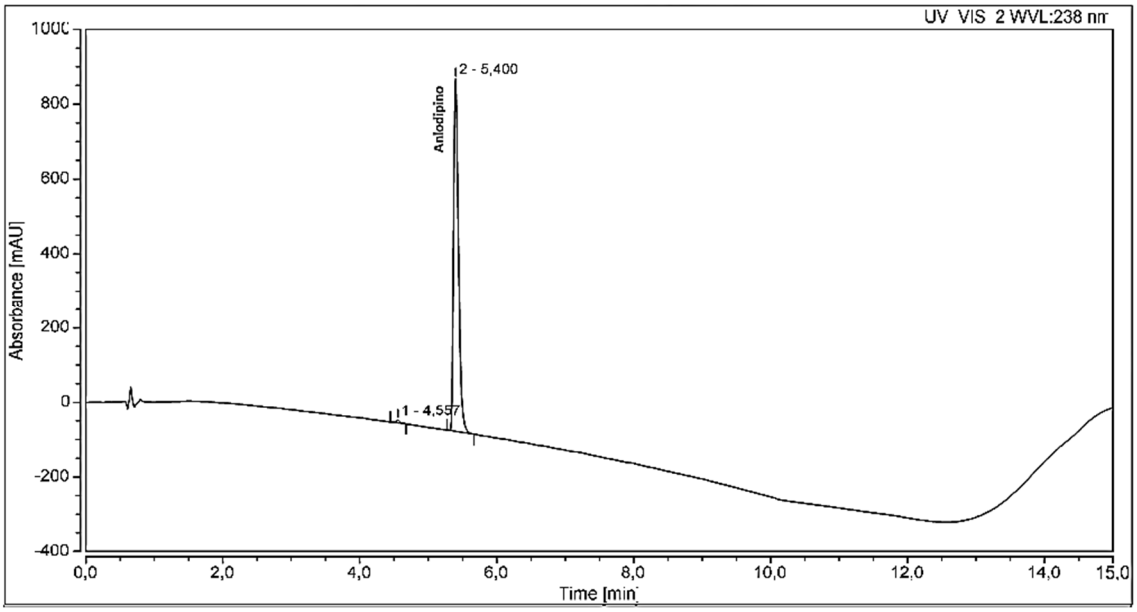

Figura 37. Cromatograma referente ao IFA sob condições de degradação fotolítica no estado sólido (por 5 dias sob exposição a 1,2 milhões de lux horas a 20ºC). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

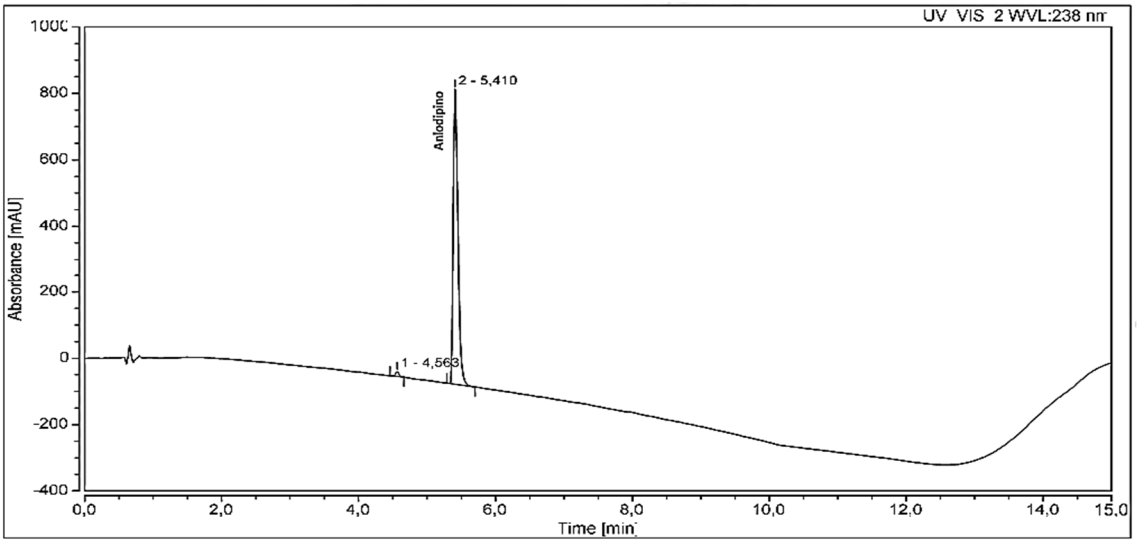

Figura 38. Cromatograma referente ao produto terminado sob condições de degradação fotolítica no estado sólido (por 5 dias sob exposição a 1,2 milhões de lux horas a 20ºC).

Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

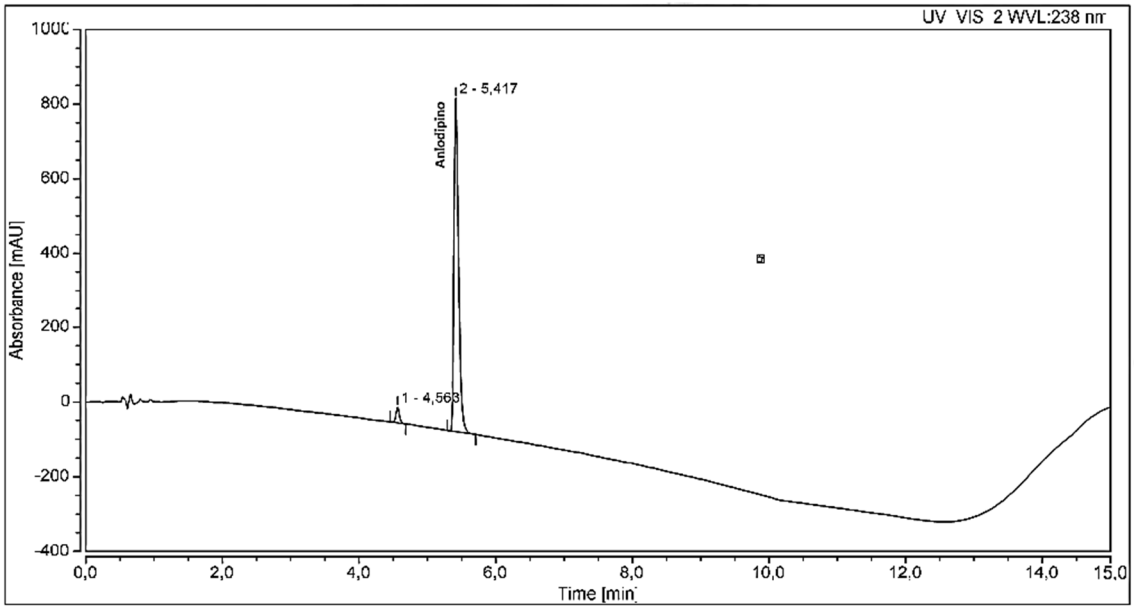

Figura 39. Cromatograma referente ao IFA sob condições de degradação por oxidação pelos íons metálicos ($CuSO_4$ 1mM por 5 dias a 40ºC). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

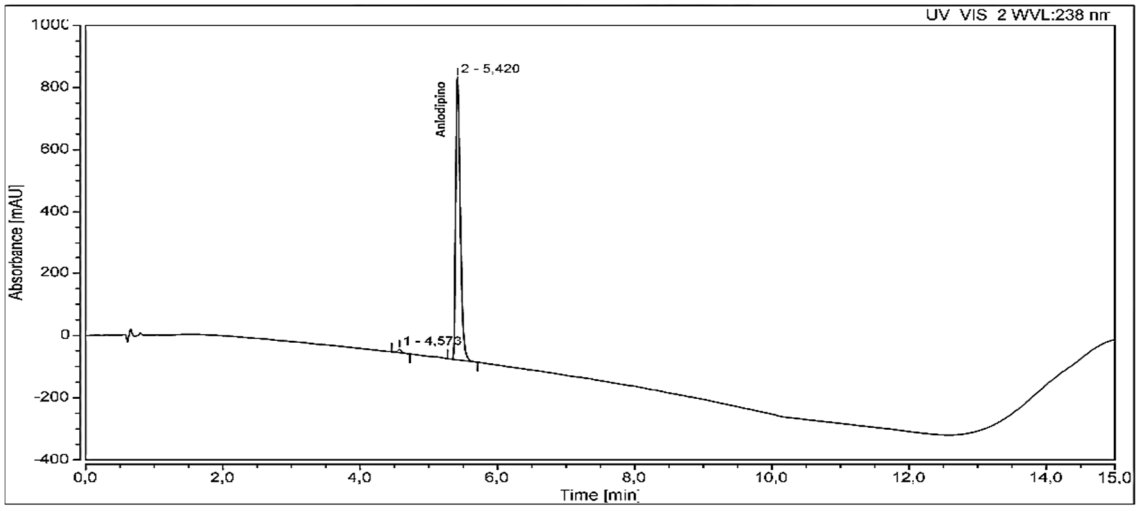

Figura 40. Cromatograma referente ao produto terminado sob condições de degradação por oxidação pelos íons metálicos ($CuSO_4$ 1mM por 5 dias a 40ºC). Condições: coluna Zorbax SB-

phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

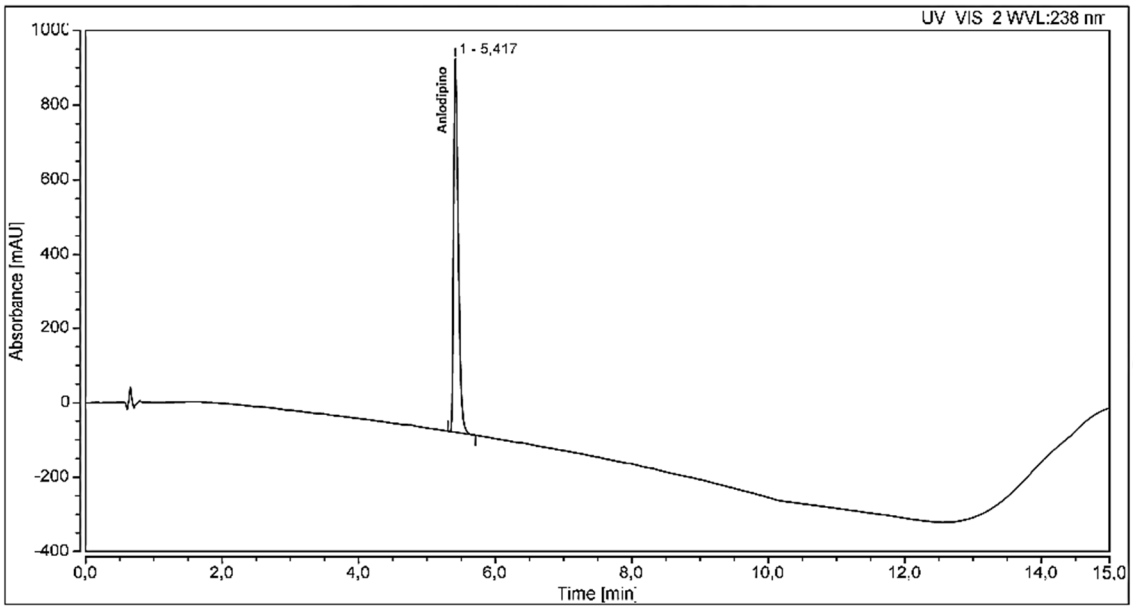

Figura 41. Cromatograma referente ao IFA sob condições de degradação por termólise (5 dias a 70ºC). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

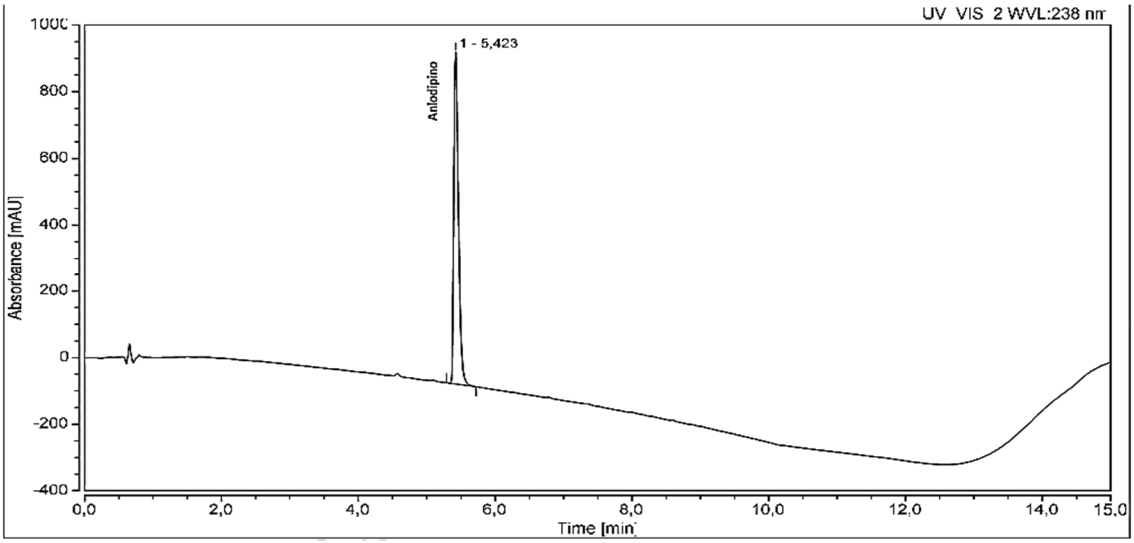

Figura 42. Cromatograma referente ao produto terminado sob condições de degradação por termólise (por 5 dias a 70ºC). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase

móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

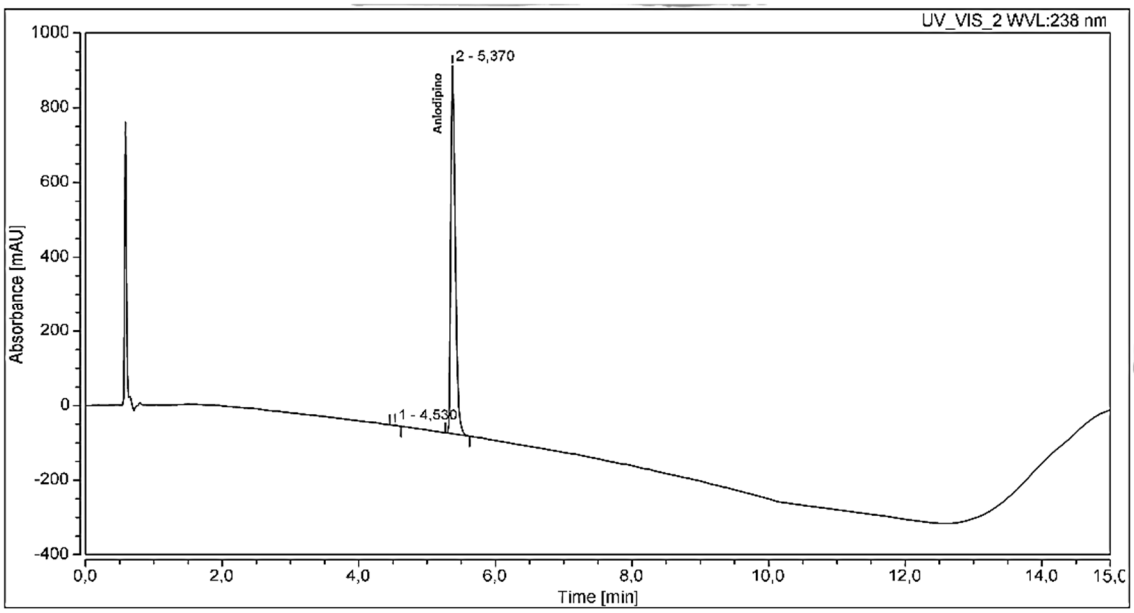

Figura 43. Cromatograma referente ao IFA sob condições de degradação por oxidação com peróxido de hidrogênio (H_2O_2 3% por 1 dia em temperatura ambiente). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

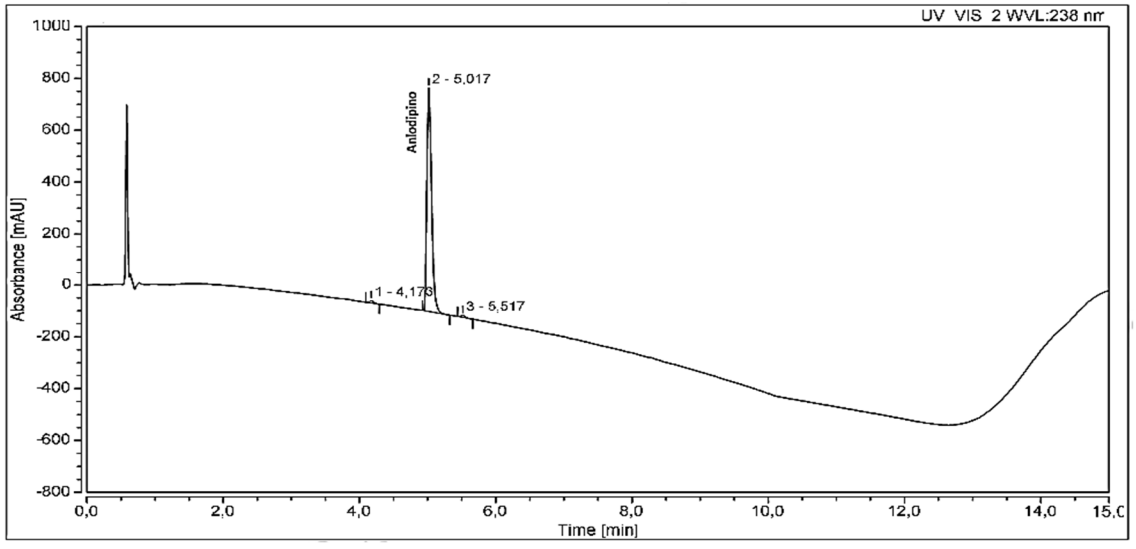

Figura 44. Cromatograma referente ao produto terminado sob condições de degradação por oxidação com peróxido de hidrogênio (H_2O_2 3% por 6 horas em temperatura ambiente).

Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

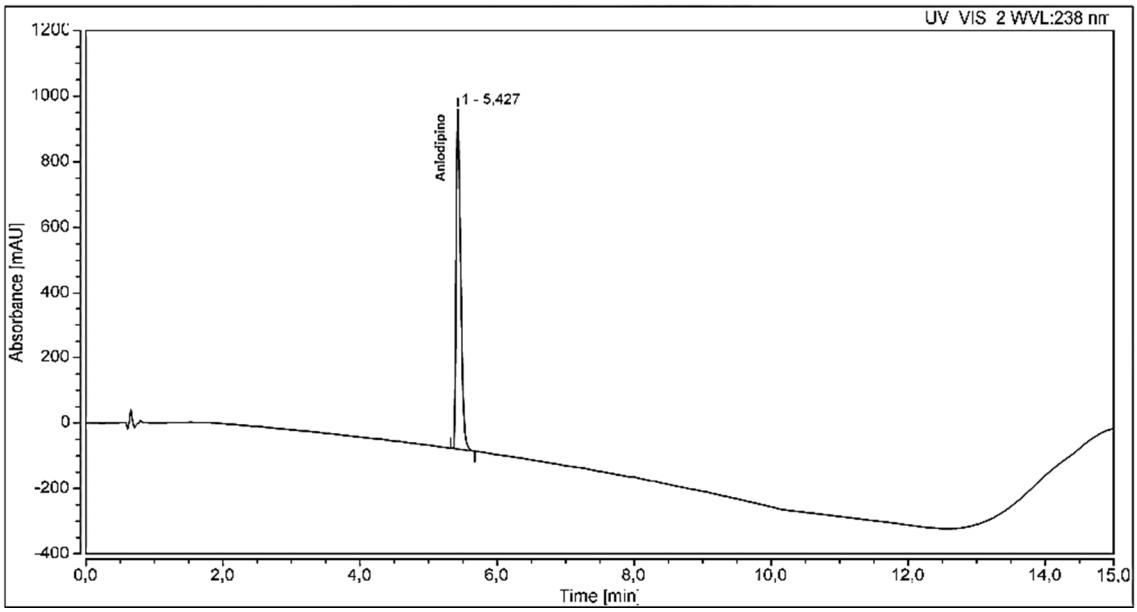

Figura 45. Cromatograma referente ao IFA sob condições de degradação por umidade (90%UR/ 70ºC por 10 dias). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

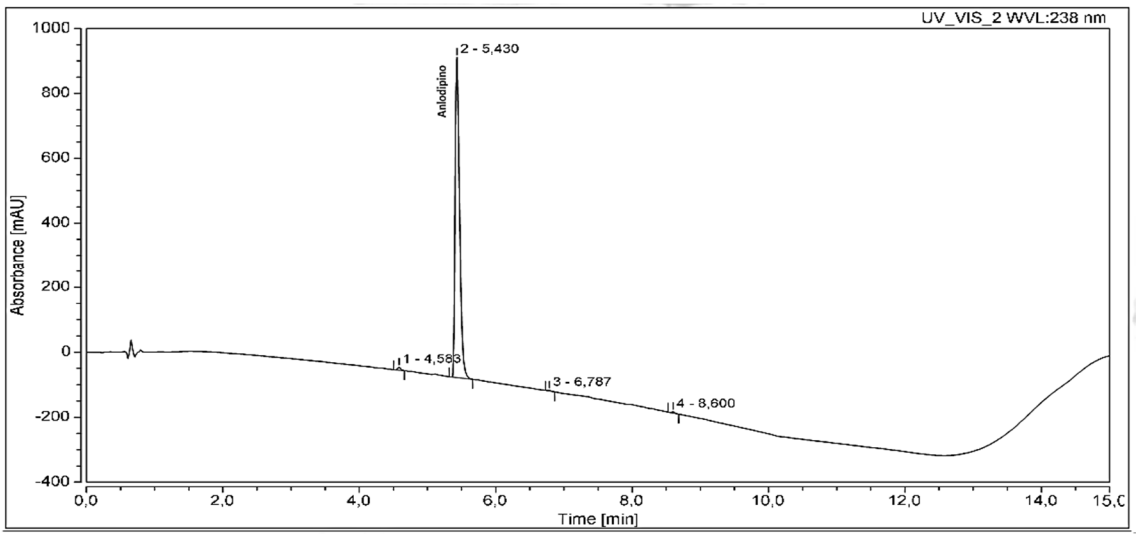

Figura 46. Cromatograma referente ao produto terminado sob condições de degradação por umidade (90%UR/70ºC por 10 dias). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50

mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

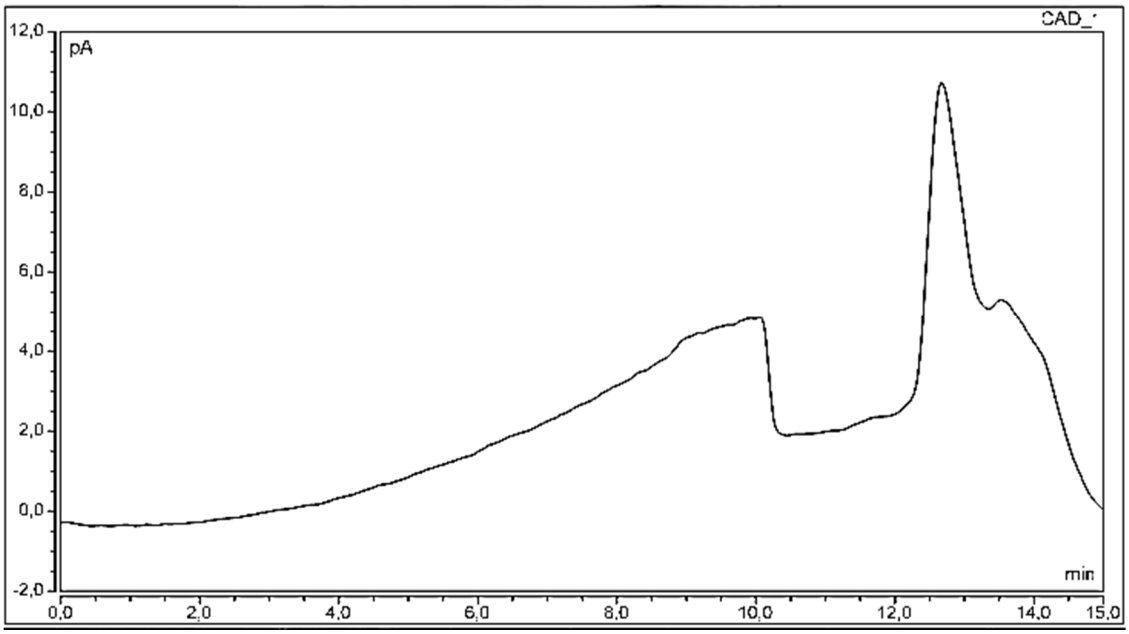

Figura 47. Cromatograma referente a fase móvel. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

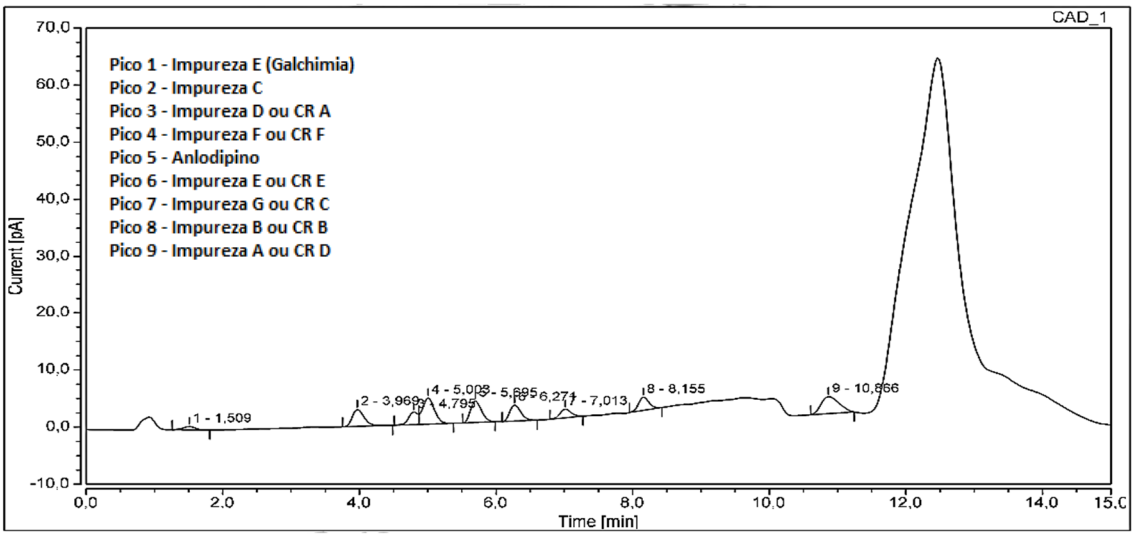

Figura 48. Cromatograma referente a mistura de impurezas + IFA. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/

acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD com filtro 7 e ganho 100 pA, volume de injeção 2 µL e temperatura da coluna de 20ºC.

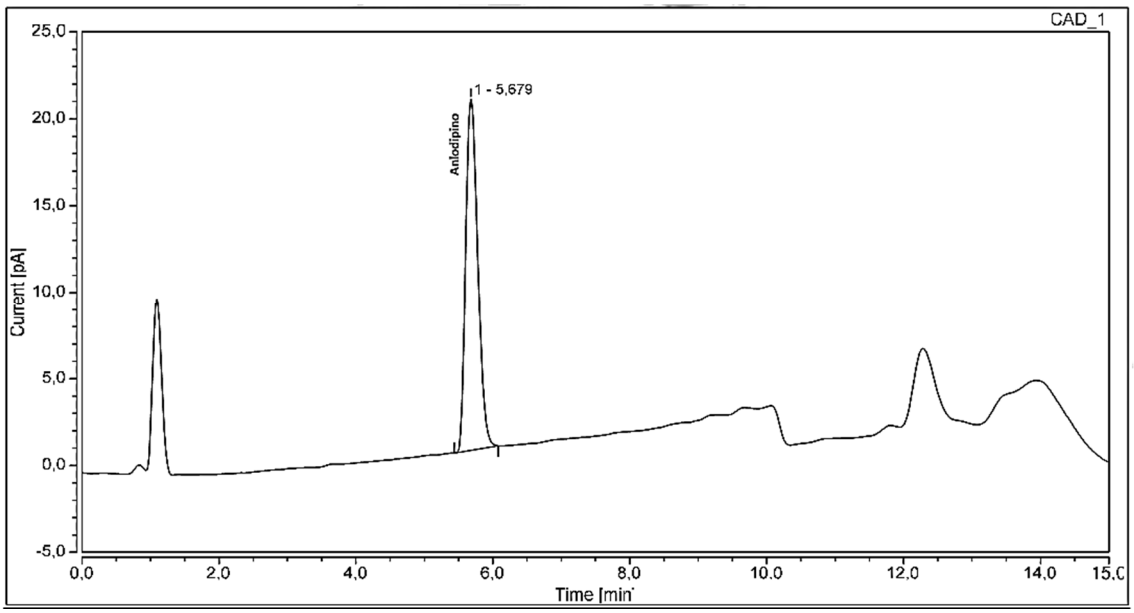

Figura 49. Cromatograma referente ao IFA sob condição inicial – sem agentes estressantes. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD com filtro 7 e ganho 100 pA, volume de injeção 2 µL e temperatura da coluna de 20ºC.

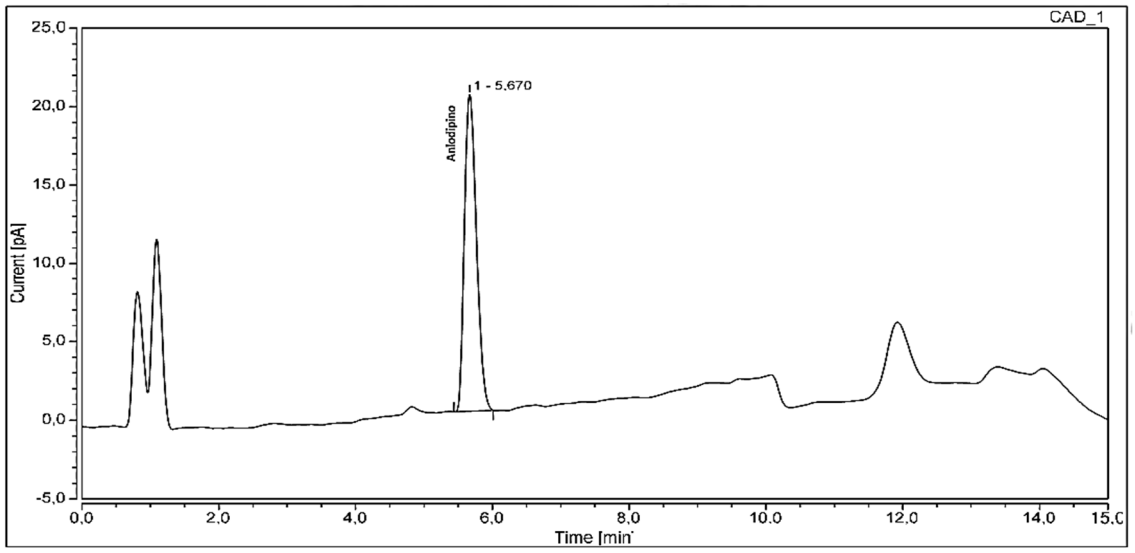

Figura 50. Cromatograma referente ao produto terminado sob condição inicial – sem agentes estressantes. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10;

vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD com filtro 7 e ganho 100 pA, volume de injeção 2 µL e temperatura da coluna de 20ºC.

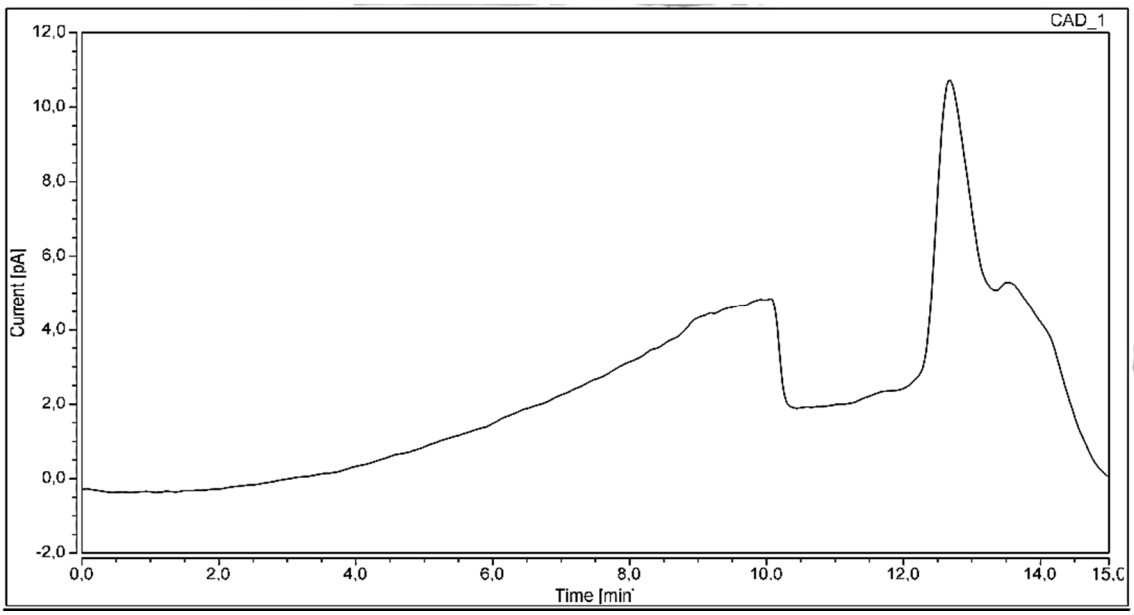

Figura 51. Cromatograma referente ao placebo sob condição inicial – sem agentes estressantes. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD com filtro 7 e ganho 100 pA, volume de injeção 2 µL e temperatura da coluna de 20ºC.

