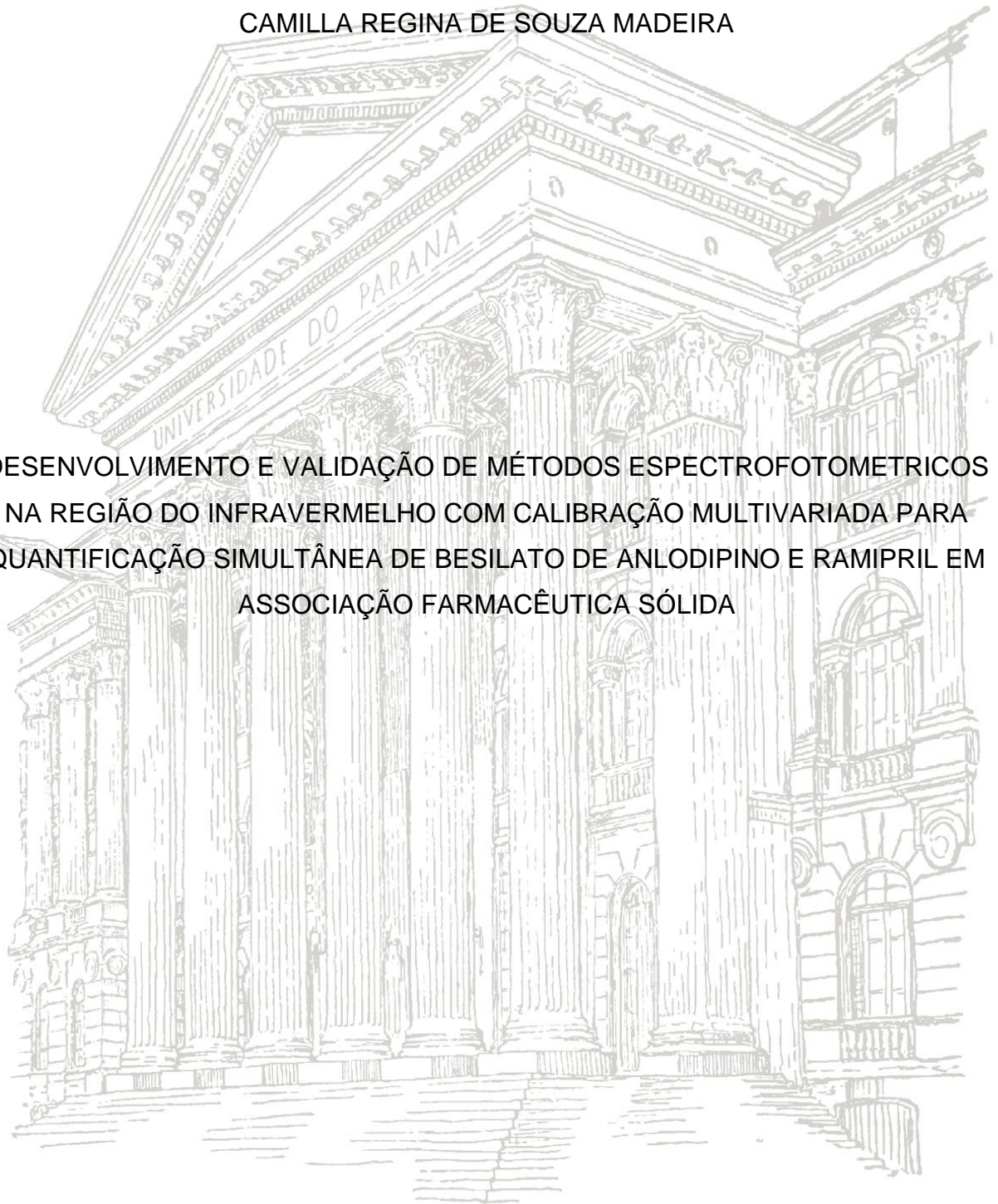


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAMILLA REGINA DE SOUZA MADEIRA

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ESPECTROFOTOMETRICOS
NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA PARA
QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE BESILATO DE ANLODIPINO E RAMIPRIL EM
ASSOCIAÇÃO FARMACÊUTICA SÓLIDA



CURITIBA
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAMILLA REGINA DE SOUZA MADEIRA

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ESPECTROFOTOMETRICOS
NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA PARA
QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE BESILATO DE ANLÓDIPINO E RAMIPRIL EM
ASSOCIAÇÃO FARMACÊUTICA SÓLIDA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Angela Cristina Leal Badaró Trindade
Coorientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Piantavini

CURITIBA
2015

Madeira, Camilla Regina de Souza

Desenvolvimento e validação de métodos espectrofotométricos na região do infravermelho com calibração multivariada para quantificação simultânea de besilato de anlodipino e ramipril em associação farmacêutica sólida / Camilla regina de Souza
Madeira - Curitiba, 2015.

