

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Métodos indicativos de estabilidade para determinação do besilato de anlodipino,
nifedipino e nimodipino considerados inibidores do canal de cálcio

Helen Dutra Leite

Versão corrigida

Tese para obtenção do grau de
Doutor

Orientadora:

Dra Érika Rosa Maria Kedor-Hackmann

São Paulo
2014

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Leite, Helen Dutra

L533m Métodos indicativos de estabilidade para determinação do
besilato de anlodipino, nifedipino e nimodipino considerados
inibidores do canal de cálcio / Helen Dutra Leite. -- São Paulo,
2014.

104p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.

Orientador: Kedor-Hackmann, Érika Rosa Maria

1. Fármaco : Controle de qualidade 2. Polimorfismo 3. Análise
térmica I. T. II. Kedor-Hackmann, Érika Rosa Maria, orientador.

615.19015 CDD

Helen Dutra Leite

Métodos Indicativos de estabilidade para determinação do besilato de anlodipino,
nifedipino e nimodipino considerados inibidores do canal de cálcio

Comissão Julgadora

da

Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Érika Rosa Maria Kedor-Hackmann
orientador/presidente

1o. examinador

2o. examinador

3o. examinador

4o. examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2014.

*Agradeço à Deus pois
sem ele nada é possível*

Aos meus pais, Temistocles Leite (in memoriam)

e a minha mãe, por toda minha educação e construção do meu conhecimento pois sem eles eu não teria chegado até aqui.

A minha amada família que soube respeitar e compreender a minha ausência durante todo esse tempo.

Mãe (Maria da Penha Dutra)

Irmã (Luciene), Sérgio (cunhado),

sobrinhos (Sérgio e Luana)

*À minha querida orientadora Profa. Érika Rosa Maria Kedor-Hackmann pelos ensinamentos,
apoio, paciência e dedicação
dispensados que tornou possível
a realização deste sonho.*

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-Graduação de Fármaco e Medicamentos do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas Universidade de São Paulo.

À Profa. Dra. Maria Inês Rocha Miritello Santoro, pela participação da banca de qualificação, pelos ensinamentos, oportunidade de aprendizado e sugestões, muito importantes para realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Humberto Gomes Ferraz pelo apoio na realização das análises

Ao Dr. Flávio Machado S. Carvalho, pelos ensinamentos de difração de Raio X

Aos Professores Maria Aurora Prado, Anil Kumar Singh, pelo apoio.

A Professora Dra Lucildes Pita Mercuri pela valiosa participação na Banca de qualificação

Aos queridos alunos do Laboratório de Controle Físico-Químico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo: Viviane, Cintia, Pedro, Claudia, Grazielle, Angel, Cibele, Daniela, Joyce, Mariana e Vanessa.

Aos funcionários, Iria da Silva, Davi, Elaine Ychico, Raquel, Leila Bonadio e Adriana

Ao colega João Roberto do Carmo pelo apoio na realização das análises e valiosas informações

Ao colega Alexandre Gomes Rodrigues que mesmo de longe, pode acrescentar muito em meu trabalho

A farmadoro pelo fornecimento dos insumos

Enfim, a todos que contribuíram para realização deste trabalho o meu muito

obrigada!

*Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não
teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar.*

Mesmo as críticas nos auxiliam muito”

Chico Xavier

RESUMO

Leite, H.D. **Métodos indicativos de estabilidade para determinação do besilato de anlodipino, nifedipino, e nimodipino considerados inibidores do canal de cálcio.** 104 p. 2014. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas-Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A hipertensão é uma doença crônica não transmissível e mais freqüente na população sendo o principal fator de risco para complicações cardiovasculares, tais como acidente vascular cerebral e infarto agudo do miocárdio. Na presente pesquisa estão sendo estudados os fármacos utilizados no tratamento da hipertensão mais especificamente, os bloqueadores do canal de cálcio do grupo diidropiridínicos: besilato de anlodipino, nifedipino e nimodipino. O objetivo desse trabalho foi verificar a estabilidade intrínseca dos fármacos besilato de anlodipino, nifedipino e nimodipino, para isto foram utilizadas as seguintes técnicas: testes indicativos de estabilidade utilizando as técnicas de espectrofotometria na região do Ultravioleta/Visível (UV/VIS) e Cromatografia em fase Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Termogravimetria/ Termogravimetria Derivada (TG/DTG), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Difração de Raios X (DRX), Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Para o fármaco besilato de anlodipino (AB) pelo método de degradação forçada, analisado por espectrofotometria no UV/VIS, as condições para a análise espectrofotométrica foram metanol e água a uma proporção de (5:45 v/v) e a segunda diluição com água. A leitura foi efetuada a 364,4nm. A linearidade foi estabelecida na faixa de 40,0-65,0 µg/mL e o coeficiente de correlação foi (r) 0,9992. O método cromatográfico, mostrou o diferente comportamento das substâncias nifedipino e nimodipino diante dos meios básicos, ácido, neutro e oxidativo. As condições para a substância nifedipino foram coluna LiChrospher®100 RP-18 (5µm) Merck® fase móvel constituída por metanol e água (45:55v/v), fluxo 1.0 mL/min, tempo de retenção 5,1min, detecção UV a 234nm e vazão de 1.0 mL/min. Foi obtida uma linearidade no intervalo de 5.0-55.0 µg/mL coeficiente de correlação (r) =0,9964. E para a substância nimodipino foram coluna LiChrospher®100 RP-18 (5µm) Merck® fase móvel constituída por acetonitrila e água (55:45v/v), fluxo 1.0mL/min, tempo de retenção 5,8 min, detecção UV a 235 nm e vazão de 1.0mL/min. Foi obtida uma linearidade no intervalo de 5.0-55.0 µg/mL coeficiente de correlação (r) =0,9964. Os resultados obtidos das curvas TG/DTG e DSC mostraram o perfil da decomposição térmica das substâncias estudadas pela Calorimetria Exploratória Diferencial. A análise dos resultados de DRX e DSC mostraram que não há evidências de polimorfismo nessas substâncias. No entanto nas análises de Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) não foram encontradas diferenças significativas na matéria-prima e no padrão de referência. As análises de MEV permitiram observar a cristalinidade das substâncias estudadas.

Palavras-chave: Polimorfismo, análise térmica, degradação forçada.

ABSTRACT

Leite, H.D. **Determination of calcium channel blockers amlodipine besylate, nifedipine and nimodipine by stability assays.** 104 p. 2014. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas- Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Hypertension is the most frequent non-communicable chronic disease in the population being the main factor of risk for cardiovascular complications, such as stroke and acute myocardial infarction. In this work, active pharmaceutical ingredients used to treat hypertension were studied, more specifically the blockers calcium channel dihydropyridine group: amlodipine besylate, nifedipine and nimodipine. The aim of this study was to determine the intrinsic stability of amlodipine besylate, nifedipine and nimodipine. For this purpose the following stability test techniques were used: UV/VIS spectrophotometry and chromatography Net phase High Performance. Thermogravimetry/Derivative Thermogravimetry (TG/ DTG), Differential Scanning Calorimetry (DSC), X-Ray Diffraction (XRD), Fourier Transformed Infrared absorption (FTIR) and Scanning Electron Microscopy (MEV). For drug amlodipine besylate (AB) by forced degradation method analyzed by spectrophotometry UV/VIS spectrophotometric conditions for the analysis were methanol and water at a ratio (5:45v/v) and the second dilution with water. The reading was made at 364,4nm. The linearity was established in the range of 40.0 to 65.0 mg/mL and the correlation coefficient was (r) 0.9992. The chromatographic method showed different behavior of nifedipine and nimodipine substances on the basic means, acid, neutral and oxidative. The conditions for nifedipine were LiChrospher®100 RP-18 column (5µm) Merck® mobile phase consisting of methanol and water (45:55v/v), flow 1.0 mL/min, retention time 5,1min, UV detection at 234 nm and flow of 1.0 mL/min. Linearity was obtained within the range of 5.0-55.0 mg/mL correlation coefficient (r) = 0.9964. And for nimodipine the parameters were: LiChrospher®100 RP-18 column (5µm) Merck® mobile phase consisted of acetonitrile: water (55:45v/v), flow 1.0 mL/min, retention time 5,8min, UV detection at 235nm and flow of 1.0 mL/min. The linearity was obtained within the range of 5.0-55.0 mg/mL correlation coefficient (r) = 0.9964. The results of TG/DTG and DSC curves presented the profile of the thermal decomposition of the substances studied by DSC. The results of XRD and DSC presented no evidence of polymorphism in these analyzes, however, according to analyzes of absorption spectroscopy in the infrared (FTIR) there were no significant differences in the raw materials and standard reference. SEM analyzes allowed to observe the crystallinity of the studied substances.

Key words: polymorphism; thermal analysis; forced field analysis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do besilato de anlodipino* carbono quirálico.....	23
Figura 2 - Estrutura química do nifedipino	24
Figura 3 - Estrutura química do nimodipino	25
Figura 4- Curva analítica para determinação de besilato de anlodipino, nas concentrações de 40, 45, 50, 55, 60 e 65 µg/mL em metanol: água destilada (5:45v/v).Equação da reta $y= 0,0118x$ $R^2=0,999$	47
Figura 5 - Espectro de absorção, da solução padrão de besilato de anlodipino na concentração de 50 µg/mL submetida ao teste de degradação forçada com HCl 1 mol/L.....	49
Figura 6 - Espectro de absorção, da solução padrão de besilato de anlodipino na concentração de 50 µg/mL submetida ao teste de degradação forçada com NaOH 1 mol/L.....	50
Figura 7 - Espectro de absorção, da solução padrão de besilato de anlodipino na concentração de 50 µg/mL submetida ao teste de degradação forçada com 3% H ₂ O ₂	51
Figura 8 - Espectro de absorção, da solução padrão de besilato de anlodipino na concentração de 50 µg/mL dissolvido em metanol e diluído com água.	51
Figura 9 - Espectro de absorção, da solução padrão de nimodipino na concentração de 40 µg/mL em metanol e comprimento de onda 362 nm.....	52
Figura 10 - Curva analítica para determinação do nifedipino, nas concentrações de 5, 15, 25, 35, 45 e 55 µg/mL em metanol e água destilada (55:45 v/v).Equação da reta $y=89718x$ $R^2=0,992$	53
Figura 11 - Cromatograma de soluções contendo 15.0 µg/mL de nifedipino. Fase móvel metanol e água (50:50 v/v) Coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) Merck®, UV detecção a 235 nm vazão de 1.0 mL/min.....	55
Figura 12 - Cromatograma da solução contendo 25 µg/mL de nifedipino. Fase móvel metanol e água (45:55 v/v). Coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) Merck®, UV detecção a 235 nm vazão de 1.0 mL/min.....	55
Figura 13 - Curva analítica para determinação do nimodipino, nas concentrações de 5, 15, 25, 35, 45, e 55 µg/mL em fase móvel acetonitrila e água (55:45 v/v). Equação da reta $y= 11127x$ $R^2=0,995$	56
Figura 14 - Cromatograma de soluções contendo 40 µg/mL de nimodipino. Fase móvel acetonitrila e água (70:30 v/v). Coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) Merck®, UV detecção a 235 nm vazão de 1.0 mL/min.....	58
Figura 15 - Cromatograma de soluções contendo 25 µg/mL de nimodipino. Fase móvel acetonitrila e água (55:45 v/v). Coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) Merck®, UV detecção a 235 nm vazão de 1.0 mL/min.....	58
Figura 16 - Cromatograma de solução contendo 25.0 µg/mL de nifedipino em condições de estresse: hidrólise ácida. Condições cromatográficas: fase móvel: metanol e água (55:45 v/v). Coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) Merck®, UV detecção a 235 nm vazão de 1.0 mL/min.	59
Figura 17 - Cromatograma de solução contendo 25.0 µg/mL de nifedipino em condições de estresse: hidrólise alcalina. Condições cromatográficas: fase móvel: metanol e água (55:45 v/v). Coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) Merck®, UV detecção a 235 nm vazão de 1.0 mL/min.	60

Figura18 - Cromatograma de solução contendo 25.0 µg/mL de nifedipino em condições de estresse: oxidação 3% H ₂ O ₂ . Condições cromatográficas: fase móvel: metanol e água (55:45 v/v). Coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) Merck®, UV detecção a 235 nm vazão de 1.0 mL/min.	60
Figura 19 - Cromatograma de solução contendo 25.0 µg/mL de nifedipino em condições de estresse: H ₂ O meio neutro. Condições cromatográficas: fase móvel: metanol e água (55:45 v/v). Coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) Merck®, UV detecção a 235 nm vazão de 1.0 mL/min.	61
Figura 20 - Cromatograma de solução contendo 25.0 µg/mL de nimodipino em condições de estresse: hidrólise ácida. Condições cromatográficas: fase móvel: acetonitrila e água (55:45 v/v). Coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) Merck®, UV detecção a 235 nm vazão de 1.0 mL/min.	62
Figura 21 - Cromatograma de solução contendo 25.0 µg/mL de nimodipino em condições de estresse: hidrólise básica. Condições cromatográficas: fase móvel: acetonitrila e água (55:45 v/v). Coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) Merck®, UV detecção a 235 nm vazão de 1.0 mL/min.	62
Figura 22 - Cromatograma de solução contendo 25.0 µg/mL de nimodipino em condições de estresse: oxidação. Condições cromatográficas: fase móvel: acetonitrila e água (55:45 v/v). Coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) Merck®, UV detecção a 235 nm vazão de 1.0 mL/min.	63
Figura 23 - Cromatograma de solução contendo 25.0 µg/mL de nimodipino em condições de estresse: hidrólise neutra. Condições cromatográficas: fase móvel: acetonitrila e água (55:45 v/v). Coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) Merck®, UV detecção a 235 nm vazão de 1.0 mL/min.	63
Figura 25 - a) Sobreposição das curvas TG/DTG e DTA da amostra de nifedipino matéria-prima obtidas na razão de aquecimento 10°C.min ⁻¹ entre 25 a 600°C, atmosfera de nitrogênio: 100 mL.min ⁻¹ utilizando-se cadinho de alumínio. b) Curva DSC da amostra de nifedipino matéria-prima obtida por uma razão de aquecimento 10°C.min ⁻¹ entre 25 a 350°C, atmosfera dinâmica de nitrogênio: 50 mL.min ⁻¹	66
Figura 26 - a) Curvas TG/DTG e DTA da amostra de comprimido de nifedipino de 10 mg, obtida na razão de aquecimento 10°C.min ⁻¹ entre 25 a 600°C, atmosfera dinâmica de nitrogênio: 100 mL.min ⁻¹ utilizando-se cadinho de alumínio. b) Curva DSC da amostra de comprimido de nifedipino 10mg obtida por uma razão de aquecimento 10°C.min ⁻¹ entre 25 a 350°C, atmosfera dinâmica de nitrogênio: 50 mL.min ⁻¹	67
Figura 27 – a) Sobreposição das curvas TG/DTG e DTA da amostra de nifedipino em comprimido de 20 mg, obtida na razão de aquecimento 10°C.min ⁻¹ entre 25 a 600°C, atmosfera dinâmica de nitrogênio: 100 mL.min ⁻¹ utilizando-se cadinho de alumínio. b) obtida por uma razão de aquecimento 10°C.min ⁻¹ entre 25 a 350°C, atmosfera dinâmica de nitrogênio: 50 mL.min ⁻¹	68
Figura 28 – a) Sobreposição das curvas TG/DTG e DTA da amostra de nimodipino matéria-prima, obtida na razão de aquecimento 10°C.min ⁻¹ entre 25 a 600°C, atmosfera dinâmica de nitrogênio: 100 mL.min ⁻¹ utilizando-se cadinho de alumínio. b) Curva DSC da amostra padrão de nimodipino obtida por uma razão de aquecimento 10°C.min ⁻¹ entre 25 a 350°C, atmosfera dinâmica de nitrogênio: 50 mL.min ⁻¹	69
Figura 29 - Difrátogramas de raios X do besilato de anlodipino padrão temperatura de (2.000°- 40.000° passo de 0,010°), da celulose (4.020°- 40.000° passo de 0.020°), do comprimido de besilato de anlodipino marca A (2.000°- 100.004° passo de 0,020°) e do estearato de magnésio (2.020°- 40.000° passo de 0,020°).....	70
Figura 30 - Difrátogramas de raios X do nifedipino padrão temperatura de (2.000°- 40.000° passo de 0,010°) e nifedipino matéria-prima (2.000°- 40.000° passo de 0,010°).	71
Figura 31 - Difrátogramas de raios X do nifedipino padrão temperatura de (2.000°- 40.000° passo de 0,010°), da celulose (4.020°- 40.000° passo de 0.020°), do comprimido de nifedipino 20 mg marca A (2.000°- 100.004° passo de 0,020°) do estearato de magnésio (1854°- 39.844° passo de 0,020°) e do manitol.	72

Figura 32 - Difratoogramas de raios X do nifedipino padrão temperatura de (2.000°- 40.000° passo de 0,010°), da celulose (4.020°- 40.000° passo de 0.020°), do comprimido de nifedipino 20 mg marca A (2.000°- 100.004° passo de 0,020°) do estearato de magnésio (1854°- 39.844° passo de 0,020°) e da lactose.	72
Figura 33 - Difratoogramas de raios X do nimodipino padrão temperatura de (2.000°- 40.000° passo de 0,010°), da celulose (4.020°- 40.000° passo de 0.020°), do comprimido de nimodipino 30mg marca A (2.000°- 100.004° passo de 0,020°) e talco.	73
Figura 34 - Espectro de absorção na região do infravermelho do besilato de anlodipino padrão.	74
Figura 35 - Espectro de absorção na região do infravermelho do besilato de anlodipino padrão.	75
Figura 36 - Espectro de absorção na região do infravermelho do besilato de anlodipino matéria-prima	76
Figura 37 - Espectro de absorção na região do infravermelho do besilato de anlodipino comprimidos	77
Figura 38 - Espectro de absorção na região do infravermelho do nifedipino padrão	78
Figura 39 - Espectro de absorção na região do infravermelho do nifedipino padrão	79
Figura 40 - Espectro de absorção na região do infravermelho do nifedipino matéria- prima	79
Figura 41 - Espectro de absorção na região do infravermelho do nifedipino matéria- prima	80
Figura 42 - Espectro de absorção na região do infravermelho do nifedipino comprimidos	80
Figura 43 - Espectro de absorção na região do infravermelho do nifedipino comprimidos	81
Figura 44 - Espectro de absorção na região do infravermelho do nimodipino padrão	82
Figura 45 - Espectro de absorção na região do infravermelho do nimodipino padrão	83
Figura 46 - Espectro de absorção na região do infravermelho do nimodipino matéria-prima	84
Figura 47 - Espectro de absorção na região do infravermelho do nimodipino matéria-prima	85
Figura 48 - Espectro de absorção na região do infravermelho do nimodipino comprimidos	86
Figura 49 - Espectro de absorção na região do infravermelho do nimodipino comprimidos	87
Figura 50 - Micrografia (MEV) com aumento de 250x para o padrão besilato de anlodipino.	88
Figura 51 - Micrografia (MEV) com aumento de 250x para a matéria- prima besilato de anlodipino. .	89
Figura 52 - Micrografia (MEV) com aumento de 15000 vezes para o padrão nifedipino	89
Figura 53 - Micrografia (MEV) com aumento de 15000 vezes para matéria- prima nifedipino	90
Figura 54 - Micrografia (MEV) com aumento de 15000 vezes para o padrão nimodipino	91
Figura 55 - Micrografia (MEV) com aumento de 15000 vezes para matéria- prima nimodipino	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados experimentais da solução padrão besilato de anlodipino, utilizados na curva analítica pelo método espectrofotométrico.	47
Tabela 2 - Resultados experimentais das soluções de besilato de anlodipino 50 µg/mL utilizados para determinação da precisão do método espectrofotométrico metanol e água (5:95v/v) na primeira diluição e na segunda diluição somente água.	48
Tabela 3 - Resultados experimentais da solução padrão nifedipino, utilizados na curva analítica pelo método cromatográfico. Fase móvel metanol e água destilada (55:45 v/v). Coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) Merck®, UV detecção a 235 nm vazão de 1.0 mL/min.	53
Tabela 4 - Resultados experimentais das soluções da amostra nifedipino (A), utilizados para determinação da precisão do método cromatográfico. Fase móvel metanol e água (55:45 v/v). Coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) Merck®, UV detecção a 235 nm vazão de 1.0 mL/min.	54
Tabela 5 - Resultados experimentais das soluções da amostra de nimodipino 20 mg (c) utilizados para determinação da precisão do método cromatográfico fase móvel acetonitrila e água (55:45 v/v). Coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) Merck®, UV detecção a 235 nm vazão de 1.0 mL/min.	57
Tabela 6- Resultados experimentais da solução padrão nimodipino, utilizados na curva analítica pelo método cromatográfico. Fase móvel acetonitrila e água (55:45 v/v). Coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) Merck®, UV detecção a 235 nm vazão de 1.0 mL/min.	57
Tabela 7- Atribuições das principais bandas características do besilato de anlodipino.	74
Tabela 8- Atribuições das principais bandas características do Nifedipino.	78
Tabela 9- Atribuições das principais bandas características do Nimodipino.	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB	Besilato de Anlodipino
ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
°C	Grau Celsius
DRX	Difração de Raios X
DPR	Desvio Padrão Relativo
DSC	Differential scanning calorimetry
EPA	Environmental Protection Agency
FDA	Food and Drug Administration
FTIR	Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier
g	Grama
IR	Espectroscopia do Infravermelho
HPLC	High Performance/Pressure Liquide Chromatography
ISO/IEC	International Standardization Organization / international Electrotechnical Commission
meOH	Metanol
nm	nanômetros

MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mAU	Miliunidades de absorvância
µg	Micrograma
mL	Mililitro
pH	Logaritmo negativo da atividade do íon hidrogênio
DP	“Standard Deviation” (Desvio Padrão)
TEA	Trietilamina
USP	United States Pharmacopeia
UV-VIS	Ultravioleta/ Visível
®	Marca registrada
TG/DTG	Termogravimetria/ Termogravimetria derivada
λ	Comprimento de onda
µL	Microlitros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
1	REVISÃO DA LITERATURA.....	22
1.1	Bloqueadores dos canais de cálcio.....	22
	Classificação dos bloqueadores do canal de cálcio.....	22
1.2	Propriedades farmacológicas.....	23
1.2.1	Mecanismo de ação.....	23
1.3	Características dos fármacos.....	23
1.3.1	Besilato de anlodipino.....	23
1.3.2	Nifedipino.....	24
1.3.3	Nimodipino.....	25
1.4	Técnicas analíticas utilizadas na pesquisa.....	26
1.4.1	Espectrofotometria de absorção molecular no Ultravioleta/Visível (UV/Vis) 26	
1.4.2	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	27
1.4.3	Polimorfismo.....	28
1.4.4	Técnicas empregadas no estudo do polimorfismo.....	29
1.4.5	Análise Térmica.....	29
1.4.6	Difração de Raios X (DRX).....	30
1.4.7	Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	32
1.4.8	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	33

1.4.9	Teste de degradação forçada	33
2	OBJETIVOS	35
2.1	Geral	35
2.2	Específicos.....	35
3	JUSTIFICATIVA	36
4	MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1	Material	38
4.1.1	Solventes e soluções	38
4.1.2	Substâncias químicas de referência	38
4.1.3	Amostras comercializadas no Brasil	39
4.2	Equipamentos	39
4.3	Métodos	40
4.3.1	Teste de degradação forçada do besilato de anlodipino analisado por espectrofotometria	40
4.3.2	Espectrofotometria UV/Visível	41
4.3.3	Ensaio preliminares empregando a CLAE	41
4.3.4	Teste de degradação forçada do nifedipino analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	42
4.3.5	Teste de degradação forçada do nimodipino analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	42
4.3.6	Análise Térmica	43
4.3.7	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	45

4.3.8	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	45
5	RESULTADOS	46
5.1	Forma de análise dos resultados	46
5.1.1	Linearidade do besilato de anlodipino analisado por espectrofotometria ..	46
5.1.2	Precisão do besilato de anlodipino analisado por espectrofotometria	47
5.1.3	Teste de degradação forçada do besilato de anlodipino analisado por espectrofotometria.	48
5.1.5	Linearidade do nifedipino analisado por CLAE	52
5.1.6	Precisão do nifedipino analisado por CLAE	53
5.1.7	Linearidade do nimodipino analisado por CLAE	56
5.1.8	Precisão do nimodipino analisado por CLAE	56
5.1.9	Teste de degradação forçada do nifedipino analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	59
5.1.10	Teste de degradação forçada do nimodipino analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	61
5.2	Análise térmica.....	64
5.2.1	Caracterização das amostras dos fármacos por Termogravimetria (TG) /Termogravimetria derivada (DTG), Análise Térmica Diferencial (DTA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	64
5.3	Análise de difração de raio X	69
5.3.1	Besilato de anlodipino	70
5.3.2	Nifedipino	71
5.3.3	Nimodipino	73

5.4	Espectroscopia de Absorção na região do Infravermelho com Transformada De Fourier (FTIR).....	73
5.4.1	Besilato de anlodipino.....	74
5.4.2	Nifedipino.....	77
5.4.3	Nimodipino.....	82
5.5	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	87
5.5.1	Besilato de anlodipino.....	88
5.5.2	Nifedipino.....	89
5.5.3	Nimodipino.....	90
6	DISCUSSÃO.....	92
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	95
9	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	96
10	REFERÊNCIAS.....	97

1 INTRODUÇÃO

Os agentes anti-hipertensivos podem ser classificados de acordo com os seus locais ou mecanismos de ação (GILMAN, 1996). Os compostos utilizados no tratamento da hipertensão pertencem a quatro grandes grupos: fármacos que alteram a função do sistema nervoso simpático, fármacos que interferem no sistema renina-angiotensina-aldosterona, fármacos bloqueadores seletivos dos canais de cálcio e fármacos diuréticos (KOROLKOVAS, 2005). Neste trabalho será estudado o grupo dos bloqueadores do canal de cálcio.

A realização do teste de estresse, assim como o desenvolvimento do método analítico para a identificação e quantificação dos produtos de degradação é de extrema importância para as indústrias farmacêuticas, pois no momento do registro, pós-registro e renovação, o estudo de estresse, acompanhado de sua análise crítica deverá ser necessários (SILVA, 2009; SILVA, *et al*, 2014).

O estudo de degradação forçada é estudo que permite a geração de produtos de degradação através da exposição da substância ativa e produto acabado a condições de estresse, como por exemplo, luz, temperatura, calor, umidade, hidrólise ácida/ básica e oxidação, entre outras. Esse estudo possibilita o desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade com especificidade e seletividade adequada, bem como fornecer informações acerca das possíveis rotas de degradação de um determinado produto (BRASIL, 2013).

O ensaio de estresse é definido como degradação forçada que proporciona informação sobre as rotas da degradação e dos produtos que poderiam se originar durante o armazenamento do produto, tendo como objetivo buscar condições para degradar o princípio ativo em cerca de 10%, não mais que isto pois condições mais drásticas poderiam destruir o composto ou conduziriam degradações sem relevância (REYNOLDS, 2002).

Atualmente há uma tendência das indústrias químicas adotarem, para estudo de estabilidade de seus produtos, os Guias de Boas Práticas do International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH, que foram montados especificamente para produtos farmacêuticos (ORIQUNI, 2011).

Testes de estabilidade em produtos farmacêuticos produzem evidências sobre como a qualidade do produto varia com o tempo sob a influência destes fatores permitindo, assim, a determinação do prazo de validade e as recomendações de armazenamento (ICH, 2003).

Segundo Singh e colaboradores, 2012, demonstraram que a preocupação com impurezas e produtos de degradação em fármacos e excipientes tem sido constante no o setor farmacêutico. Desta forma, os estudos acerca destes compostos têm aumentado significativamente. Há legislações sobre o assunto em vários países, assim como o desenvolvimento de instrumentação analítica capaz avaliar a presença de impurezas.

Os fármacos estudados neste trabalho pertencem ao grupo dos bloqueadores seletivos do canal de cálcio. São assim chamados porque agem primariamente, embora não exclusivamente, inibindo fluxo de cálcio extracelular para o interior das células através dos canais das membranas. Desse bloqueio resultam a redução na concentração de cálcio intracelular e dilatação das artérias, arteríolas periféricas e dos vasos cerebrais (KOROLKOVAS, 2005).

Bloqueadores ou antagonistas dos canais de cálcio estão entre os mais amplamente utilizados na terapêutica no mundo inteiro. Eles exercem seus efeitos terapêuticos por bloqueio reversível dos canais, que podem ser do tipo L,T,N, P/Q e R, no sistema cardiovascular. Nos canais do tipo L a inativação ocorre com longa duração, o tipo T possui abertura transitória, o N ou neuronal com abertura intermediária, tipo P/Q com inativação ausente ou intermediária e tipo R com inativação permanente (LARINI, 2008).

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 BLOQUEADORES DOS CANAIS DE CÁLCIO

Das enfermidades crônicas consideradas de risco, a hipertensão arterial é uma das que mais acometem a população, sendo considerada como o mais importante problema de saúde pública nos países desenvolvidos (LUI, 2008).

A Metodologia analítica utilizada pelos centros habilitados para fiscalização e monitoração dos medicamentos comercializados é a de doseamento do princípio ativo e outras indicadas pelo fabricante ou a constante em farmacopéias. No entanto, poucas monografias existentes em farmacopéias incluem Metodologias para análise de produtos de degradação, e poucos fabricantes conhecem e desenvolvem metodologias validadas para detecção e quantificação desses produtos (BRASIL, 2003).

A necessidade de desenvolver Metodologias quantitativas indicadoras de estabilidade atende as diretrizes da “International Conference on Harmonization” (ICH) e da FDA (Guidance for industry, 2010; *INTERNACIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION*, 2005). A Farmacopéia dos Estados Unidos da América em seu capítulo “Estudos de Estabilidade durante a Fabricação” preconiza que as amostras retiradas durante o processo de fabricação devem ser analisadas por métodos quantitativos indicativos de estabilidade (USP, 34).