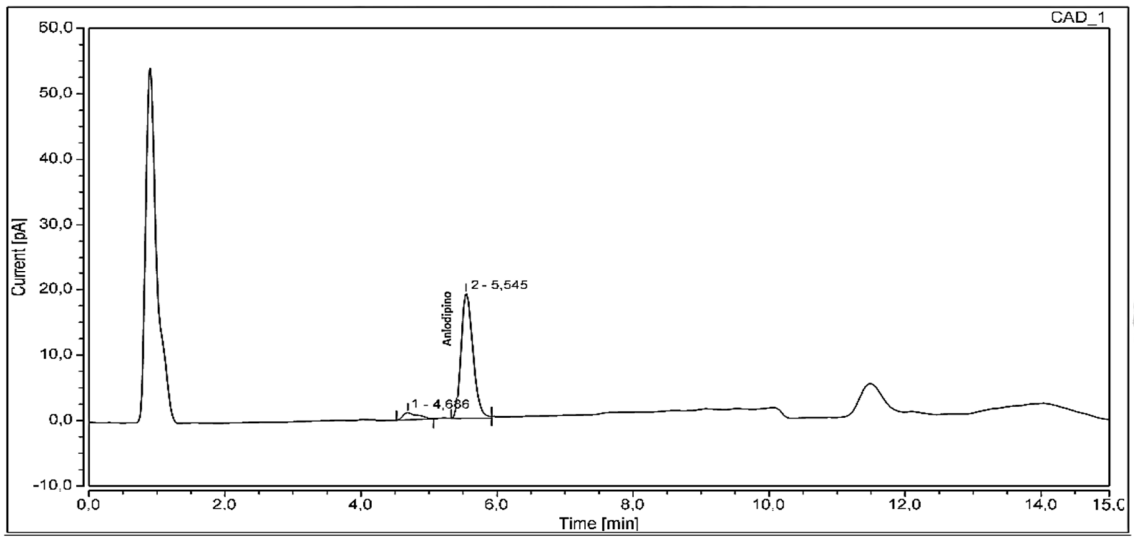

Figura 52. Cromatograma referente ao IFA sob condições de degradação ácida (HCl 0,1M por 2 horas a 70ºC). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel:

gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD com filtro 7 e ganho 100 pA, volume de injeção 2 µL e temperatura da coluna de 20ºC.

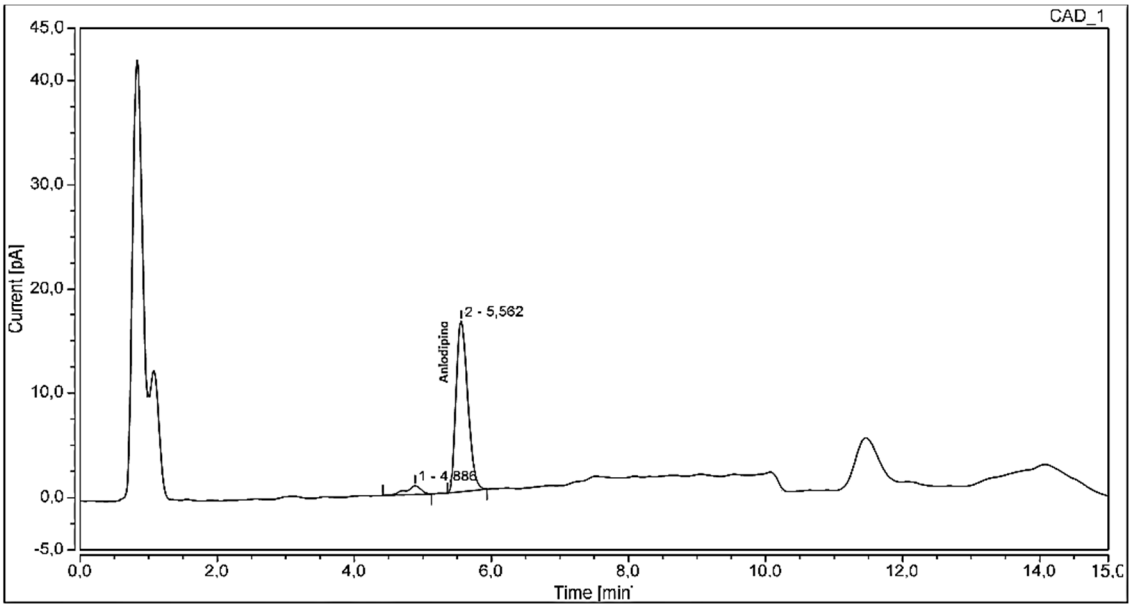

Figura 53. Cromatograma referente ao produto terminado sob condições de degradação ácida (HCl 0,1M por 2 horas a 70ºC). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD com filtro 7 e ganho 100 pA, volume de injeção 2 µL e temperatura da coluna de 20ºC.

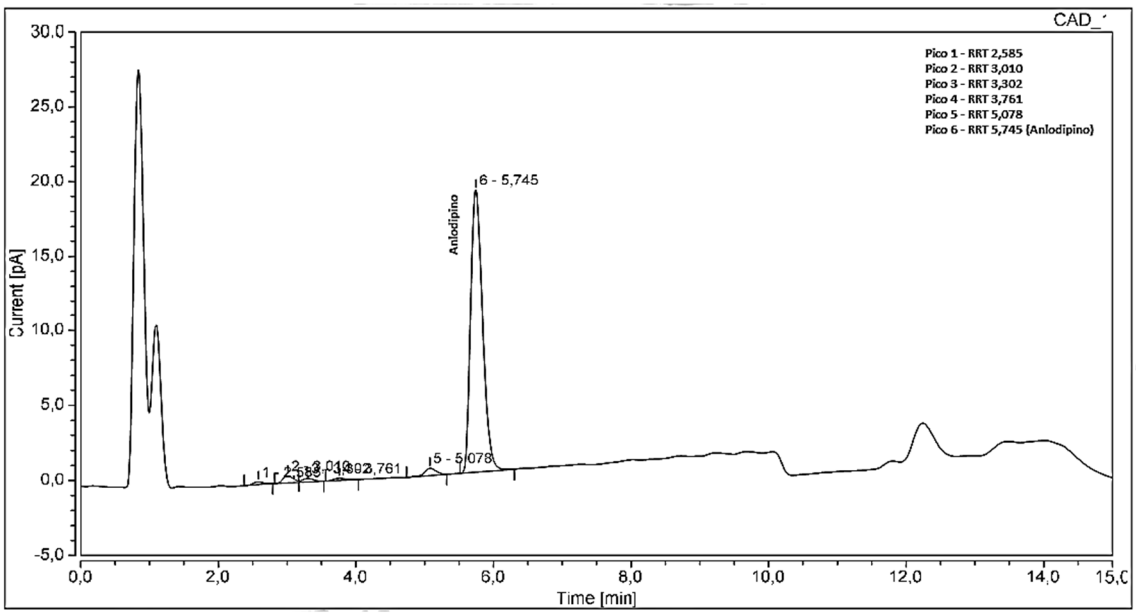

Figura 54. Cromatograma referente ao IFA sob condições de degradação alcalina (NaOH 0,05M por 4 dias em temperatura ambiente). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD com filtro 7 e ganho 100 pA, volume de injeção 2 µL e temperatura da coluna de 20ºC.

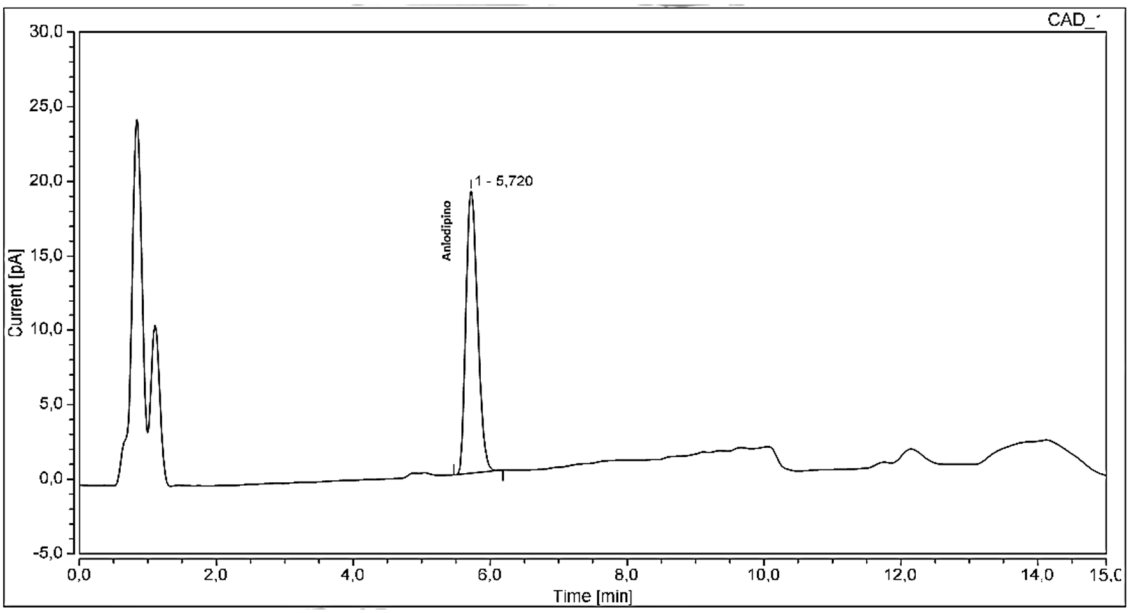

Figura 55. Cromatograma referente ao produto terminado sob condições de degradação alcalina (NaOH 0,05M por 3 dias em temperatura ambiente). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min

13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD com filtro 7 e ganho 100 pA, volume de injeção 2 µL e temperatura da coluna de 20ºC.

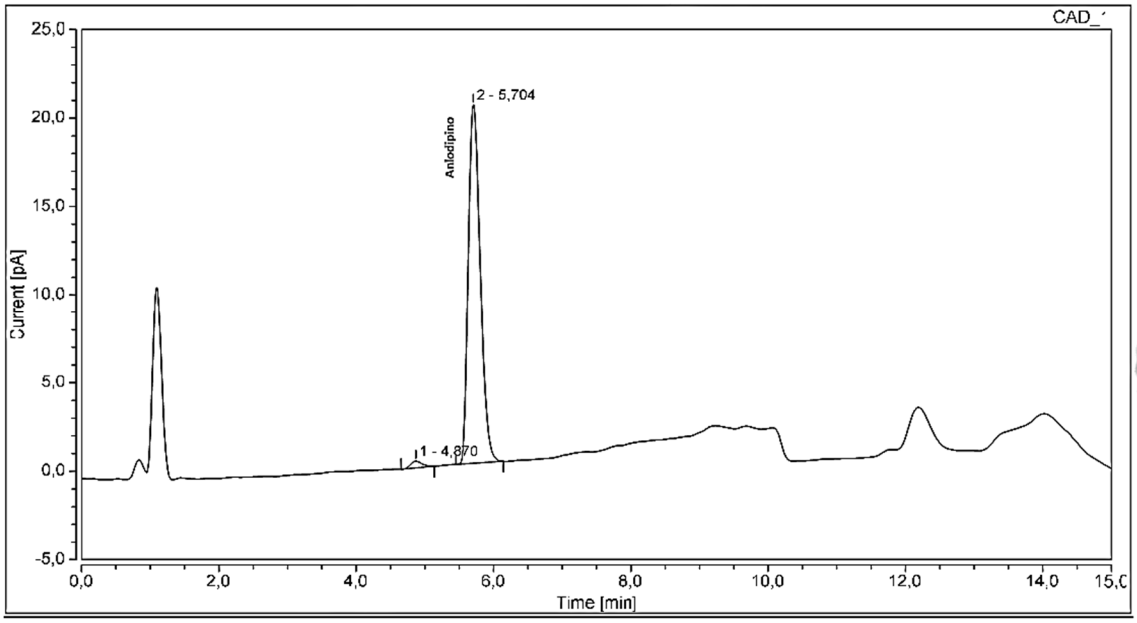

Figura 56. Cromatograma referente ao IFA sob condições de degradação fotolítica no estado sólido (por 5 dias sob exposição a 1,2 milhões de lux horas a 20ºC). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD com filtro 7 e ganho 100 pA, volume de injeção 2 µL e temperatura da coluna de 20ºC.

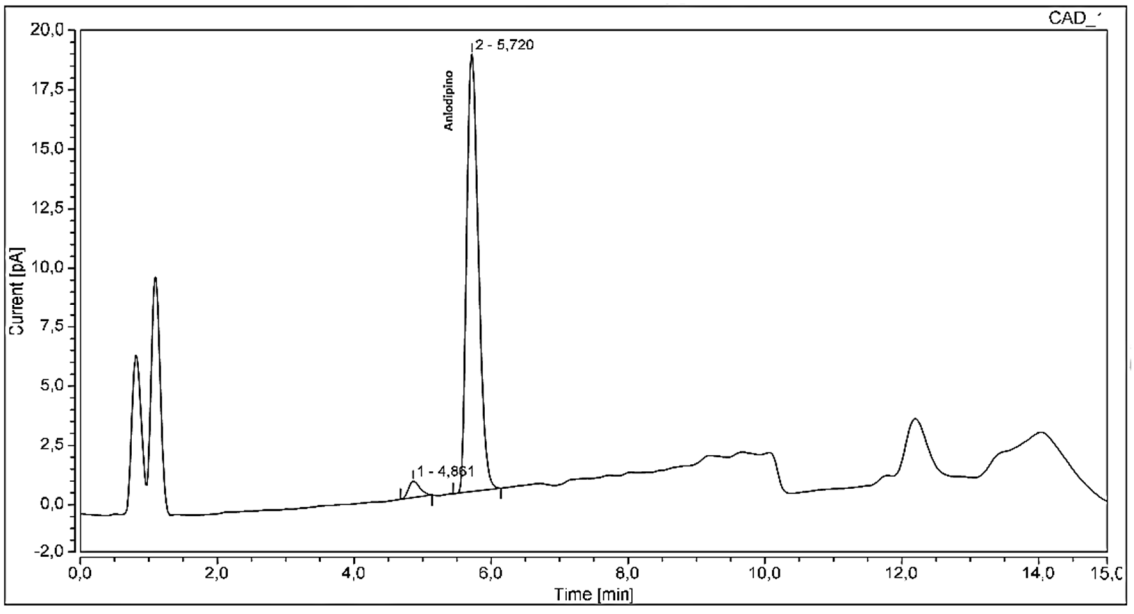

Figura 57. Cromatograma referente ao produto terminado sob condições de degradação fotolítica no estado sólido (por 5 dias sob exposição a 1,2 milhões de lux horas a 20ºC).

Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD com filtro 7 e ganho 100 pA, volume de injeção 2 µL e temperatura da coluna de 20ºC.