99 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientadora: Professora Dra. Angela Cristina Leal Badaró Trindade

Coorientador: Professor Dr. Mário Sérgio Piantavini

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. 2015.

Inclui bibliografia

1. Fármaco de baixa dosagem. 2. Besilato de anlodipino. 3. Ramipril. 4. Infravermelho. 5. PLS. I. Trindade, Angela Cristina Leal Badaró. II. Piantavini, Mário Sérgio. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

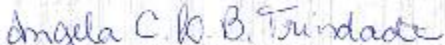
CDD 615.1


TERMO DE APROVAÇÃO

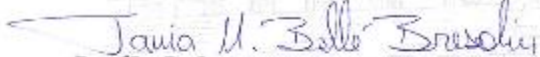
CAMILLA REGINA DE SOUZA MADEIRA


Título: "DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA PARA QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE BESILATO DE ANLODIPINO E RAMIPRIL EM ASSOCIAÇÃO FARMACÊUTICA"

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.


Prof.ª Dr.ª. Angela Cristina Leal Badaró Trindade
Orientadora


Prof. Dr. Mário Sérgio Piantavini
Co-orientador


Prof.ª Dr.ª. Tania Mari Belle Bresolin
Universidade do Vale do Itajai


Prof.ª Dr.ª. Lucía Regina Rocha Martins
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Curitiba, 11 de fevereiro de 2015.

Dedico este trabalho
À minha família

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, saúde, força e fé para chegar até aqui.

À minha mãe, minha amiga, Márcia, exemplo vivo de superação, esforço e otimismo, a qual sempre me apoia em tudo que faço. Obrigada pela acolhida e pela oportunidade de revivermos momentos importantes pra nós.

À meu pai, Kerton, que sempre acreditou que o estudo é o bem mais sagrado que poderia me oferecer. Muito obrigada por sempre me incentivar e me proporcionar a oportunidade de estudar e me aperfeiçoar. Gratidão eterna!

Aos meus avós paternos, Ivone e Hélio, os quais foram e são o meu exemplo e a minha inspiração profissional.

Aos meus avós maternos, Wilma e Celso, “meus pais”, os quais sempre estiveram, estão e certamente estarão ao meu lado. Obrigada pelos ensinamentos, pelo exemplo de caráter, justiça, por todo apoio, amor e confiança que necessito para continuar em frente.

À meu irmão, Fábio, pela oportunidade de convivermos mais. Obrigada pela amizade, pelos momentos que nos fizeram refletir, aprender e evoluir. Sempre estarei ao seu lado!

À minha irmã, Maria Eduarda, pela amizade e carinho, pelas “comilanças” e fotos que nos divertem sempre! Sempre estarei ao seu lado também!

À minha tia, madrinha, guerreira, Mary, pelo incentivo e exemplo de fé, esperança e força. Obrigada por suas palavras positivas e acolhedoras.

Ao meu namorado, Luiz Faustino, meu grande amor... Obrigada pelo apoio incondicional em todos os momentos desse desafio, desde o “material escolar” e o “jaleco mais lindo e elaborado” até o cuidado e carinho com meus avós.

Às minhas grandes amigas, Silvana e Nicole, mesmo longe, sempre estivemos juntas. Obrigada pelos inúmeros momentos importantes onde vocês estiveram presentes na minha vida, com palavras e sinceras atitudes.

À minha orientadora, professora Dr^a Angela Trindade, pela oportunidade, toda paciência e crescimento profissional e pessoal.

Ao meu coorientador, professor Dr. Mário Piantavini, pessoa grandiosa, sábia. Obrigada por toda ajuda, conhecimento e paciência.

Ao professor Dr. Roberto Pontarolo, pela oportunidade e gentilezas concedidas.

Aos meus amigos e parceiros diários, Luna, Flávia, Carol, Lorilei, Cássio, Helena, Suzane, Mário, Rômulo, Fernanda, Mariana, Thais Piazza, Letícia, Laiza, Cleverson, Raquel, Breno, Reginaldo, João e Thais

Guimarães pelo respeito, amizade, por conseguirmos nos apoiar sempre, pelas risadas, “eventos”, “almoço feliz”, ajuda com as análises, almoços no RU, entre outros. Vocês fizeram desta etapa, um momento mais leve, eterno e muito feliz! Muito obrigada!