CLASSIFICAÇÃO DOS BLOQUEADORES DO CANAL DE CÁLCIO

Os bloqueadores do canal de cálcio possuem estruturas químicas diferentes, o que possibilita sua classificação em cinco grupos: fenilalquilaminas, diidropiridinas, benzotiazepinas, difenilpiperazinas, e diarilaminopropilaminas. Nesta pesquisa apenas o grupo das diidropiridinas, entre eles, os fármacos besilato de anlodipino nifedipino e nimodipino foram estudados (LARINI, 2008).

1.2 PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS

A despolarização das células do músculo liso vascular é dependente do influxo de cálcio. Três mecanismos distintos são responsáveis pela contração das células do músculo liso vascular. Primeiro os canais de cálcio sensíveis à voltagem abrem-se em resposta a despolarização da membrana e o cálcio extracelular diminui seu gradiente eletroquímico para célula. Após o fechamento dos canais é necessário um período limitado de tempo antes que os canais possam abrir mais uma vez para responder a um estímulo. Segundo as contrações induzidas por agonistas liberam Ca^{2+} intracelular. Terceiro os canais de cálcio ligados ao receptor permitem a entrada de cálcio extracelular (GILMAN, 1996)

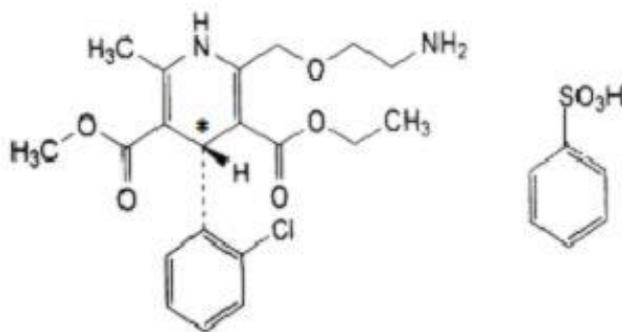
1.2.1 Mecanismo de ação

O aumento do cálcio citoplasmático promove aumento da contração das células dos músculos lisos cardíacos e vascular (GILMAN, 1996).

1.3 CARACTERÍSTICAS DOS FÁRMACOS

1.3.1 Besilato de anlodipino

Figura 1 - Estrutura química do besilato de anlodipino* carbono quirálico



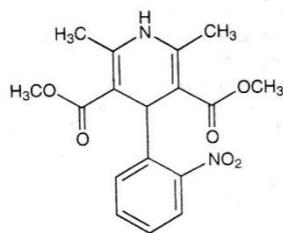
$\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{ClN}_2\text{O}_5 \cdot \text{C}_6\text{H}_5\text{SO}_3\text{H}$ Massa molecular: 567,05 g/mol
Fonte: British, 2005

Sintetizado em 1983, possui o nome químico de: 3 etil 5 metil éster do ácido 2-[(2-aminoetóxi)-Metil]-4-(2-clorofenil)-1,4dihidro-6-Metil-3,5-piridinodicarboxílico (MERCK, 2006). É um pó cristalino branco, levemente solúvel em água, fracamente solúvel em etanol. Possui ponto de fusão entre 195° a 204°C. Possui quatro formas

distintas: anidra, amorfa, monohidratada e dihidratada (KORADIA. *et al*, 2010) Diversos métodos analíticos são desenvolvidos na literatura para análise do besilato de anlodipino, em fluidos biológicos, empregando a cromatografia em camada delgada (PANDYA, 1995), e cromatografia líquida de alta eficiência (ALSARRA, 2009; BAHRAMI, 2004; FENG *et. al*, 2002; KANG, 2008 *et. al*; MAY *et. al*, 2007; SANTOS *et. al*, 2005; WEI, *et al*, 2009); cromatografia líquida com separação quiral (JOSEFSSON, 1996, LUKSA *et al*,1997); cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas Tandem (LC-MS/MS) (SARKAR, *et. al*, 2008; ZOU, 2009); cromatografia a gás com detector de massas (GC-MS) (MA Y, 2007). A determinação em formulações farmacêuticas pode ser feita por cromatografia em camada delgada (DHANESHWAR, 2008); cromatografia líquida de alta eficiência (BARMAN, *et. al*, 2007;CHAUDHARI, 2007; DONGRE, *et. al*, 2008; JOSHI, *et al*, 2009, MALESUIK, 2006; SHAH *et al*, 2008); cromatografia com separação quiral (BARANDA *et al*, 2005); espectrofotometria (RAGNO, 2002; RAHMAN, 2001; RAHMAN, 2003; RAHMAN, 2004).

1.3.2 Nifedipino

Figura 2 - Estrutura química do nifedipino



C₁₇H₁₈N₂O₆ Massa molecular: 346,33 g/mol

Fonte: MERCK, 2006

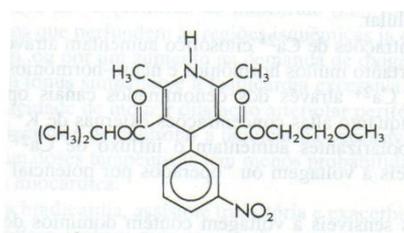
Sintetizado em 1968 possui nome químico: ester dimetilico do ácido 1,4 diidro-2,6-dimetil-4-(2-nitrofenil)-3,5-piridinadicarboxílico. É composto por cristais amarelos e possui faixa de fusão: 172-174°C. É solúvel em acetona, cloreto de metileno, clorofórmio, etil acetato, etanol e metanol. Muito sensível a luz (MERCK, 2006). É utilizado na angina estável crônica vasoespástica e na hipertensão, é

também utilizado na enxaqueca, na insuficiência cardíaca congestiva e na miocardiopatia. Sua meia vida é de 4h (GENNARO, 2004).

A literatura apresenta métodos para determinação do nifedipino em formulações farmacêuticas por espectrofotometria (RICHTER, 2006); eletroforese capilar (EI WALILY, 1997); cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e em fluidos biológicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (BARANOWSKA, 2009; PERROTTI, 2009) e CLAE com separação quiral.

1.3.3 Nimodipino

Figura 3 - Estrutura química do nimodipino



$C_{21}H_{26}N_2O_7$ Massa molecular: 418,44 g/mol

Fonte: GENNARO, 2004

Sintetizado em 1979, apresenta o nome químico de 2-Metoxietil 1-Metoxietil éster do ácido 1,4 diidro-2,6 diil-4-(3-nitrofenil)-3,5- piridinodicarboxílico. O nimodipino devido a sua alta lipossolubilidade foi desenvolvido como um fármaco para relaxar os vasos cerebrais. É insolúvel em água e solúvel em álcool, funde a aproximadamente 125 °C (GENNARO, 2004). É eficaz na inibição do vasoespasm cerebral sendo basicamente utilizado para tratar os pacientes com defeitos neurológicos (GILMAN, *et al.*, 1996). Na literatura são descritos métodos de determinação para formulações farmacêuticas empregando cromatografia líquida de alta eficiência (BARMPALEXIS, KANAZE e GEORGAKIS, 2009), eletroforese (DENG, *et al.*, 2005), espectroscopia Raman (YANG, *et al.*, 2008) e em fluidos biológicos por cromatografia a gás com detector de massas (GC-MS) (MUCK e BODE, 1994) cromatografia líquida de alta eficiência (BARANDA, *et al.*, 2005), com eletrospray (LC-ESI-MS) (ZHAO, *et al.*, 2010) e ainda separação quiral (HONG, *et al.*, 2009).

1.4 TÉCNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS NA PESQUISA

1.4.1 Espectrofotometria de absorção molecular no Ultravioleta/Visível (UV/Vis)

Espectrofotometria ou espectroscopia de absorção molecular é um dos métodos mais utilizados no mundo em laboratórios químicos e clínicos. Em análise farmacêutica é bastante utilizado para identificação (análise qualitativa e doseamento (análise quantitativa) de fármacos e medicamentos (FERREIRA, 2008).

Esta técnica, continuamente aperfeiçoada, ainda permanecerá durante longo período sendo um dos mais úteis instrumentos de medida. Possui como principais vantagens a facilidade no manuseio ou operação, boa sensibilidade (10^{-4} a 10^{-7} mol/L); boa exatidão, seletividade moderada e ampla aplicabilidade (GIL, 2007).

Espectrofotômetros utilizados na região do ultravioleta e visível são dotados, fundamentalmente, de fonte de radiação; seletor de comprimento de onda; celas de absorção (cubetas), para inserção de soluções de amostras no feixe de luz monocromática; detector de radiação e uma unidade de leitura e de processamento de sinal (BRASIL, 2010).

De acordo com a Farmacopeia Brasileira, 2010, a análise espectrofotométrica quantitativa por absorção tem como princípio a relação direta existente entre a quantidade de luz absorvida e a concentração da substância, também conhecida como lei de Beer. Quando a concentração (c) é expressa em mol. L⁻¹ e o caminho óptico (b) em centímetro, a equação torna-se:

$$A = \epsilon b c$$

que A = absorvância, logaritmo do inverso da transmitância ($A = -\log T$)

ϵ = absortividade molar.

T = transmitância

Sabendo-se que a transmitância é o quociente entre a intensidade da radiação transmitida pela solução (I_0) e a intensidade da radiação incidente (I), tem-se:

$$\log_{10} (I_0 / I) = A = \epsilon b c$$

1.4.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A cromatografia em coluna teve o início de seu desenvolvimento pelo químico D. T. Day em 1900. Em 1906 o Botânico, Mikhail Semenovitch Tswett usou as colunas de adsorção nas suas investigações de pigmentos das plantas e criou o termo cromatografia. Até 1930, o método cromatográfico não foi extensivamente estudado pelos químicos (AQUINO, 2003). A partir da década de 30, no século passado, o estudo da técnica cromatográfica cresceu tanto que foi responsável por diversos prêmios Nobel (SKOOG, 2006).

O nome cromatografia deriva das palavras gregas chrom (cor) e graphe (escrever), embora o processo não dependa da cor, a menos para facilitar a identificação dos componentes separados.

O método cromatográfico possibilita a separação de várias substâncias presentes em uma mesma amostra desde que os componentes presentes sejam solubilizados em um meio líquido chamado de fase móvel. Esse líquido mantido em movimento faz com que todos os componentes nele solubilizados caminhem em uma mesma direção. Durante seu percurso as substâncias entrariam em contato com uma outra fase, sendo esta imiscível na fase móvel, chamada de fase estacionária (GIL, 2007).

A separação das substâncias solubilizadas em fase móvel ocorre de acordo com suas diferentes velocidades de migração em razão da afinidade relativa a fase móvel (líquido) ou fase fixa ou estacionária (sólido) (FERREIRA, 2008).

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma importante técnica de separação pois consegue separar misturas que contém um grande número de compostos similares (COLINS, 2007). A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a técnica predominante no controle de qualidade de produtos formulações farmacêuticas. A CLAE apresenta alta sensibilidade e seletividade na análise de métodos analíticos e ainda maior robustez e eficiência de separação. A cromatografia líquida quiral é empregada na separação de enantiômeros, que são estruturas que possuem imagens não sobreponíveis. São considerados compostos quirais por possuírem um centro quiral, na maior parte das vezes um átomo de carbono quiral (carbono assimétrico). A separação se faz necessária pois muitas vezes apenas um enantiômero tem ação farmacológica. Neste trabalho, os fármacos que apresentam carbono quiral são: besilato de anlodipino e nimodipino.

Na pesquisa foram utilizados solventes de acordo com a solubilidade, grupos químicos e o pKa da molécula.

Segundo LANÇAS, 2009 a fase móvel ideal deveria possuir, pelo menos, os seguintes requisitos: solubilizar completamente todos os componentes da amostra; apresentar baixa (ou nenhuma) reatividade; possuir baixa viscosidade; baixa ou (nenhuma) toxicidade; estar disponível em elevado grau de pureza e, se possível, ter baixo custo.

A cromatografia está baseada na repartição dos analitos entre duas fases uma estacionária e outra móvel. A distribuição, exclusão, partição ou adsorção seletiva dos componentes é um processo de equilíbrio dinâmico e as moléculas dos analitos ou estão retidas na fase estacionária ou estão deslocando-se com a fase móvel (AQUINO, 2003).

1.4.3 Polimorfismo

O termo polimorfismo é usado para designar os sistemas de cristal em que uma substância pode existir em estruturas caracterizadas por células unitárias diferentes, mas em que cada uma das formas consiste exatamente a mesma composição elementar. Durante um longo tempo, o termo pseudopolimorfismo foi usado para denotar outras variações de cristal onde a estrutura cristalina da substância é definida por outras células unitárias onde estas células unitárias diferem na sua composição elementar através da inclusão de uma ou mais moléculas de solvente. A existência de diferentes estruturas cristalinas em substâncias polimórficas evidencia uma diferença nas propriedades físicas como: volume, o volume molar, densidade, índice de refração ao longo de um determinado eixo do cristal, a condutividade térmica, condutividade elétrica, e higroscopicidade, diferentes pontos de fusão. Polimorfos decorrem das diferenças das interações cooperativas das moléculas no estado sólido, comparado com o estado líquido. Também ocorrem diferenças nas propriedades espectroscópicas, propriedades cinéticas e algumas propriedades da superfície. Diferenças em propriedades de embalagem e na energia das interações intermoleculares (ou seja, propriedades termodinâmicas) entre os polimorfos dão origem a diferenças nas propriedades mecânicas (BRITAIN, 2009).

O polimorfismo é comum em compostos farmacêuticos. Oito modificações cristalinas de fenobarbital foram isoladas, mas 11 foram identificadas com pontos de

fusão variando entre 112 e 176 °C. Dentre os barbituratos de uso clínico, cerca de 70% exibem polimorfismo. São exemplos de polimorfismo verdadeiro, e não de pseudopolimorfismo, no qual o solvente é causa (FLORENCE; ATTWOOD, 2011).

1.4.4 Técnicas empregadas no estudo do polimorfismo

Os polimorfos podem ser caracterizados e diferenciados através de suas propriedades físico-químicas empregando várias técnicas analíticas como a de difração de raios X por policristais (DRXP) ligada ao método de Rietveld. Outras técnicas também foram utilizadas, como a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Termogravimetria (TG), Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), apenas para identificação dos compostos, e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

1.4.5 Análise Térmica

É descrita como um conjunto de técnicas que permitem avaliar as propriedades físico-químicas das substâncias em função da temperatura. As técnicas mais utilizadas são as que avaliam variações de energia ou de massa de uma substância (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

1.4.5.1 Análise Termogravimétrica (TG)

A TG é utilizada para medir a variação de massa em função da temperatura em uma atmosfera controlada sob um programa de aquecimento. Para fins farmacêuticos, seu uso é descrito na caracterização, determinação de pureza e de umidade, identificação de pseudopolimorfismo, na avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos e em estudos de cinética de degradação (OLIVEIRA, 2011).

1.4.5.2 Termogravimetria derivada (DTG)

1.4.5.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A DSC é utilizada para medir a diferença de fluxo de calor entre uma substância e um material de referência em função de um programa de aquecimento ou resfriamento. Na área farmacêutica é utilizada na caracterização térmica e determinação da pureza de fármacos, estudos de compatibilidade entre os constituintes da formulação e identificação de polimorfismo com determinação das entalpias de cada forma cristalina. Como os diferentes polimorfos absorvem e liberam energia de forma diferenciada, a Calorimetria Exploratória Diferencial é a técnica mais utilizada no estudo do polimorfismo (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010; STORPIRTS, 2009).

1.4.6 Difração de Raios X (DRX)

A difratometria de raios X, utilizando método do pó, é uma das técnicas mais importantes para a caracterização e quantificação dos polimorfos. Os materiais cristalinos em pó, ou policristalinos, possuem padrões característicos de difração de raios X que permite a caracterização microestrutural de materiais cristalinos, possibilitando a quantificação e detecção de transformações polimórficas (SKOOG, 2002).

As distâncias interplanares e suas respectivas intensidades relativas são características e específicas para cada substância cristalina. Assim, esta técnica é baseada na propriedade intrínseca que cada cristal possui em difratar os raios X incidentes num ângulo específico, permitindo sua caracterização. A equação matemática que descreve este fenômeno é dada pela Lei de Bragg (SKOOG, 2002).

Sólidos cristalinos possuem arranjos, regulares e repetidos, de moléculas ou íons, em uma estrutura chamada rede cristalina.

Os cristais de uma determinada substância podem variar de tamanho no desenvolvimento relativo de uma determinada face, bem como no número e tipos de faces ou formas presentes apresentando diferentes hábitos cristalinos. O hábito descreve a forma de um cristal, em termos gerais, inclui, por exemplo, os tipos acicular (em forma de agulha), prismático, piramidal, tabular, equidimensional (equant), colunar e lamelar. O hábito cristalino pode influenciar a facilidade de

compressão de um comprimido, bem como as propriedades de um fármaco no estado sólido. Tem sua importância também na administração dos medicamentos. A facilidade para injetar uma suspensão contendo um fármaco na forma cristalina será influenciada pelo hábito cristais placóides são mais fáceis de injetar do que cristais aciculares (FLORENCE, ATTWOOD, 2011)

A cristalização ocorre pela precipitação do composto, pela sua remoção de uma solução e constituição de uma rede ordenada. Alguns fatores influenciam na formação dessa rede tais como o solvente, a temperatura, a pressão, o padrão de arranjo cristalino, os sais (MARTIN, 2008). Sete sistemas cristalinos distintos compõem as formas cristalinas de acordo com a sua simetria, o cúbico (cloreto de sódio), tetragonal (uréia), hexagonal (iodofórmio), rômboico (iodo), monoclinico (sacarose), triclinico (ácido bórico) e ortorrombico. A estrutura cristalina pode ser constituída por unidades como átomos, moléculas ou íons. Nos compostos orgânicos as moléculas mantêm coesas pelas forças de Van der Waals, forças coulômbicas e ligações de hidrogênio sendo desta forma as ligações fracas e consequentemente possuem baixos pontos de fusão (MARTIN, 2008).

Muitos elementos e compostos existem em mais de uma forma cristalina, em diferentes condições de temperatura e pressão. Este fenômeno é designado por polimorfismo ou alotropia. Polimorfos possuem pontos de fusão, padrões cristalinos de raios X, de refração e de solubilidade diferentes embora quimicamente idênticos (MARTIN, 2008). A solubilidade e os pontos de fusão são muito importantes em processos farmacêuticos, incluindo dissolução e formulação por isso a importância do estudo de polimorfismo em produtos farmacêuticos. Pode-se classificar o polimorfismo por meio de dois mecanismos de formação de estruturas cristalinas diferentes. O polimorfismo conformacional (conformações diferentes) e o polimorfismo por empacotamento (organização diferente de moléculas de mesma conformação). (STORPIRTIS, 2009). Embora a determinação da estrutura cristalina tenha se tornado rotina através de métodos difratométricos rápidos e de alta resolução sua determinação ainda é muito difícil (MARTIN, 2008).

Quando cristais isolados estão indisponíveis ou inadequados para análise a substância pode ser analisada na forma de pó. O padrão de difração de raios X pode ser considerado a impressão digital de um cristal. A difração de raios X (ondas eletromagnéticas acompanhadas por um campo elétrico em flutuação periódica) pelos cristais ocorre quando os raios X são dispersos pelos elétrons dos átomos sem mudança de comprimento de onda. Um elétron de um átomo, influenciado

pelos raios X, é excitado pelo campo elétrico flutuante, tornando-se uma fonte de ondas eletromagnéticas de mesma frequência e comprimento de onda que os raios X incidentes. Assim o elétron dispersa o feixe incidente. As ondas dispersas pelos diversos elétrons do átomo combinam-se e desta forma o átomo difrata a radiação X (GOMES,1984). Na difração de raios X de pó o padrão de difração apresenta uma série de reflexões, as quais são identificadas em difratogramas pelo ângulo 2θ (escala correspondente ao eixo x dos difratogramas) ou pela distância interplanar. Essa técnica está ao alcance da rotina industrial, pois são necessários apenas 50 a 500 mg do insumo necessário para a análise (STORPIRTS, 2009). A Farmacopeia Americana define que, para assegurar a identidade entre uma amostra teste e sua referência os valores de 2θ para as reflexões mais intensas na DRX devem ser reproduzíveis em aproximadamente $\pm 0,10^\circ$, podendo as intensidades relativas variarem devido ao preparo da amostra e condições experimentais (USP, 2011).

1.4.7 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Quando uma amostra é exposta a uma radiação eletromagnética de comprimento de onda, na região do infravermelho, que proporciona transições rotacionais e vibracionais a técnica é chamada de espectroscopia do infravermelho (STORPIRTIS, 2009).

A forma convencional de se preparar amostras sólidas para análises no infravermelho é principalmente utilizando o método de pastilhas de KBr. Porém, esse não é o melhor método para pesquisa de polimorfos, pois a pressão necessária para fazer a pastilha pode promover mudanças no polimorfo. O método mais indicado é por reflectância difusa onde não é necessário adicionar pressão a amostra. Neste método, o feixe de luz infravermelha incide sobre a amostra e sofre absorção, reflexão e difração. A parte da radiação incidente que sofre reflectância difusa é, então, utilizada para construir o espectro de infravermelho da amostra (STORPIRTIS, 2009).

A faixa espectral da radiação de infravermelho compreende as regiões de infravermelho distante: 10 e 400 cm^{-1} infravermelho médio: 400 e 4000 cm^{-1} e infravermelho próximo 4000 e 20000 cm^{-1} . Os sólidos orgânicos normalmente não são avaliados na região do infravermelho distante. O infravermelho médio é largamente utilizado na área farmacêutica. É bastante aplicado na para identificação

de insumos farmacêuticos, pois as bandas dos grupos funcionais são bastante conhecidas (STORPIRTIS, 2009).

1.4.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O princípio de um microscópio eletrônico de varredura (MEV) consiste em utilizar um feixe de elétrons de pequeno diâmetro para explorar a superfície da amostra, ponto a ponto, por linhas sucessivas e transmitir o sinal do detector a uma tela catódica cuja varredura está perfeitamente sincronizada com aquela do feixe incidente. Por um sistema de bobinas de deflexão, o feixe pode ser guiado de modo a varrer a superfície da amostra segundo uma malha retangular. A principal função de qualquer microscópio é tornar visível ao olho humano o que possui dimensões muito pequenas. Um microscópio eletrônico de varredura (MEV) utiliza um feixe de elétrons no lugar de fótons utilizados em um microscópio óptico convencional, o que permite aumentar a resolução em 1000 vezes quando comparado com a fonte de luz branca.

O MEV é um aparelho que pode fornecer rapidamente informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos de uma amostra sólida. É um instrumento disponível para a observação e análise de características microestruturais de objetos sólidos. A principal razão de sua utilidade é a alta resolução que pode ser obtida quando as amostras são observadas; valores da ordem de 2 a 5 nanômetros podendo chegar até 1 nm (DEDAVID, 2007).

1.4.9 Teste de degradação forçada

O estudo de degradação forçada inclui os efeitos causados pela variação da temperatura, umidade quando apropriado, oxidação, fotólise e suscetibilidade à hidrólise por extensa variação dos valores de pH, que são condições típicas de degradação de fármacos. Vários estudos vêm sendo realizados para a obtenção de produtos de degradação de muitos fármacos utilizados na terapêutica, utilizando diferentes métodos de obtenção e identificação (KAPOOR *et.al.*, 2006; KUMAR *et al.*, 2008; BEDSE *et al.*, 2009).

O art. 1º da RDC N°58 de 28/12/2013 que estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares institui estudo de degradação forçada: estudo que permite a geração de produtos de degradação pela da exposição do insumo farmacêutico ativo e produto acabado a condições de estresse, como por exemplo, luz, temperatura, calor, umidade, hidrólise ácida/ básica e oxidação, entre outras. Este estudo permite o desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade com especificidade e seletividade adequada, bem como fornecer informações acerca das possíveis rotas de degradação de um determinado produto (BRASIL, 2013).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Esse trabalho tem como objetivo principal pesquisar a estabilidade intrínseca dos fármacos, besilato de anlodipino, nifedipino, nimodipino, frente a condições de degradação forçada como termólise, hidrólise e oxidação pelos métodos de difração utilizando as seguintes técnicas Espectrofotometria de Absorção Molecular na região do Ultravioleta/Visível (UV/Vis), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Termogravimetria (TG), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Difração de raio X, Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

2.2 ESPECÍFICOS

- (a) Identificar o besilato de anlodipino, nifedipino, nimodipino, pelas técnicas oficiais já existentes.
- (b) Verificar a estabilidade intrínseca dos fármacos, besilato de anlodipino, nifedipino, nimodipino, frente a condições de degradação forçada como termólise, hidrólise e oxidação.
- (c) Comparar a estabilidade térmica do besilato de anlodipino, nifedipino, nimodipino utilizando análise termogravimétrica e análise termogravimétrica diferencial.
- (d) Pesquisar o polimorfismo do besilato de anlodipino, nifedipino, nimodipino pela técnica de difração de raio X, pelo método do pó, em matéria-prima, padrão farmacopéico e produto acabado (comprimidos).

3 JUSTIFICATIVA

A estabilidade é definida como o tempo durante o qual a especialidade farmacêutica ou mesmo a matéria-prima considerada isoladamente, mantém dentro dos limites especificados e durante todo o período de armazenamento e uso, as mesmas condições e características que possuía quando da época de sua fabricação. Pode também ser definida como o período de tempo compreendido entre o momento no qual o produto está sendo fabricado àquela que sua potência está reduzida a não mais do que 10%, desde que os produtos de alteração estejam todos seguramente identificados e previamente reconhecidos seus efeitos (TABORIANSKI, 2003; STULZER & SILVA, 2006).

No Brasil, a ANVISA, através do Informe Técnico nº1, esclarece procedimentos a serem seguidos, uma vez que a identificação e quantificação dos produtos de degradação já eram exigidas no item 2.2.6 da RE nº 560/2002 e no item 2.8 da RE nº 398/2004 – regulamentações específicas sobre estudos de estabilidade, vigentes à época, além dos estudos de fotoestabilidade exigidos no item 2.6 da Resolução RE nº 398/2004, assim como as recomendações para a sua realização no Anexo II da mesma. Já no item 2.9 do anexo da RE nº 1, de 29/07/2005 - Guia para Realização dos Estudos de Estabilidade, já era preconizada a realização do ensaio de identificação e quantificação de produtos de degradação e método analítico correspondente no estudo de estabilidade, para todos os produtos a serem registrados (Brasil, 2005). E recentemente, em de 20 de dezembro de 2013, foi publicada a - RDC Nº 58 que estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. Desta forma destaca-se a importância dos estudos de degradação forçada.

A realização do teste de degradação forçada, assim como, o desenvolvimento do método analítico para a identificação e quantificação dos produtos de degradação são de extrema importância para as indústrias farmacêuticas, pois no momento do registro, pós-registro e renovação estes testes são imprescindíveis. Este estudo acompanhado de sua análise crítica será complementado pela pesquisa de

polimorfos utilizando a técnica de Difração de Raio X (DRX) pelo método do pó, espectros Análise térmica e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Os reagentes e solventes que foram utilizados nesse trabalho são de grau analítico.

4.1.1 Solventes e soluções

- Acetonitrila (Merck[®]) grau cromatográfico;
- Ácido fosfórico;
- Água ultrapurificada por meio do sistema Mili-Q[®] Plus; com resistividade igual a 18,2 Ωcm a 25°C;
- Metanol (Merck[®]) grau cromatográfico;
- Metanol grau espectrofotométrico;
- Soluções tampão fosfato pH 4,0 e 7,0 (Digimed[®]);
- Trietilamina (TEA);

4.1.2 Substâncias químicas de referência

Substância química de referência besilato de anlodipino lote P500185.

Substância química de referência nimodipino lote LRAA0583.

Substância química de referência nifedipino lote SLBD7789V, teor $\geq 98\%$.

Os fármacos empregados como matéria-prima, neste trabalho, foram gentilmente cedidos pela FARMAD`ORO.

4.1.3 Amostras comercializadas no Brasil

- besilato de anlodipino: Norvasc® Pfizer 5 mg e 10 mg.
- Nifedipino: Adalat® comprimidos de 10 mg e 20 mg
- Nimodipino: Nimotop® comprimidos de 30 mg

4.2 EQUIPAMENTOS

- Aparelho de ultra-som, Thornton®, modelo T-14;
- Agitador mecânico modelo 103 (Nova Ética®);
- Balança Analítica – Marca Sartorius®, capacidade 100 g, precisão $\pm 0,0001$;
- Sistema cromatográfico HPLC 10 vp marca Shimadzu®: degaseificador DGU-14A; bomba binária LC-10ADvp; injetor automático com Loop de 50 μ L Sil-10ADvp; compartimento de coluna CTO-10ACvp; detector de arranjo de diodos UV-Vis SPD-M10Avp; controlador do sistema SCL-10Avp; software LC Workstation Class-Vp 5.1.2; computador com Windows Millennium;
- Espectrofotômetro Ultravioleta/Visível, marca Shimadzu® UV - 1601, munido de cubetas de quartzo, de 1 cm de caminho óptico e acoplado a computador e impressora Epson – FX 850;
- Aparelho de eletroforese capilar Beckman and Coulter P/ACE MDQ equipado com detector UV-VIS com arranjo de diodos, detector fluorimétrico e controle de temperatura.
- Coluna LiChrospher® 100RP-18 (5 μ m) Merck®;
- Medidor de pH Digimed®, modelo TE-91;
- Balança analítica eletrônica BG-2000 Gehaka®;
- Aparelho MiliQ-Plus, Milipore® para obtenção da água purificada;

- Membranas filtrantes HV 0,45 μm de poro e 13 mm de diâmetro (Milipore[®]);
- Vidraria usual do laboratório;
- TA-2950 (TA instruments[®] New Castle, DE EUA)
- Difratorômetro modelo Iris 6, com configuração configurado segundo a geometria Bragg-Brentano e com um motor de passo
- Espectrofotômetro de absorção modelo CHN2400 marca Perkin Elmer
- Microscópio eletrônico de varredura marca JEOL, modelo JSM-7401F

4.3 Métodos

O ensaio de estresse será realizado com soluções ácidas, alcalinas, oxidantes e neutras para provocar uma degradação forçada das amostras dos inibidores do canal de cálcio. Estes produtos de degradação são utilizados como amostras para desenvolver os métodos indicativos de estabilidade.