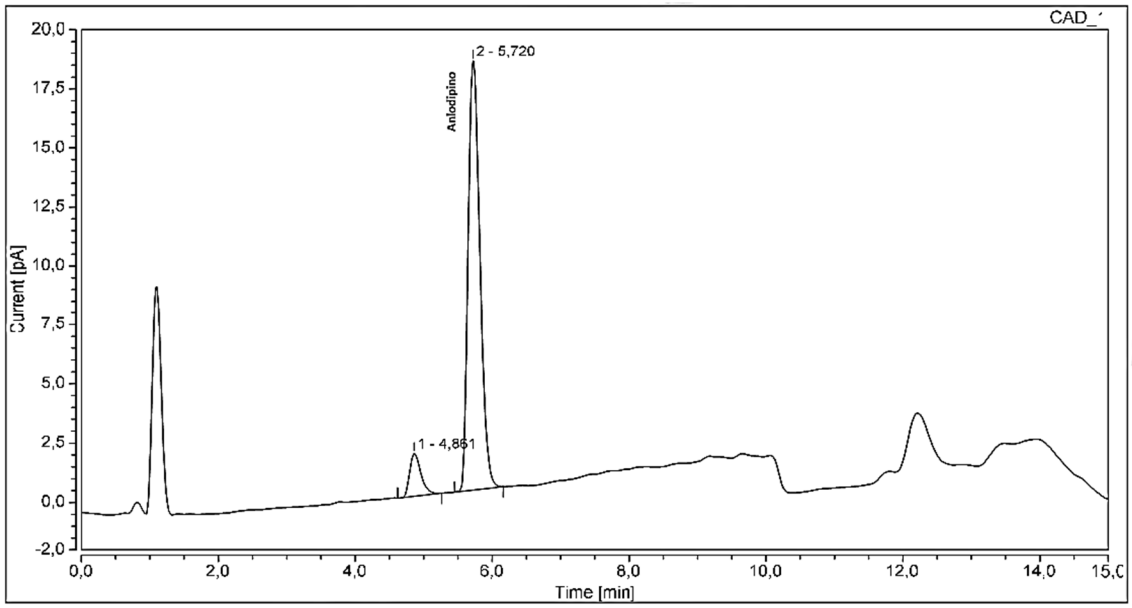

Figura 58. Cromatograma referente ao IFA sob condições de degradação por oxidação pelos íons metálicos ($CuSO_4$ 1mM por 5 dias a 40ºC). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD com filtro 7 e ganho 100 pA, volume de injeção 2 µL e temperatura da coluna de 20ºC.

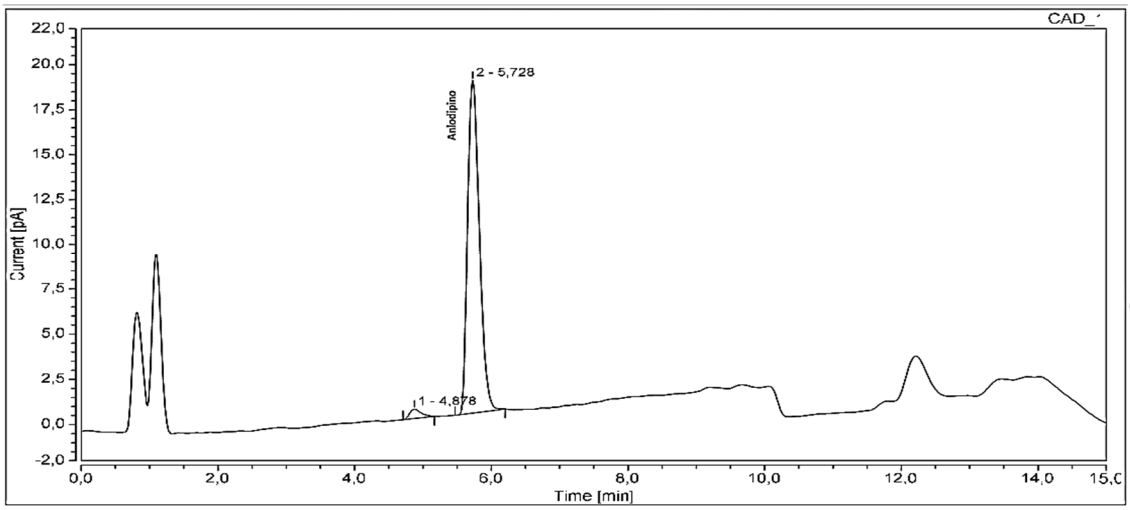

Figura 59. Cromatograma referente ao produto terminado sob condições de degradação por oxidação pelos íons metálicos ($CuSO_4$ 1mM por 5 dias a 40ºC). Condições: coluna Zorbax SB-

phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD com filtro 7 e ganho 100 pA, volume de injeção 2 µL e temperatura da coluna de 20ºC.

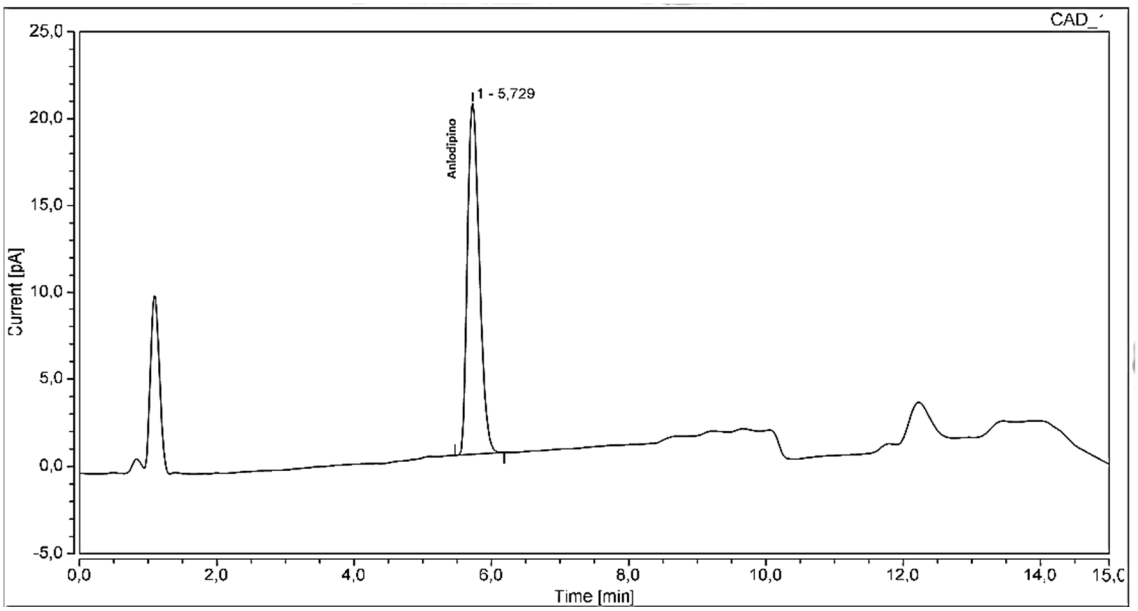

Figura 60. Cromatograma referente ao IFA sob condições de degradação por termólise (5 dias a 70ºC). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD com filtro 7 e ganho 100 pA, volume de injeção 2 µL e temperatura da coluna de 20ºC.

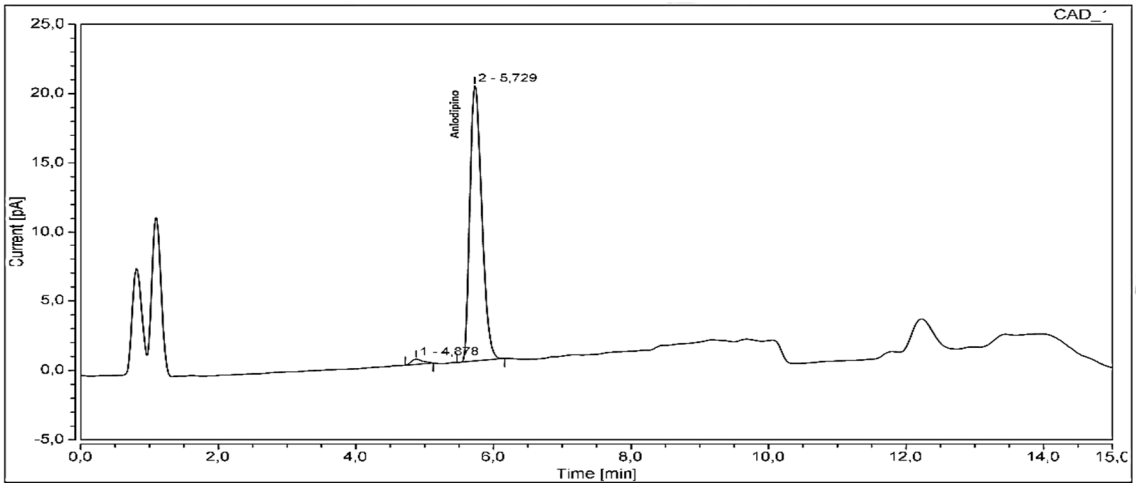

Figura 61. Cromatograma referente ao produto terminado sob condições de degradação por termólise (por 5 dias a 70ºC). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase

móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD com filtro 7 e ganho 100 pA, volume de injeção 2 µL e temperatura da coluna de 20ºC.

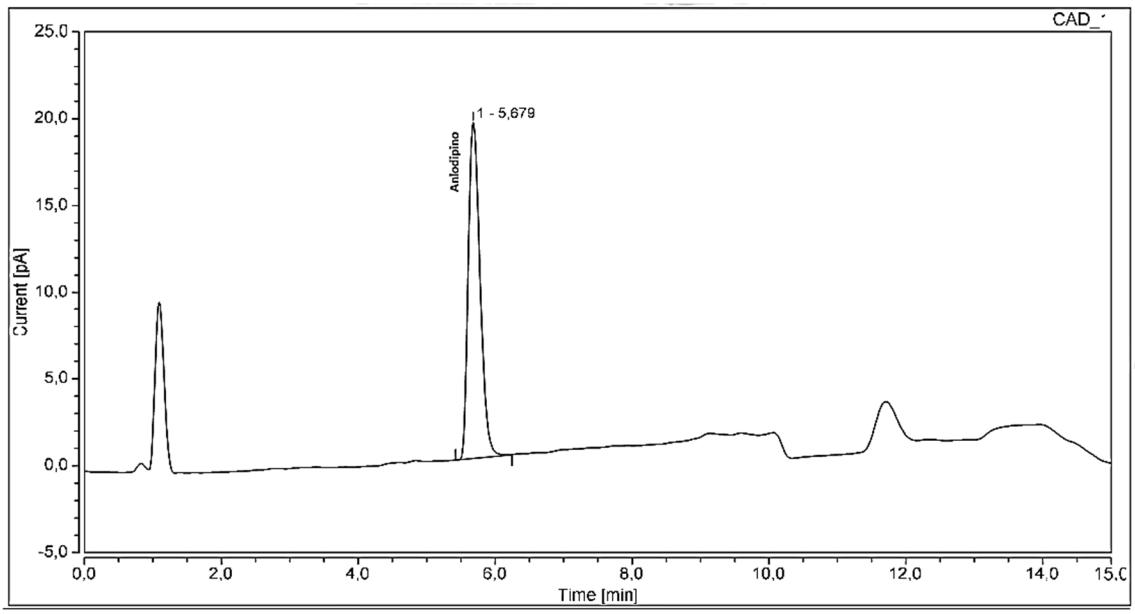

Figura 62. Cromatograma referente ao IFA sob condições de degradação por oxidação com peróxido de hidrogênio (H_2O_2 3% por 1 dia em temperatura ambiente). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD com filtro 7 e ganho 100 pA, volume de injeção 2 µL e temperatura da coluna de 20ºC.

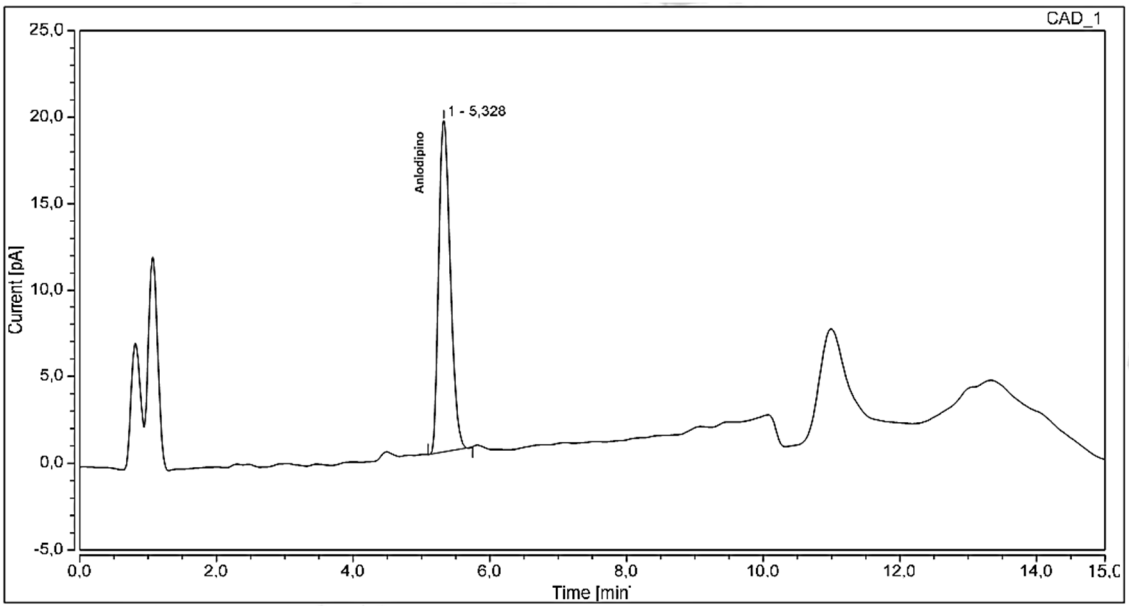

Figura 63. Cromatograma referente ao produto terminado sob condições de degradação por oxidação com peróxido de hidrogênio (H_2O_2 3% por 6 horas em temperatura ambiente). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD com filtro 7 e ganho 100 pA, volume de injeção 2 µL e temperatura da coluna de 20ºC.

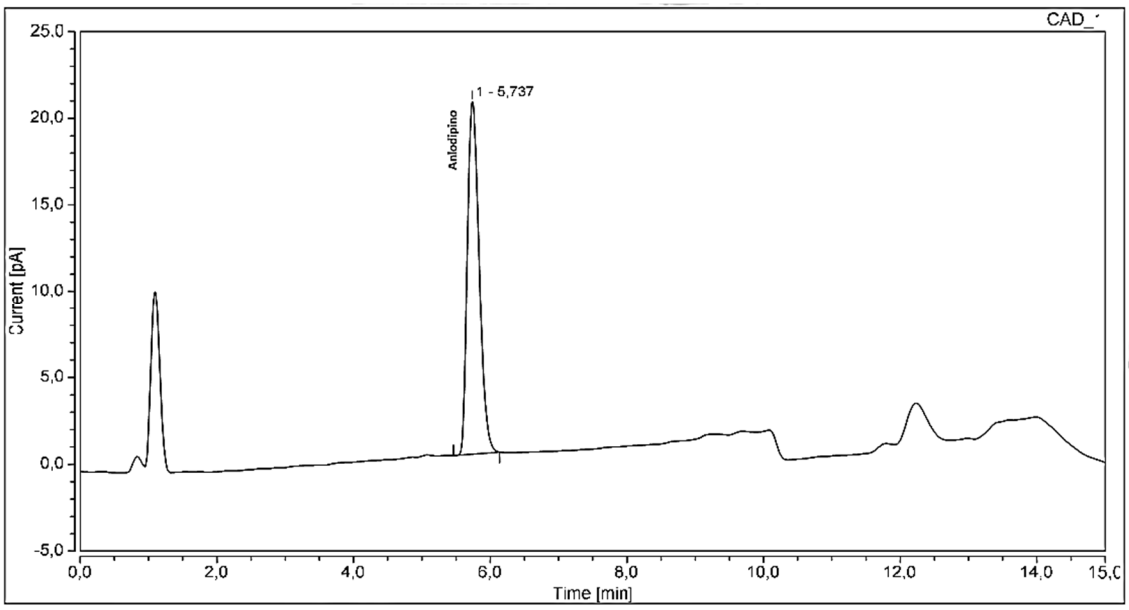

Figura 64. Cromatograma referente ao IFA sob condições de degradação por umidade (90%UR/ 70ºC por 10 dias). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10,

vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD com filtro 7 e ganho 100 pA, volume de injeção 2 µL e temperatura da coluna de 20ºC.