À todos os meus colegas da pós, todo carinho, força e conhecimentos trocados. Agradeço pelos momentos em que estivemos juntos, torcendo sempre um pelo outro.

Aos professores Dr. Stamar, Dr. Marcelo, Dr.^a Samantha e Dr.^a Marilis, os quais me auxiliaram e contribuíram com seus conhecimentos para o melhor desenvolvimento deste trabalho.

Ao professoras Dr.^a Jânia e Dr.^a Lúcia pelo tempo e sugestões despendidas para tornarem esse trabalho melhor.

Ao programa de pós-graduação em Química desta Universidade, em especial ao professor Dr. Patrício Peralta-Zamora e à professora Dr.^a Noemi Nagata, pela orientação e auxílio com o uso da calibração multivariada.

Ao Tiago, também da pós-graduação em Química da UFPR, pelo auxílio no uso do equipamento de Infravermelho Próximo.

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.”

Cora Coralina

RESUMO

A associação dos fármacos besilato de anlodipino (BA) e ramipril (RAM) é utilizada, na mesma forma farmacêutica, para tratamento da hipertensão arterial sistêmica, a qual é considerada um grande problema de saúde pública, tanto nacional quanto mundialmente, e apresenta baixas taxas de controle. A espectroscopia na região do infravermelho no modo reflectância difusa pode ser aplicada para quantificar o princípio ativo em cápsulas de baixa dosagem. O objetivo deste estudo foi demonstrar a viabilidade do infravermelho próximo (IVP) e infravermelho médio (IVM), associado à calibração multivariada, de quantificar simultaneamente o ramipril (10,0 mg) e anlodipino (5,0 mg), em cápsulas comerciais. Uma vez que a composição quantitativa dos excipientes dos produtos comerciais não era conhecida, o desenho experimental foi modelado com uma mistura com os principais excipientes. Para IVP, o melhor modelo foi obtido selecionando a região espectral de 7000-4000 cm^{-1} para ambos os fármacos. Para ramipril, os dados foram pré-processados através da primeira derivada e alisamento Savitzky-Golay seguido por dados centrados na média. O melhor modelo para o anlodipino foi pré-processado pela primeira derivada e alisamento Savitzky-Golay, acrescido da correção do espalhamento de luz (MSC), seguido por dados centrados na média. Em ambos os casos algoritmo PLS1 foi utilizado. Para IVM, o melhor modelo para ramipril e anlodipino foi pré-processado por SNV (*standard normal variate*) seguido por dados centrados na média. Foi considerado o espectro completo (4000-400 cm^{-1}), utilizando o algoritmo de PLS2. Os modelos, IVP e IVM, foram construídos usando duas variáveis latentes, proporcionando RMSEP inferior a 2,8 mg/g para os dois analitos. O método foi validado de acordo com os respectivos regulamentos nacionais (ANVISA) e recomendações internacionais (ASTM E1655-05) através da estimativa de figuras de mérito, tais como exatidão, precisão, linearidade, sensibilidade analítica, seletividade, *bias* e desvio previsão residual (DPR). Em seguida, duas formulações farmacêuticas comerciais foram avaliadas (cápsulas industriais e magistrais). Os métodos desenvolvidos na região do IVP (RAM e BA) forneceram resultados estatisticamente iguais ao método descrito da literatura (CLAE). No entanto, para o medicamento industrial, os resultados obtidos pelo modelo na região do IVM foram estatisticamente diferentes dos outros métodos (CLAE e IVP), no nível de confiança de 95%. Os métodos IVP e IVM são simples, não utiliza solvente orgânico, é mais barato e cerca de dez vezes mais rápido que o CLAE.