As Metodologias analíticas foram desenvolvidas nas instalações do Laboratório de Controle de Qualidade Físico-Químico de Medicamentos e Cosméticos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, no laboratório do Instituto de Geociências de Difração de Raios X-LDRX, no laboratório de Farmacotécnica do Departamento de Farmácia da FCF/USP e na Central Analítica do Instituto de Química da USP.

4.3.1 Teste de degradação forçada do besilato de anlodipino analisado por espectrofotometria

Foram pesados 12,5 mg de padrão de besilato de anlodipino e transferidos para 4 balões volumétricos (1,2,3,4) de 25 mL cada. Foram adicionados em cada balão 5 mL de metanol para solubilizar o besilato de anlodipino e em seguida completou-se o volume de cada balão (1,2,3,4) com HCl mol/L, NaOH mol/L, 3% de peróxido de

hidrogênio e água respectivamente. As amostras foram aquecidas a 80°C durante 4 horas. Em seguida retirou-se uma alíquota de 5 mL de cada balão e transferiu-se para os balões (5,6,7,8) respectivamente e completou-se o volume para 50 mL com água. O equipamento utilizado foi o espectrofotômetro UV-1601, em comprimento de onda de 364.4 nm, a água foi utilizada como solvente. Figuras 4,5,6 e 7.

4.3.2 Espectrofotometria UV/Visível

Foram pesados analiticamente 25 mg de nimodipino padrão e transferidos para balão volumétrico de 25 mL, dissolvendo-se com cloreto de metileno, uma vez que o nimodipino solubiliza-se facilmente neste solvente. Na segunda diluição foi utilizado como solvente água e a concentração final foi de 40 µg/mL.

Foram realizadas varreduras no espectrofotômetro ultravioleta/visível entre os comprimentos de onda 500 nm e 190 nm. Figura 9

4.3.3 Ensaios preliminares empregando a CLAE

4.3.3.1 Nifedipino

Para a substância nifedipino foram pesados 2,5 mg e transferidos para balão de 25 mL chegando-se a uma concentração de 100 µg/mL (solução estoque). Retirou-se uma alíquota de 0,5 mL e transferiu-se para balão de 10 mL, chegando a uma concentração final de 5 µg/mL.

Da solução estoque retirou-se uma alíquota de 2,5 mL e transferiu-se para balão de 10 mL. Chegando-se a uma concentração de 25 µg/mL. Figura 12

4.3.3.2 Nimodipino

Foram pesados analiticamente 25 mg de nimodipino padrão e transferidos para balão volumétrico de 25 mL e dissolvidos com metanol. Na segunda diluição

também foi utilizado como solvente o metanol obtendo-se uma concentração final de 40 µg/mL.

Acetonitrila e água foram utilizadas como fase móvel com proporções de 70:30 v/v com tempo de retenção de 2,4 min. Figura 14

Outras proporções de acetonitrila e água foram feitas até a obtenção da proporção ideal acetonitrila e água (55:45 v/v), com tempo de retenção de 5,1 min, pH de 6,9 comprimento de onda de 235 nm, vazão de 1 mL/min e injeção de 60 µg/mL. Figura 15

4.3.4 Teste de degradação forçada do nifedipino analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Foram pesados 12,5 mg de padrão de nifedipino e transferidos para 4 balões volumétricos (1,2,3,4) de 25 mL cada. Foram adicionados em cada balão 5 mL de metanol para solubilizar o nifedipino e em seguida completou-se o volume de cada balão (1,2,3,4) com HCl mol/L, NaOH mol/L, 3% H₂O₂ e H₂O respectivamente. As amostras foram aquecidas a 80 °C durante 4 horas. Em seguida retirou-se uma alíquota de 0,5 mL de cada balão e transferiu-se para os balões de 10 mL (5,6,7,8) completou-se o volume com fase móvel metanol:água (55:45 v/v). O equipamento utilizado foi o CLASS-VP® V 5.03 software (Shimadzu® Corporation, Japan). E a coluna utilizada LiChrospher® 100 RP-18 Merck® column (125 mm x 4.6 mm, 5µm). Vazão de 1 mL/min e detecção a 235 nm. Figuras 16,17,18 e 19.

4.3.5 Teste de degradação forçada do nimodipino analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Foram pesados 12,5 mg de padrão de nimodipino e transferidos para 4 balões volumétricos (1,2,3,4) de 25 mL cada. Foram adicionados em cada balão 5

mL de metanol para solubilizar o nimodipino e em seguida completou-se o volume de cada balão de 10 mL (1,2,3,4) com HCl 1 mol/L, NaOH 1 mol/L, 3% H₂O₂ e H₂O respectivamente. As amostras foram aquecidas a 80°C durante 4 horas. Em seguida retirou-se uma alíquota de cada balão de 0,5 mL e transferiu-se para os balões (5,6,7,8) respectivamente e completou-se o volume com fase móvel contendo acetonitrila e água (55:45 v/v) e água. O equipamento utilizado foi o CLASS-VP® V 5.03 software (Shimadzu® Corporation, Japan). E a coluna utilizada LiChrospher® 100 RP-18 Merck® column (125 mm x 4.6 mm, 5µm). Vazão de 1mL/min e detecção a 235nm. Figuras 20,21,22 e 23.

4.3.6 Análise Térmica

A análise térmica é um conjunto de técnicas que permite medir mudanças de uma propriedade física ou química de uma substância ou material em função da temperatura ou do tempo, enquanto a substância é submetida a uma programação controlada de temperatura. É a técnica na qual a mudança da massa de uma substância é medida em função da temperatura enquanto esta é submetida a uma programação controlada.

4.3.6.1 Termogravimetria (TG)

A Termogravimetria é a técnica de análise térmica que determina a variação de massa da amostra (perda ou ganho) é determinada em função da temperatura, ou tempo de aquecimento, utilizando um programa controlado de temperatura. Desta forma é possível conhecer as alterações que o aquecimento pode provocar na massa dos materiais e, assim permite estabelecer a faixa de temperatura em que eles adquirem composição química fixa, definida e constante. Permite determinar a temperatura em que os materiais começam a se decompor (estabilidade térmica) e, também acompanhar o andamento das reações de desidratação, oxidação e combustão. A Termogravimetria é expressa por isotérmicas (STORPIRTS, 2009).

Quase isotérmica, em que a amostra é aquecida a uma razão linear enquanto não ocorre variação de massa. Quando a balança detecta variação de massa a temperatura é mantida até se obter um novo patamar, característico de massa constante, e assim sucessivamente. É TG dinâmica ou convencional em que a temperatura da amostra varia de maneira pré-determinada quando o equipamento é programado para uma razão de aquecimento (STORPIRTS, 2009).

É constituído por uma termobalança, um porta amostra sob atmosfera especificada (nitrogênio, ar sintético). É possível medir e aquecer a amostra analisada. Pode ser acoplado a um sistema para detectar produtos voláteis. As curvas geradas fornecem informações sobre estabilidade térmica da amostra sua composição e a estabilidade dos compostos intermediários e do produto final. No método termogravimétrico convencional ou dinâmico são registradas curvas de massa da amostra (m), em função da temperatura T (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

$$m = f(T \text{ ou } t)$$

Essas curvas são conhecidas como curvas termogravimétricas ou, simplesmente, curvas de TG.

As análises Termogravimétricas foram realizadas no equipamento TA-2950 (TA instruments[®] New Castle, DE EUA) na faixa de 25 a 600 °C, massa da amostra de aproximadamente 3,0 mg, razão de aquecimento 10°C min⁻¹ e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 100 mL min⁻¹.

4.3.6.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Para esse estudo foram utilizadas amostras com besilato de anlodipino padrão, besilato de anlodipino matéria-prima, nifedipino padrão, nifedipino matéria-prima, nifedipino comprimidos 10 mg, 20 mg nifedipino referência; nimodipino padrão farmacopéico. As curvas DSC foram obtidas no equipamento TA-2950 (TA instruments[®] New Castle, DE EUA) na faixa de 25 a 350 °C, massa das amostras foi de aproximadamente 3,0 mg adicionada a cadinho de alumínio fechado e a perda de massa registrada em função da temperatura. A razão de aquecimento foi de 10°C min⁻¹ e atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL min⁻¹. Antes dos ensaios foram obtidas curvas em branco para avaliar o sistema utilizado. Todas as

amostras estavam no prazo de validade e acondicionadas em embalagens protetoras contra a luminosidade.

4.3.7 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Embora o espectro de infravermelho seja característico da molécula, certos grupos de átomos dão origem a bandas que ocorrem mais ou menos na mesma frequência, independentemente da estrutura da molécula. Nessas bandas que é possível identificar, através das características dos grupos e auxílio de tabelas para identificar as estruturas (SILVERSTAIN, 1994). Por ser uma técnica de fácil execução, rápida e não necessitar de solubilização da amostra é bastante empregada na indústria farmacêutica.

4.3.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Esta técnica é muito útil para caracterização dos diferentes hábitos e superfície dos polimorfos. Fundamenta-se na irradiação de um feixe fino de elétrons. A interação entre o feixe e a superfície da amostra resulta em elétrons secundários, elétrons retrodispersados, elétrons Auger, fótons, raios X característicos. Na Microscopia Eletrônica de Varredura a detecção dos elétrons secundários é responsável pela imagem da superfície da amostra analisada (STORPIRTS, 2009).

5 RESULTADOS

5.1 FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados obtidos, foram analisados com as metodologias validadas tendo por finalidade comprovar se existe ou não diferença significativa entre elas e estimar as diferentes causas de variação.

5.1.1 Linearidade do besilato de anlodipino analisado por espectrofotometria

É a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003). Foi determinada por meio de curvas padrão, obtidas em 6 níveis de concentração: 40 µg/mL, 45 µg/mL, 50 µg/mL, 55 µg/mL, 60 µg/mL, 65 µg/mL.

As soluções foram preparadas em triplicatas e os seguintes resultados foram encontrados:

Tabela 1- Resultados experimentais da solução padrão besilato de anlodipino, utilizados na curva analítica pelo método espectrofotométrico

Concentração de leitura $\mu\text{g/mL}$	absorbância (1)	absorbância (2)	absorbância (3)	absorbância (média)
40	0,4723	0,4745	0,4738	0,4735
45	0,5329	0,5313	0,5348	0,533
50	0,5822	0,5852	0,5840	0,5838
55	0,6495	0,6486	0,6460	0,648
60	0,7095	0,7108	0,7112	0,7105
65	0,7712	0,7734	0,7783	0,7743

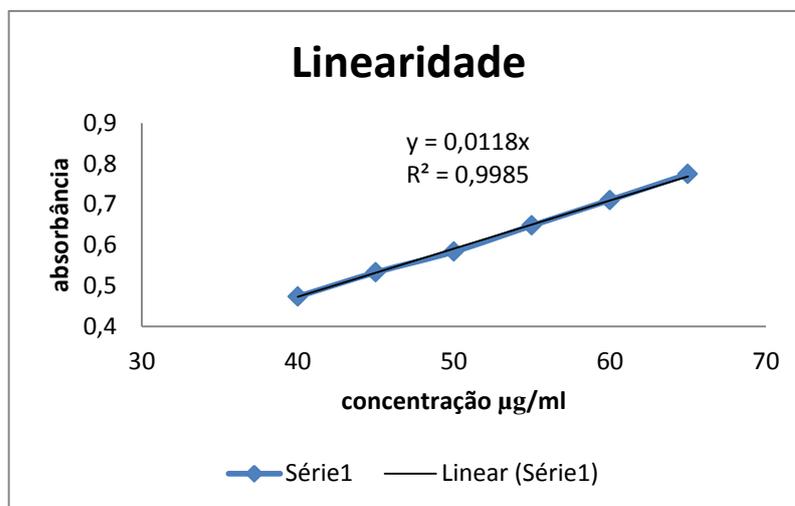


Figura 4- Curva analítica para determinação de besilato de anlodipino, nas concentrações de 40, 45, 50, 55, 60 e 65 $\mu\text{g/mL}$ em metanol: água destilada (5:45v/v). Equação da reta $y = 0,0118x$ $R^2 = 0,999$

5.1.2 Precisão do besilato de anlodipino analisado por espectrofotometria

Foi utilizado o ponto médio da linearidade. Foram pesados 12,5 mg de besilato de anlodipino transferidos para balão de 25 mL e solubilizados com metanol e água a uma proporção de (5:45v/v) e posteriormente retirada uma alíquota de 2,5

mL transferida para balão de 25 mL e completado com água. Concentração final de 50 µg/mL.

Tabela 2 - Resultados experimentais das soluções de besilato de anlodipino 50 µg/mL utilizados para determinação da precisão do método espectrofotométrico metanol e água (5:95v//v) na primeira diluição e na segunda diluição somente água

Concentração de leitura µg/mL	Amostra *
50	0,5859
50	0,5847
50	0,5892
50	0,5875
50	0,5893
50	0,5884
50	0,5891
50	0,5865
50	0,5823
50	0,5890
Média	0,5830
DPR(%)	0,4056

* Média de três determinações para cada concentração

5.1.3 Teste de degradação forçada do besilato de anlodipino analisado por espectrofotometria.

Na Figura 5 o resultado da análise de espectro de absorção, da solução padrão de besilato de anlodipino.

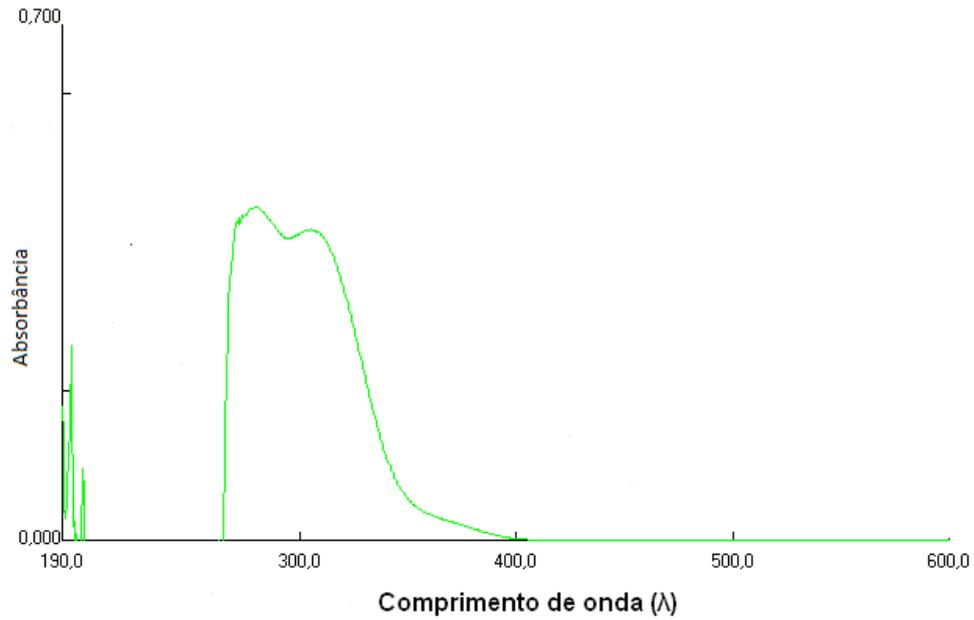


Figura 5 - Espectro de absorção, da solução padrão de besilato de anlodipino na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ submetida ao teste de degradação forçada com HCl 1 mol/L.

Mostra-se na Figura 5 espectro de absorção, da solução padrão de besilato de anlodipino na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ submetida ao teste de degradação forçada com HCl 1 mol/L.

A Figura 6 mostra o espectro de absorção, da solução padrão de besilato de anlodipino na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ submetida ao teste de degradação forçada com NaOH 1 mol/L.

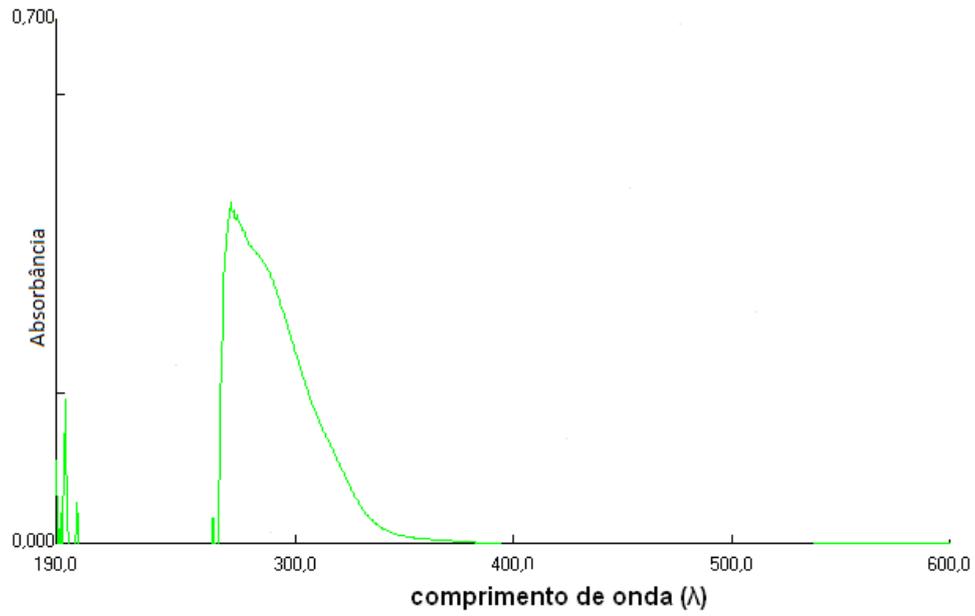


Figura 6 - Espectro de absorção, da solução padrão de besilato de anlodipino na concentração de 50 µg/mL submetida ao teste de degradação forçada com NaOH 1 mol/L.

Pode-se ver na Figura 6 o resultado da análise de espectro de absorção da solução padrão de besilato de anlodipino na concentração de 50 µg/mL submetida ao teste de degradação forçada com 3% H₂O₂.

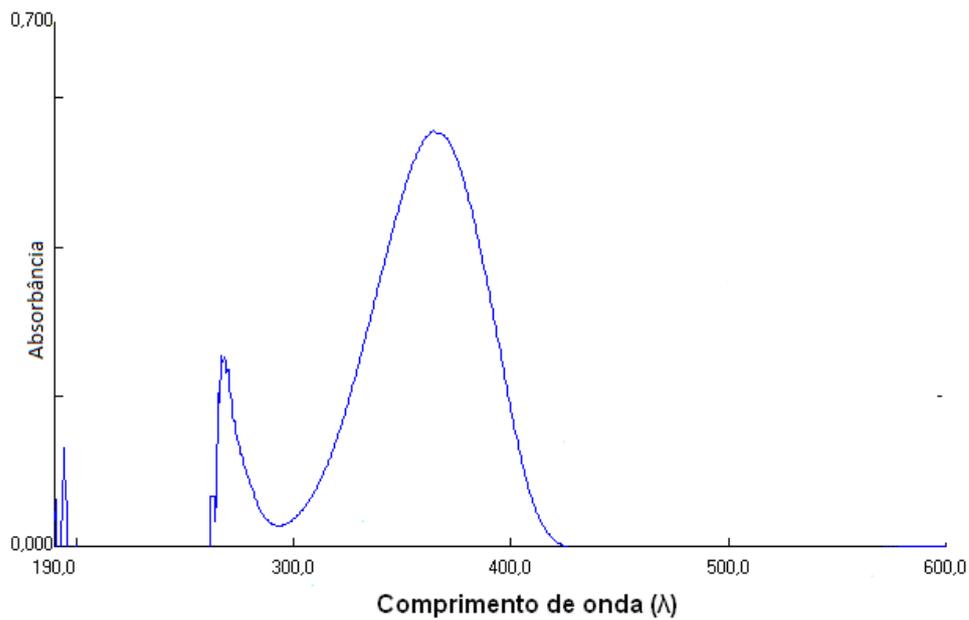


Figura 7 - Espectro de absorção, da solução padrão de besilato de anlodipino na concentração de 50 µg/mL submetida ao teste de degradação forçada com 3% H₂O₂.

Pode-se ver na Figura 7 o espectro de absorção da solução padrão de besilato de anlodipino na concentração de 50 µg/mL dissolvido em metanol e diluído com água.

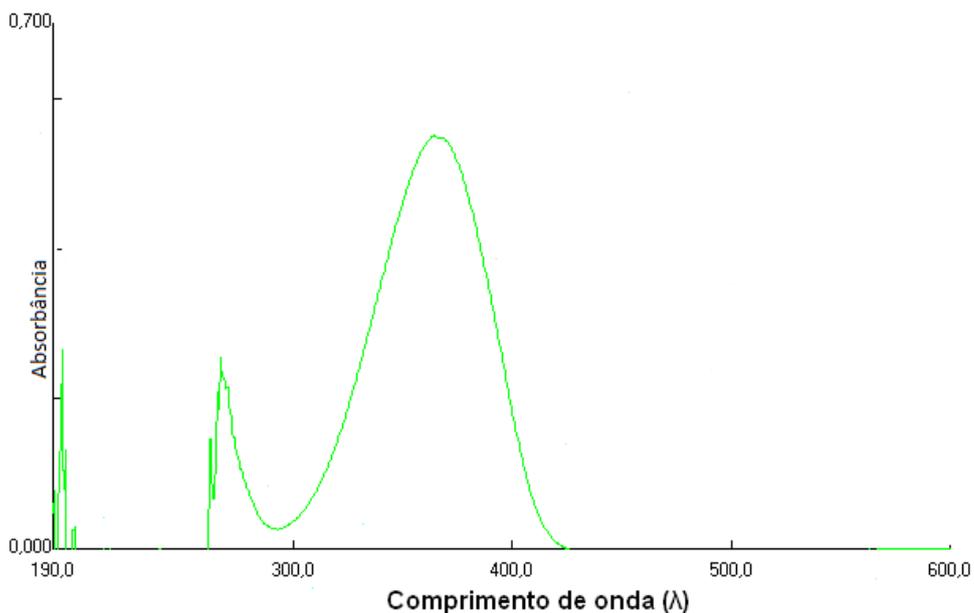


Figura 8 - Espectro de absorção, da solução padrão de besilato de anlodipino na concentração de 50 µg/mL dissolvido em metanol e diluído com água.

5.1.4 Teste do nimodipino por Espectrofotometria na região do Ultravioleta/Visível

A substância apresentou melhor absorção em 362 nm.

O resultado não se reproduz, não foi possível estabelecer a linearidade pois a amostra turva com facilidade.

O preparo das soluções somente com metanol apresentou resultado mais satisfatório, em comprimento de onda de 364,50 nm.

A Figura 9 mostra o resultado da análise de espectro de absorção, da solução padrão de nimodipino.

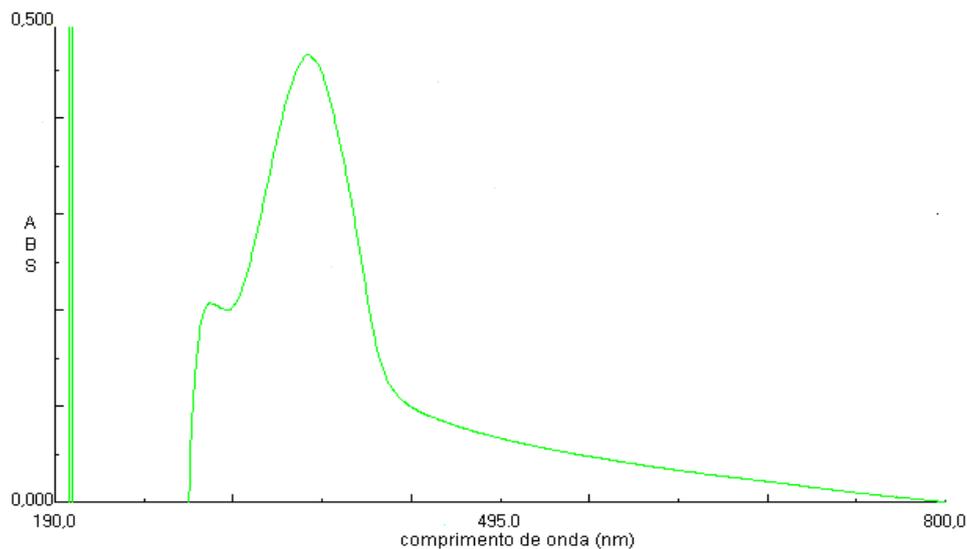


Figura 9 - Espectro de absorção, da solução padrão de nimodipino na concentração de 40 µg/mL em metanol e comprimento de onda 362 nm.

5.1.5 Linearidade do nifedipino analisado por CLAE

Foi determinada por meio de curvas padrão, obtidas em 6 níveis de concentração: 5 µg/mL, 15 µg/mL, 25 µg/mL, 35µg/mL, 45 µg/mL, 55 µg/mL. As soluções foram preparadas em triplicata e os seguintes resultados foram encontrados:

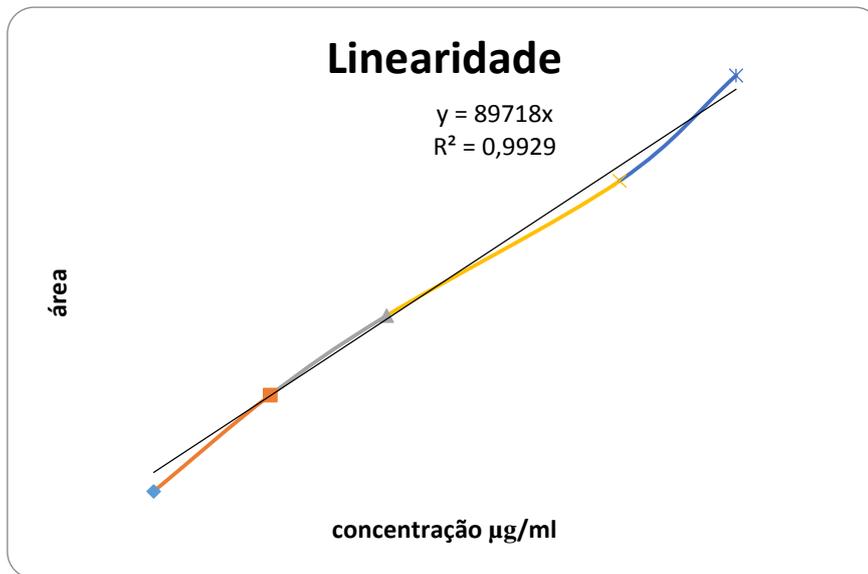


Figura 10 - Curva analítica para determinação do nifedipino, nas concentrações de 5, 15, 25, 35, 45 e 55 µg/mL em metanol e água destilada (55:45 v/v).Equação da reta $y=89718x$ $R^2=0,992$

Tabela 3- Resultados experimentais da solução padrão nifedipino, utilizados na curva analítica pelo método cromatográfico. Fase móvel metanol e água destilada (55:45v/v). Coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) Merck®, UV detecção a 235 nm vazão de 1.0 mL/min

Concentração de leitura µg/mL	Área (média)
5	337781
15	921080,7
25	1476385
35	2154858
45	2821832
55	3845155

5.1.6 Precisão do nifedipino analisado por CLAE

Foi utilizado o ponto médio da linearidade 25 µg/mL. Foram pesados 12,5 mg de nifedipino, transferidos para balão de 25 mL, solubilizados com metanol. Para um balão de 10 mL foi transferida uma alíquota de 0,5 mL e o volume completado com fase móvel metanol e água (55:45v/v).

Para a precisão do nifedipino de 10 mg foram pulverizados 20 comprimidos de nifedipino de 10 mg e uma amostra de 124,6875 mg, equivalente a 12,5 mg, foi pesada. A amostra foi transferida para um balão de 25 mL e dissolvida com metanol. Filtrou-se a amostra e uma alíquota de 0,5 mL, da solução preparada, foi transferida para um balão de 10 mL e o volume completado com fase móvel metanol e água (55:45 v/v).

Tabela 4-Resultados experimentais das soluções da amostra nifedipino (A), utilizados para determinação da precisão do método cromatográfico. Fase móvel metanol e água (55:45 v/v). Coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) Merck®, UV detecção a 235 nm vazão de 1.0 mL/min

Concentração de leitura µg/mL	Amostra A*
25	1472971
25	1479393
25	1476791
25	1471520
25	1476013
25	1478932
25	1473246
25	1478905
25	1478936
25	1478970
25	1478690
DPR(%)	0,42

* Média de três determinações para cada concentração

A Figura 11 mostra o cromatograma de soluções contendo 15.0 µg/mL de nifedipino. Fase móvel metanol e água (50:50 v/v) Coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) Merck®, UV detecção a 235 nm vazão de 1.0 mL/min.

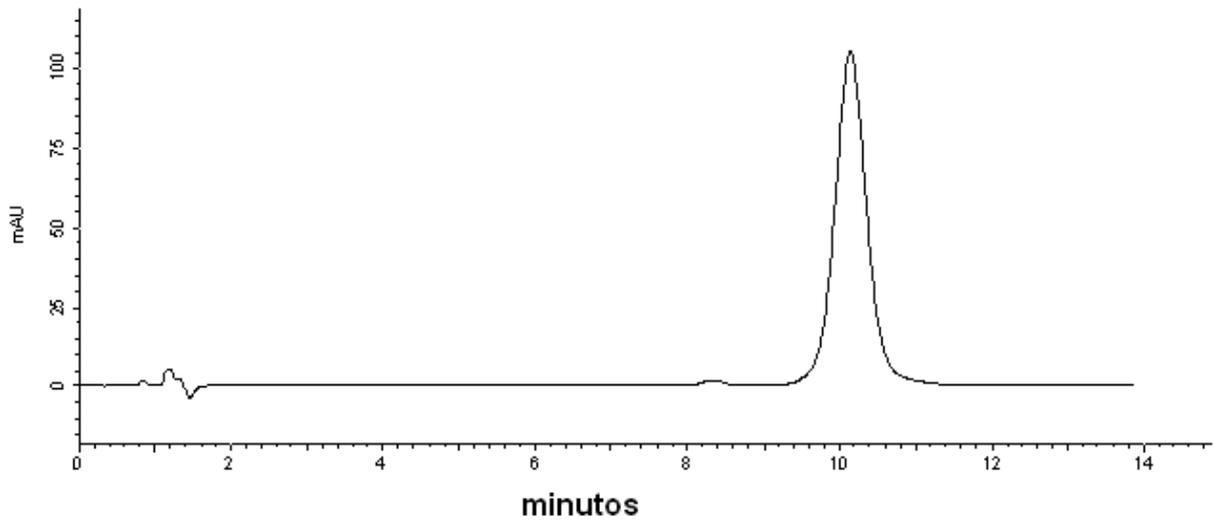


Figura 11 - Cromatograma de soluções contendo 15.0 µg/mL de nifedipino. Fase móvel metanol e água (50:50 v/v) Coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) Merck®, UV detecção a 235 nm vazão de 1.0 mL/min.