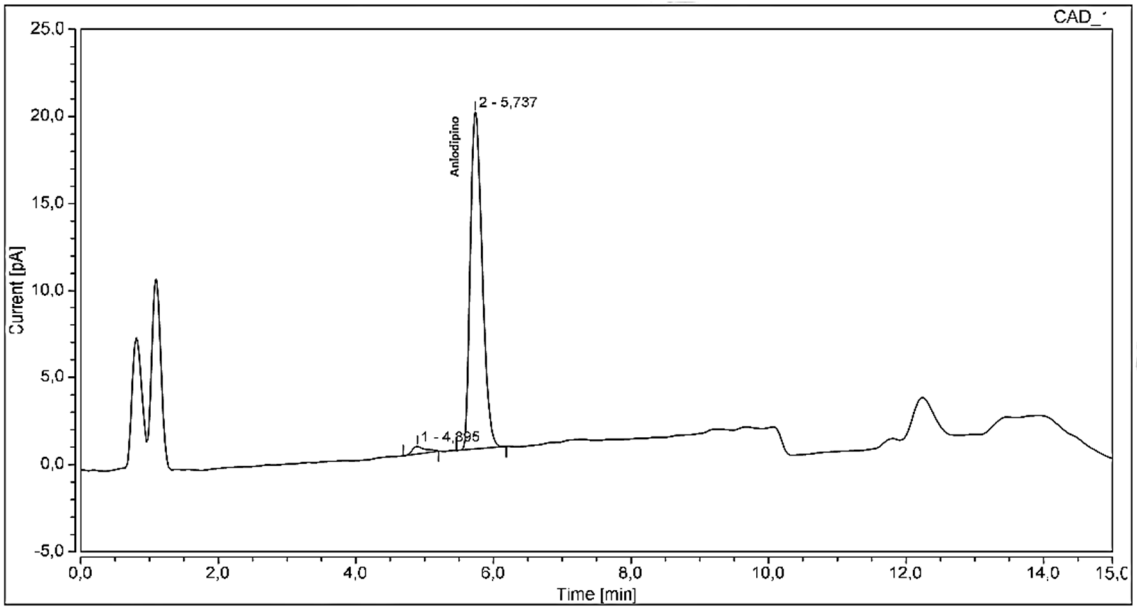

Figura 65. Cromatograma referente ao produto terminado sob condições de degradação por umidade (90%UR/70ºC por 10 dias). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD com filtro 7 e ganho 100 pA, volume de injeção 2 µL e temperatura da coluna de 20ºC.

Diversos testes foram realizados para se obter a melhor condição para a separação das impurezas e detecção no DAD e CAD. Porém, como o CAD necessita de maior quantidade de solvente orgânico para melhorar a resposta dos compostos de interesse, houve um certo impacto na separação das impurezas, pois ao se aumentar a quantidade dos modificadores orgânicos e diminuir a proporção do tampão, não havia uma boa separação das impurezas, havendo coeluição das mesmas.

De acordo com Almeling et al, (2012) para melhorar a resposta do CAD há a necessidade de aumentar a quantidade de orgânico, com isso ele sugere o uso de uma bomba após o sistema cromatográfico, pois assim pode-se adicionar maior quantidade de modificador orgânico após a separação cromatográfica, melhorando a resposta das impurezas sem impactar na separação das mesmas, como se observa na Figura 66. Porém, como não dispúnhamos desse tipo de bomba após o sistema cromatográfico, teve-se que chegar num equilíbrio entre a concentração de orgânico e tampão que mantivesse uma boa separação entre as impurezas e uma boa resposta no CAD.

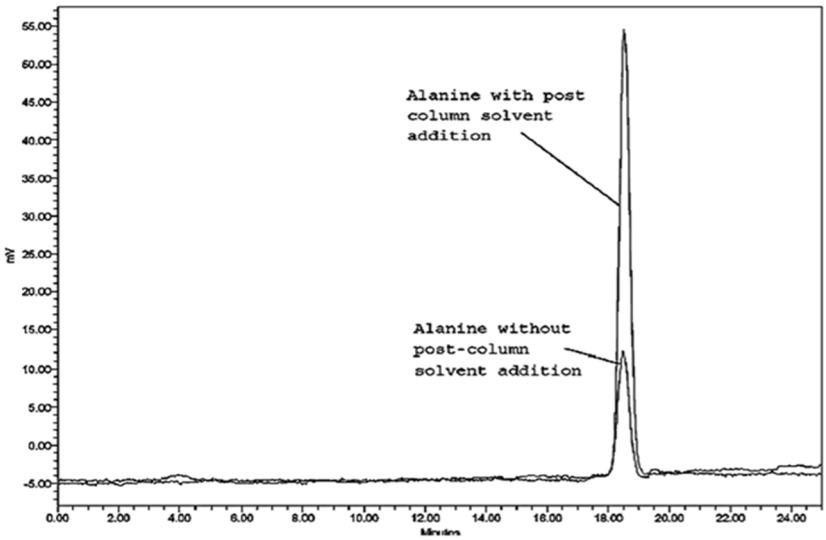

Figura 66. Exemplo de diferença de resposta da alanina com a adição de orgânico após a separação cromatográfica.
Fonte: ALMELING; ILKO; HOLZGRABE, 2012.

Conforme a RDC nº 53 de dezembro de 2015 para um fármaco como besilato de anlodipino com posologia de 10 mg por dia, como se observa na Tabela 14, tem-se o limite de notificação a 0,1%, limite de identificação a 0,2% e limite de qualificação a 0,2%.

Tabela 14. Limites de notificação, identificação e qualificação dos produtos de degradação utilizados nos estudos de estabilidade de medicamentos.

	Dose Máxima Diária[1]	**Limites[2]**
Limites de Notificação	≤ 1g	0,1 %
	> 1g	0,05 %
Limites de Identificação	< 1mg	1,0 % ou 5 µg ATD, o que for menor
	1mg - 10mg	0,5 % ou 20 µg ATD, o que for menor
	> 10mg – 2g	0,2 % ou 2 mg ATD, o que for menor
	> 2g	0,10 %
Limites de Qualificação	< 10mg	1,0 % ou 50 µg ATD, o que for menor
	10mg – 100mg	0,5 % ou 200 µg ATD, o que for menor
	> 100mg – 2g	0,2 % ou 3 mg ATD, o que for menor
	> 2g	0,15%

Onde:

1 – Quantidade máxima do insumo farmacêutico ativo administrado por dia.

2 – Limites dos produtos de degradação são expressos como a percentagem do insumo farmacêutico ativo ou como a administração total diária (ATD) de um produto de degradação.

Fonte: BRASIL (2), 2015.

Com o intuito de melhorar a resposta no CAD, já que o método deve ser capaz de quantificar com exatidão e precisão o limite de 0,1% do ativo, chegou-se à conclusão que haveria a necessidade de uma alta concentração da amostra (1,0 mg/mL de anlodipino) para obter sensibilidade adequada no DAD e CAD.

Maiores concentrações de anlodipino foram testadas, bem como o aumento de volume de injeção para melhorar a resposta no CAD, porém o perfil cromatográfico obtido não foi adequado e tão pouco melhorou a resposta no CAD, pois a resposta no CAD é proporcional a concentração do solvente orgânico na fase móvel, o qual se tornou um desafio atrelar a separação cromatográfica no DAD e a resposta do IFA + impurezas no CAD (BAERTSCHI et al, 2013.

6.1.2.1. Avaliação da seletividade – Estudo de degradação forçada

Com o objetivo de obter-se uma degradação entre 10 a 30% do ativo, condições mais brandas foram testadas. De maneira a evitar uma grande degradação do ativo, bem como evitar a formação de subprodutos dos produtos de degradação.

As condições e resultados apresentados nas Tabelas 15 e 16 representam os resultados da degradação do besilato de anlodipino, insumo farmacêutico ativo e como comprimido (produto terminado).

Sob condições de degradação o IFA e o produto terminado se apresentaram mais sensíveis à condição oxidativa por peróxido de hidrogênio e hidrólise alcalina e ácida, com exposições mais brandas e por tempos menores para conseguir uma queda de teor entre 10 a 30%.

A principal impureza formada, como se esperava de acordo com a literatura, foi a impureza D ou composto relacionado A, na maioria das condições de degradação. Devido esse resultado, para uma melhor avaliação do balanço de massas, fez-se a linearidade dessa impureza, bem como calculou-se seu fator resposta (FR= 5,6) em relação a resposta da linearidade do anlodipino a 238 nm.

Verifica-se que a queda de teor em relação a amostra controle não corresponde a porcentagem de impurezas formadas, logo, houve uma diferença significativa no balanço de massas.

Muito se discuti a respeito do balanço de massas, na qual pela teoria ter-se-ia que obter-se uma concordância entre a queda de teor e a porcentagem de impurezas formadas. Porém, esse problema é recorrente em muitos métodos indicativos de estabilidade, uma vez que o estudo de degradação, força condições irreais de degradação, levando a condições extremas; o qual degrada a molécula, porém a isso está atrelado diversas implicações para a avaliação do balanço de massas (BAERTSCHI, 2005; BAERTSCHI et al., 2013).

A avaliação do balanço de massas deve-se considerar entre outros fatores, o erro analítico da análise, os fatores respostas das impurezas/ produtos de degradação formados, se

os mesmos são voláteis, se foram eluídos ou detectados; pois muitas vezes durante a degradação os produtos formados formam ligações não covalentes com a matriz, o que diminui a solubilidade, ou podem perder o grupo cromóforo, interferindo na detecção, por exemplo, no DAD.

Como forma de minimizar tais efeitos, atrelar técnicas ortogonais de detecção pode ser uma boa opção para melhorar os resultados de balanço de massas. Porém todas as técnicas analíticas têm suas vantagens e desvantagens dependendo do seu objetivo.

Nesse trabalho associou-se duas técnicas analíticas de detecção, o DAD e o CAD, a primeira muito sensível na detecção de moléculas com grupos cromóforos e a segunda, permite a detecção de moléculas independentes de sua estrutura, porém não detecta compostos voláteis e semi-voláteis (BAERTSCHI, 2005; BAERTSCHI et al., 2013; ALCÂNTARA, 2013).

Porém, mesmo com as duas técnicas analíticas hifenadas, observa uma diferença expressiva entre a queda do teor e a porcentagem de produtos de degradação formados. Logo, foi realizado uma avaliação crítica dos cromatogramas gerados durante o estudo de degradação, seja ele no DAD ou CAD, porém não foi identificado qualquer pico sobressalente em outros comprimentos de onda ou ao longo da corrida cromatográfica que justificasse a menor formação de PDs.

Logo, conclui-se que tal diferença pode estar associada a formação de PDs voláteis ou semi-voláteis, ou a formação de compostos insolúveis, que não eluiram durante o gradiente de fase móvel.

Tabela 15. Resultados da degradação forçada do insumo farmacêutico ativo – besilato de anlodipino.

IFA Condição		Recuperação (%)	Queda de Teor em relação a amostra controle	% Impurezas formadas
Controle	NA	100	NA	ND
HCl	0,1M 2h 70°C	80	20	4,81
NaOH	0,05M em temperatura ambiente por 4 dias	81	19	4,02
Fotólise	5 dias de exposição	89	11	1,6
$CuSO_4$	1mM a 40°C por 5 dias	86	14	7,36
H_2O_2	3% em temperatura ambiente por 1 dia	85	15	0,63
Umidade	90%UR/70°C por 10 dias	90	10	ND
Calor	70°C por 5 dias	90	10	ND

Tabela 16. Resultados da degradação forçada do produto terminado – besilato de anlodipino 5 mg.

PT Condição		Recuperação (%)	Queda de Teor em relação a amostra controle	% Impurezas formadas
Controle	NA	101	NA	NA
HCl	0,1M 2h 70ºC	91	10	2,62
NaOH	0,05M em temperatura ambiente por 4 dias	91	10	ND
Fotólise	5 dias de exposição	88	13	2,91
$CuSO_4$	1mM a 40ºC por 5 dias	87	14	2,28
H_2O_2	3% em temperatura ambiente por 1 dia	89	12	2,32
Umidade	90%UR/70ºC por 10 dias	91	10	1,82
Calor	70ºC por 5 dias	91	10	0,39

6.1.2.2. Avaliação da linearidade

Foram feitas duas curvas de calibração com o intuito de garantir a linearidade para a quantificação do ativo (teor) e outra para a quantificação das impurezas, como se observa nas Figuras 67, 69, 71 e 73. Verifica-se nas Figuras 68, 70, 72 e 74 uma boa distribuição dos resíduos padronizados.

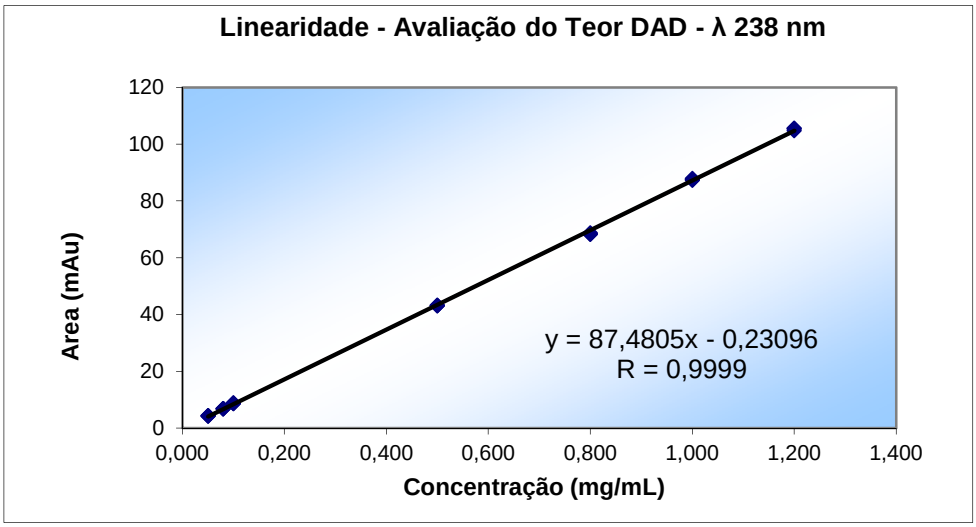

Figura 67. Curva analítica para avaliação do teor. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

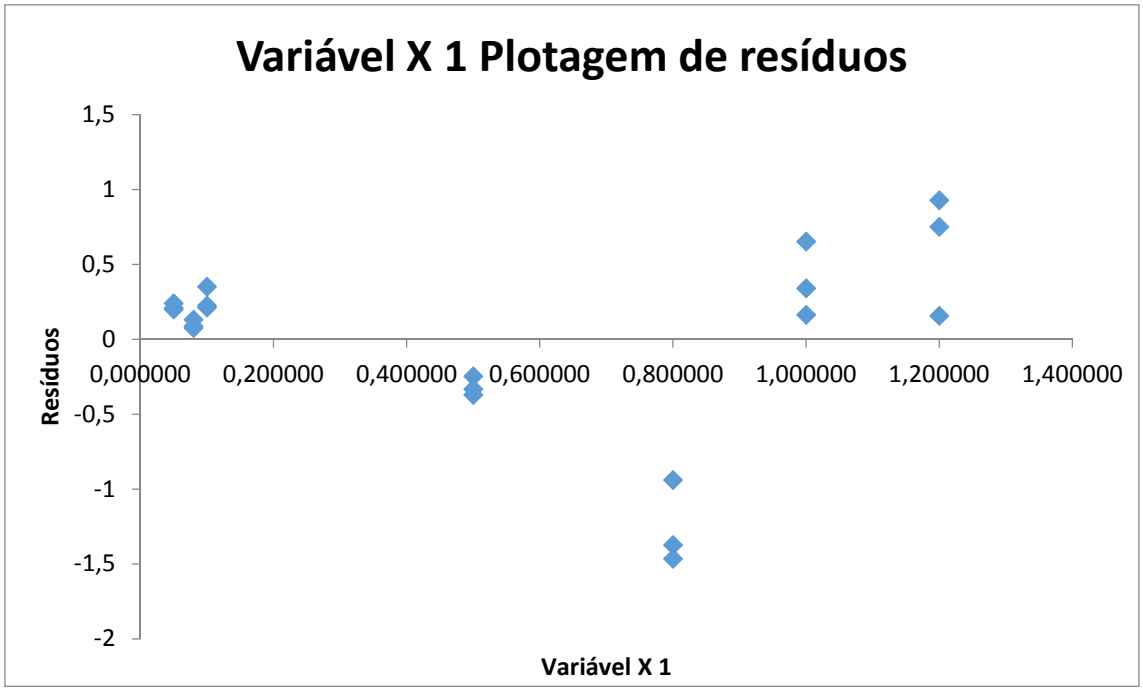

Figura 68. Avaliação da dispersão dos resíduos da curva analítica para avaliação do teor. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