Palavras-chave: Fármaco de baixa dosagem, Besilato de anlodipino, Ramipril, Infravermelho e PLS

ABSTRACT

The combination of amlodipine besylate drug (AB) and ramipril (RAM) is used in the same dosage form for the treatment of hypertension, which is considered a major public health problem, nationally and globally, and has low rates control. The infrared spectroscopy based on diffuse reflectance may be applied to determine the content of low-dosage active substance in capsules. The aim of this study was to demonstrate the feasibility of near infrared (NIR) and mid infrared (MIR) spectroscopy, couple to multivariate calibration, to quantify simultaneously ramipril (10.0 mg) and amlodipine (5.0 mg), in commercial low-dosage capsules. Once the quantitative composition of the excipients of the commercial products were not known, the experimental design was modeled with a selected mixture of the major excipients. For NIR, the best model was obtained by selecting the spectral region of 7000-4000 cm^{-1} for both drugs. For ramipril, the data were preprocessed by first derivative and Savitzky–Golay smoothing followed by mean centering. The best data model for amlodipine besylate was preprocessed by first derivative and Savitzky-Golay smoothing, plus multiplicative scatter correction (MSC) followed by mean centering. In both case using algorithm PLS1. For MIR, the best model for ramipril and amlodipine besylate was preprocessed by standard normal variate (SNV) followed by mean centering. The region considered was the full spectra (4000-400 cm^{-1}), using algorithm PLS2. The models, NIR e MIR, were built using two latent variables, providing RMSEP lower than 2.8 mg/g for the two analytes. The method was validated according the appropriate national regulations (ANVISA) and international recommendations (ASTM E1655-05) through the estimate of figures of merit, such as trueness, precision, linearity, analytical sensitivity, selectivity, bias and residual prediction deviation (RPD). Then, it was applied to two pharmaceutical formulations (industrial and handling capsules). The methods developed in the NIR region (RAM and AB) provided statistically similar results to the method described in the literature (HPLC). However, for the industrial product, the results of the model in the MIR region were statistically different from other methods (HPLC and NIR) at 95% confidence level. The NIR and MIR methods are simple, no using organic solvent, is cheaper and about ten times faster than HPLC.

Keywords: Low-dosage, Amlodipine besylate, Ramipril, Infrared and PLS

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 – Classificação da PA.....	24
TABELA 02 – Decisão terapêutica para HAS	26
TABELA 03 – Regiões espectrais do infravermelho.....	36
TABELA 04 – Ensaio necessários para validação do método analítico, segundo sua finalidade.....	44
TABELA 05 – Proporções de SAC, AMD e HPMC testadas para compor as amostras para o desenvolvimento do método.....	56
TABELA 06 – Quantidades utilizadas de BA, RAM e EXC na composição das amostras do conjunto de calibração.....	58
TABELA 07 – Quantidades utilizadas de BA, RAM e EXC na composição das amostras do conjunto de validação.....	59
TABELA 08 – Composição das misturas para avaliação do ensaio de robustez.....	63
TABELA 09 – Parâmetros estimados para desenvolvimento e validação dos métodos IVP-PLS1 e IVM-PLS2.....	84
TABELA 10 – Valores médios de concentração e desvio padrão para determinação simultânea de RAM e BA em 2 formulações comerciais distintas através de IVP e IVM e CLAE (n = 10)	86

LISTA DE QUADROS

QUADRO 01 - Métodos analíticos aplicados ao fármaco BA e associações em produto acabado.....	31
QUADRO 02 - Métodos analíticos aplicados ao fármaco RAM e associações em produto acabado.....	33

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 - Possíveis combinações das classes de anti-hipertensivos.....	27
FIGURA 02 - Fórmula estrutural do besilato de anlodipino.....	29
FIGURA 03 - Fórmula estrutural do ramipril.....	32
FIGURA 04 - Regiões do espectro eletromagnético com suas respectivas energias e alterações moleculares.....	35
FIGURA 05 - Reflectância difusa em uma amostra de superfície irregular.....	37
FIGURA 06 - (a) Matriz de variáveis independentes, gerada por dados espectrofotométricos e (b) Matriz de variáveis dependentes ...	40
FIGURA 07 - Representação geométrica da propriedade de ortogonalidade do NAS.....	45
FIGURA 08 – Representação gráfica do planejamento do tipo composto central das amostras de BA e RAM.....	57
FIGURA 09 Espectro de absorção dos medicamentos comerciais: industrial e magistral.....	68
FIGURA 10 - Espectros na região do infravermelho próximo das amostras dos conjuntos de calibração (29 amostras) e validação (14 amostras) da associação RAM e BA.....	70
FIGURA 11 - Espectros de absorção na região do infravermelho próximo dos padrões de RAM e BA.....	72
FIGURA 12 Espectros de absorção na região do infravermelho próximo das amostras comerciais (industrial e magistral).....	72
FIGURA 13 - Escolha do número de VL para o modelo de quantificação do RAM na região do infravermelho próximo.....	73
FIGURA 14 - Escolha do número de VL para o modelo de quantificação do BA na região do infravermelho próximo.....	73
FIGURA 15 - Avaliação de <i>outliers</i> no modelo de quantificação do RAM na região do infravermelho próximo.....	74
FIGURA 16 - Avaliação de <i>outliers</i> no modelo de quantificação do BA na região do infravermelho próximo.....	74
FIGURA 17 - Espectros na região do infravermelho médio das amostras dos conjuntos de calibração (29 amostras) e validação (14 amostras) da associação RAM e BA.....	75
FIGURA 18 - Espectros de absorção na região do infravermelho médio dos padrões de RAM e BA.....	76