A Figura 12 mostra o Cromatograma da solução contendo 25 µg/mL de nifedipino. Fase móvel metanol e água (45:55 v/v). Coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) Merck®, UV detecção a 235 nm vazão de 1.0 mL/min.

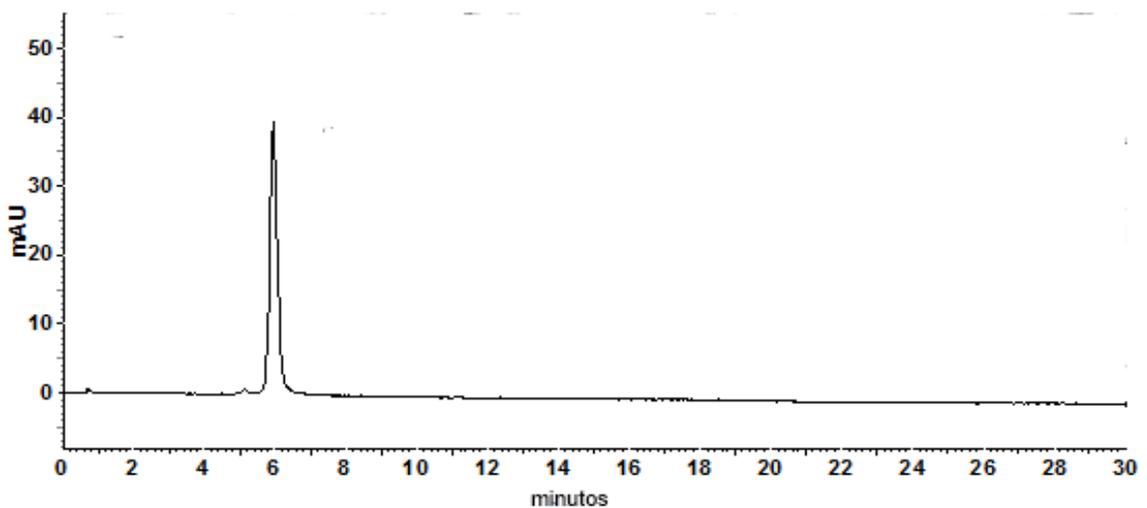


Figura 12 - Cromatograma da solução contendo 25 µg/mL de nifedipino. Fase móvel metanol e água (45:55 v/v). Coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) Merck®, UV detecção a 235 nm vazão de 1.0 mL/min.

5.1.7 Linearidade do nimodipino analisado por CLAE

Foi determinada por meio de curvas padrão, obtidas em 6 níveis de concentração: 5 µg/mL, 15 µg/mL, 25 µg/mL, 35 µg/mL, 45 µg/mL, 55 µg/mL.

Foram pesados 12,5 mg de nimodipino transferidos para balão de 25mL e solubilizados com metanol e completado o volume posteriormente retirada uma alíquota de 2,5 mL transferida para balão de 25 mL e completado com fase acetonitrila e água (55:45 v/v).

As soluções foram preparadas em triplicata e os seguintes resultados foram encontrados

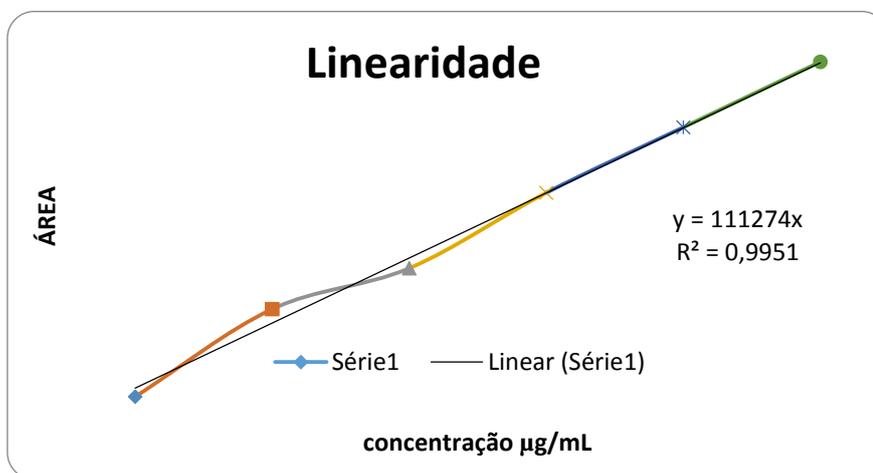


Figura 13 - Curva analítica para determinação do nimodipino, nas concentrações de 5, 15, 25, 35, 45, e 55 µg/mL em fase móvel acetonitrila e água (55:45 v/v). Equação da reta $y = 11127x$ $R^2 = 0,995$.

5.1.8 Precisão do nimodipino analisado por CLAE

Para a precisão do nimodipino de 20 mg foram pulverizados 20 comprimidos de nimodipino de 20 mg e uma amostra de 70,875 mg, equivalente a 12,5 mg de nimodipino, foi pesada. A amostra foi transferida para um balão de 25 mL e dissolvida com metanol. Filtrou-se a amostra e uma alíquota de 0,5mL, da solução preparada, foi transferida para um balão de 10 mL e o volume completado com fase móvel metanol e água (55:45 v/v).

Tabela 5 - Resultados experimentais das soluções da amostra de nimodipino 20 mg (c) utilizados para determinação da precisão do método cromatográfico fase móvel acetonitrila e água (55:45 v/v). Coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) Merck®, UV detecção a 235 nm vazão de 1.0 mL/min.

Concentração de leitura µg/mL	Amostra C*
25	2619437
25	2616922
25	2607119
25	2602234
25	2623425
25	2604202
25	2610116
25	2619425
25	2624989
25	2621756
DPR(%)	0,083

* Média de três determinações para cada concentração

Tabela 6 - Resultados experimentais da solução padrão nimodipino, utilizados na curva analítica pelo método cromatográfico. Fase móvel acetonitrila e água (55:45 v/v). Coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) Merck®, UV detecção a 235 nm vazão de 1.0 mL/min.

Concentração de leitura µg/mL	Área (média)
5	411678
15	1909291
25	2607925
35	3897897
45	5017108
55	6136700

A Figura 14 mostra o cromatograma de soluções contendo 40 µg/mL de nimodipino. Fase móvel acetonitrila e água (70:30 v/v). Coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) Merck®, UV detecção a 235 nm vazão de 1.0 mL/min.

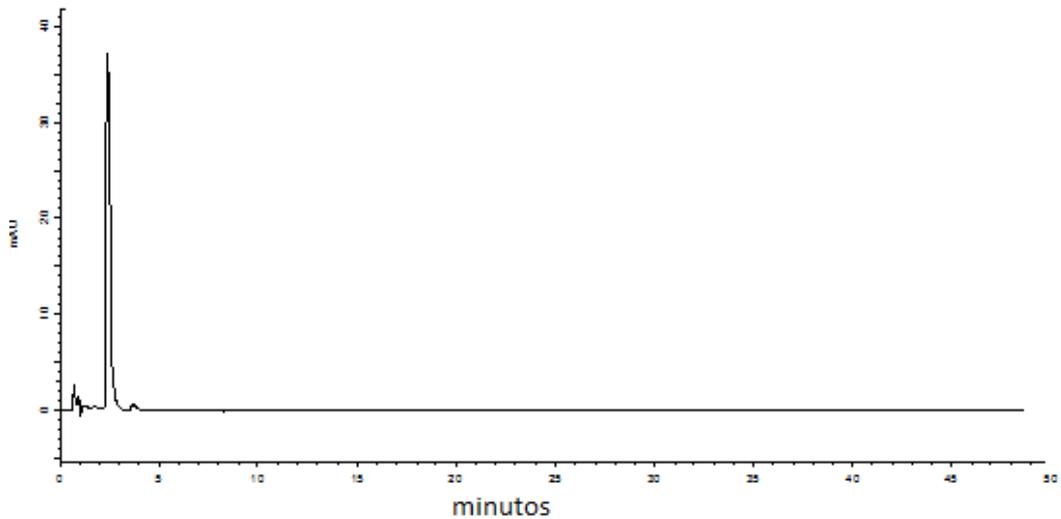


Figura 14 - Cromatograma de soluções contendo 40 µg/mL de nimodipino. Fase móvel acetonitrila e água (70:30 v/v). Coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) Merck®, UV detecção a 235 nm vazão de 1.0 mL/min.

A Figura 15 mostra cromatograma de soluções contendo 25 µg/mL de nimodipino. Fase móvel acetonitrila e água (55:45 v/v). Coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) Merck®, UV detecção a 235 nm vazão de 1.0 mL/min.

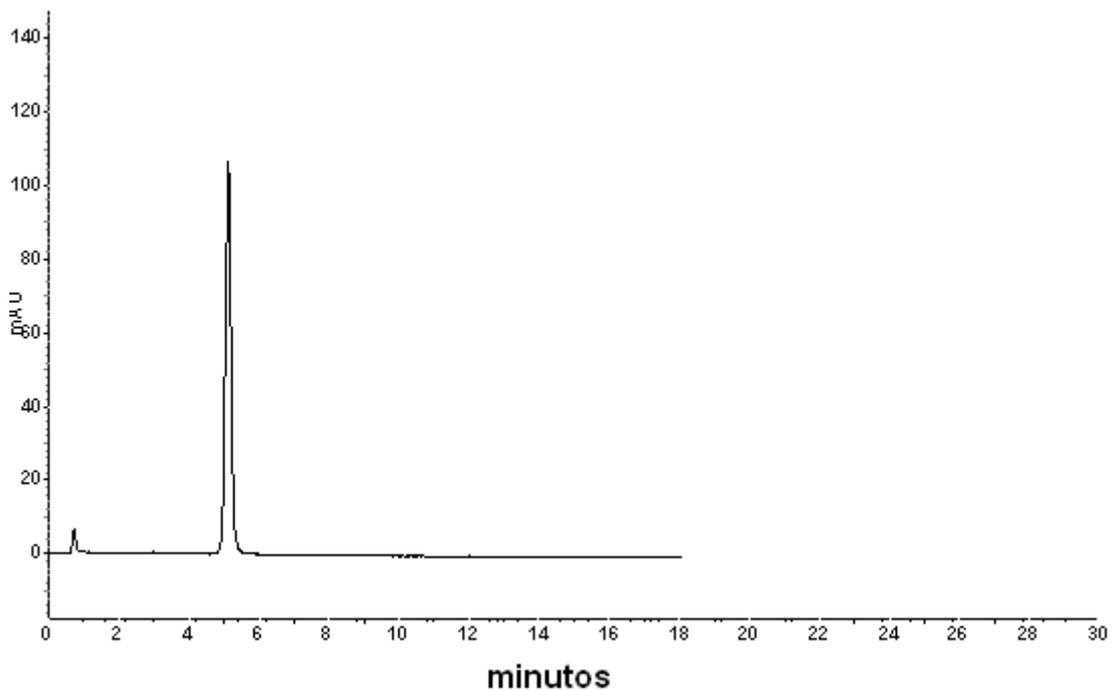


Figura 15 - Cromatograma de soluções contendo 25 µg/mL de nimodipino. Fase móvel acetonitrila e água (55:45 v/v). Coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) Merck®, UV detecção a 235 nm vazão de 1.0 mL/min.

5.1.9 Teste de degradação forçada do nifedipino analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A Figura 16 mostra o cromatograma de solução contendo 25.0 µg/mL de nifedipino em condições de estresse: hidrólise ácida.

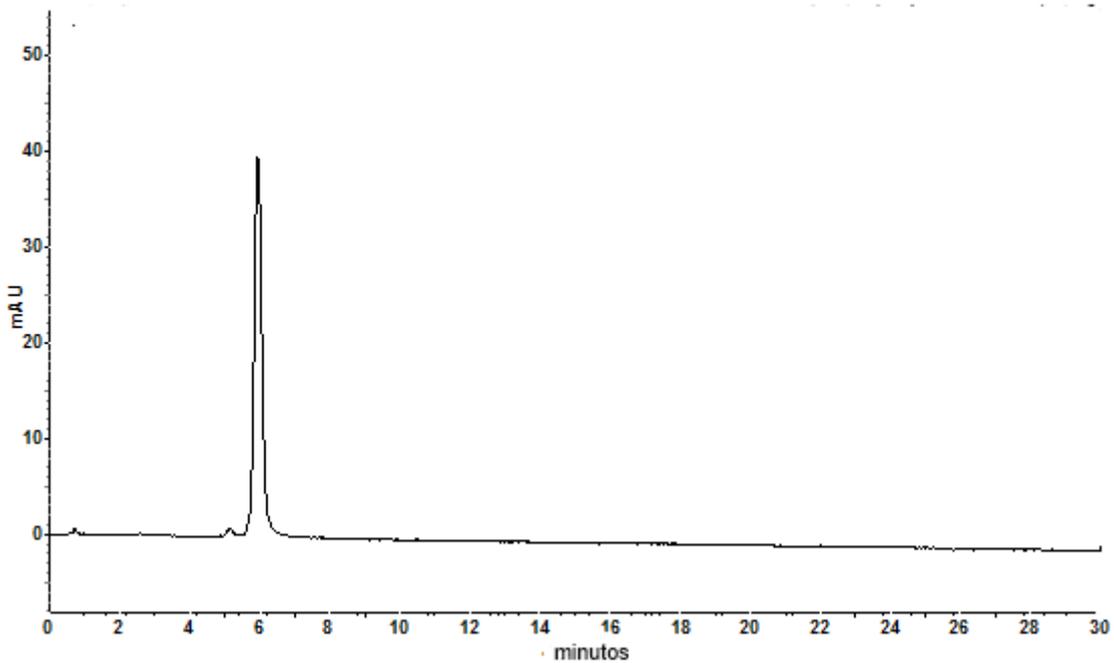


Figura 16 - Cromatograma de solução contendo 25.0 µg/mL de nifedipino em condições de estresse: hidrólise ácida. Condições cromatográficas: fase móvel: metanol e água (55:45 v/v). Coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) Merck®, UV detecção a 235 nm vazão de 1.0 mL/min.

A Figura 17 mostra o cromatograma de solução contendo 25.0 µg/mL de nifedipino em condições de estresse: hidrólise alcalina.

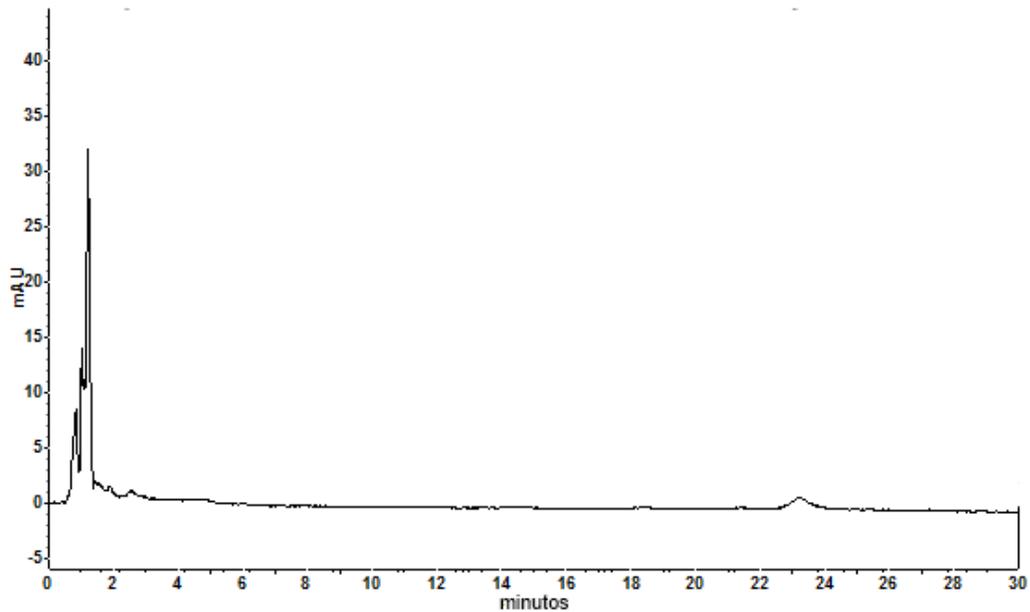


Figura 17 - Cromatograma de solução contendo 25.0 µg/mL de nifedipino em condições de estresse: hidrólise alcalina. Condições cromatográficas: fase móvel: metanol e água (55:45 v/v). Coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) Merck®, UV detecção a 235 nm vazão de 1.0 mL/min.

A Figura 18 mostra o cromatograma de solução contendo 25.0 µg/mL de nifedipino em condições de estresse: oxidação 3% H₂O₂.

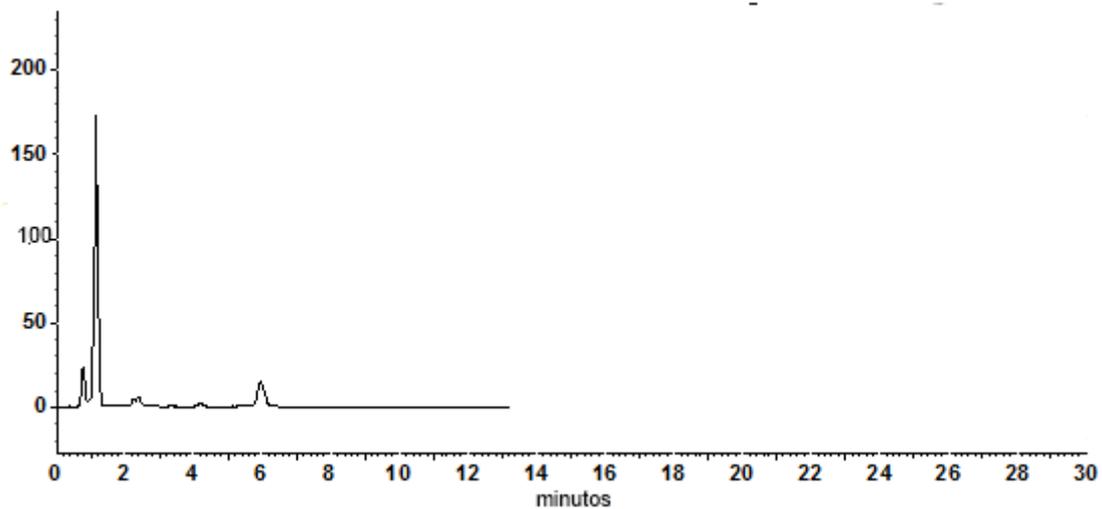


Figura18 - Cromatograma de solução contendo 25.0 µg/mL de nifedipino em condições de estresse: oxidação 3% H₂O₂. Condições cromatográficas: fase móvel: metanol e água (55:45 v/v). Coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) Merck®, UV detecção a 235 nm vazão de 1.0 mL/min.

A Figura 19 mostra o cromatograma de solução contendo 25.0 µg/mL de nifedipino em condições de estresse: H₂O meio neutro.

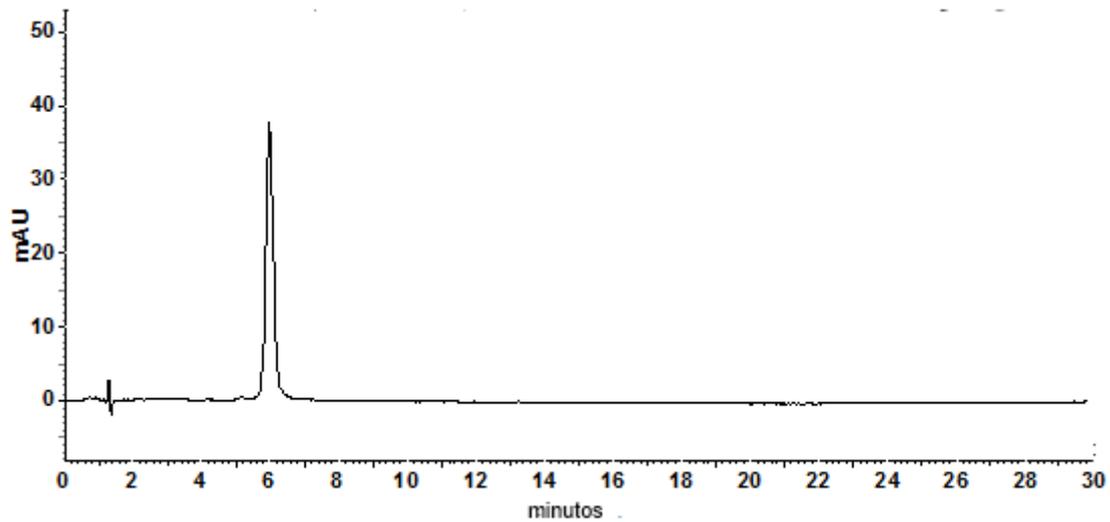


Figura 19 - Cromatograma de solução contendo 25.0 $\mu\text{g/mL}$ de nifedipino em condições de estresse: H_2O meio neutro. Condições cromatográficas: fase móvel: metanol e água (55:45 v/v). Coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5 μm) Merck®, UV detecção a 235 nm vazão de 1.0 mL/min.

5.1.10 Teste de degradação forçada do nimodipino analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A Figura 20 mostra o cromatograma de solução contendo 25.0 $\mu\text{g/mL}$ de nimodipino em condições de estresse: hidrólise ácida.

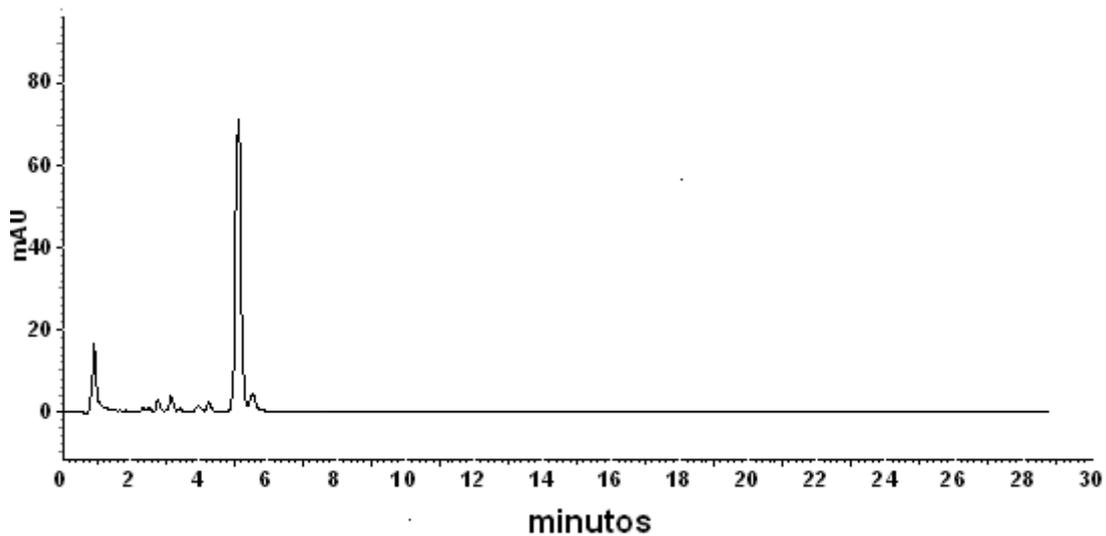


Figura 20 - Cromatograma de solução contendo 25.0 µg/mL de nimodipino em condições de estresse: hidrólise ácida. Condições cromatográficas: fase móvel: acetonitrila e água (55:45 v/v). Coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) Merck®, UV detecção a 235 nm vazão de 1.0 mL/min.

A Figura 21 mostra o cromatograma de solução contendo 25.0 µg/mL de nimodipino em condições de estresse: hidrólise básica.

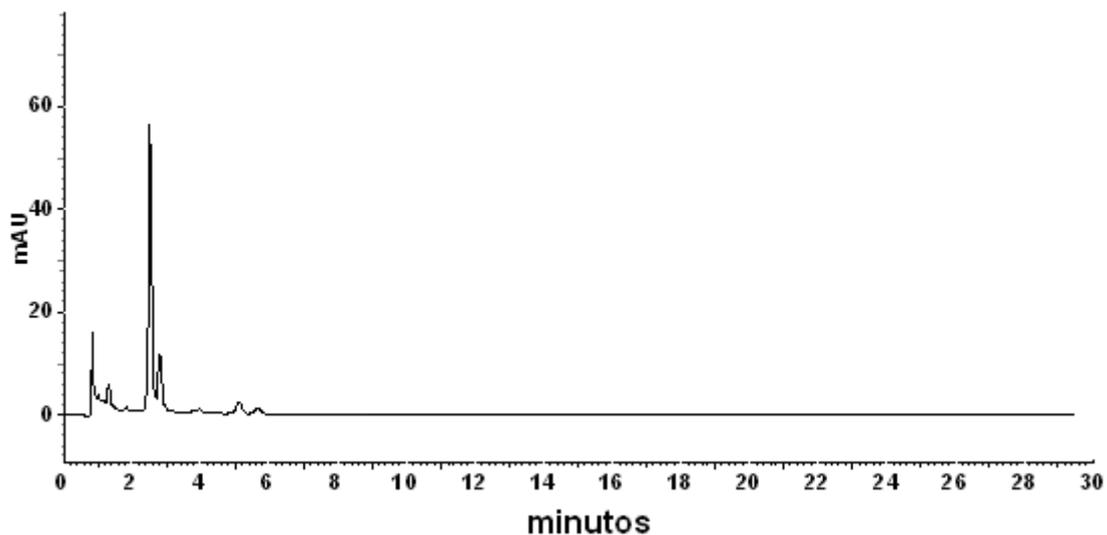


Figura 21 - Cromatograma de solução contendo 25.0 µg/mL de nimodipino em condições de estresse: hidrólise básica. Condições cromatográficas: fase móvel: acetonitrila e água (55:45 v/v). Coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) Merck®, UV detecção a 235 nm vazão de 1.0 mL/min.

A Figura 22 mostra o cromatograma de solução contendo 25.0 µg/mL de nimodipino em condições de estresse: oxidação.

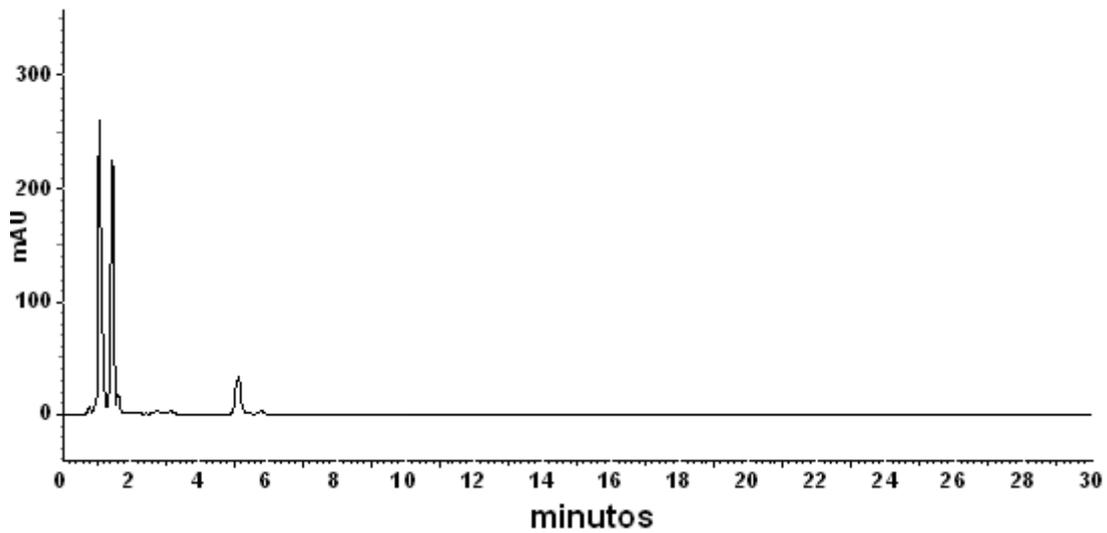


Figura 22 - Cromatograma de solução contendo 25.0 µg/mL de nimodipino em condições de estresse: oxidação. Condições cromatográficas: fase móvel: acetonitrila e água (55:45 v/v). Coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) Merck®, UV detecção a 235 nm vazão de 1.0 mL/min.

A Figura 23 mostra o cromatograma de solução contendo 25.0 µg/mL de nimodipino em condições de estresse: hidrólise neutra

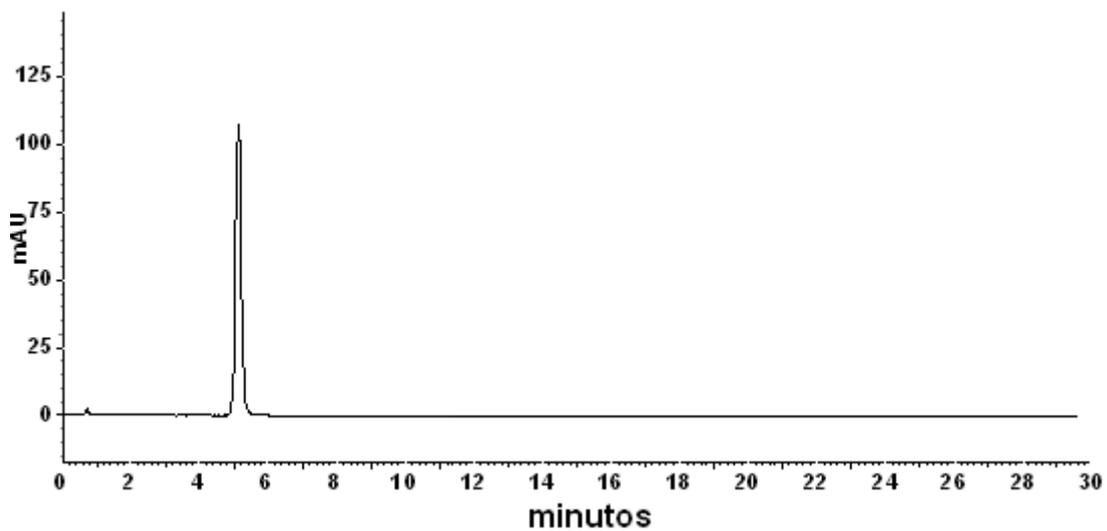


Figura 23 - Cromatograma de solução contendo 25.0 µg/mL de nimodipino em condições de estresse: hidrólise neutra. Condições cromatográficas: fase móvel: acetonitrila e água (55:45 v/v). Coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) Merck®, UV detecção a 235 nm vazão de 1.0 mL/min.