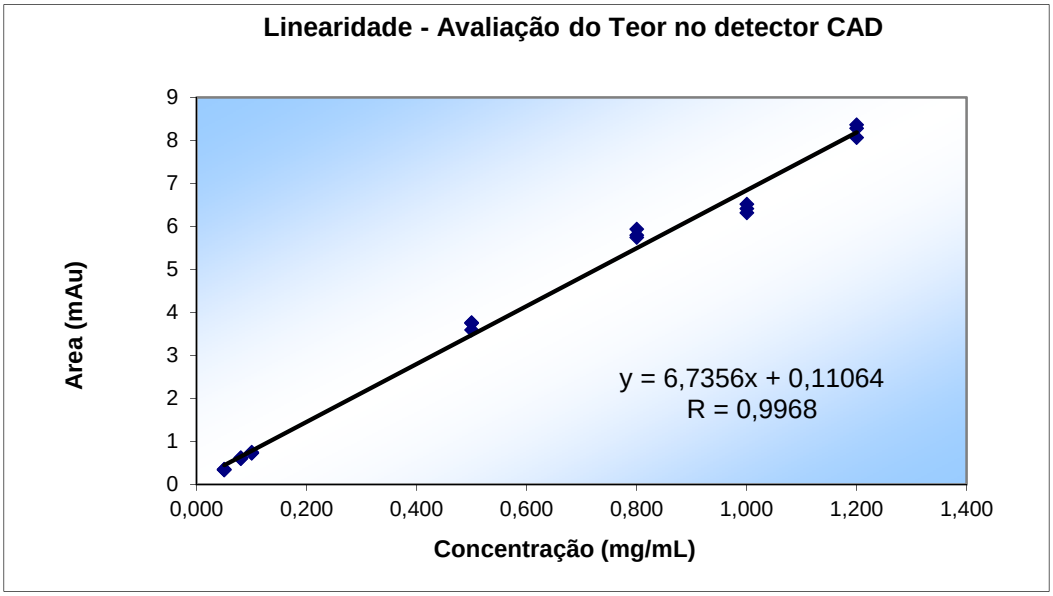

Figura 69. Curva analítica para avaliação da concentração das impurezas do limite de notificação ao limite de qualificação. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min

15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

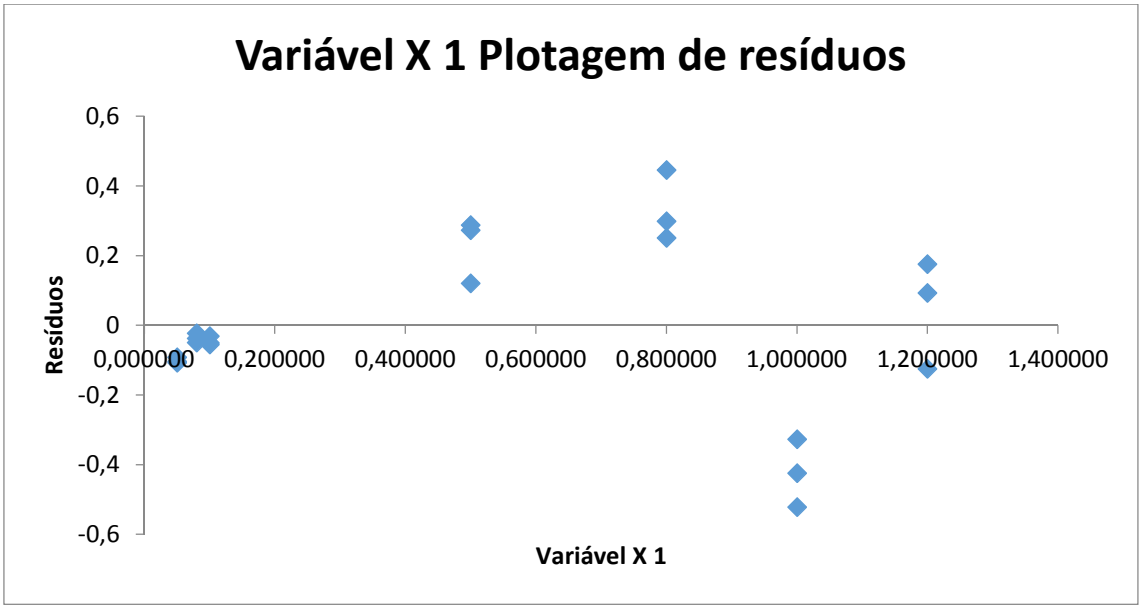

Figura 70. Avaliação da dispersão dos resíduos da curva analítica para avaliação do teor. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

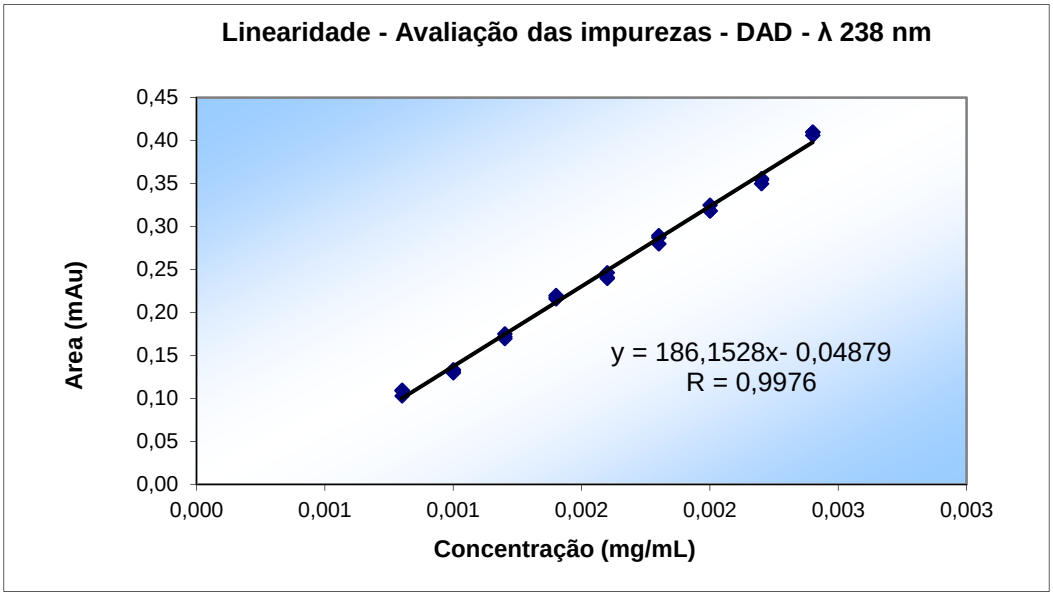

Figura 71. Curva analítica para avaliação da concentração das impurezas do limite de notificação ao limite de qualificação. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50

mm, fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

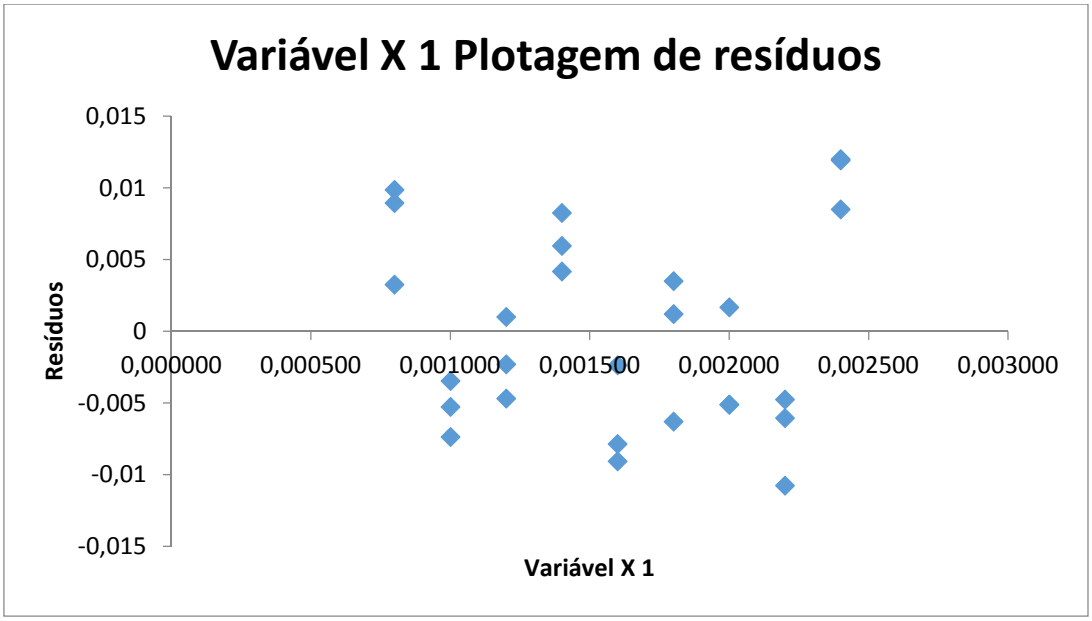

Figura 72. Avaliação da dispersão dos resíduos da curva analítica para avaliação no nível das impurezas. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

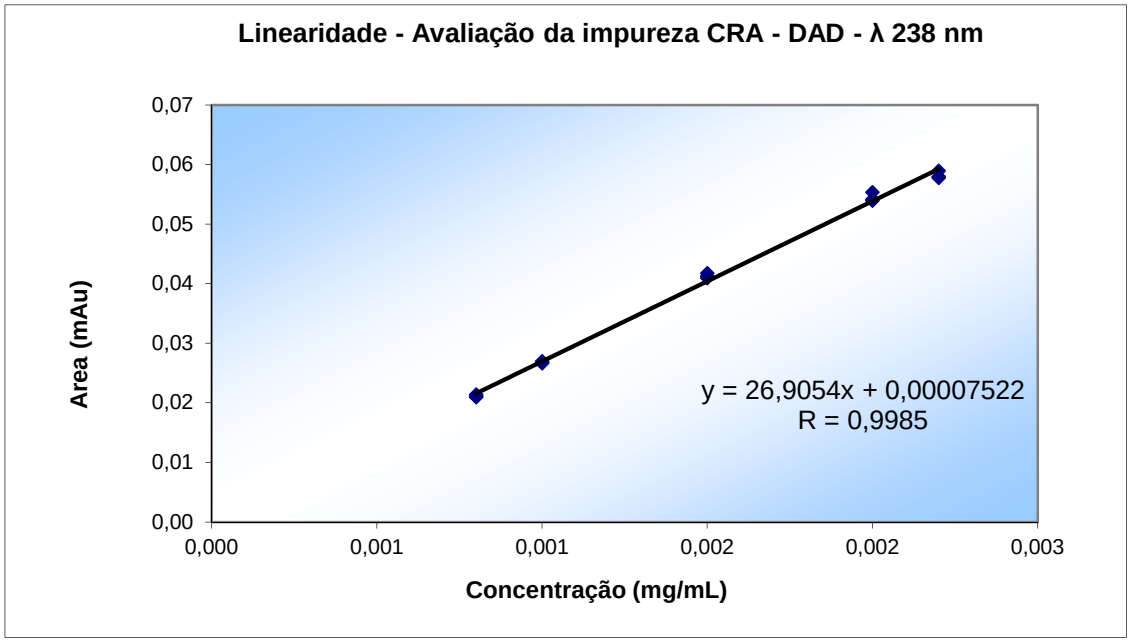

Figura 73. Curva analítica para avaliação da concentração da impureza Composto Relacionado A (CRA) do limite de notificação ao limite de qualificação. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm, fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

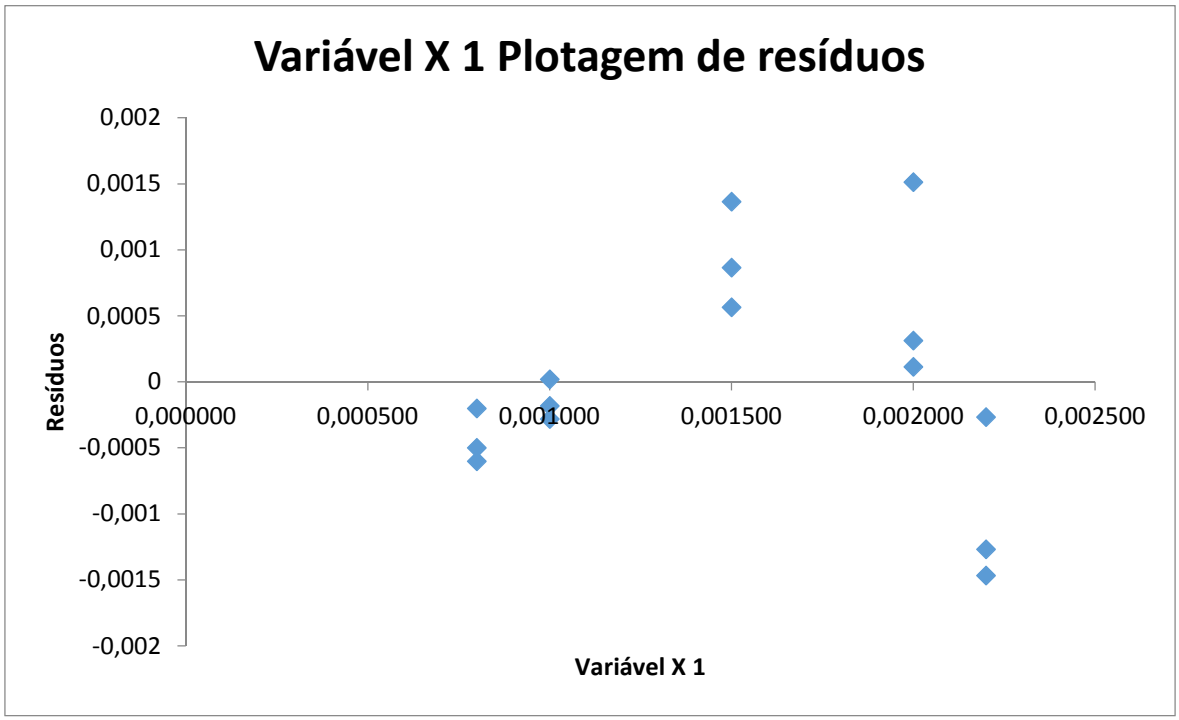

Figura 74. Avaliação da dispersão dos resíduos da curva analítica para a impureza Composto Relacionado A (CRA). Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel:

gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

No teste de linearidade para a avaliação das impurezas, nos limites de notificação ao limite de qualificação não foi observado qualquer sinal de detecção no detector CAD; que de acordo com Vervoot et al, 2008 tal detector tem uma sensibilidade menor que o detector UV, quando os compostos apresentam grupos cromóforos.

De acordo com os resultados de linearidade, pode-se inferir que o método se apresenta linear nas faixas de concentrações testadas para o teor em ambos os detectores, já para o nível de quantificação de impurezas apenas o detector DAD se mostrou sensível às baixas concentrações.

Na concentração de 0,0008 mg/mL, no detector DAD, o método apresentou uma relação de sinal/ruído de 20, sendo ainda adequado para condições de quantificação.

Foi avaliado também alguns parâmetros no CAD como filtro e ganho, com o objetivo de melhorar a resposta dos picos cromatográficos, os quais podem ser variados de 0 a 7 para o primeiro parâmetro e 1 pA a 500 pA para o segundo. O resultado mais satisfatório foi obtido com filtro 7 e ganho de 100 pA, por apresentar menor ruído na linha de base e melhor definição dos picos cromatográficos.

6.1.2.3. Avaliação da exatidão

A exatidão foi avaliada nos níveis das impurezas, com alvo a 0,001 mg/mL e 0,002 mg/mL, e no nível do teor a 1,0 mg/mL. De acordo com os resultados apresentados nas tabelas 17 a , verifica-se uma exatidão satisfatória em todos os níveis avaliados, seja no detector DAD 238 nm ou no CAD.

Tabela 17. Avaliação da exatidão no nível do Teor – DAD λ 238 nm. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

Avaliação no nível Teor DAD - λ 238 nm			
Nível (%)	**Concentração Teórica (mg/mL)**	**Concentração Experimental (mg/mL)**	**Recuperação (%)**
80%-1	0,793158	0,783862	98,8
80%-2	0,796763	0,793193	99,6
80%-3	0,794600	0,785512	98,9
100%-1	1,002263	1,010592	100,8
100%-2	1,009473	1,029091	101,9
100%-3	0,998658	1,012259	101,4
120%-1	1,189737	1,192610	100,2
120%-2	1,204158	1,199889	99,6
120%-3	1,201994	1,207461	100,5
Média das recuperações			**100,2**
Desvio padrão das recuperações			**1,1**

Tabela 18. Avaliação da exatidão no nível das impurezas – Alvo 0,001 mg/mL– DAD λ 238 nm. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

Avaliação no nível impurezas - Alvo 0,001 mg/mL DAD - λ 238 nm			
Nível (%)	**Concentração Teórica (mg/mL)**	**Concentração Experimental (mg/mL)**	**Recuperação (%)**
80%-1	0,000793	0,000777	98,0
80%-2	0,000797	0,000766	96,2
80%-3	0,000795	0,000772	97,1
100%-1	0,001002	0,000967	96,5
100%-2	0,001009	0,001010	100,0
100%-3	0,000999	0,000960	96,2
120%-1	0,001190	0,001169	98,2
120%-2	0,001204	0,001143	94,9
120%-3	0,001202	0,001175	97,8
Média das recuperações			**97,2**
Desvio padrão das recuperações			**1,5**

Tabela 19. Avaliação da exatidão no nível das impurezas – Alvo 0,002 mg/mL– DAD λ 238 nm. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

Avaliação no nível impurezas - Alvo 0,002 mg/mL DAD - λ 238 nm			
Nível (%)	**Concentração Teórica (mg/mL)**	**Concentração Experimental (mg/mL)**	**Recuperação (%)**
80%-1	0,001586	0,001558	98,2
80%-2	0,001594	0,001605	100,7
80%-3	0,001589	0,001569	98,7
100%-1	0,002005	0,002053	102,4
100%-2	0,002019	0,002034	100,7
100%-3	0,001997	0,002046	102,4
120%-1	0,002379	0,002411	101,3
120%-2	0,002408	0,002398	99,6
120%-3	0,002404	0,002406	100,1
Média das recuperações			**100,5**
Desvio padrão das recuperações			**1,5**

Tabela 20. Avaliação da exatidão no nível do Teor. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

Avaliação no nível do Teor - CAD			
Nível (%)	**Concentração Teórica (mg/mL)**	**Concentração Experimental (mg/mL)**	**Recuperação (%)**
80%-1	0,793158	0,803290	101,3
80%-2	0,796763	0,793194	99,6
80%-3	0,794600	0,799593	100,6
100%-1	1,002263	1,025987	102,4
100%-2	1,009473	1,015372	100,6
100%-3	0,998658	0,998106	99,9
120%-1	1,189737	1,204145	101,2
120%-2	1,204158	1,222154	101,5
120%-3	1,201994	1,203997	100,2
Média das recuperações			**100,8**
Desvio padrão das recuperações			**0,9**

6.1.2.4. Avaliação da precisão

Como se observa, nas tabelas 21 a 24, os resultados de precisão e precisão intermediária foram adequados, logo, o método pode ser considerado preciso nos níveis e detectores avaliados.