FIGURA 19	Espectros na região do infravermelho médio das amostras comerciais (industrial e magistral).....	77
FIGURA 20 -	Escolha do número de VL para o modelo de quantificação do RAM e BA na região do infravermelho médio.....	77
FIGURA 21 -	Avaliação de <i>outliers</i> no modelo de quantificação do RAM na região do infravermelho médio.....	78
FIGURA 22 -	Avaliação de <i>outliers</i> no modelo de quantificação do BA na região do infravermelho médio.....	78
FIGURA 23 -	Avaliação da linearidade pela distribuição dos resíduos no modelo IVP-PLS1-RAM.....	80
FIGURA 24 -	Avaliação da linearidade pela distribuição dos resíduos no modelo IVP-PLS1-BA.....	81
FIGURA 25 -	Avaliação da linearidade pela distribuição dos resíduos no modelo IVM-PLS2-RAM.....	81
FIGURA 26 -	Avaliação da linearidade pela distribuição dos resíduos no modelo IVM-PLS2-BA.....	82
FIGURA 27 -	Cromatograma da amostra industrial.....	86
FIGURA 28 -	Cromatograma da amostra magistral.....	86

LISTA DE EQUAÇÕES

EQUAÇÃO 1-	Sensibilidade.....	46
EQUAÇÃO 2	Sensibilidade Analítica.....	47
EQUAÇÃO 3 -	Precisão.....	47
EQUAÇÃO 4 -	Limite de Detecção.....	49
EQUAÇÃO 5 -	Limite de Quantificação.....	49
EQUAÇÃO 6 -	Exatidão.....	50
EQUAÇÃO 7 -	Bias a,b.....	51
EQUAÇÃO 8 -	RPD a, b.....	53

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
BA	Besilato de anlodipino
BCC	Bloqueador dos Canais de Cálcio
CCD	Planejamento Composto Central (<i>central composite design</i>)
CMD	Concentração Média Determinada
CV	Coefficiente de Variação
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
DRIFTS	Espectroscopia por refletância difusa no Infravermelho com transformada de Fourier, (<i>Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy</i>)
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	Espectrometria no IV com Transformada de Fourier
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
IECA	Inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
iPLS	Regressão de mínimos quadrados parciais por intervalo (<i>interval partial least squares regression</i>)
IVM	Infravermelho médio
IVP	Infravermelho próximo
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MIR	<i>Mid infrared</i>
MSC	Correção multiplicativa do espelhamento da Luz (<i>Multiplicative Scatter Correction</i>)
NAS	Sinal Analítico Líquido (<i>Net Analyte Signal</i>)
NIR	<i>Near infrared</i>
PA	Pressão Arterial
PC	Componente Principal (<i>Principal Component</i>)
PLS	Mínimos Quadrados Parciais (<i>Partial Least Squares</i>)

r	Coeficiente de Correlação
RAM	Ramipril
RMSEC	Raiz quadrada do erro médio de calibração (<i>Root Mean Standard Error of Calibration</i>)
RMSECV	Raiz quadrada do erro médio de calibração por validação cruzada (<i>Root Mean Standard Error of Calibration with Cross Validation</i>)
RMSEP	Raiz quadrada do erro médio de predição (<i>Root Mean Standard Error of Prediction</i>)
RPD	Desvio Padrão de Previsão (<i>Residual Prediction Deviation</i>)
SDV	<i>Standard Deviation of Validation</i>
SEL	Seletividade
SEN	Sensibilidade
SPC	<i>Single-pill combinations</i>
UV	Espectroscopia na região do ultravioleta
UV-Vis	Espectroscopia na região do ultravioleta e visível
VL	Variável Latente