5.2 ANÁLISE TÉRMICA

5.2.1 Caracterização das amostras dos fármacos por Termogravimetria (TG) /Termogravimetria derivada (DTG), Análise Térmica Diferencial (DTA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

5.2.1.1 Besilato de anlodipino

A Figura 24 apresenta a sobreposição das curvas TG/DTG e DTA da amostra de besilato de anlodipino matéria-prima. A amostra do fármaco apresentou estabilidade térmica até aproximadamente 215°C (KORADIA *et.al*, 2010). A partir desta temperatura um único evento de perda de massa relacionado a decomposição térmica do material foi observado e finalizando-se em torno de 500°C.

A curva DTA evidenciou dois picos (endotérmicos) que estão associados à fusão (em torno de 200°C) e ao processo de decomposição do fármaco (em torno de 215°C), respectivamente.

A curva DSC apresentou um pico endotérmico que se refere a fusão do fármaco, iniciando-se em 194,4°C (T_{onset}) e finalizando em 214,0°C (T_{offset}) com T_{pico} em 205,8°C, corroborando com os dados de DTA.

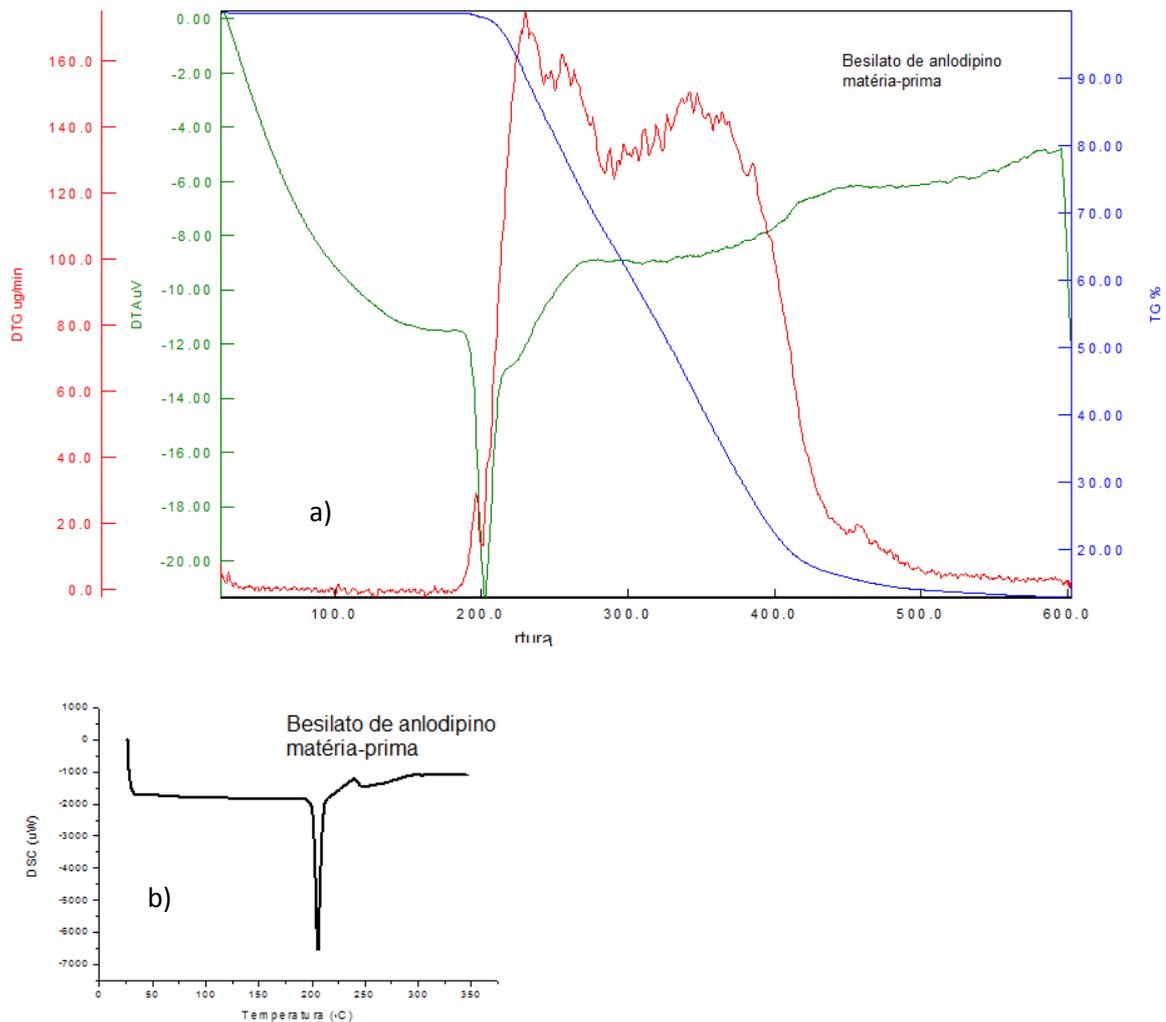


Figura 24 – a) Sobreposição das curvas TG/DTG e DTA da amostra de besilato de anlodipino matéria-prima obtidas na razão de aquecimento $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ de 25 a 600°C em atmosfera dinâmica de nitrogênio: $100\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ utilizando-se cadinho de alumínio. b) Curva DSC da amostra de besilato de anlodipino matéria-prima obtida por uma razão de aquecimento $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ entre 25 a 350°C , atmosfera dinâmica de nitrogênio: $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

5.2.1.2 Nifedipino

A Figura 25 apresenta a sobreposição das curvas TG/DTG e DTA da amostra de nifedipino matéria-prima. A partir dos resultados de TG/DTG, observou-se que a amostra apresentou-se estável termicamente até próximo a 200°C , onde se iniciou um único evento de decomposição térmica, finalizando em torno de 350°C . A curva DTA indicou três eventos endotérmicos: o primeiro em torno de 172°C , relacionado à fusão e o segundo e o terceiro estão relacionados ao processo de decomposição térmica do material, pois podem ser observados na curva TG/DTG com perda de massa.

A curva DSC apresentou um pico endotérmico que se refere a fusão do fármaco, iniciando-se em 164,6 °C (T_{onset}) e finalizando em 178,9 °C (T_{offset}) com T_{pico} em 172,8 °C, corroborando com os dados de DTA.

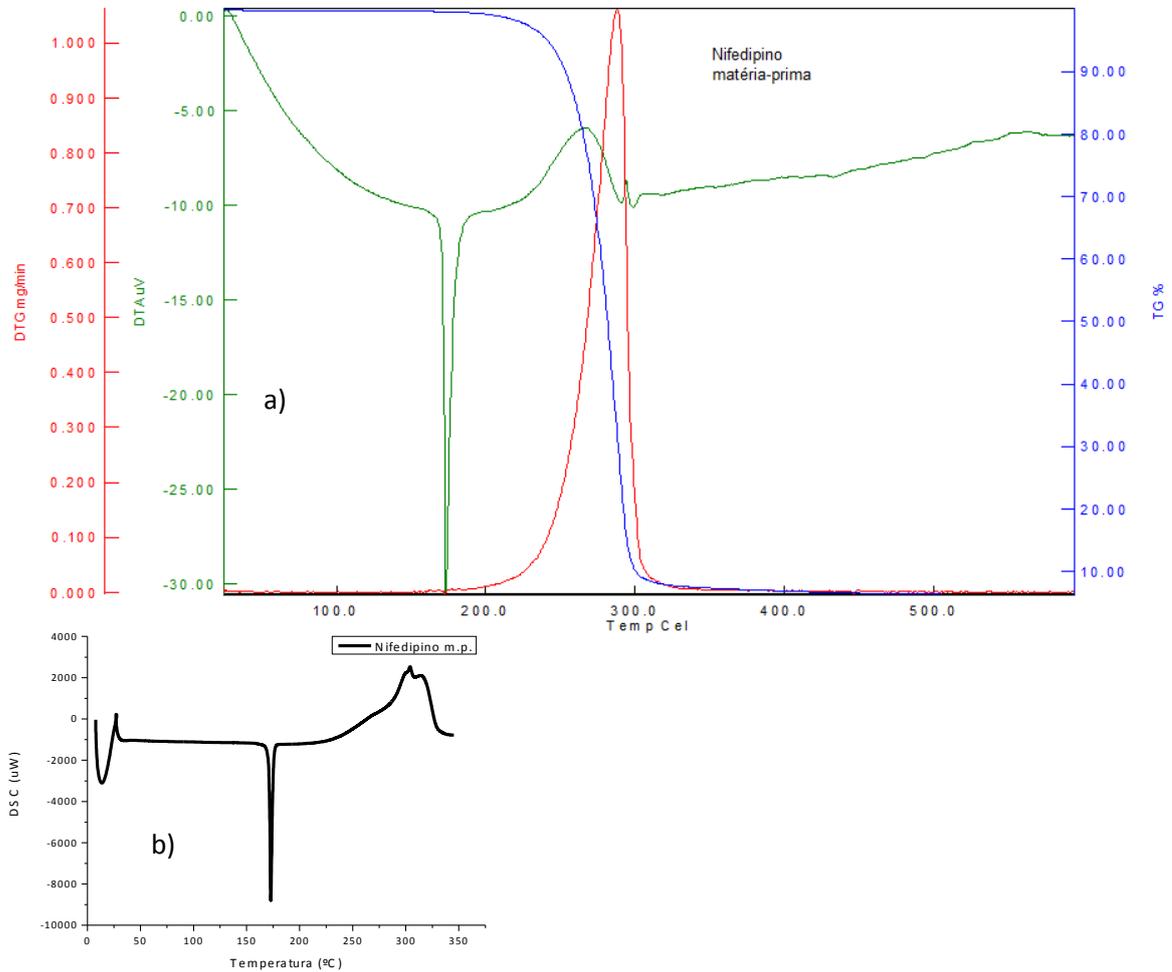


Figura 245 - a) Sobreposição das curvas TG/DTG e DTA da amostra de nifedipino matéria-prima obtidas na razão de aquecimento $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ entre 25 a 600°C , atmosfera de nitrogênio: $100\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ utilizando-se cadinho de alumínio. b) Curva DSC da amostra de nifedipino matéria-prima obtida por uma razão de aquecimento $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ entre 25 a 350°C , atmosfera dinâmica de nitrogênio: $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

A Figura 26 apresenta a sobreposição das curvas TG/DTG e DTA da amostra de comprimido de nifedipino 10mg. As curvas TG/DTG indicaram que a amostra se decompôs em cinco etapas de perda de massa: a primeira ocorreu desde a temperatura ambiente (25°C), indicando a presença de água em sua composição e as outras relacionadas a decomposição térmica do fármaco e de seus excipientes.

A curva DTA evidenciou sete eventos endotérmicos sendo que, como pode ser observado nas curvas TG/DTG, ou seja estão relacionados com a energia envolvida na decomposição térmica dos excipientes do comprimido.

A curva DSC apresentou um pico endotérmico característico de fusão iniciando-se em 153 °C (T_{onset}) e finalizando em 165,2 °C (T_{offset}).

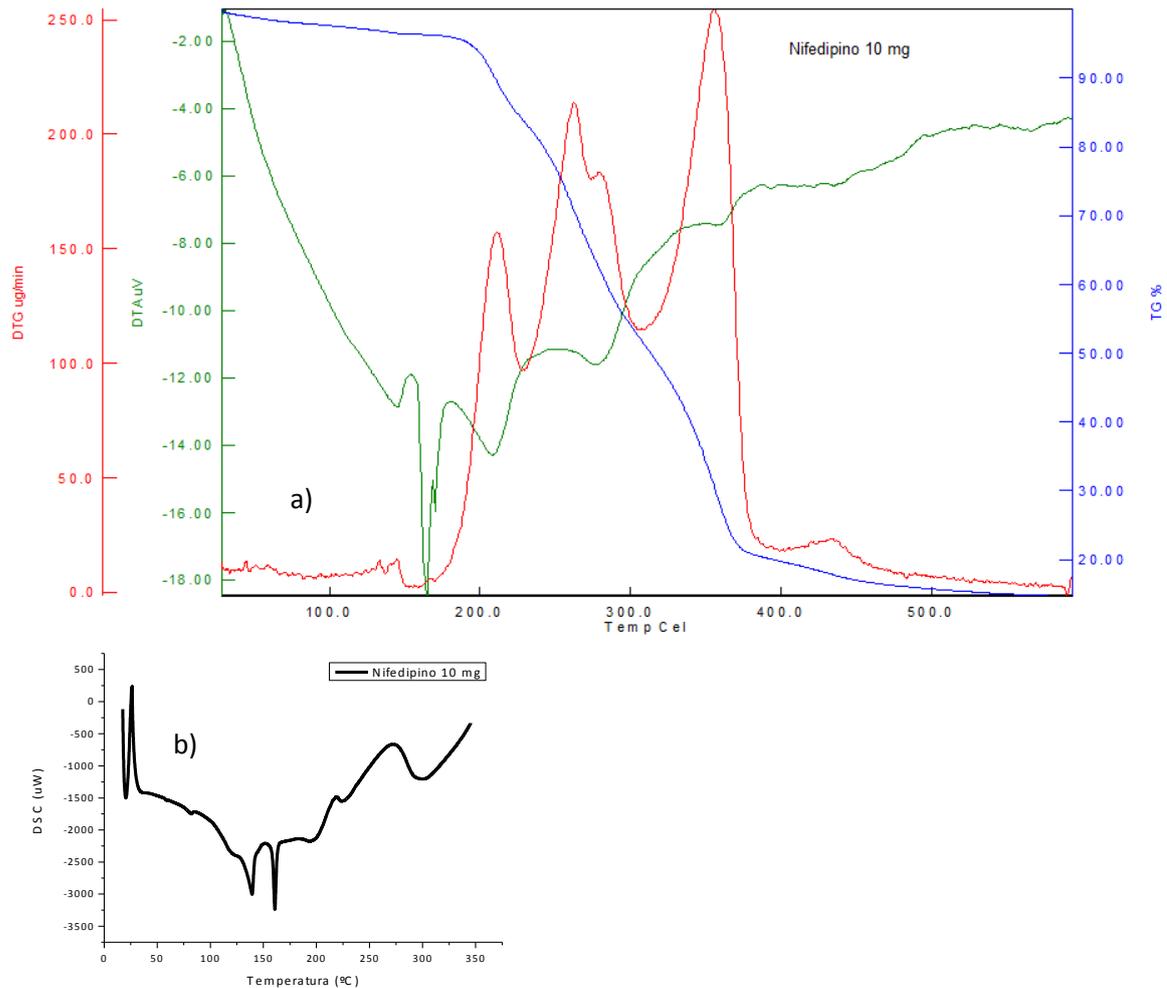


Figura 25 - a) Curvas TG/DTG e DTA da amostra de comprimido de nifedipino de 10 mg, obtida na razão de aquecimento $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ entre 25 a 600°C , atmosfera dinâmica de nitrogênio: $100\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ utilizando-se cadinho de alumínio. b) Curva DSC da amostra de comprimido de nifedipino 10mg obtida por uma razão de aquecimento $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ entre 25 a 350°C , atmosfera dinâmica de nitrogênio: $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

A Figura 27 apresenta a sobreposição das curvas TG/DTG e DTA da amostra de comprimido de nifedipino 20mg. O perfil térmico foi semelhante a amostra de comprimido de nifedipino 10mg. A curva DSC apresentou dois picos bem definidos de fusão: o primeiro iniciando em $154,4^{\circ}\text{C}$ (T_{onset}) e finalizando em $167,3^{\circ}\text{C}$ (T_{offset})

com T_{pico} em 164,2 °C e o segundo iniciando em 167,3 °C (T_{onset}), finalizando em 174,7 °C (T_{offset}) com T_{pico} em 169,7 °C.

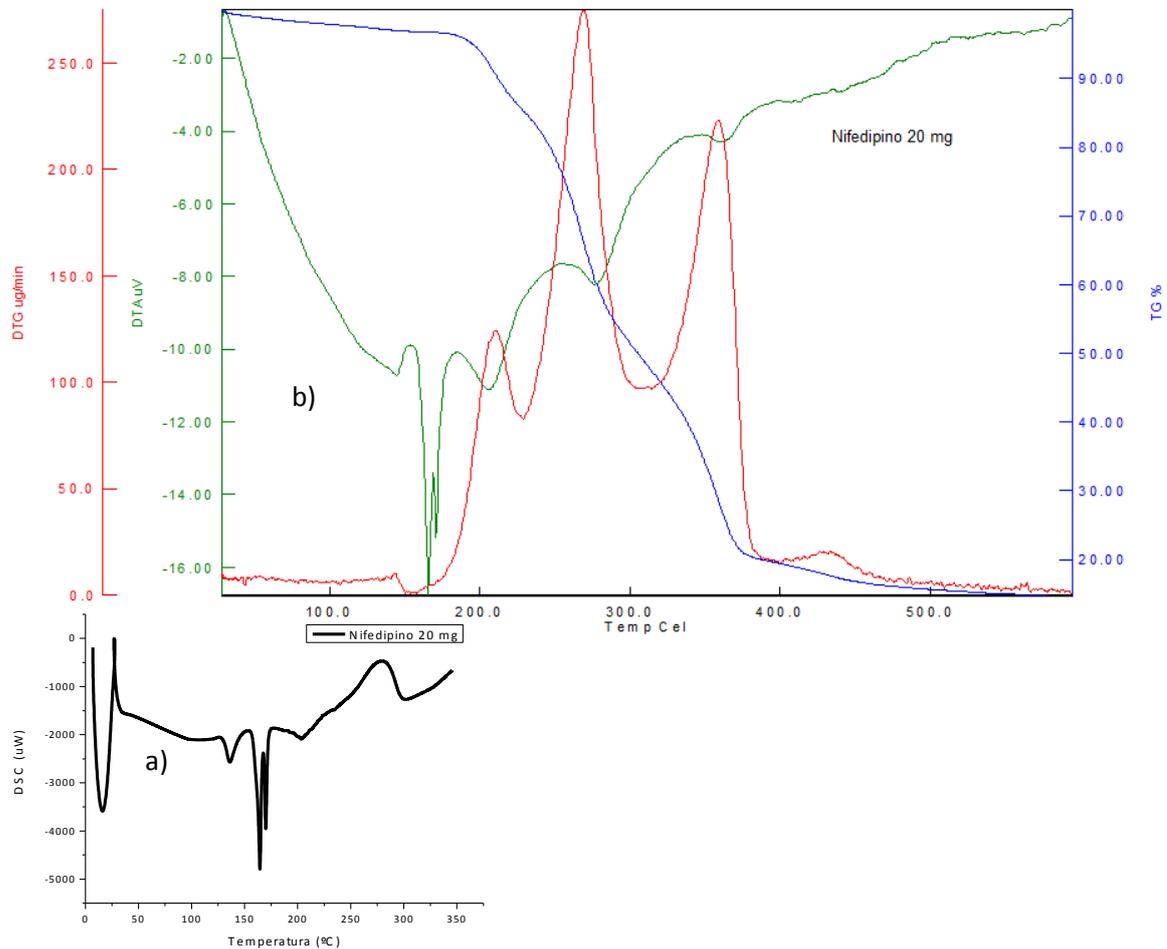


Figura 26 – a) Sobreposição das curvas TG/DTG e DTA da amostra de nifedipino em comprimido de 20 mg, obtida na razão de aquecimento $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ entre 25 a 600°C , atmosfera dinâmica de nitrogênio: $100\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ utilizando-se cadinho de alumínio. b) obtida por uma razão de aquecimento $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ entre 25 a 350°C , atmosfera dinâmica de nitrogênio: $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

5.2.1.3 Nimodipino

A Figura 25 apresenta a sobreposição das curvas TG/DTG e DTA da amostra de nimodipino matéria-prima. As curvas TG/DTG indicaram que a amostra se decompôs em uma única etapa acentuada, iniciando-se em 230°C e finalizando em aproximadamente 360°C .

A curva DTA indicou 2 eventos endotérmicos: o primeiro em torno de 120°C , relacionado a fusão (GENARO, 2004) e o segundo em torno de 290°C , relacionado a decomposição térmica da amostra.

Os dados de DSC corroboram com os dados extraídos da curva DTA. Aquela apresentou um pico de fusão iniciando em 118,0°C e finalizando em 132,5°C com T_{pico} em 124,7°C.

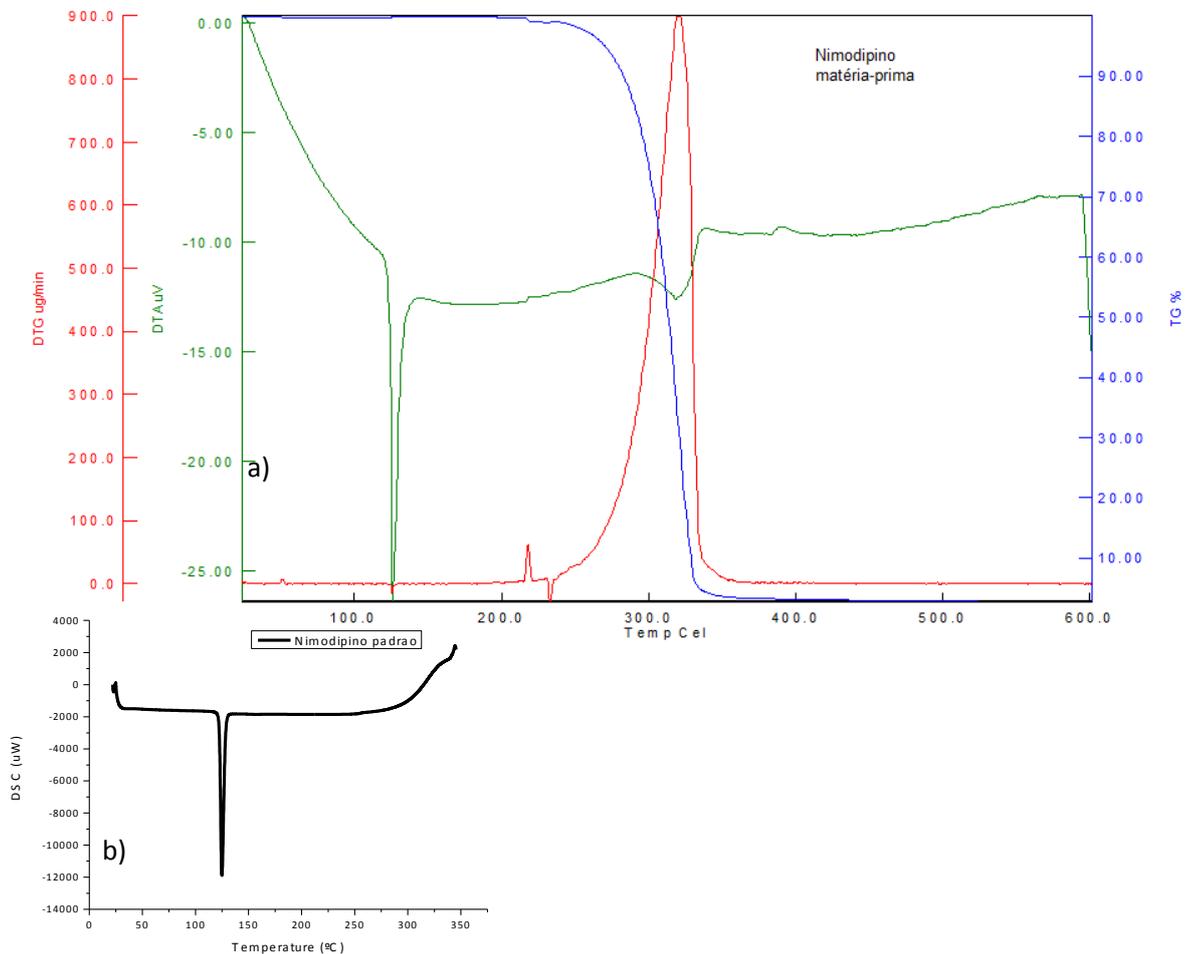


Figura 27 – a) Sobreposição das curvas TG/DTG e DTA da amostra de nimodipino matéria-prima, obtida na razão de aquecimento $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ entre 25 a 600°C , atmosfera dinâmica de nitrogênio: $100\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ utilizando-se cadinho de alumínio. b) Curva DSC da amostra padrão de nimodipino obtida por uma razão de aquecimento $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ entre 25 a 350°C , atmosfera dinâmica de nitrogênio: $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

5.3 ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X

As análises de fases por difração de raios X a temperatura ambiente foram realizadas no Instituto de Geociências, Departamento de Mineralogia e Petrologia da USP. Utilizou-se um difratômetro modelo D8, com configuração configurado segundo a geometria Bragg-Brentano e com um motor de passo. O motor de passo permite a aquisição de dados na forma digital (leitura por computador) ou na forma analógica (registrador gráfico). A técnica digital consiste na leitura dos dados em

Quando comparados padrão e amostra não observamos presença de polimorfos do padrão em relação ao comprimido analisado.

5.3.2 Nifedipino

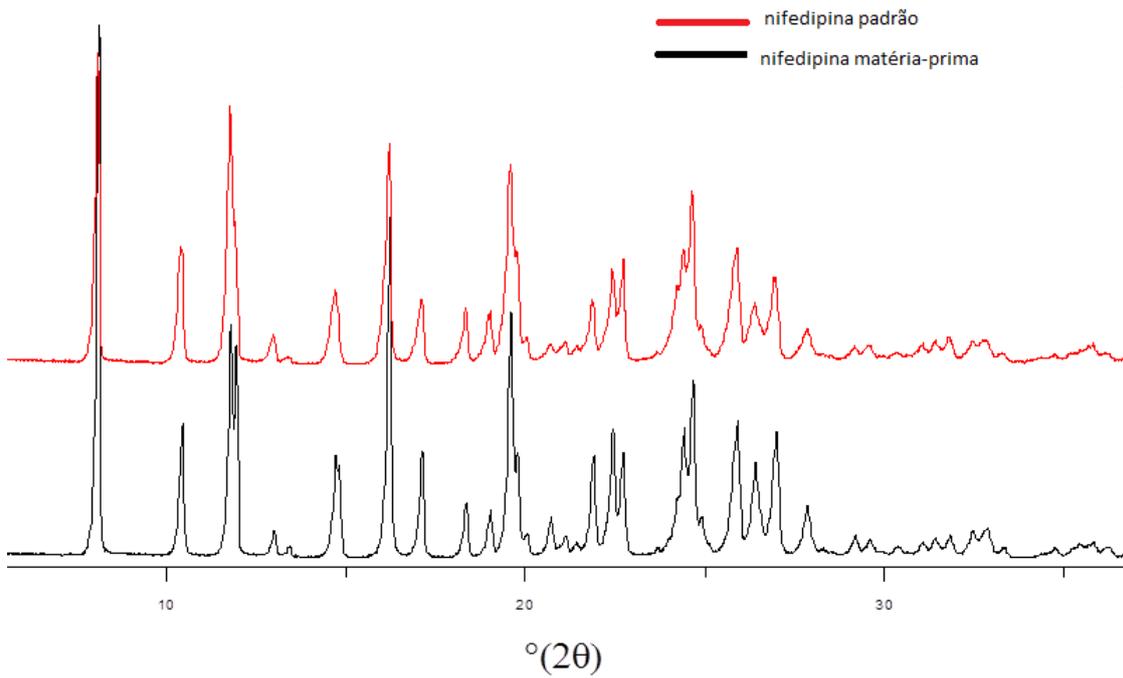


Figura 29 - Difratomogramas de raios X do nifedipino padrão temperatura de (2.000°- 40.000° passo de 0,010°) e nifedipino matéria-prima (2.000°- 40.000° passo de 0,010°).

Em relação ao padrão e a matéria-prima analisados não existem diferenças significativas.

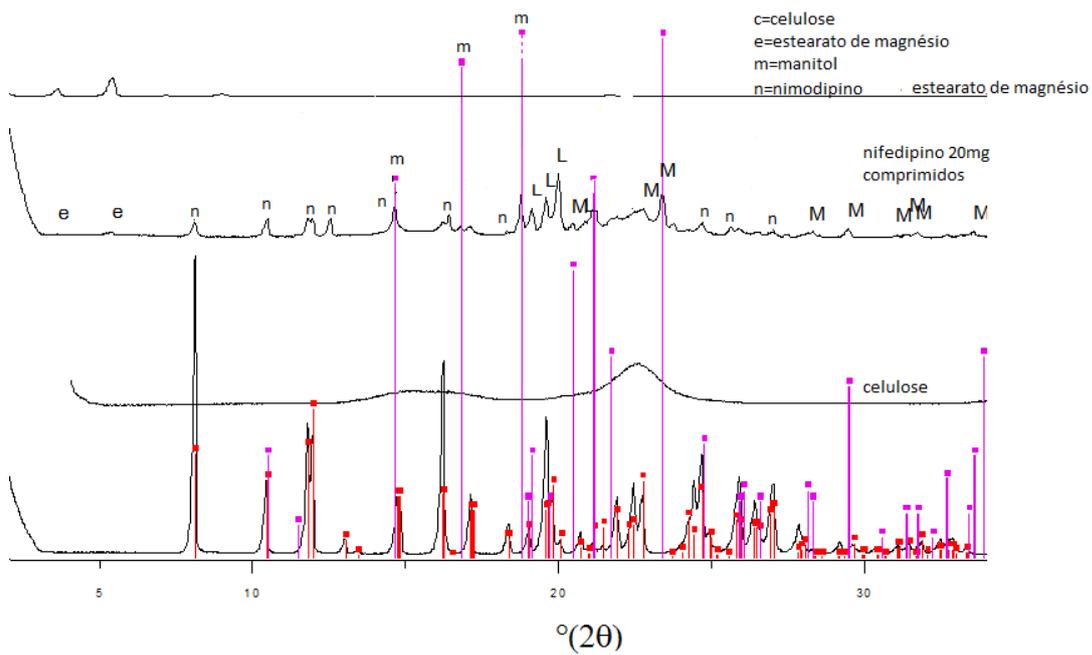


Figura 30 - Difratomogramas de raios X do nifedipino padrão temperatura de (2.000°- 40.000° passo de 0,010°), da celulose (4.020°- 40.000° passo de 0,020°), do comprimido de nifedipino 20 mg marca A (2.000°- 100.004° passo de 0,020°) do estearato de magnésio (1854°- 39.844° passo de 0,020°) e do manitol.