Tabela 21. Avaliação da precisão no nível do Teor – DAD λ 238 nm. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

Avaliação no nível Teor - DAD λ 238 nm		
Amostras	**Precisão 1 (%)**	**Precisão 2 (%)**
1	101,12	100,46
2	99,22	98,44
3	100,71	99,08
4	101,48	98,95
5	100,64	98,31
6	98,58	100,28
Média	100,29	99,25
DPR%$_{intra-dias}$	1,1	0,9
CV%$_{inter-dias}$	1,1	
F calculado	1,61	
F crítico	5,05	

Tabela 22. Avaliação da precisão no nível das impurezas – Alvo: 0,001 mg/mL – DAD λ 238 nm. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

Avaliação no nível das impurezas - 0,001 mg/mL - DAD λ 238 nm		
Amostras	**Precisão 1 (%)**	**Precisão 2 (%)**
1	101,10	98,51
2	97,65	97,14
3	101,97	101,36
4	97,92	96,95
5	95,48	98,51
6	98,78	98,71
Média	98,82	98,53
DPR%$_{intra-dias}$	2,4	1,6
CV%$_{inter-dias}$	2,0	
F calculado	2,27	
F críico	5,05	

Tabela 23. Avaliação da precisão no nível das impurezas – Alvo: 0,002 mg/mL – DAD λ 238 nm. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

Avaliação no nível das impurezas - 0,002 mg/mL - DAD λ 238 nm		
Amostras	**Precisão 1 (%)**	**Precisão 2 (%)**
1	99,25	97,49
2	101,78	98,66
3	100,95	100,88
4	98,83	101,51
5	97,14	100,95
6	97,68	97,33
Média	99,27	99,47
DPR%$_{intra-dias}$	1,8	1,9
CV%$_{inter-dias}$	1,8	
F calculado	1,07	
F crítico	5,05	

Tabela 24. Avaliação da precisão no nível do Teor. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

Avaliação no nível do Teor - CAD		
Amostras	**Precisão 1 (%)**	**Precisão 2 (%)**
1	100,74	99,09
2	98,11	100,94
3	101,44	102,45
4	98,56	101,11
5	102,57	99,16
6	98,75	101,48
Média	100,03	100,70
$DPR\%_{intra\text{-}dias}$	1,8	1,3
$CV\%_{inter\text{-}dias}$	1,6	
F calculado	1,85	
F crítico	5,05	

6.1.2.5. Avaliação da robustez

Pequenas variações durante a análise podem ocorrer, mas de acordo com os resultados apresentados nas figuras 75 a 77, verifica-se o método analítico ser robusto nos níveis avaliados, teor e impurezas, nos detectores DAD 238 nm e CAD.

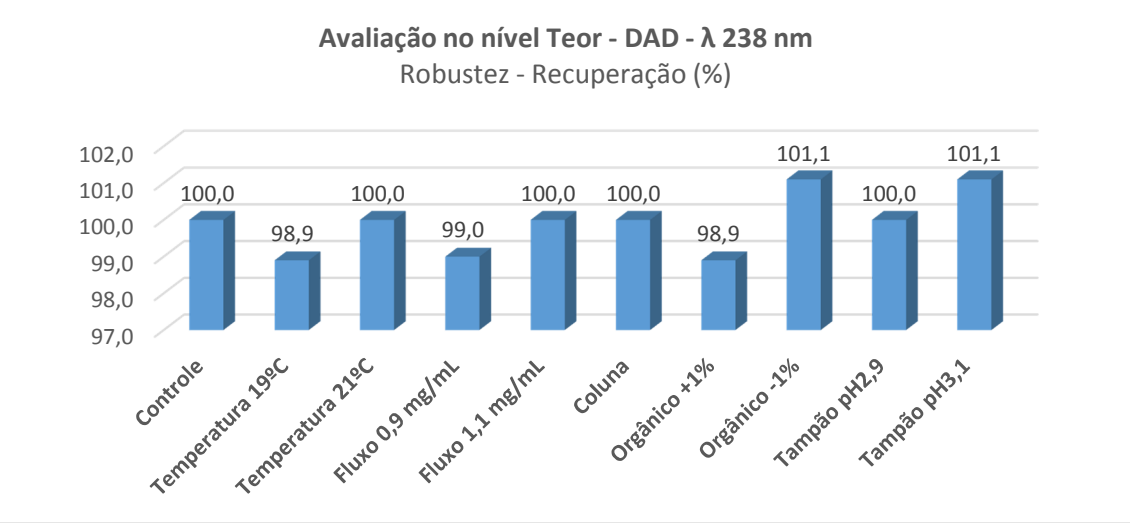

Figura 75. Avaliação da robustez no nível do teor. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

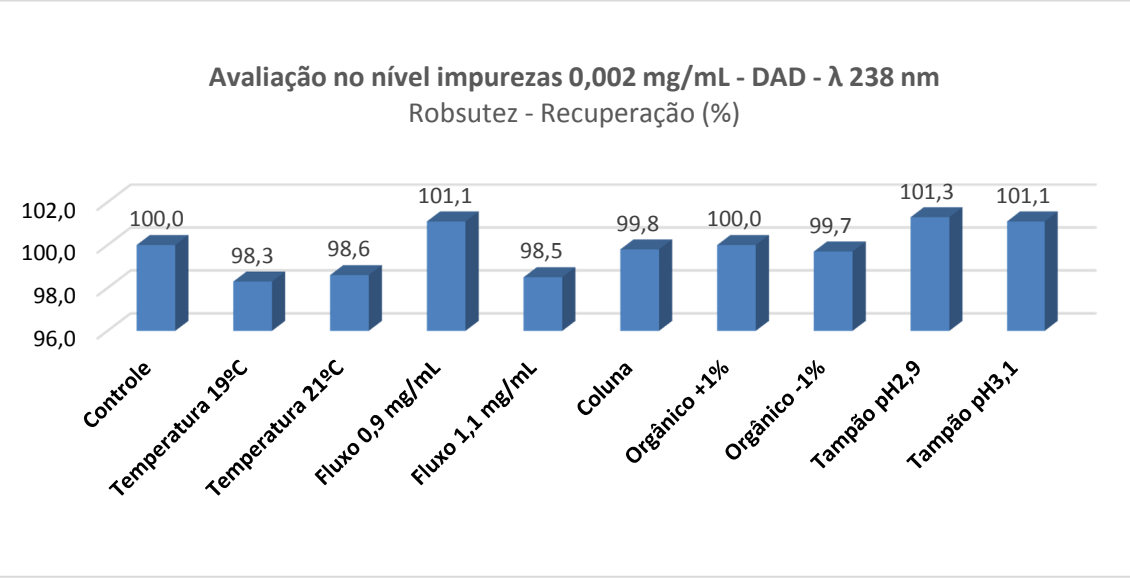

Figura 76. Avaliação da robustez no nível das impurezas. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0

mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção 238 nm, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

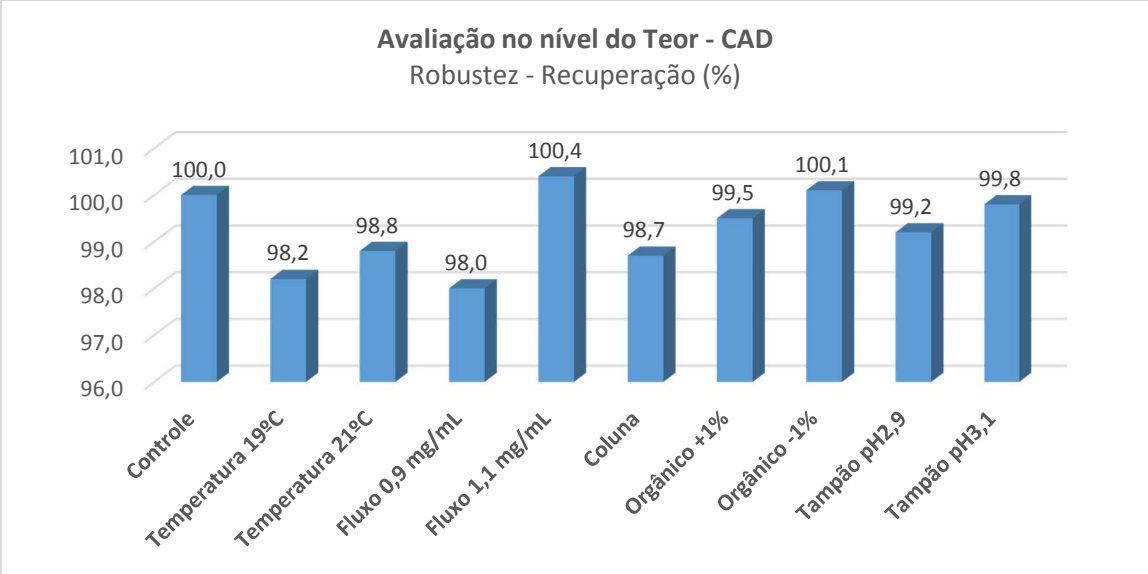

Figura 77. Avaliação da robustez no nível do teor. Condições: coluna Zorbax SB-phenyl (1,8 µm 4,6 x 50 mm), fase móvel: gradiente (minutos/ tampão pH3,0/ metanol/ acetonitrila v/v), vazão de 1,0 mL/min 0/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 10/20/60/20; vazão de 0,5 mL/min 10,1/ 20/60/20, vazão de 0,5 mL/min 13/75/15/10; vazão de 1,0 mL/min 13,1/75/15/10, vazão de 1,0 mL/min 15/75/15/10, vazão: 1,0 mL/min, detecção CAD, volume de injeção 2 µL e temperatura do forno 20ºC.

7. CONCLUSÃO FINAL

De acordo com os resultados obtidos, os métodos se mostram lineares, seletivos, exatos, precisos e robustos para a avaliação de teor (nos detectores DAD e CAD) e para as impurezas (no detector DAD).

O método mostrou maior sensibilidade no detector DAD do que no CAD, uma vez que as impurezas apresentam grupos cromóforos, mas o CAD ainda foi utilizado para acompanhar a formação de prováveis produtos de degradação durante o estudo de degradação forçada, os quais poderiam impactar no balanço de massas.

Durante o estudo de perfil de degradação, tanto o IFA como o produto terminado apresentaram maior degradação quando expostos sob condições de oxidação por peróxido de hidrogênio, hidrólise alcalina e ácida. Pois para se obter uma queda de 10 a 30%, teve-se que testar condições brandas devido a sensibilidade do anlodipino sob tais condições.

Não houve uma boa correlação entre a porcentagem de produtos de degradação formados e a queda do teor nos resultados do estudo de degradação forçada, logo, obteve-se diferenças significativas no balanço de massas.

Novas técnicas analíticas devem ser utilizadas para avaliar a formação de produtos de degradação voláteis ou semi-voláteis e a possível insolubilidade dos produtos de degradação formados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, Jailson Vieira; FERREIRA, Tassia Caroline; BONI, Thais Soto. **HPLC como ferramenta tecnológica computadorizada para analise cromatográfica no século XXI.** Disponível em: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAfxYoAH/hplc-revisao-final>. Acesso em: 11 maio 2015.

ALCÂNTARA, Francisco C. et al. **Testes de degradação forçada para fármacos e medicamentos.** Disponível em: <http://www.ufrgs.br/ppgcf/escoladeverao/wp-content/uploads/2016/02/TESTES-DE-DEGRADAÇÃO-FORÇADA-PARA-FARMACOS-E-MEDICAMENTOS-2013.pdf>. Acesso em: 01 maio 2016.

ALMELING, Stefan; ILKO, David; HOLZGRABE, Ulrike. Charged aerosol detection in pharmaceutical analysis. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis,** [s.l.], v. 69, p.50-63, out. 2012. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2012.03.019.

ANSARI, Khalid A.; PAGAR, Kunai P.; VAVIA, Pradeep R. Development and validation of HPLC method for the determination of S (-) Amlodipine Besylate and its related substance in tablet formulation by using chiral separation. **Asian Journal of Biomedical & Pharmaceutical Sciences.** v. 2 (12), p. 60-64, out, 2012. http://dx.doi.org/10.15272/ajbps.v2i12.98.

ARGENTON, Ayrton. Conceitos fundamentais de Cromatografia a líquido de Alto Desempenho (HPLC). Conselho Regional de Química IV Região, São José do Rio Preto, p. 1-146, 2010. Disponível em:< http://www.crq4.org.br/sms/files/file/conceitos_hplc_2010.pdf>. Acesso em 24 de julho de 2016.

BAERTSCHI, Steven W. (Ed.). **Pharmaceutical Stress Testing:** Predicting Drug Degradation. Indianápolis: Taylor&francis; 2005.

BAERTSCHI, Steven W. et al. Assessing mass balance in pharmaceutical drug products: New insights into an old topic. **Trac Trends In Analytical Chemistry,** [s.l.], v. 49, p.126-136, set. 2013. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2013.06.006.

BORGES, Endler Marcel; GORAIEB, Karen; COLLINS, Carol H.. O desafio de analisar solutos básicos por cromatografia líquida em modo reverso: algumas alternativas para melhorar as separações. **Química Nova,** [s.l.], v. 35, n. 5, p.993-1003, 2012. FapUNIFESP (SciELO). http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422012000500024.

BRASIL (1). Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Guia para obtenção do perfil de degradação, e identificação e qualificação de produtos de degradação em**

medicamentos. 2015. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/b4a318804ade24a6a8d9e8a0b2a25178/Perfil+e+produtos+de+degradação+em+medicamentos.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 15 maio 2016.

BRASIL. Consulta Pública nº 68, de 29 de agosto de 2014. **Proposta de Guia Para Obtenção do Perfil de Degradação, Identificação e Qualificação de Produtos de Degradação**. Brasília, DF, 01 set. 2014. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/11674b00455047269157d7aa67d7913d/Consulta+Pública+n°+68+SUMED.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 09 maio 2015.

BRASIL (2). Resolução da Diretoria Colegiada nº 53, de 04 de dezembro de 2015. **Estabelece Parâmetros para a Notificação, Identificação e Qualificação de Produtos de Degradação em Medicamentos Com Substâncias Ativas Sintéticas e Semissintéticas Como Novos, Genéricos e Similares, e Dá Outras Providências**. Brasília, DF, 08 dez. 2015. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/01e88b004addf939a81ce8a0b2a25178/Despacho_Prorroga+Prazo_CP_87_2015.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 01 mar. 2016.

BRASIL. Resolução nº 01, de 29 de julho de 2005**. Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade**. Brasília, DF, 01 ago. 2005. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/legis/01_05_re_comentada.pdf>. Acesso em: 10 maio 2015.

BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia Para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**. Brasília, DF, 02 jun. 2003. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publicação+do+Guia+para+validação+de+métodos+analíticos+e+bioanalíticos.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 09 maio 2015.

CADILA HEALTHCARE LIMITED. **Common technical document active substance master file applicants part for amlodipine besilate.** Ankleshwar: Zydus, 2015.

CHEMAXON (Org.). **Chemicalize.org.** Disponível em: <http://www.chemicalize.org>. Acesso em: 15 maio 2017.

CIONE, Ana Paola; TONHI, Edivan; SILVA, Paulo. **Stability Indicating Methods.** Disponível em: <http://cdn.intechweb.org/pdfs/23465.pdf>. Acesso em: 10 maio 2015.

COLLINS, Carol.; BRAGA, Gilberto L., BONATO, Pierina S. Fundamentos da cromatografia. 1ed. Campinas, SP: Editora Unicamp, 453p. 2007.

DANTE MARCELO A. GIORGI (Ed.). **Diretrizes Brasileiras de Hipertensão VI.** Disponível em: <http://www.sbh.org.br/pdf/diretrizes_final.pdf>. Acesso em: 10 maio 2015.

DEGANI, Ana Luiza; CASS, Quesia B.; VIEIRA, Paulo C.. **Cromatografia um breve ensaio.** 7. ed. São Paulo: Química Nova, 1998. Disponível em: <http://zeus.qui.ufmg.br/~valmir/Artigo_Cromatografia.pdf>. Acesso em: 10 maio 2016.

DONADUZZI, Luiz. **Bula - Besilato de anlodipino.** Disponível em: <http://www.medicinanet.com.br/bula/5713/besilato_de_anlodipino.htm>. Acesso em: 01 fev. 2016.

EDQM (Org.). **European Pharmacopoeia.** 8. ed. Strasbourg: Edqm, 2014.

ERANKI, Rama Joga Venkata et al. New Stability Indicating Method for Quantification of Impurities in Amlodipine and Benazepril Capsules by Validated HPLC.**American Journal Of Analytical Chemistry,** [s.l.], v. 04, n. 12, p.715-724, 2013. Scientific Research Publishing, Inc,. http://dx.doi.org/10.4236/ajac.2013.412086.

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DO PORTO (Org.).**Farmacologia dos canais iónicos. Antagonistas dos canais de cálcio.** Disponível em: <http://medicina.med.up.pt/farmacologia/pdf/Canais_ionicos_BEC.pdf>. Acesso em: 07 mar. 2016.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for industry:** Drug Stability Guidelines. 2008. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/animalveterinary/guidancecomplianceenforcement/guidanceforindustry/ucm051556.pdf>. Acesso em: 15 maio 2016.

GALCHIMIA (Espanha). **Certificado de análise.** Coruna: Galchimia, 2015.

GIORGETTI, Leandro. **Desenvolvimento e caracterização de minicomprimidoos contendo besilato de anlodipino.** 2012. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Produção e Controle de Medicamentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

GONÇALVES, Kairo Henrique Elias. E**studos de degradação forçada de fármacos fluoroquinolínicos assistida por irradiação micro-ondas.** 2014. 78 f. Dissertação (Mestrado)

- Curso de Ciências Exatas e Tecnológicas, Ciências Moleculares, Universidade Estatual de Gioás, Anápolis, 2014.

GUMUSTAS, Mehmet; OZKAN, Sibel A.. A Validated Stability-Indicating RP-LC Method for the Simultaneous Determination of Amlodipine and Perindopril in Tablet Dosage Form and Their Stress Degradation Behavior Under ICH-Recommended Stress Conditions. **Journal Of Aoac International,** [s.l.], v. 96, n. 4, p.751-757, 1 jul. 2013. The Journal of AOAC International. http://dx.doi.org/10.5740/jaoacint.11-010.

ITO, Katia Nami. **Avaliação da estabilidade e desenvolvimento de formulações para o complexo benznidazol-β-ciclodextrina**. 2012. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Produção e Controle de Medicamentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

JANKOVICS, Péter et al. Amlodipine Besilate Screening in Pharmaceutical Preparations by CE. **Chroma,** [s.l.], v. 68, n. 1, p.43-48, 17 abr. 2008. Springer Science + Business Media. http://dx.doi.org/10.1365/s10337-008-0620-8.

LABMASS. **Estudo de caracterização e padronização de fármacos**: Besilato de anlodipino. Campinas: Labmass Laboratory, 2015.

LEITE, Helen Dutra. **Métodos indicativos de estabilidade para determinação do besilato de anlodipino, nifedipino e nimodipino considerados inibidores do canal de cálcio.** 2015. 104 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Fármacos e Medicamentos, Área de Produção e Controle Farmacêuticos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

MOLCAN CORPORATION (Org.). **Amlodipine.** Richmond Hill: Molcan Corporation, 2014. Disponível em: <http://www.molcan.com/category/138>. Acesso em: 15 abr. 2016.

NOVÁKOVÁ, Lucie et al. Comparison of UV and charged aerosol detection approach in pharmaceutical analysis of statins. **Talanta,** [s.l.], v. 78, n. 3, p.834-839, 15 maio 2009. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2008.12.057.

OLIVEIRA, Flávia. **57,4 milhões de brasileiros têm pelo menos uma doença crônica.** Disponível em: <http://www.blog.saude.gov.br/index. php/34861-57-4-milhoes-de-brasileiros-tem-pelo-menos-uma-doenca-cronica>. Acesso em: 10 maio 2015.

PINHEIRO, Pedro. **REMÉDIOS PARA PRESSÃO ALTA – HIPERTENSÃO.**Disponível em: <http://www.mdsaude.com/2013/12/remedios-pressao-alta.html>. Acesso em: 15 maio 2015.

PINTO, Fernando et al. **Estudo da prevalência, conhecimento, tratamento e controle da hipertensão arterial e do consumo de sal em portugal; evolução ao fim de uma década: estudo physa.** Disponível em: <http://cientifico.cardiol.br/cardiosource2/hipertensao/int_artigo21.asp?cod=661>. Acesso em: 09 maio 2015.

PORTAL BRASIL. Hipertensão atinge mais de 30 milhões de pessoas no País. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/saude/2015/04/hipertensao-atinge-mais-de-30-milhoes-de-pessoas-no-pais>. Acesso em: 10 maio 2015.

RAGHAM, Pramod Kumar; CHANDRASEKHAR, Kothapalli B.. Development and validation of a stability-indicating RP-HPL C-CAD method for gabapentin and its related impurities in presence of degradation products. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis,** [s.l.], v. 125, p.122-129, jun. 2016. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2016.03.035.

SANTOS NETO, Álvaro José dos. **Problemas com o formato dos picos em cromatografia líquida.** Alfenas: Scientia Chromatographica, 2010. Disponível em: <http://www.scientiachromatographica.com/files/v2n1/v2n1a6.pdf>. Acesso em: 15 abril 2016.

SQUIBB, Anthony W. et al. Application of parallel gradient high performance liquid chromatography with ultra-violet, evaporative light scattering and electrospray mass spectrometric detection for the quantitative quality control of the compound file to support pharmaceutical discovery. **Journal Of Chromatography A,** [s.l.], v. 1189, n. 1-2, p.101-108, maio 2008. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2007.11.017.

STENGER, Fernanda Cristina. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE indicativa de estabilidade do cloridrato de metformina em comprimidos e estudo de citotoxicidade dos produtos de degradação.** 2011. 124 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Produtos Naturais e Substâncias Bioativas, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2011. Disponível em: <http://siaibib01.univali.br/pdf/Fernanda Cristina Stenger.pdf>. Acesso em: 10 maio 2015.

SZABÓ, L. et al. Spectroscopic and theoretical study of amlodipine besylate. **Journal Of Molecular Structure**, [s.l.], v. 924-926, p.385-392, abr. 2009. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2009.02.003.

THE INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. **Quality Guidelines.** Disponível em: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>. Acesso em: 10 abr. 2016.

U.S. PHARMACOPEIAL CONVENTION (Org.). **USP 39 - NF 34.** Disponível em: <http://www.uspnf.com/uspnf/pub/index?usp=39&nf=34&s=0&officialOn=May 1, 2016>. Acesso em: 15 maio 2016.

VERVOORT, N.; DAEMEN, D.; TÖRÖK, G.. Performance evaluation of evaporative light scattering detection and charged aerosol detection in reversed phase liquid chromatography. **Journal Of Chromatography A,** [s.l.], v. 1189, n. 1-2, p.92-100, maio 2008. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.111. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967307018985?np=y>. Acesso em: 10 abr. 2016.

WATERS CORPORATION. c2012. Disponível em:< http://www.waters.com/waters/pt_BR/HPLC---High-Performance-Liquid-Chromatography/nav.htm?locale=pt_BR&cid=10048919>. Acesso em: 15/04/2016.

WHO EXPERT COMMITTEE (Org.). **WHO Tecnical Report Series 929.** 39 ed. Geneva: Who Publications, 2005. Disponível em: <http://apps.who.int/prequal/info_general/documents/trs929/who_trs_929.pdf>. Acesso em: 01 maio 2016.

WISHART RESEARCH GROUP. **Drug Bank:** Amlodipine. Disponível em: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00381>. Acesso em: 15 abr. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (Comp.). **A global brief on hypertension: Silent killer, global public health crisis.** Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/ 10665/79059/1/WHO_DCO_WHD_2013.2_eng.pdf? ua=1>. Acesso em: 10 maio 2015.

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9139 - 9480375/1 - Livia dos Santos Ichinose

Email:	ichinose_livia@yahoo.com.br (favor indicar um email usp.br o mais rápido possível)
Data de Nascimento:	19/11/1986
Cédula de Identidade:	RG - 40.107.356.7 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Farmacêutico-Bioquímico - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - São Paulo - Brasil - 2011

Curso:	Mestrado
Programa:	Fármaco e Medicamentos
Área:	Produção e Controle Farmacêuticos
Data de Matrícula:	03/07/2015
Início da Contagem de Prazo:	03/07/2015
Data Limite para o Depósito:	03/01/2018
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Erika Rosa Maria Kedor - 03/07/2015 até o presente. Email: ermkedor@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 03/07/2015
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 24/08/2016
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 03/07/2015

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2017
Impresso em: 12/12/2017 17:56:33

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9139 - 9480375/1 - Livia dos Santos Ichinose

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5777-3/5	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos I	13/08/2015	25/11/2015	45	3	80	B	N	Concluída
QFL5947-2/4	Conceitos Básicos de Espectroscopia (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	24/08/2015	06/12/2015	150	10	100	B	N	Concluída
MPT6006-2/1	Planejamento e Otimização de Experimentos (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	15/10/2015	11/11/2015	60	4	100	A	N	Concluída
QFL5726-6/1	Técnicas Espectroscópicas Aplicadas às Determinações de Baixas Concentrações de Elementos (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	15/08/2016	23/10/2016	120	8	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	25
Estágios:			
Total:	0	25	25

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2017
Impresso em: 12/12/2017 17:56:33

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9139 - 9480375/1 - Livia dos Santos Ichinose

Comissão julgadora da dissertação de mestrado:

NUSP	Nome	Vínculo	Função
33633	Erika Rosa Maria Kedor	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2017
Impresso em: 12/12/2017 17:56:33

Currículo Lattes

Livia dos Santos Ichinose

Endereço para acessar este CV:http://lattes.cnpq.br/2792341597808487

Última atualização do currículo em 15/06/2016

Resumo informado pelo autor

Possui graduação em Farmácia e Bioquímica pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (2011). Atualmente é analista de desenvolvimento de métodos analíticos pleno - Eurofarma Laboratórios SA. Tem experiência na área de Farmácia, com ênfase em Pesquisa e Desenvolvimento de métodos analíticos. Em setembro de 2013 obteve titulação de especialista em Análise Instrumental Avançada pela Faculdade Oswaldo Cruz. Em julho de 2015 iniciou o mestrado acadêmico na Universidade de São Paulo na área de Produção e Controle de medicamentos e cosméticos.

(Texto informado pelo autor)

Dados pessoais

Nome Livia dos Santos Ichinose

Nascimento 19/11/1986 - Brasil

CPF 332.173.428-10

Formação acadêmica/titulação

2015 Mestrado em Fármacos e Medicamentos.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
Título: Desenvolvimento e validação de método analítico indicativo de estabilidade por CLAE-DAD-CAD para besilato de anlodipino e seus produtos de degradação
Orientador: Profa. Dra. Erika Rosa Maria Kedor

2011 - 2013 Especialização em Análise Instrumental Avançada.
Faculdades Oswaldo Cruz, FOC, Sao Paulo, Brasil
Título: AVALIAÇÃO DAS FASES ESTACIONÁRIAS HÍBRIDAS E MONOLÍTICAS USADAS NA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA NA ÁREA FARMACÊUTICA
Orientador: Profa. Dra. Sonia Aparecida de Andrade Chudzinski

2005 - 2011 Graduação em Farmácia e Bioquímica.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil, Ano de obtenção: 2011

Formação complementar

2016 - 2016 Curso de curta duração em Caracterização de biofármacos. (Carga horária: 8h).
Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, CNPEM, Campinas, Brasil

2016 - 2016 Curso de curta duração em Caracterização de produtos de degradação. (Carga horária: 8h).
Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, CNPEM, Campinas, Brasil

2015 - 2015 Curso de curta duração em Filtração analítica. (Carga horária: 2h).
Merck Millipore, MERCK MILLIPORE, Brasil

2015 - 2015 Curso de curta duração em Workshop – Fundamentos de estatística aplicada à avaliação de processos far. (Carga horária: 16h).
Fundação Instituto de Pesquisas Farmacêuticas, FIPFARMA, Sao Paulo, Brasil

2015 - 2015 Curso de curta duração em Espectrometria de massas. (Carga horária: 31h).
U.S. Pharmacopeial Convention, USP, Brasil

2014 - 2014 Curso de curta duração em Segurança em laboratórios físico-químicos e conceitos do GHS. (Carga horária: 8h).
IsoLab, ISOLAB, Brasil

2013 - 2013 Curso de curta duração em Sistema de classificação biofarmacêutica. (Carga horária: 8h).
Fundação Instituto de Pesquisas Farmacêuticas, FIPFARMA, Sao Paulo, Brasil

2012 - 2012 Curso de curta duração em Filtração e Purificação de Água para Laboratório. (Carga horária: 2h).
Merck Millipore, MERCK MILLIPORE, Brasil

2011 - 2011 Curso de curta duração em Análise voltamétrica. (Carga horária: 10h).
Metrohm Pensalab Instrumentacão Analitica , METROHM, Sao Paulo, Brasil

2011 - 2011 Curso de curta duração em Análise por injeção em fluxo. (Carga horária: 8h).
Metrohm Pensalab Instrumentacão Analitica , METROHM, Sao Paulo, Brasil

2006 - 2006 Curso de curta duração em Fármacos de Origem Natural. (Carga horária: 12h).
Jornada Farmacêutica da UNESP, JFU, Brasil

2006 - 2006 Curso de curta duração em Cosmetologia: Beleza e Inovações. (Carga horária: 36h).
Jornada Farmacêutica da UNESP, JFU, Brasil

2005 - 2005 Curso de curta duração em Células Tronco e o futuro da terapia. (Carga horária: 8h).
Jornada Farmacêutica da UNESP, JFU, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

2015 - Atual Vínculo: Aluno , Enquadramento funcional: Aluno de pós-graduação, Regime: Parcial

Atividades

06/2015 - Atual Pesquisa e Desenvolvimento, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Fármacos e Medicamentos

Linhas de pesquisa:
Desenvolvimento e validação de métodos indicativos de estabilidade

2. Eurofarma laboratórios SA - EUROFARMA

Vínculo institucional

2013 - Atual Vínculo: Empregado , Enquadramento funcional: Analista de Desen de métodos analíticos Pleno

Atividades

08/2013 - Atual Pesquisa e Desenvolvimento, Desenvolvimento de métodos analíticos - Inovação

Linhas de pesquisa:
Desenvolvimento e validação de métodos analíticos de teor, dissolução e produtos de degradação para produtos novos

3. Grupo EMS Sigma Pharma - EMS

Vínculo institucional

2010 - 2013 Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: Pesquisador pleno , Carga horária: 40, Regime: Integral

4. Droxter Ind, Comércio e Participações Ltda - DROXTER

Vínculo institucional

2010 - 2010 Vínculo: Estagiário , Enquadramento funcional: Estagiário , Carga horária: 30, Regime: Parcial

5. Marjan Indústria e Comércio - MIC

Vínculo institucional

2009 - 2010 Vínculo: Estagiário , Enquadramento funcional: Estagiário , Carga horária: 30, Regime: Parcial

Linhas de pesquisa

1. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos de teor, dissolução e produtos de degradação para produtos novos
2. Desenvolvimento e validação de métodos indicativos de estabilidade

Producão

Produção técnica

Demais produções técnicas

1. **ICHINOSE, L. S.**
Programação de Medicamentos, 2008. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)
2. **ICHINOSE, L. S.**
Antidiabéticos e Imunossupressores, 2007. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 12/12/2017 às 18:05:30.