Em relação ao padrão e comprimido analisado aparentemente apresentam o mesmo polimorfo.

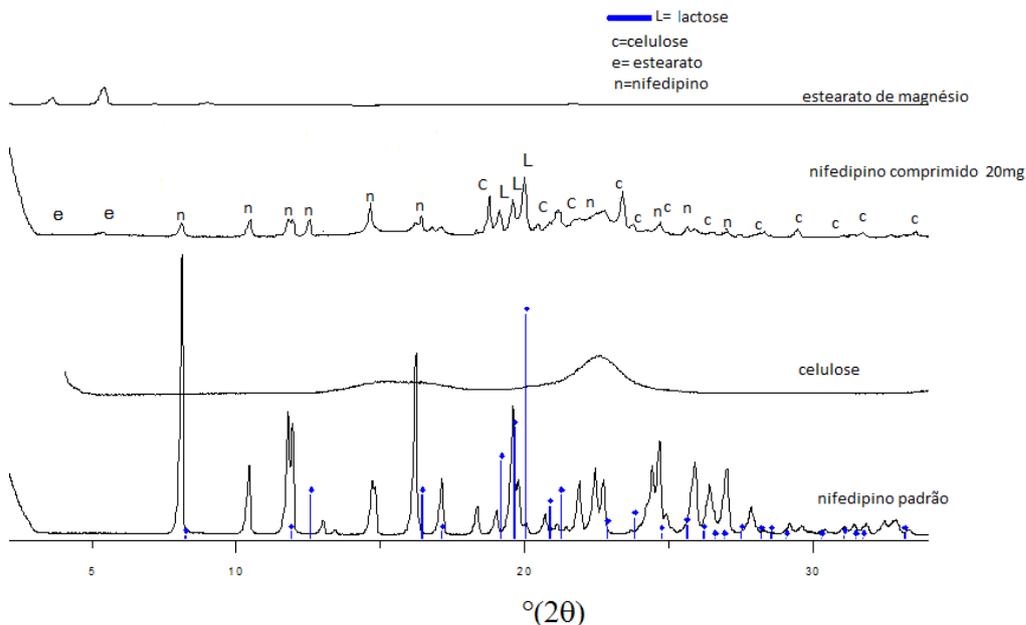


Figura 31 - Difratomogramas de raios X do nifedipino padrão temperatura de (2.000°- 40.000° passo de 0,010°), da celulose (4.020°- 40.000° passo de 0,020°), do comprimido de nifedipino 20 mg marca A (2.000°- 100.004° passo de 0,020°) do estearato de magnésio (1854°- 39.844° passo de 0,020°) e da lactose.

Em relação ao padrão e comprimido analisado não existe polimorfos.

5.3.3 Nimodipino

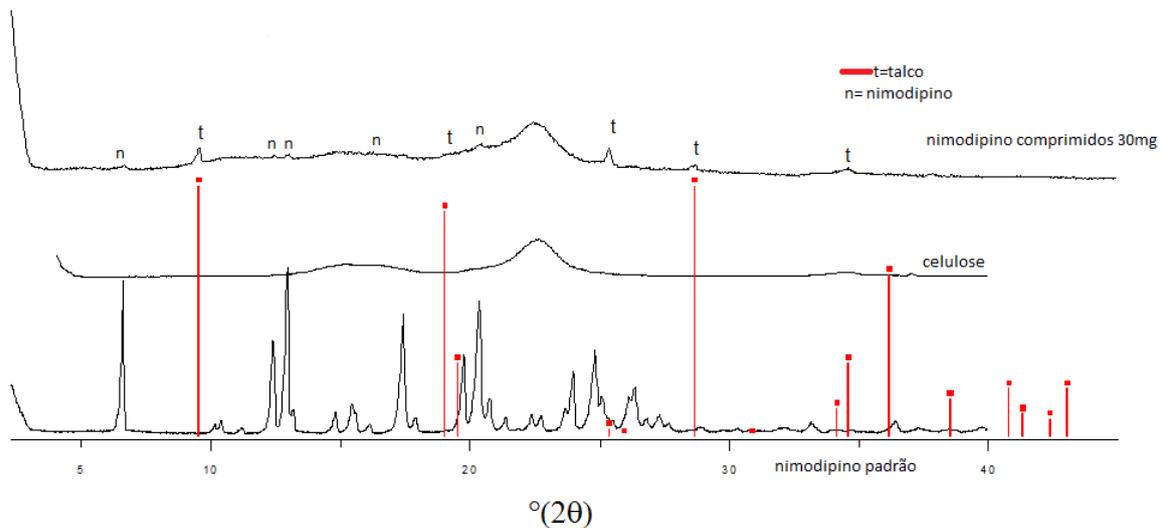


Figura 32 - Difrátogramas de raios X do nimodipino padrão temperatura de (2.000°- 40.000° passo de 0,010°), da celulose (4.020°- 40.000° passo de 0.020°), do comprimido de nimodipino 30mg marca A (2.000°- 100.004° passo de 0,020°) e talco.

Em relação ao padrão e comprimido analisado não existe polimorfos.

5.4 Espectroscopia de Absorção na região do Infravermelho com Transformada De Fourier (FTIR)

Os espectros de absorção na região do infravermelho das amostras de, besilato de anlodipino padrão, besilato de anlodipino matéria-prima, besilato de anlodipino comprimido; nifedipino padrão, nifedipino matéria-prima e nifedipino comprimido; nimodipino padrão, nimodipino matéria-prima e nimodipino comprimido foram obtidos em equipamento Perkin Elmer na região de 4000 à 400 cm^{-1} . Foram

preparadas pastilhas de KBr contendo amostras. A análise de espectroscopia foi realizada para caracterização do material e não para identificar polimorfismo. Os ensaios foram realizados nos laboratórios da Central Analítica do Instituto de Química da USP.

5.4.1 Besilato de anlodipino

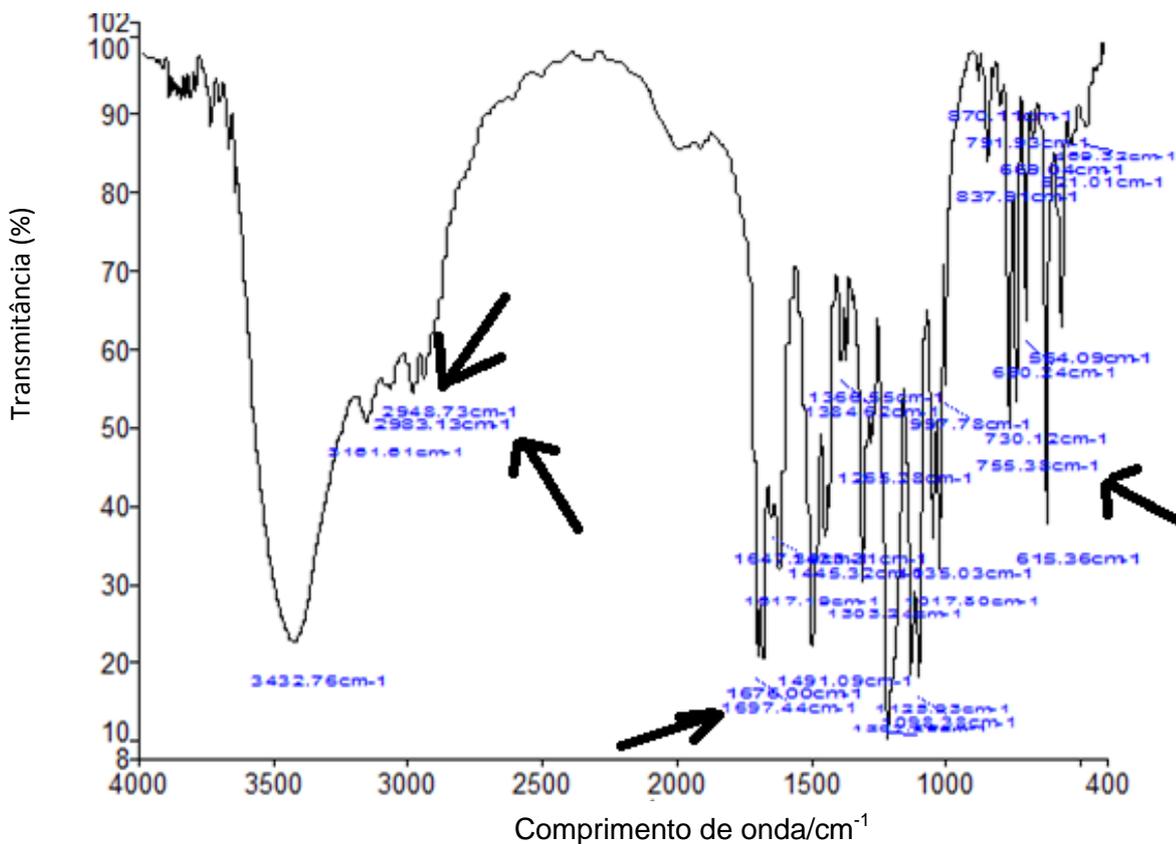


Figura 33 - Espectro de absorção na região do infravermelho do besilato de anlodipino padrão.

A tabela 8 apresenta as principais bandas características atribuídas ao besilato de anlodipino.

Tabela 7- Atribuições das principais bandas características do besilato de anlodipino

Comprimento de onda cm ⁻¹	atribuições
2983	banda de deformação axial simétrica referente a CH ₃
2948	bandas de deformação axial e assimétrica de CH ₂
1697	deformação axial das ligações c=o
755	deformação angular de CH ₂

Com base na análise das principais bandas do espectro e dos resultados obtidos empregando-se as demais técnicas analíticas, pode-se concluir a substância é o besilato de anlodipino padrão.

A Figura 34 representa uma ampliação na faixa de 1972 a 386 cm^{-1} . A banda de 1220 -1190 cm^{-1} proveniente de uma deformação axial de carbonila representa a impressão digital é específica da substância.

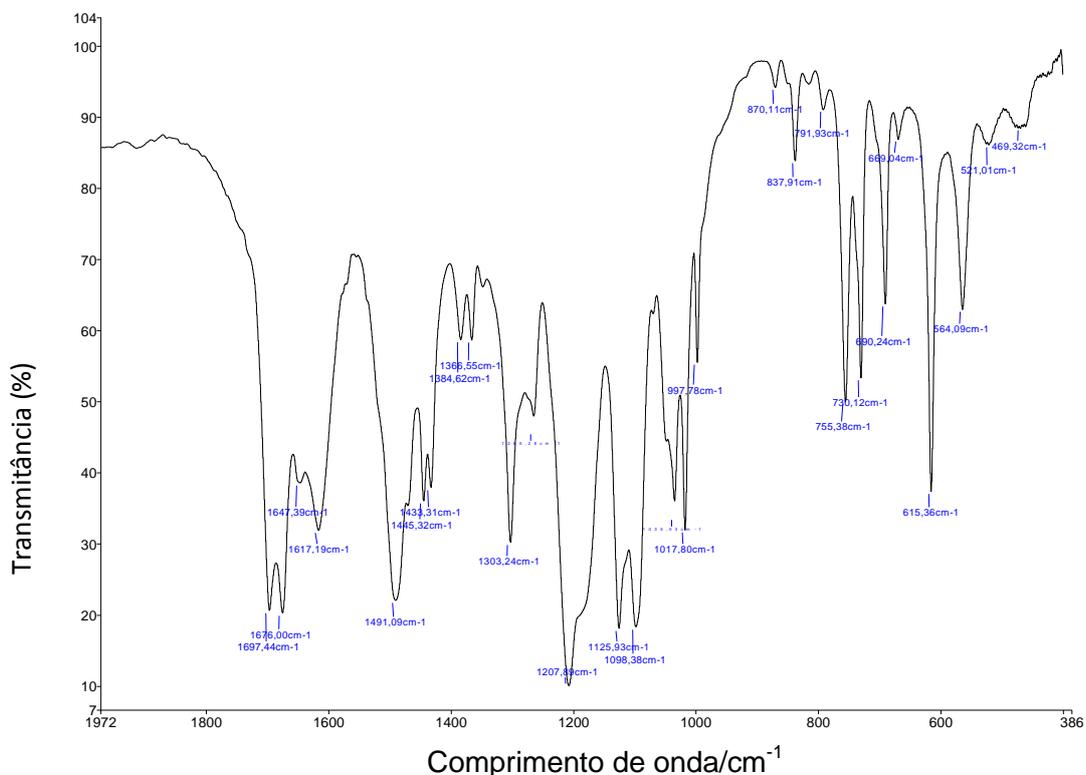


Figura 34 - Espectro de absorção na região do infravermelho do besilato de anlodipino padrão.

A Figura 35 representa o espectro de absorção da substância besilato de anlodipino matéria-prima. A vibração simétrica absorve fortemente em 1300 -1255 cm^{-1} característico dos grupos nitratos específicos para essa molécula.

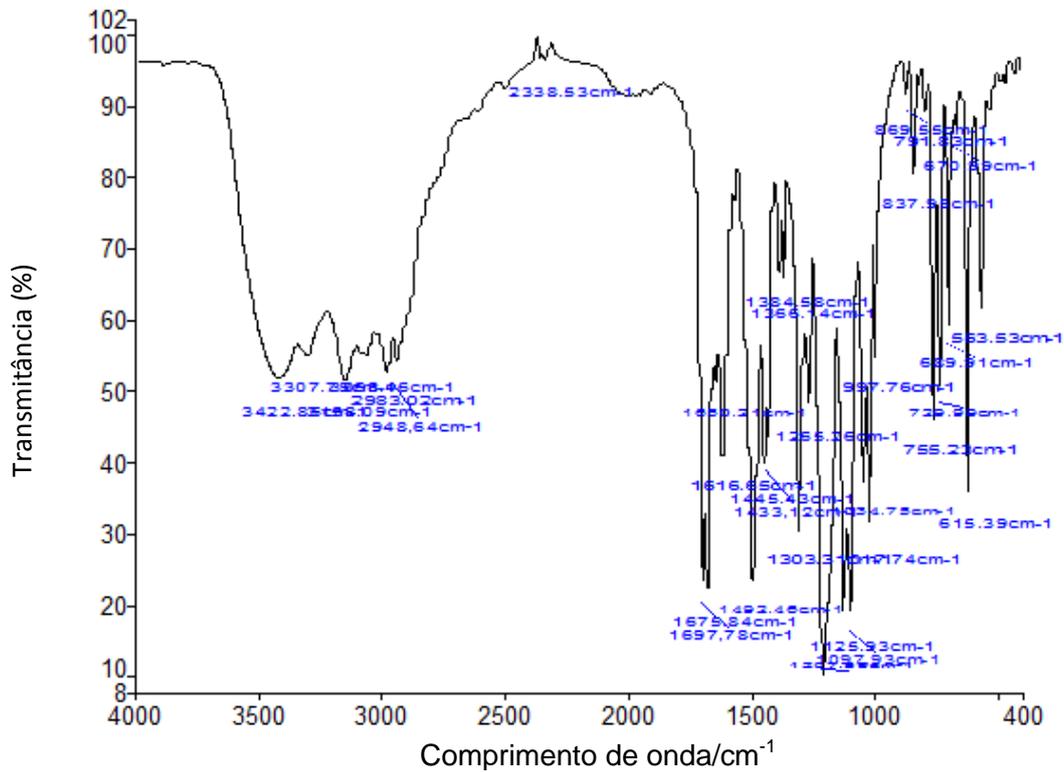


Figura 35 - Espectro de absorção na região do infravermelho do besilato de anlodipino matéria-prima

Na Figura 36 a quantidade de ativo é pouco expressiva uma vez que o peso médio foi de 200,7mg para comprimidos de 10 mg.

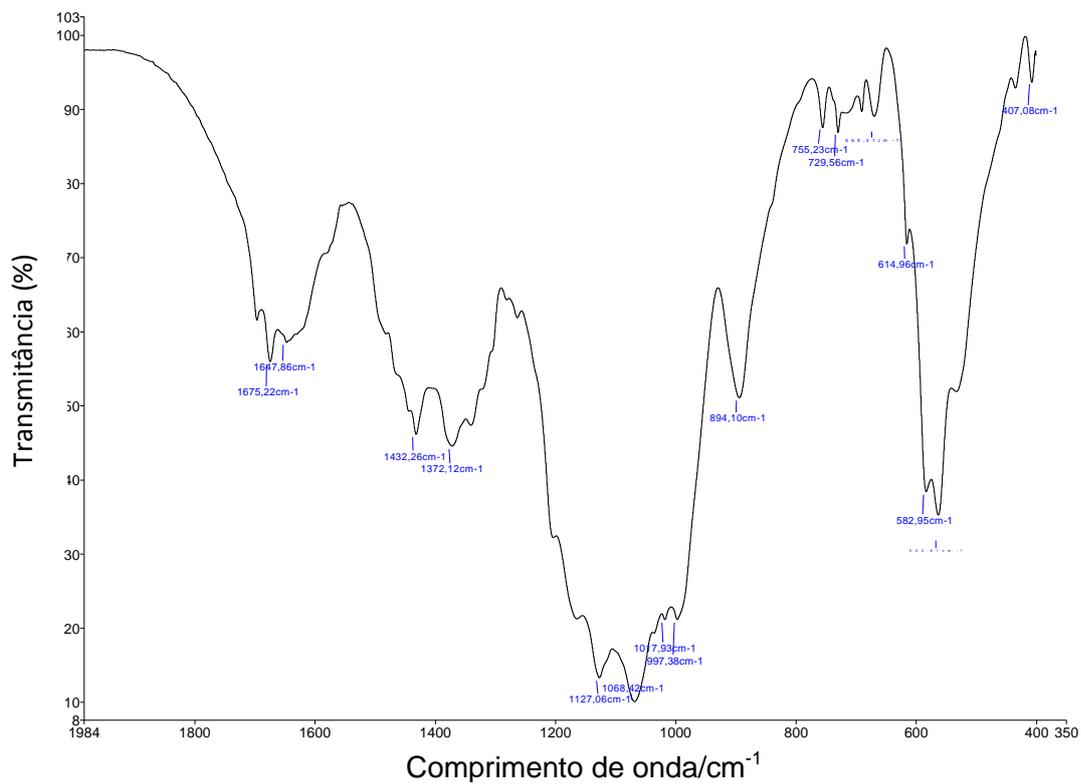


Figura 36 - Espectro de absorção na região do infravermelho do besilato de anlodipino comprimidos

5.4.2 Nifedipino

A Figura 37 representa a substância nifedipino padrão. Na região de 3332.13 cm^{-1} observa-se uma banda que representa uma amina secundária, característico da substância.

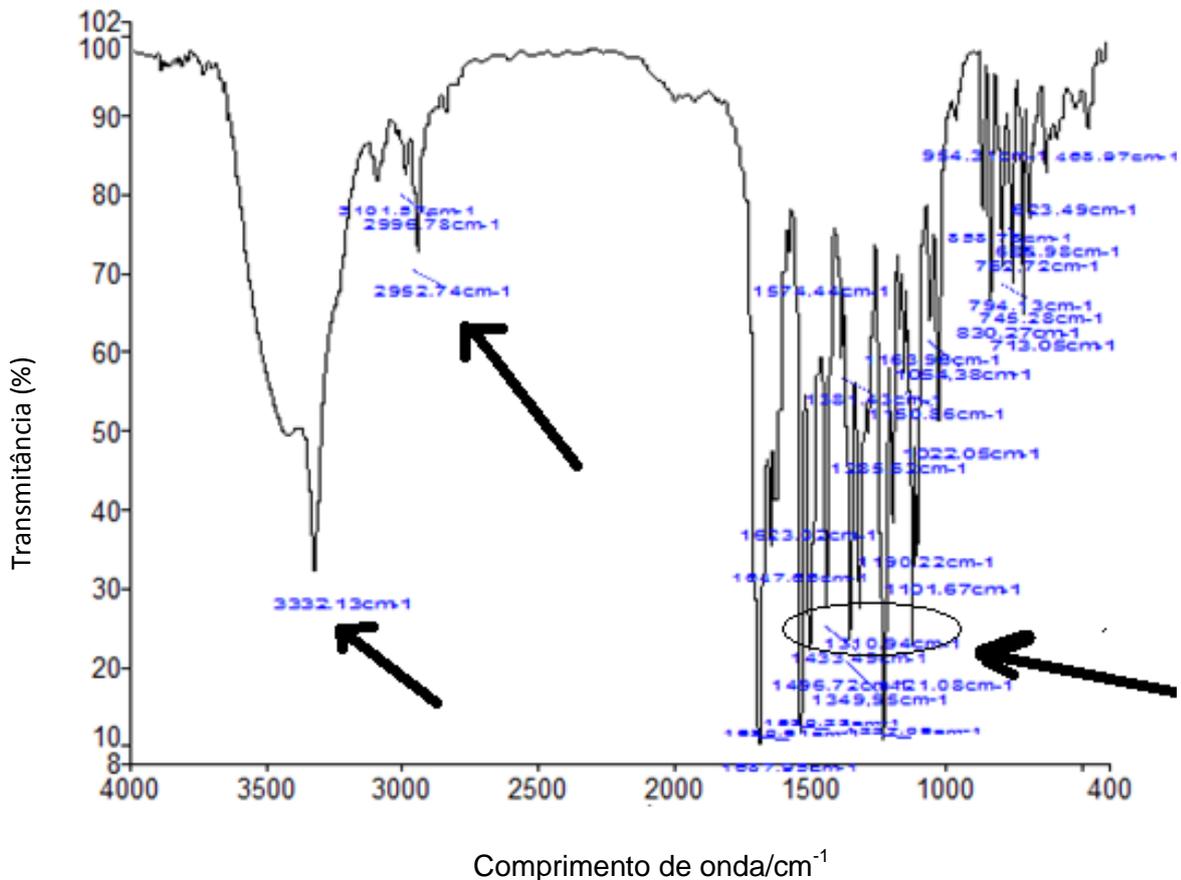


Figura 37 - Espectro de absorção na região do infravermelho do nifedipino padrão

Tabela 8- Atribuições das principais bandas características do Nifedipino

Comprimento de onda cm^{-1}	atribuições
2952.74	Ácido carboxílico
1380-1300	NO_2

Figura 38 representa uma ampliação na região 2000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} para melhor identificar as bandas que representam o composto. Em 1688 cm^{-1} região característica para carbonila, bandas de 1100 cm^{-1} que representam OCH_3 , bandas aromáticas 1450 cm^{-1} , bandas de CH_3 região de 2950 cm^{-1} região de 3100 cm^{-1} hidrogênio ligado a carbono de anel aromático (SILVERSTAIN, 2004).

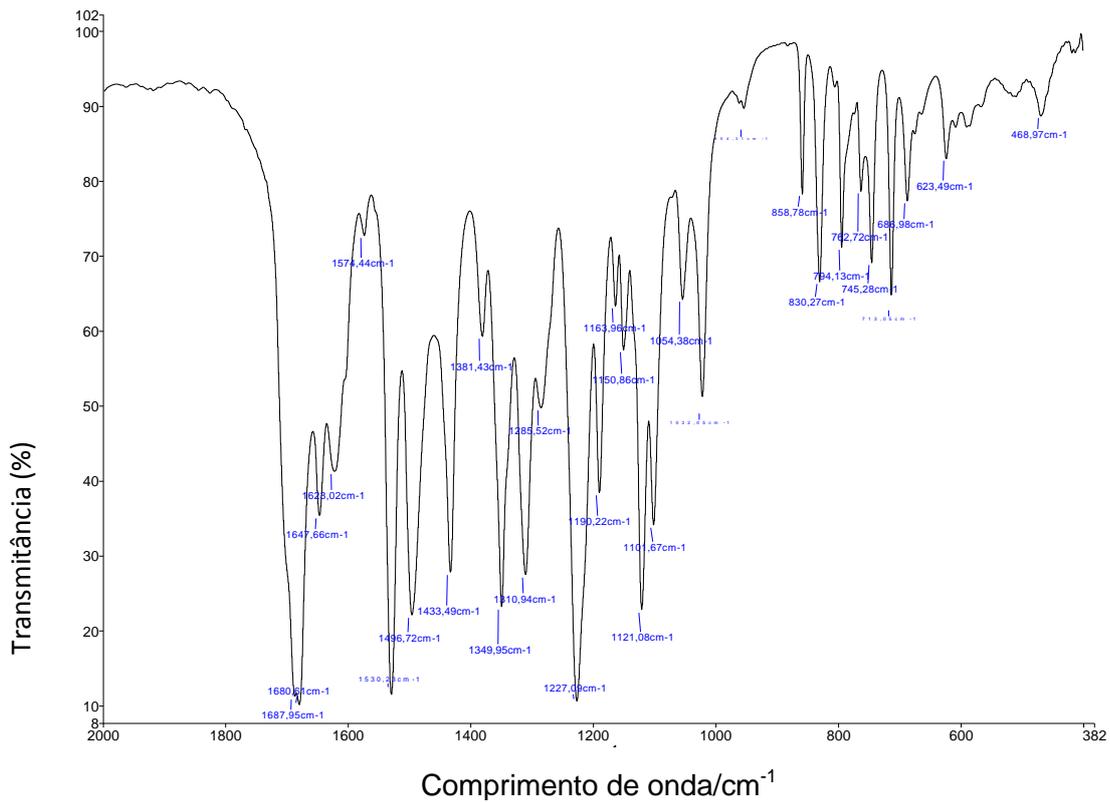


Figura 38 - Espectro de absorção na região do infravermelho do nifedipino padrão

A Figura 37 mostra o espectro e absorção da substância nifedipino matéria-prima. Não são observadas diferenças significativas entre nifedipino padrão e nifedipino matéria-prima.

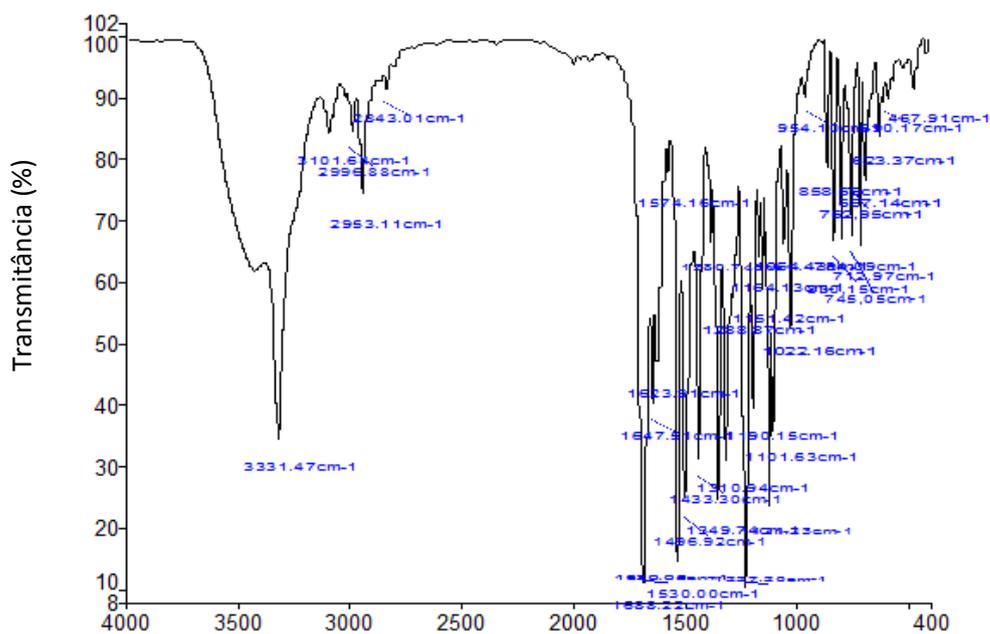


Figura 39 - Espectro de absorção na região do infravermelho do nifedipino matéria-prima

A Figura 40 representa uma ampliação na região 1996 cm^{-1} a 400 cm^{-1} para melhor identificar as bandas que representam o composto.

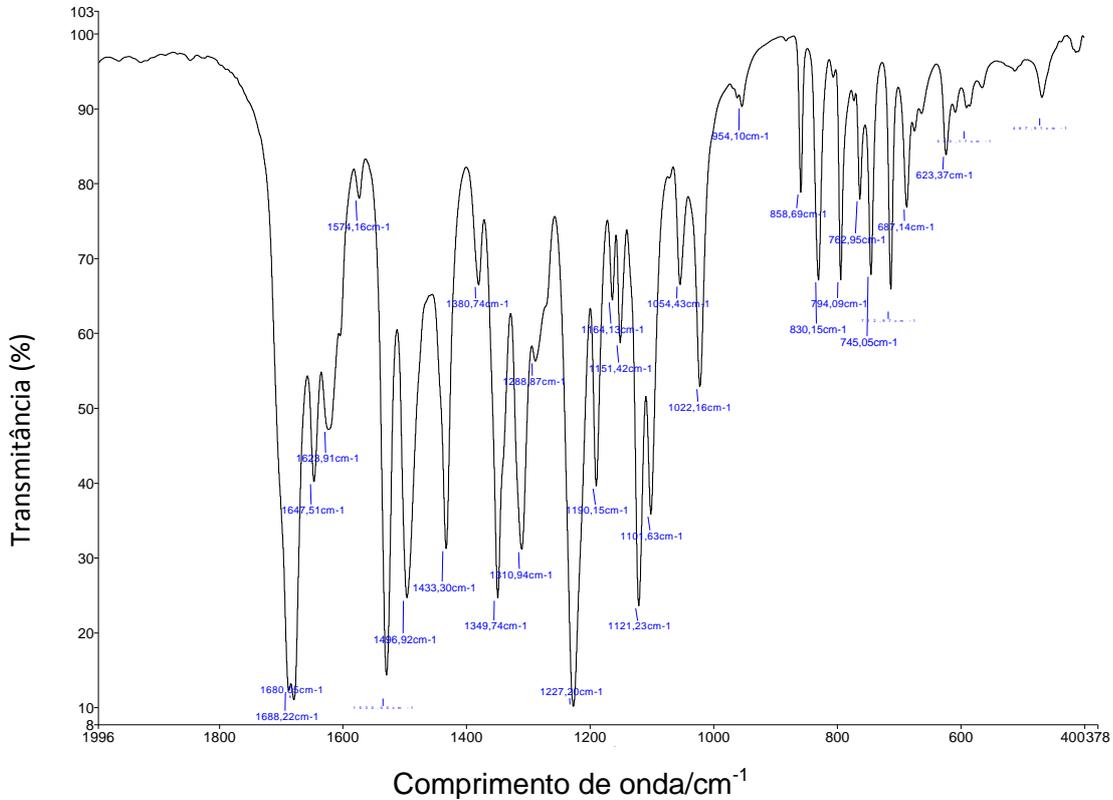


Figura 40 - Espectro de absorção na região do infravermelho do nifedipino matéria- prima

A Figura 41 representa o espectro e absorção da substância nifedipino comprimidos

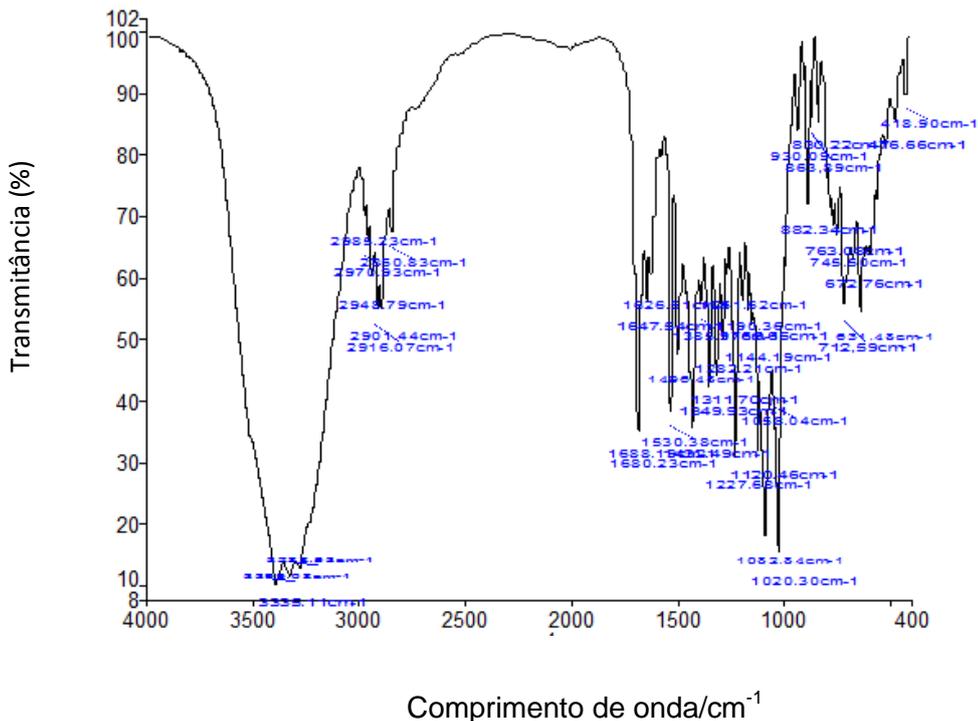


Figura 41 - Espectro de absorção na região do infravermelho do nifedipino comprimidos

Figura 42 mostra o espectro de absorção da substância nifedipino comprimidos. Observa-se bandas pouco concentradas.

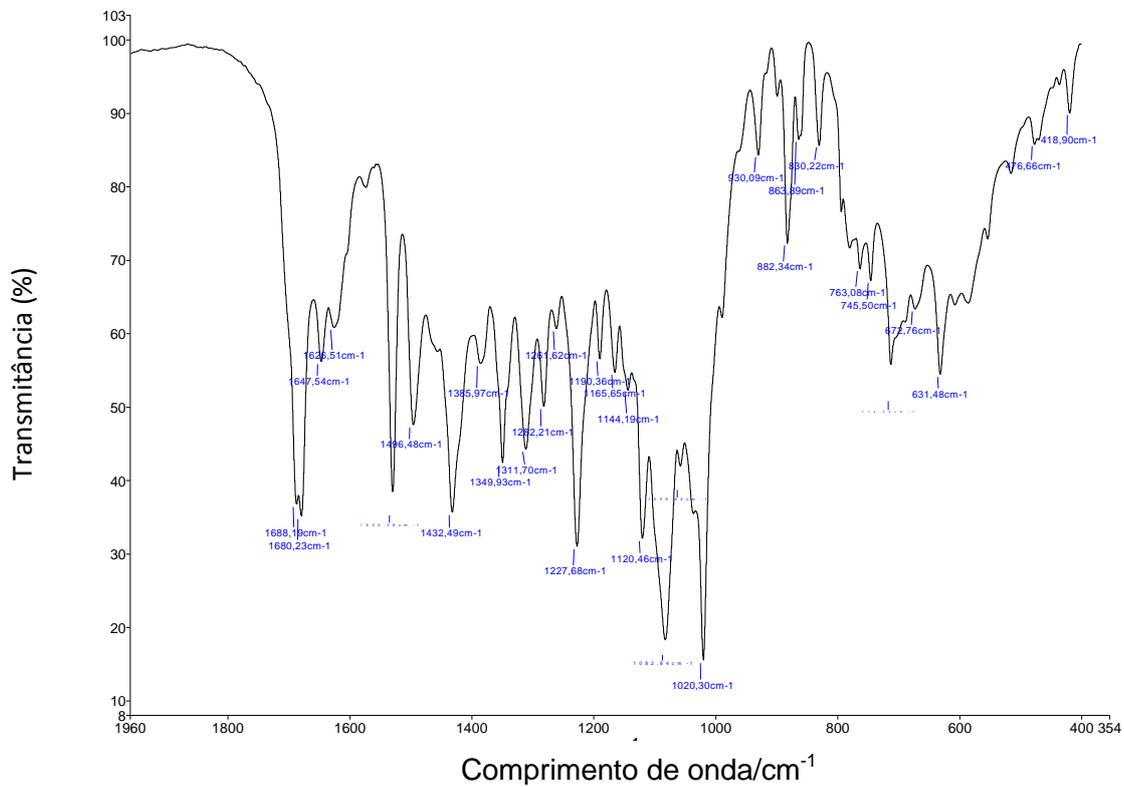


Figura 42 - Espectro de absorção na região do infravermelho do nifedipino comprimidos.

5.4.3 Nimodipino

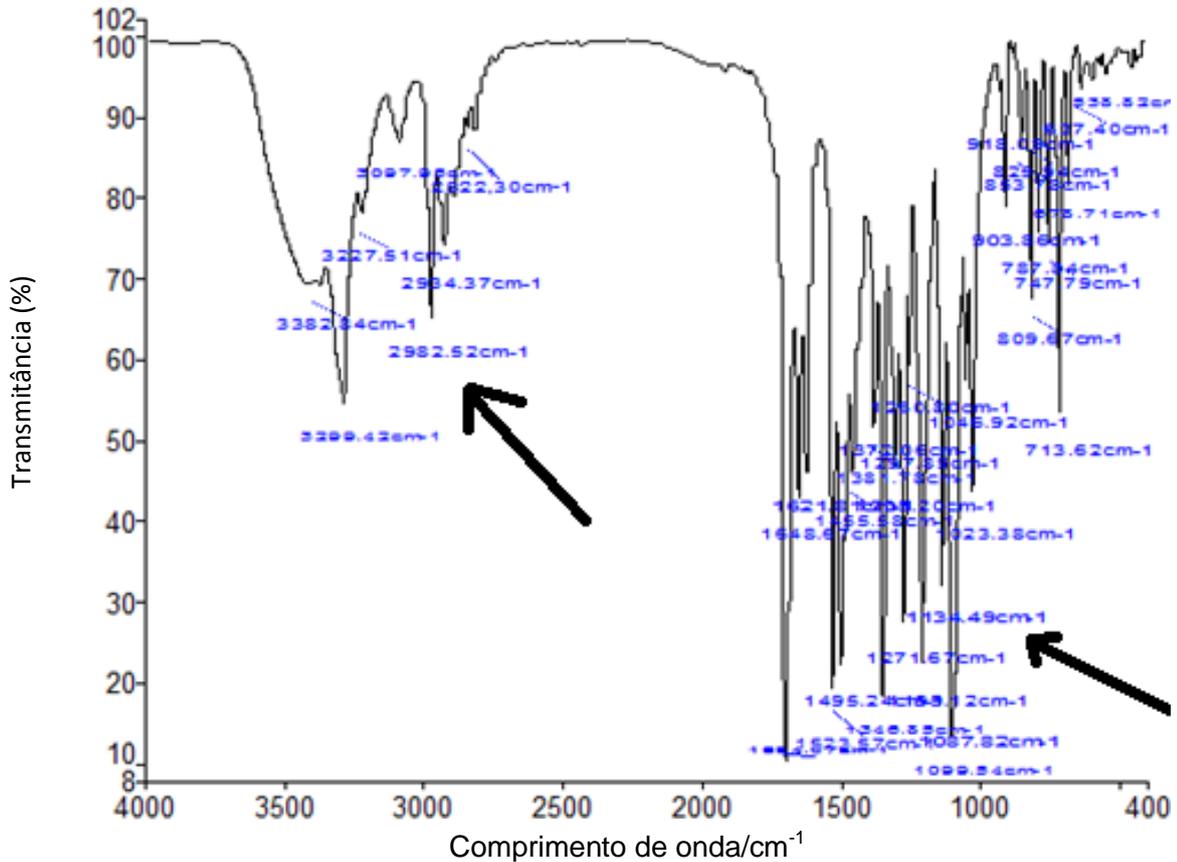


Figura 43 - Espectro de absorção na região do infravermelho do nimodipino padrão

Tabela 9- Atribuições das principais bandas características do Nimodipino

Comprimento de onda cm ⁻¹	atribuições
3200-2500	Ácido carboxílico
1300-1100	éter

A Figura 44 mostra o espectro de absorção na região do infravermelho do nimodipino padrão. Ampliação da região 1960 – 400 cm⁻¹ para melhor identificação dos grupos funcionais. 1694 cm⁻¹ carbonila. 3.350-3310 cm⁻¹ amina secundária (SILVERSTEIN, 2004).

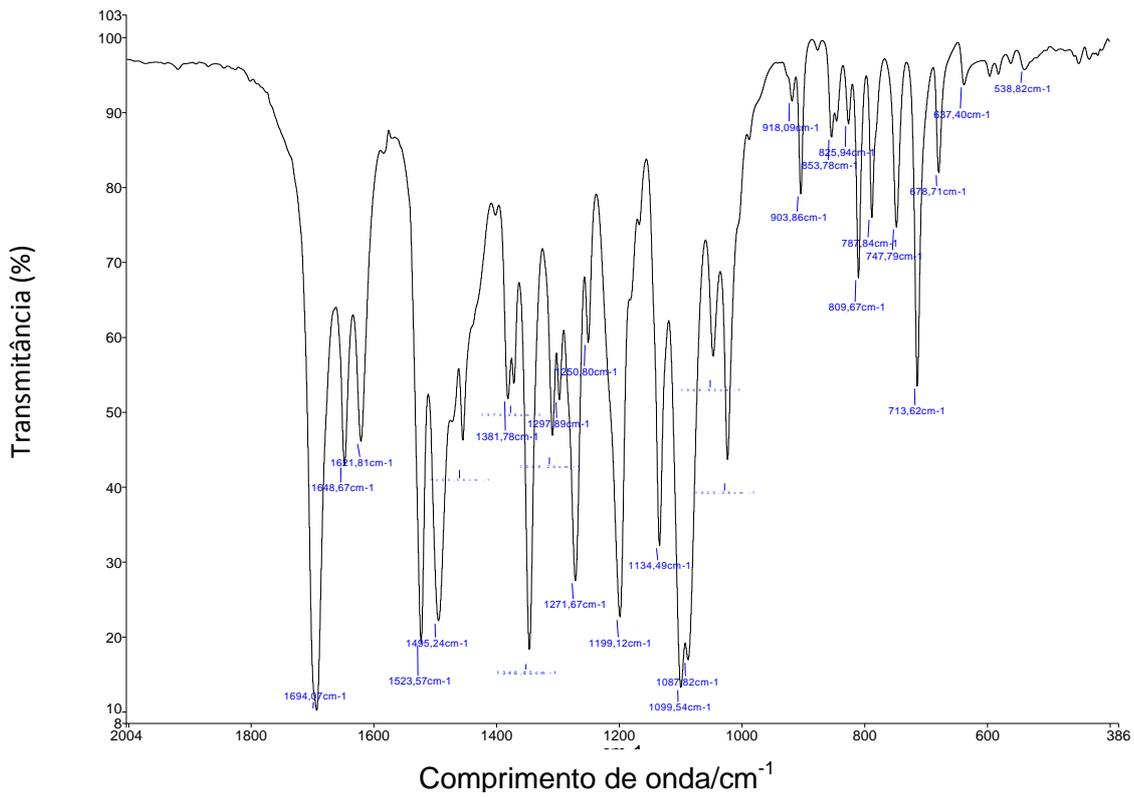


Figura 44 - Espectro de absorção na região do infravermelho do nimodipino padrão

Figura 45 mostra o espectro de absorção da substância nimodipino matéria- prima.

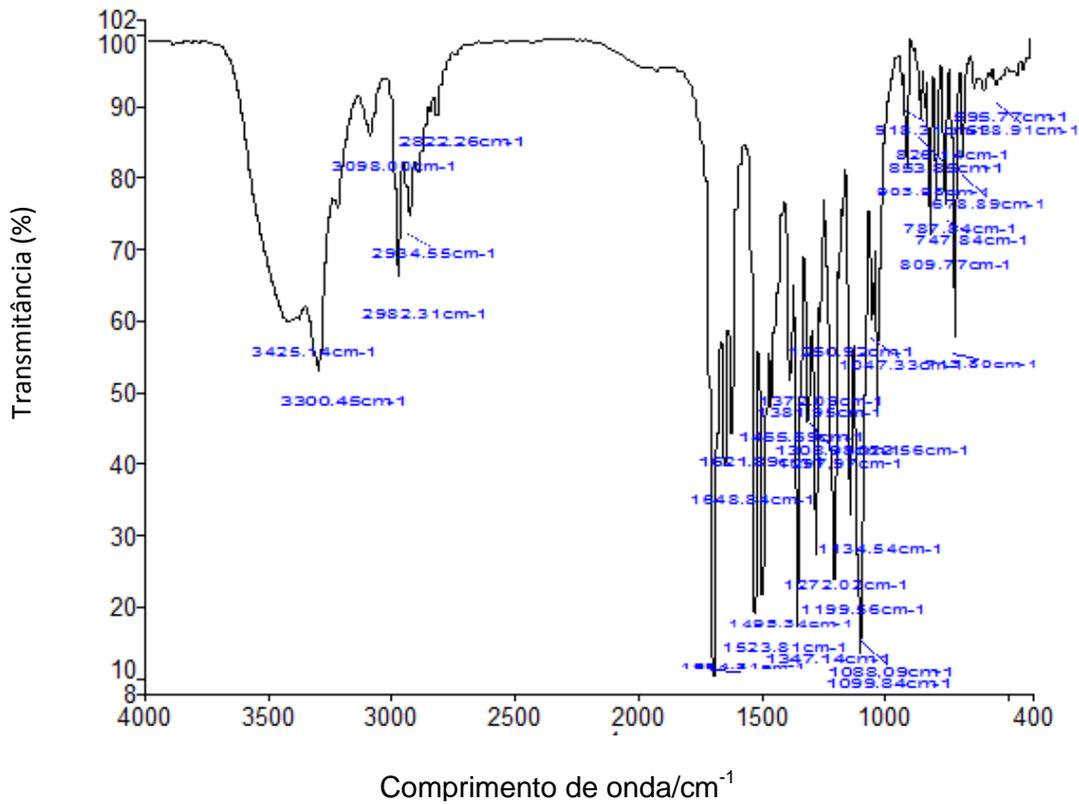


Figura 45 - Espectro de absorção na região do infravermelho do nimodipino matéria-prima

A Figura 46 mostra o espectro de absorção da substância nimodipino matéria-prima. Ampliação realizada na faixa de 1960-400 cm⁻¹. Não foram identificadas diferenças significativas entre o padrão e a matéria-prima da substância nimodipino.

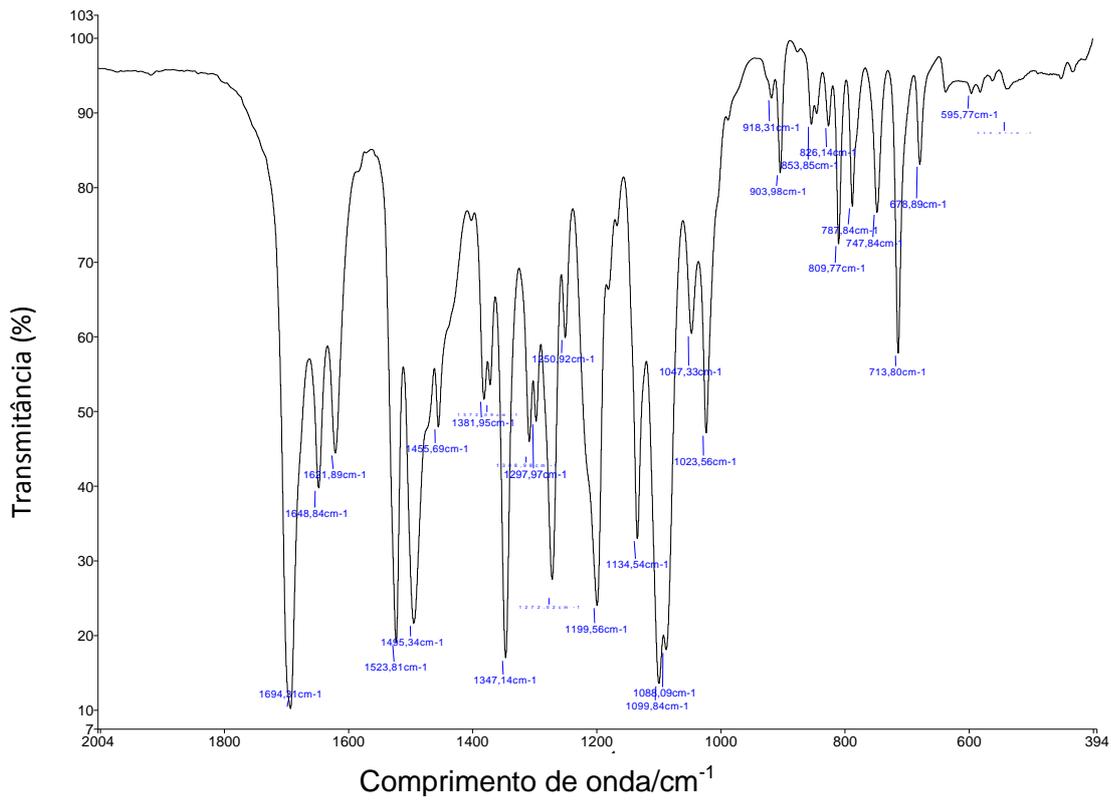


Figura 46 - Espectro de absorção na região do infravermelho do nimodipino matéria-prima

Figura 45 mostra o espectro de absorção da substância nimodipino comprimidos.

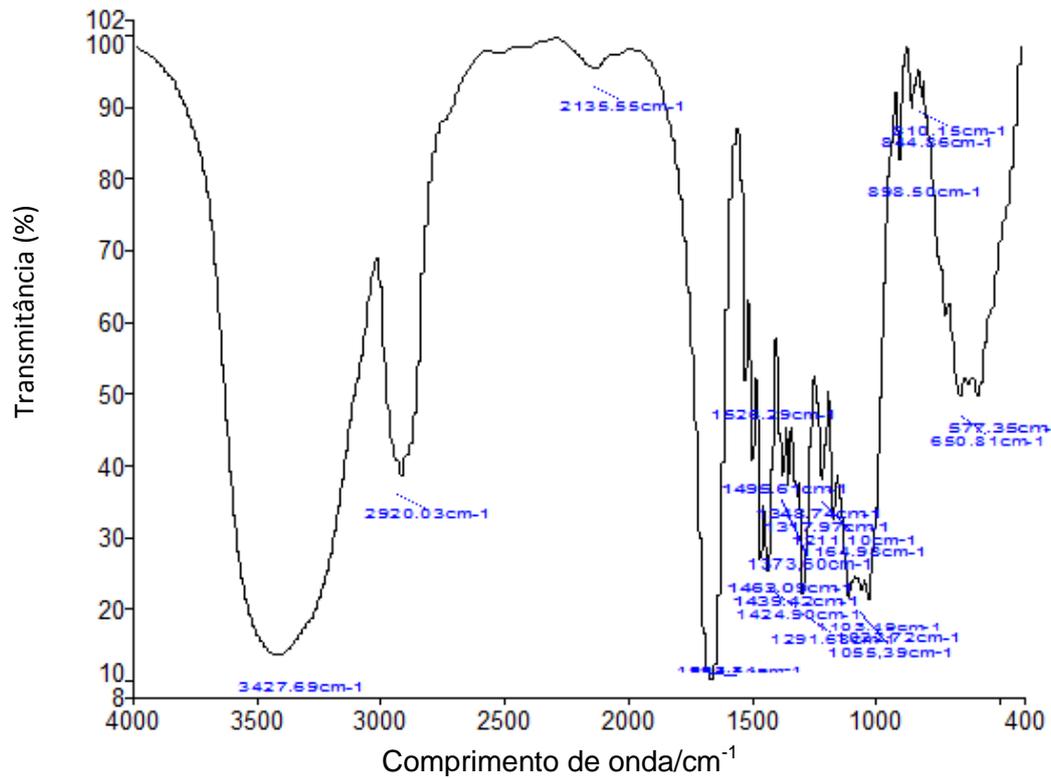


Figura 47 - Espectro de absorção na região do infravermelho do nimodipino comprimidos

A Figura 48 mostra o espectro de absorção na região do infravermelho do nimodipino comprimidos observa-se a interferência dos excipientes pois ocorre sobreposição de bandas em 1110 cm⁻¹.

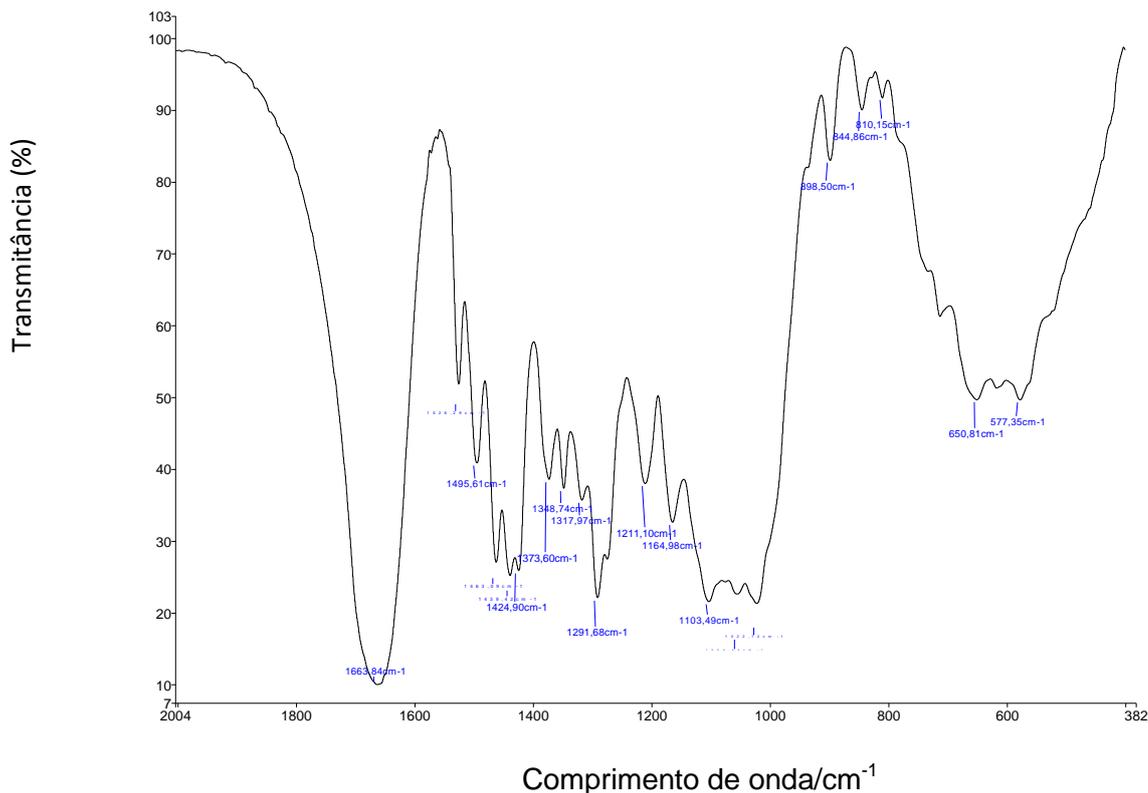


Figura 48 - Espectro de absorção na região do infravermelho do nimodipino comprimidos

5.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As análises foram realizadas utilizando-se microscópio eletrônico de varredura JEOL, modelo JSM-7401F. As amostras foram produzidas em suportes de alumínio (“stubs”) em fita adesiva dupla face de carbono e não foram previamente metalizadas com ouro, pois a metalização não interfere nesse tipo de amostra. A metalização é destinada a compostos não condutores. Mas não houve necessidade pois a análise foi realizada a uma tensão de aceleração mais baixa. As micrografias foram obtidas utilizando uma voltagem de 1kv e aumentos de 1000 a 15000 vezes. Os ensaios foram realizados pela Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Nas Figuras besilato de anlodipino matéria-prima, nifedipino padrão, nifedipino matéria-prima, nimodipino padrão e nimodipino matéria-prima.

5.5.1 Besilato de anlodipino

É visto na Figura 49 a morfologia do pó do padrão de besilato de anlodipino bastonetes de tamanhos variados.

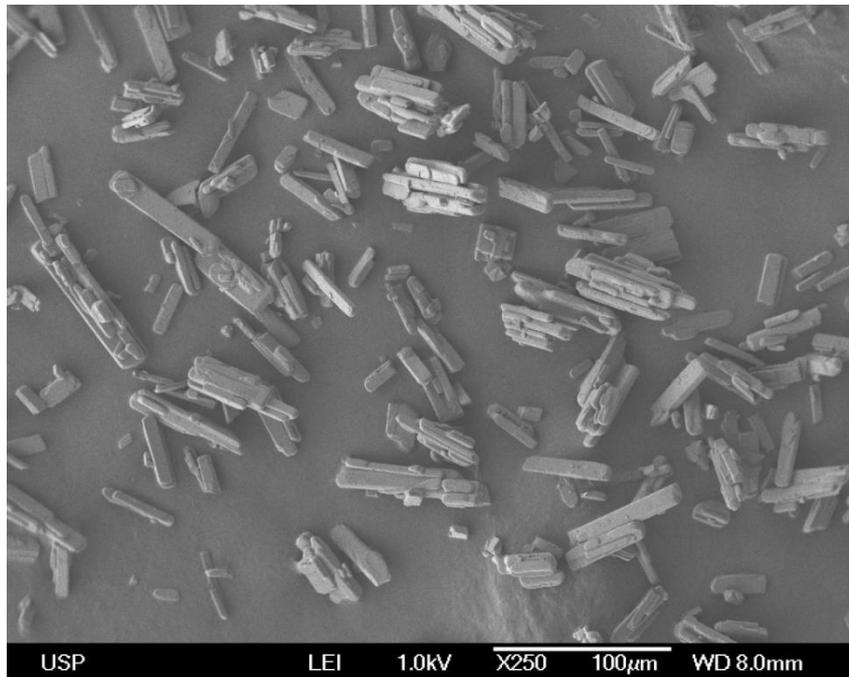


Figura 49 - Micrografia (MEV) com aumento de 250x para o padrão besilato de anlodipino.

É visto na Figura 50 a morfologia do pó do padrão de besilato de anlodipino bastonetes de tamanhos variados.

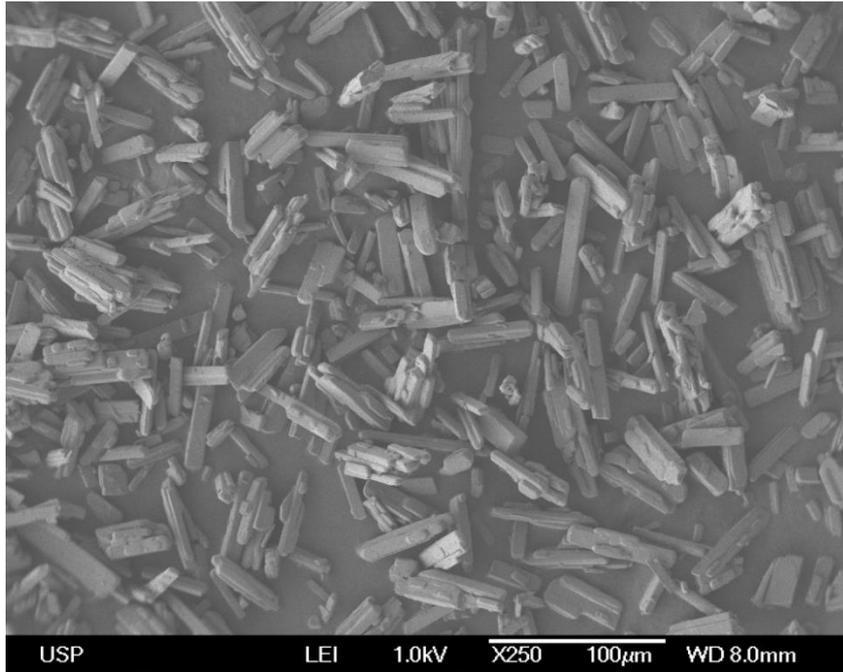


Figura 50 - Micrografia (MEV) com aumento de 250x para a matéria- prima besilato de anlodipino.

5.5.2 Nifedipino

A Figura 51 mostra detalhes da estrutura dos bastonetes de padrão de nifedipino

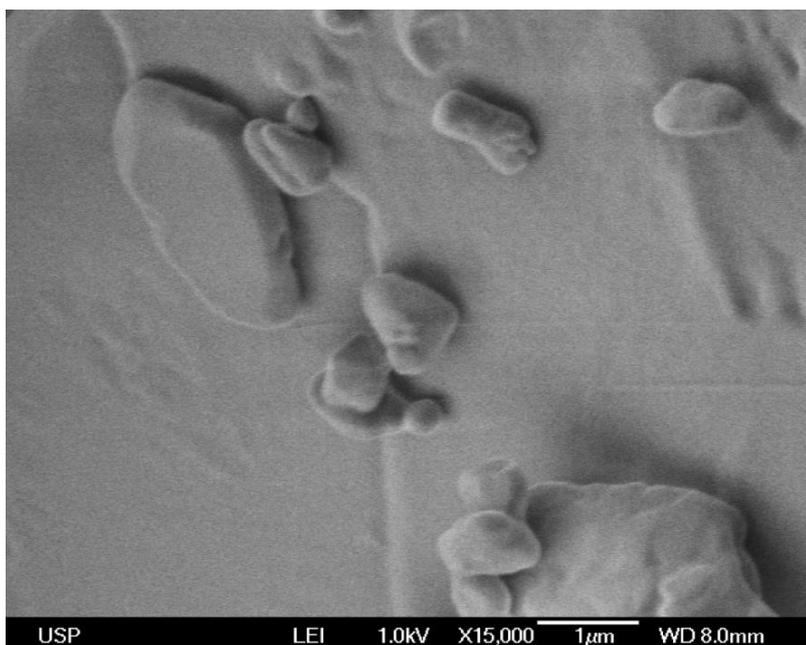


Figura 51 - Micrografia (MEV) com aumento de 15000 vezes para o padrão nifedipino

A Figura 52 mostra detalhes da estrutura dos bastonetes de matéria-prima Nifeipino



Figura 52 - Micrografia (MEV) com aumento de 15000 vezes para matéria- prima nifedipino

5.5.3 Nimodipino

A Figura 53 mostra detalhes da estrutura dos bastonetes de padrão de nimodipino

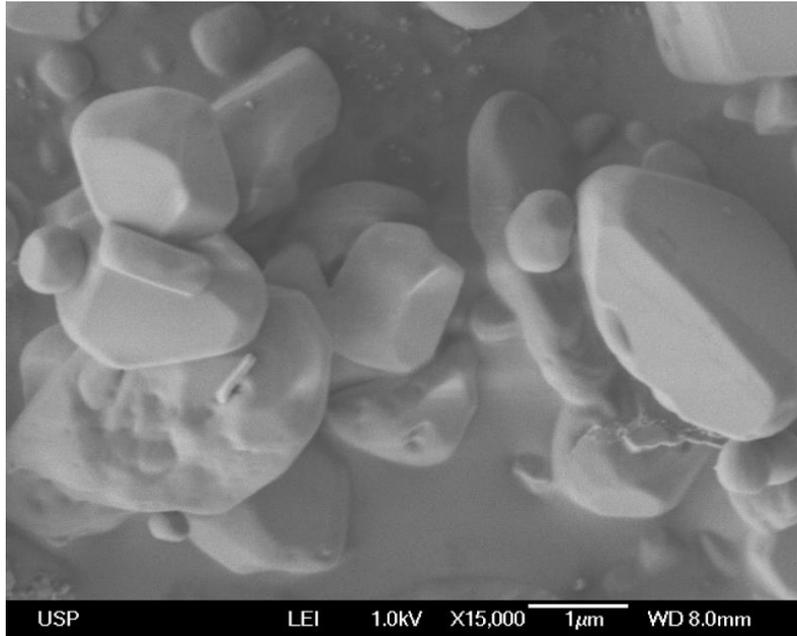


Figura 53 - Micrografia (MEV) com aumento de 15000 vezes para o padrão nimodipino

A Figura 54 mostra detalhes da estrutura dos bastonetes de matéria-prima nimodipino

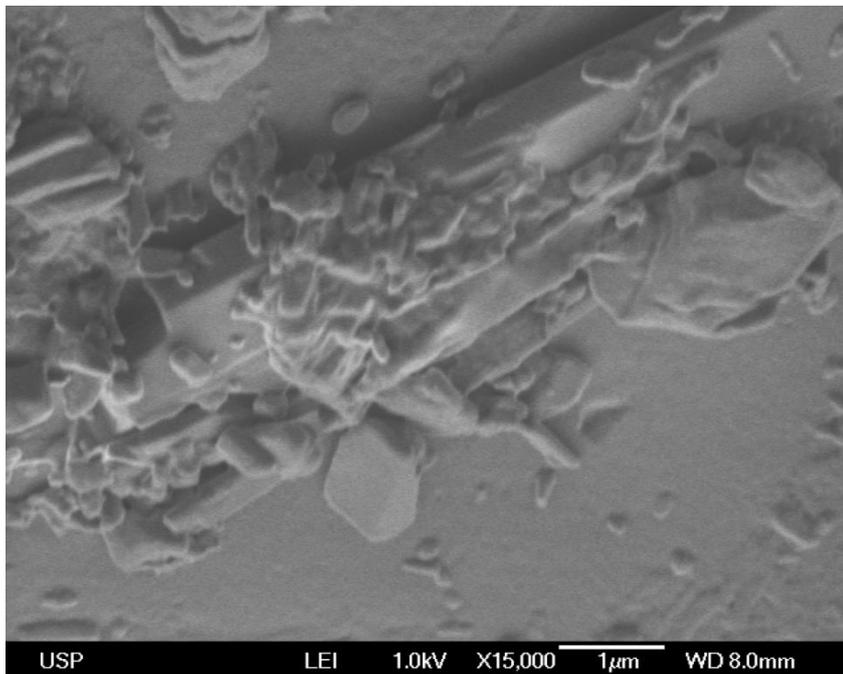


Figura 54 - Micrografia (MEV) com aumento de 15000 vezes para matéria-prima nimodipino

6 DISCUSSÃO

Nas técnicas instrumentais empregadas, os métodos foram desenvolvidos de acordo com as diretrizes da ANVISA, ICH e da Farmacopéia dos Estados Unidos da América (ANVISA, 2010; FDA, 2010; USP, 34). Várias diretrizes de estabilidade foram publicadas ao longo dos últimos 5 anos descrevendo os tipos de estudos e tipos de dados necessários para satisfazer as agências internacionais. Atualmente, as diretrizes promulgadas pelo *International Conference Harmonization* (ICH) são as mais comumente aceitas. Os Estados Unidos, Japão e União Europeia (UE) estabeleceram o princípio de que os dados de estabilidade gerados em qualquer dos três países sejam mutuamente aceitos pelos outros dois. Nos Estados Unidos, atualmente *Food and Drug Administration* (FDA) e a Farmacopéia America seguem as diretrizes do ICH. No Brasil a Agência Nacional de vigilância Sanitária (ANVISA) também recomenda estas diretrizes. A Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 58, de 20 de Dezembro de 2013 define o estudo de degradação forçada e a sua importância. Os outros países são geralmente cobertos pelos requisitos de estabilidade estabelecidas pela Organização Mundial da Saúde (OMS).

A análise espectrofotométrica mostrou a completa degradação do besilato de anlodipino (AB) quando exposto aos meios ácido e básico como pode ser visto Figuras 4 e 5 respectivamente. O meio oxidativo produziu uma variação de 6,75% e uma concentração de 46,62 µg/mL como pode ser visto na Figura 6 e a água uma variação de 6% para uma concentração de 46,62 µg/mL, como pode ser visto na Figura 7.

O nifedipino submetido a degradação forçada e analisado por HPLC, mostrou completa degradação nos meios básico e oxidativo, peróxido a 3%, como pode ser visto nas Figuras 17 e 18 respectivamente. No meio ácido ocorreu uma variação de 76,17% portanto uma concentração de 44,04 µg/mL como pode ser visto na Figura 16. No meio neutro ocorreu uma variação de 3,61% portanto uma concentração de 24,09 µg/mL como pode ser visto na Figura 19.

O fármaco nimodipino submetido ao método de degradação forçada e analisado por HPLC, mostrou em meio ácido, HCl 1 mol/L, uma variação de 36,43% embora

uma concentração de 15,89% (Figura 20). Para o meio básico e oxidativo verificou-se uma completa degradação como pode ser visto nas Figuras 21 e 22 respectivamente. Para o meio neutro, Figura 23, uma variação de 0,03% portanto uma concentração de 24,99 $\mu\text{g/mL}$.

Pode-se verificar com o teste de degradação forçada para as substâncias besilato de anlodipino, nifedipino e nimodipino, o diferente comportamento nos meios ácido HCl 1 mol/L, básico NaOH 1 mol/L, neutro (água) e oxidativo (peróxido).

Essas análises têm sido utilizadas na área farmacêutica como ferramenta útil para avaliar rapidamente uma possível interação entre os componentes ativos e os excipientes em estudos de compatibilidade na pré-formulação, além de avaliar a existência de polimorfismo, determinação de pureza química e análise de formas farmacêuticas sólidas.

Embora não substituam os estudos convencionais de estabilidade, que requerem longos períodos de armazenamento das amostras, sob condições controladas de temperatura e umidade o teste de degradação forçada é necessário, pois estes estudos de degradação forçada fornecem as diretrizes para o desenvolvimento de metodologia indicativa de estabilidade que atualmente é exigida pelas agências reguladoras. Esses estudos de estabilidade, possibilitam a escolha das formulações mais estáveis com extrema rapidez.

Em relação a análise térmica foi possível constatar que as curvas de Termogravimetria dos fármaco mostram diferenças nas faixas de temperaturas e termod decomposição. Nas curvas de DTA, realizada com as formulações farmacêuticas ficou evidente que os excipientes interferem na decomposição da amostra.

Foram realizadas derivadas de TG e DSC para encontrar o valor da temperatura que ocorreu o evento.

Para um melhor estudo do comportamento térmico dos excipientes será realizado um planejamento experimental, ou seja a análise térmica deverá ser realizada há uma razão de temperatura muito baixa.

As análises de infravermelho foram de grande importância pois foi possível identificar as amostras uma vez que bandas de absorção características dos compostos estudados foram encontradas. Não foram encontradas diferenças significativas entre os padrões farmacopéicos, besilato de anlodipino e nifedipino e nimodipino quando comparados com as matérias primas das respectivas substâncias. Nos comprimidos analisados foi possível notar nos espectros interferência dos excipientes pois ocorreu sobreposição de bandas. Foram realizadas ampliações na faixa de comprimento de onda entre $1972\text{--}386\text{ cm}^{-1}$ para melhor identificar as bandas que representam as substâncias analisadas. As análises de Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) não podem ser utilizadas para pesquisa de polimorfismo, pois quando incidimos pressão sobre o material altera a forma como o material se rearranja no espaço, desta maneira a forma como se empacota a fase cristalina poderá ser alterada. A técnica de espectroscopia foi utilizada para caracterização do material.

O objetivo das análises de difração de raios x foi a pesquisa de polimorfismo, técnica indicada para esta finalidade. Entretanto, os difratogramas dos padrões farmacêuticos de besilato de anlodino, nifedipino e nimodipino apresentaram mesma posição nos difratogramas.

Não foram encontrados polimorfos na matéria- prima analisada nem nos produtos acabados, comprimidos.

Nas análises de Microscopia Eletrônica de Varredura não podemos afirmar que as substâncias apresentam estrutura cristalina.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ De acordo com as técnicas de Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) pode-se constatar que as substâncias estudadas nesse trabalho tratam-se das substâncias besilato de anlodipino padrão e matéria-prima, nifedipino padrão e matéria-prima e nimodipino padrão e matéria-prima.
- ✓ Para o teste de degradação forçada, por análise espectrofotométrica, para o besilato de anlodipino ocorreu completa degradação do fármaco nos meios ácido e básico.
- ✓ A substância nifedipino ao ser submetida ao teste de degradação forçada pelo método de análise por CLAE foi observada completa degradação no meio oxidativo.
- ✓ Para a substância nimodipino ao ser submetida ao teste de degradação forçada pelo método de análise por CLAE ocorreu completa degradação em meio básico.
- ✓ As curvas TG/DTG e DSC comprovaram o ponto de fusão desses materiais, não foram encontradas diferenças significativas entre os padrões farmacopéicos e suas respectivas matérias-primas
- ✓ Não foram encontrados polimorfos nas análises de difração de raio X.

9 PERSPECTIVAS FUTURAS

De acordo com os achados deste trabalho, como perspectiva futura tem-se a oportunidade de elucidar os seguintes pontos:

- ✓ Pesquisar polimorfos nas amostras que foram submetidas nos meios ácido, básico, neutro e oxidativo.
- ✓ Realizar os testes de exposição fotolítica para as substâncias besilato de anlodipino, nifedipino e nimodipino.
- ✓ Identificar e quantificar os produtos de degradação

10 REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. VisaLegis. **Resolução RE n.899, de 29 de maio de 2003**. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos"; fica revogada a Resolução RE n.475, de 19 de março de 2002. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: 2 abr. 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Lista DCB 2007 consolidada**. Brasília: Anvisa, 2007. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/dcb/lista_dcb_2007.pdf. Acesso em: 19 out. 2014

ALSARRA, I.A. High-performance liquid chromatographic method for quantitative determination of amlodipine in human plasma and pharmaceutical dosage form and its application to pharmacokinetic studies. **Journal of Chromatography Sciences**, v.47, n.10, p.863-867, 2009.

AQUINO NETO, F.R.; NUNES, D.S.S. **Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins**. Rio de Janeiro: Interciência, 2003. p.23.

BAHRAMI, G.H.; MIRZAEI, S.H. Simple and rapid HPLC method for determination of amlodipine in human serum with fluorescence detection and its use in pharmacokinetic studies. **Journal Pharmaceutical Biomedical Analysis**, v.36, n.1, p.163–168, 2004.

BARANDA, A.B.; ETXEBARRIA, N.; JIMÉNEZ, R.M.; ALONSO, R.M. Improvement of the chromatographic separation of several 1,4-Dihydropyridines calcium channel antagonist drugs by experimental design. **Journal Chromatography Science**, v.43, n.10, p.505-512, 2005.

BARANOWSKA, I.; MARKOWSKI, P.; BARANOWSKI, J. Development and validation of an HPLC method for the simultaneous analysis of 23 selected drugs belonging to different therapeutic groups in human urine samples. **Analytical Sciences**, v.25, n.11, p.1307-1320, 2009.

BARMAN, R.K.; ISLAM, M.A.; AHMED, M.; IBNE, W.M.I.; ISLAM, R.; KHAN, A.; HOSSAIN, M.B.; RAHMAN, B.M. Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of atenolol and amlodipine in pharmaceutical-dosage form. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.20, n.4, p.274-279, 2007.

BARMPALEXIS, P.; KANAZE, F.I.; GEORGARAKIS, E. Developing and optimizing a validated isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography separation of nimodipine and impurities in tablets using experimental design methodology. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.49, n.5, p.1192-1202, 2009.

BEDSE, G.; KUMAR, V.; SINGH, S. Study of forced decomposition behavior of lamivudine using LC, LC–MS/TOF and MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.49, n.1, p.55-63, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução – RDC n.58, de 20 de dezembro de 2013**. Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. Disponível em: ftp://ftp.saude.sp.gov.br/ftpseesp/bibliote/informe_eletronico/2013/iels.dez.13/iels242/U_RS-MS-ANVISA-RDC-58_201213.pdf Acesso em: 7 nov. 2014.

BRITAIN, H.G., ed. **Polymorphism in pharmaceutical solids**. 2.ed. New York: Informa Healthcare, 2009. 640p. (Drugs and the pharmaceutical sciences, v.192).

CHAUDHARI, B.G.; PATEL, N.M.; SHAH, P.B. Stability indicating RP-HPLC method for simultaneous determination of atorvastatin and amlodipine from their combination drug products. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.55, n.2, p.241-246, 2007.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: UNICAMP, 2007. p.273-276.

DEDAVID, A.B.; GOMES, C.I. MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007. p.9-10.

DENG, Q.; LUN, Z.; SHAO, H.; YAN, C.; GAO, R. Molecularly imprinted polymers as tools for the screening of felodipine from dihydropyridine calcium antagonists by pressurized capillary electrochromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.382, n.1, p.51-58, 2005.

DHANESHWAR, S.R.; PATRE, N.G.; MAHADIK, M.V. Validated TLC method for simultaneous quantitation of amlodipine besylate and valsartan in bulk drug and formulation. **Chromatographia**, v.69, n.1/2, p.157-161, 2008.

DONGRE, V.G.; SHAH, S.B.; KARMUSE, P.P.; PHADKE, M.; JADHAV, V.K. Simultaneous determination of metoprolol succinate and amlodipine besylate in pharmaceutical dosage form by HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.46, n.3, p.583-586, 2008.

GROOFF, D.; LIEBENBERG, W.; DE VILLIERS, M.M. Preparation and transformation of true nifedipine polymorphs: investigated with differential scanning calorimetry and x-ray diffraction pattern fitting methods. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.100, n.5, p.1944-1957, 2011.

EL WALILY, A.F. Analysis of nifedipine-acebutolol hydrochloride binary combination in tablets using UV-derivative spectroscopy, capillary gas chromatography and high performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.16, n.1, p.21-30, 1997.

FARMACOPÉIA Brasileira. 5.ed. São Paulo: ANVISA, 2010. pt.1, p.v.2.22.

FENG, Y.; ZHANG, L.; SHEN, Z.; PAN, F.; ZHANG, Z. Analysis of amlodipine in human plasma by liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatographic Science**, v.40, n.1, p.49-53, 2002.

FERREIRA, O.A.; BRANDÃO, M. **Guia prático da farmácia magistral**. 3.ed. São Paulo: Pharmabooks, 2008. p.458, 466-467.

FLORENCE, A.T.; ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia**. 2.ed. São Paulo: Pharmabooks, 2011. p.5-11.

GENNARO, A.R. **Remington: a ciência e a prática da farmácia**. 20.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.1344.

GIL, E.S., org. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. 2.ed. São Paulo: Pharmabooks, 2007. p.380, 385.

GILMAN, A.G.; HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; MOLINOFF, P.B.; RUDDON, R.W., eds. **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 9.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana, 1996. p.571.

GROOFF, D.; DE VILLIERS, M.M.; LIEBENBERG, W. Thermal methods for evaluating polymorphic transitions in nifedipine. **Thermochimica Acta**, v.454, n.1, p.33-42, 2007.

GOMES, B.C. **Técnicas analíticas instrumentais aplicadas a geologia**. São Paulo: Edgard Blucher, 1984. p.2, 5.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. **Guidance for industry, analytical procedures and method validation**. Rockville: FDA, 2000. 33p. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070489.pdf>. Acesso em: 02 mar. 2011.

HONG, Y.; TANG, Y.; ZENG, S. Enantioselective plasma protein binding of propafenone: mechanism, drug interaction, and species difference. **Chirality**, v.21, n.7, p.692-698, 2009.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. Work Products. ICH Guidelines. Quality Guidelines. Q1A - Q1F Stability. **Q1A(R2) Stability testing of new drug substances and products**. 2003. Disponível em: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1A_R2/Step4/Q1A_R2_Guideline.pdf. Acesso em: 03 mar. 2011

INTERNATIONAL Conference on Harmonization “ICH Q1A (R2): Stability testing of new drug substances and products”. Geneva, 2005 Disponível em: www.ich.org. Acesso em: 03 mar. 2011.

JOSHI, S.J.; KARBHARI, P.A.; BHOIR, S.I. RP-LC simultaneous determination of nebivolol hydrochloride and amlodipine besilate in bi-layer tablets. **Chromatographia**, v.70, p.557–561, 2009.

KANG, X.; LI, Z.; JI, Y.; TANG, S.; YANG, W. Pharmacokinetics of amlodipine besylate tablets in healthy volunteers. **Pharmaceutical Care and Research**, v.8, n.1, p.42-45, 2008.

KAPOOR, N.; KHANDAVILLI, S.; PANCHAGNULA, R. Simultaneous determination of lamivudine and stavudine in antiretroviral fixed dose combinations by first derivative spectrophotometry and high performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.41, n.3, p.761–765, 2006.

KORADIAA, V.; DIEGO, H.L.; FRYDENVANG, K.; ELEMA, M.R.; MULLERTZ, A.; BOND, A.D.; RANTANEN, J. Solid forms of amlodipine besylate: physicochemical, structural, and thermodynamic characterization. **Crystal Growth and Design**, v.10, n.12, p.5279-5290, 2010.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário terapêutico Guanabara**: 2004-2005. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p.8.16-8.17.

KUMAR, V.; MALIK, S.; SINGH, S. Polypill for the treatment of cardiovascular diseases Part 2. LC–MS/TOF characterization of interaction/degradation products of atenolol/lisinopril and aspirin, and mechanisms of formation thereof. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.48, n.3, p.619-628, 2008.

LARINI, L. **Fármacos & medicamentos**. Porto Alegre: Artmed, 2008. p.178.

LANÇAS, F.M. **Cromatografia líquida moderna**. Campinas: Átomo, 2009. p.11.

LIU, X.; CHEN, X.; YUE, Y.; ZHANG, J.; SONG, Y. Study of interaction between drug enantiomers and human serum albumin by flow injection-capillary electrophoresis frontal analysis. **Electrophoresis**, v.29, n.13, p.2876–2883, 2008.

LUKSA, J.; JOSIC, D.; KREMSER, M.; KOPITAR, Z.; MILUTINOVIC, S. Pharmacokinetic behaviour of R-(+)- and S(-)-amlodipine after single enantiomer administration. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v.703, n.1/2, p.185-193, 1997.

MA, Y.; QIN, F.; SUN, X.; LU, X.; LI, F. Determination and pharmacokinetic study of amlodipine in human plasma by ultra performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.43, n.4, p.1540–1545, 2007.

MALESUIK, M.D.; CARDOSO, S.G.; BAJERSKI, L. LANZANOVA, F.A. Determination of amlodipine in pharmaceutical dosage forms by liquid chromatography and ultraviolet spectrophotometry. **Journal of AOAC International**, v.89, n.2 359-364, 2006.

MERCK Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 14.ed. Whitehouse Station: Merck, 2006. p.83, 906, 675, 1129, 1133-1134.

MÜCK, W.; BODE, H. Bioanalytics of nimodipine an overview of methods. **Pharmazie**, v.49, n.2/3, p.130-139, 1994.

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

ORIQUI, L.R.; MORI, M.; WONGTSCHOWSKI, P.; FREITAS, S.R.; SANTOS, J.G.M. Definição de shelf life para produtos químicos: a importância de um guia de estabilidade específico para o segmento. **Química Nova**, v.34, n.10, p.1869-1874, 2011.

PANDYA, K.K.; SATIA, M.; GANDHI, T.P.; MODI, I.A.; MODI, R.I.; CHAKRAVARTHY, B.K. Detection and determination of total amlodipine by highperformance thin-layer chromatography: a useful technique for pharmacokinetic studies. **Journal of Chromatography, Biomedical Applications**, v.667, n.2, p.315-320, 1995.

PERROTTI, P.; DOMINICI, P.; GROSSI, E.; ANTROPOLI, C.; GIANNOTTI, G.; CUSATO, M.; REGAZZI, M.; CERUTTI, R. Pharmacokinetics of anorectal nifedipine and lidocaine (lignocaine) ointment following haemorrhoidectomy: an open-label, single-dose, phase IV clinical study. **Clinical Drug Investigation**, v.29, n.4, p.243-256, 2009.

RAGNO, G.; GAROFALO, A.; VETUSCHI, C. Photodegradation monitoring of amlodipine by derivative spectrophotometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.27, n.1/2, p.19-24, 2002.

RAHMAN, N.; SINGH, M.; HODA, M.N. Application of oxidants to the spectrophotometric determination of amlodipine besylate in pharmaceutical formulations. **Farmaco**, v.59, n.11, p.913-919, 2004.

RAHMAN, N.; AZMI, S.N.H. Spectrophotometric method for the determination of amlodipine besylate with ninhydrin in drug formulations. **Farmaco**, v.56, n.10, p.731-735, 2001.

RAHMAN, N.; HODA, M.D.N. Validated spectrophotometric methods for the determination of amlodipine besylate in drug formulations using 2,3-dichloro 5,6-dicyano 1,4-benzoquinone and ascorbic acid. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.31, n.2, p.381-392, 2003.

RAHMAN, N.; AZMI, S.N.H. Spectrophotometric determination of amlodipine besylate by charge-transfer complex formation with p-chloranilic acid. **Analytical Sciences**, v.16, n.12, p.1353-1356, 2001.

REYNOLDS, D.W.; FACCHINE, K.L.; MULLANEY, J.F.; ALSANTE, K.M.; HATAJIK, T.D.; MOTTO, M.G. Available guidance and best practices for conducting forced degradation studies. **Pharmaceutical Technology**, v.26, n.2, p.48-56, 2002.

SANTOS, F.A.; NOVALBOS, J.; MÚGICA, M.A.G.; SANDÍN, S.G.; ALMEIDA, S.; VALLÉE, F. GARCÍA, A.G. Assessment of sex differences in pharmacokinetics and

pharmacodynamics of amlodipine in a bioequivalence study. **Pharmacological Research**, v.51, n.5, p.445–452, 2005.

SARKAR, A.K.; GHOSH, D.; DAS, A.; SELVAN, P.S.; GOWDA, K.V.; MANDAL, U.; BOSE, A.; AGARWAL, S.; BHAUMIK, U.; PAL, T.K. Simultaneous determination of Metoprolol succinate and amlodipine besylate in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry Method and its application in bioequivalence study. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.873, n.1, p.77-85, 2008.

SHAH, D.A.; BHATT, K.K.; MEHTA, R.S.; BALDANIA, S.L.; GANDHI, T.R. Stability indicating RP-HPLC estimation of atorvastatin calcium and amlodipine besylate in pharmaceutical formulations. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.70, n.6, p.754-760, 2008.

SILVA, K.E.R.; ALVES, L.D.S.; SOARES, M.F.R.; PASSOS, R.C.S.; FARIA, A.R.; ROLIM NETO, P.J. Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.30, n.2, p.129-135, 2009.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. **Identificação espectrométrica dos compostos orgânicos**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. p.263, 267.

SINGH, S.; HANDA, T.; NARAYANAM, M.; SAHU, A.; JUNWAL, M.; SHAH, R.P. A critical review on the use of modern sophisticated hyphenated tools in the characterization of impurities and degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.69, p.148-173, 2012.

SILVA A.C.M.; GÁLICO D.A.; GUERRA, R.B.; PERPÉTUO, G.L.; LEGENDRE, A.O.; RINALDO, D.; BANNACH, G. Thermal stability and thermal decomposition of the antihypertensive drug amlodipine besylate. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.120, n.1, p.889-892, 2015.

MARTIN, A.; SINKO, P.J. **Martin: físico-farmácia e ciências farmacêuticas**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 809p.

SILVA, K.E.R.; ALVES, L.D.S.; SOARES, M.F.R.; PASSOS, R.C.S.; FARIA, A.R.; ROLIM NETO, P.J. Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.30, n.2, p.129-135, 2009.

SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J.; CROUCH, S.R. **Fundamentos de química analítica**. 8.ed. São Paulo: Thompson, 2006. p.953.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de análise Instrumental**. 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. p.599, 687.

STORPIRTS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C. **Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. 321p. (Ciências Farmacêuticas).

STULZER, H.K.; SILVA, M.A. Estudo de estabilidade de grânulos revestidos e comprimidos contendo Captopril. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.25, n.4, p.497-504, 2006.

TABORIANSKI, A.M. **Validação de métodos para análise e estudos de estabilidade de anti-retrovirais em preparações farmacêuticas**. São Paulo, 2003. 149p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas- Universidade de São Paulo.

UNITED States Pharmacopoeia. 34.ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2011. p.1210-1211.

WEI, X.; YANG, G.; QI, L.; CHEN, Y. Determination of nicardipine and amlodipine in human plasma using on-line solid-phase extraction with a monolithic weak cation-exchange column. **Talanta**, v.77, n.3, p.1197-1202, 2009.

YANG, X.; KE, W.; ZI, P.; LIU, F.; YU, L. Detecting and identifying the complexation of nimodipine with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin present in tablets by Raman spectroscopy. **Journal Pharmaceutical Sciences**, v.97, n.7, p.2702-19, 2008.

ZHAO, Y.; ZHAI, D.; CHEN, X.; YU, Q.; HE, H.; SUN, Y.; GAO, Z.; WANG, L.; WANG, H.; HAN, D.; JI, H. Determination of nimodipine in human plasma by HPLC-ESI-MS and its application to a bioequivalence study. **Journal of Chromatography Sciences**, v.48, n.2, p.81-85, 2010.

ZOU, Q.; ZHAN, Y.; GE, Z.; WEI, P.; OUYANG, P. Liquid chromatography-mass spectrometry method for the determination of amlodipine in human plasma and its application in a bioequivalence study. **Arzneimittelforschung**, v.59, n.8, p.3, 2009.