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	22
2.1 OBJETIVO GERAL.....	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3 REVISÃO DA LITERATURA	23
3.1 HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA.....	23
3.2 TRATAMENTO PARA HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA.....	25
3.2.1 Besilato de anlodipino.....	28
3.2.2 Ramipril.....	31
3.2.3 Associação Anlodipino-Ramipril.....	33
3.3 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS.....	34
3.3.1 Espectroscopia no infravermelho.....	35
3.4 CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA.....	38
3.5 VALIDAÇÃO ANALÍTICA	42
3.5.1 Figuras de mérito.....	44
3.5.1.1 Seletividade.....	45
3.5.1.2 Linearidade.....	46
3.5.1.3 Sensibilidade.....	46
3.5.1.3.1 Sensibilidade analítica.....	47
3.5.1.4 Precisão.....	47
3.5.1.5 Limite de detecção.....	48
3.5.1.6 Limite de quantificação.....	49
3.5.1.7 Exatidão.....	50
3.5.1.8 Robustez.....	50
3.5.1.9 Teste para erro sistemático (Bias).....	51
3.5.1.10 Desvio Residual de Previsão.....	51
3.5.1.11 Intervalo.....	52
4 MATERIAL E MÉTODOS	53
4.1 MATERIAL.....	53
4.1.1 Equipamentos e consumíveis.....	53
4.1.2 Reagentes.....	53
4.1.3 Padrões Analíticos.....	54
4.1.4 Amostras comerciais.....	54
4.1.5 Matérias-primas.....	55

4.2 DESENVOLVIMENTO DOS MÉTODOS POR ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (MÉDIO E PRÓXIMO) E CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA	55
4.2.1 Seleção de excipientes.....	55
4.2.2 Planejamento experimental.....	56
4.2.3 Análise do teor do ramipril na matéria-prima.....	59
4.2.4 Análise do teor do besilato de anlodipino na matéria-prima.....	59
4.2.5 Preparo das amostras para construção do modelo multivariado.....	60
4.2.6 Aquisição dos espectros no infravermelho.....	60
4.2.7 Desenvolvimento do modelo multivariado de calibração.....	60
4.2.8 Validação dos modelos desenvolvidos.....	61
4.2.8.1 Seletividade, Sensibilidade e Sensibilidade analítica.....	62
4.2.8.2 Linearidade.....	62
4.2.8.3 Precisão.....	62
4.2.8.4 Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	62
4.2.8.5 Exatidão.....	63
4.2.8.6 Robustez.....	63
4.2.8.7 Bias.....	63
4.2.8.8 RPD.....	64
4.3 ANÁLISE DAS AMOSTRAS COMERCIAIS.....	64
4.3.1 Preparo das amostras.....	64
4.3.2 Análise por espectroscopia no infravermelho médio e próximo com calibração multivariada.....	64
4.3.3 Análise por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE).....	64
4.3.3.1 Condições cromatográficas.....	65
4.3.3.2 Fase Móvel.....	65
4.3.3.3 Curva de calibração.....	65
4.3.3.4 Preparo das amostras.....	66
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
5.1 ANÁLISE DO TEOR DO RAM E BA NAS MATÉRIAS-PRIMAS.....	67
5.2 MODELOS DESENVOLVIDOS POR CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA.....	67
5.2.1 Seleção de excipientes.....	67
5.2.2 Planejamento experimental.....	69
5.2.3 Obtenção de modelos multivariados no infravermelho próximo (IVP).....	70
5.2.4 Obtenção de modelos multivariados no infravermelho médio (IVM).....	75
5.3 VALIDAÇÃO DOS MODELOS MULTIVARIADOS.....	79
5.3.1 Precisão.....	79

5.3.2 Linearidade.....	79
5.3.3 Seletividade, Sensibilidade e Sensibilidade Analítica.....	82
5.3.4 Exatidão.....	83
5.3.5 Robustez.....	83
5.3.6 <i>Bias</i>	83
5.3.7 RPD.....	83
5.3.8 Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	84
5.4 Quantificação dos fármacos em amostras reais.....	86
6 CONCLUSÃO.....	88
REFERÊNCIAS	90

1 INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é caracterizada quando o nível da pressão arterial (PA) é superior e constante a 140/90 mmHg (BRUNTON; PARKER, 2008). É considerada um grande problema de saúde pública, tanto nacional quanto mundialmente, de modo a atingir em média 32% da população brasileira adulta, chegando a mais de 50% após os 60 anos e 75% em indivíduos com mais de 70 anos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010; CHOBANIAN *et al.*, 2003). Esses números elevam os gastos tanto para o tratamento da doença quanto das complicações decorrentes desta, como os acidentes vasculares cerebrais e infartos do miocárdio, entre outros (BRASIL, 2009).

No Brasil, as maiores incidências referem-se às regiões Sul e Sudeste, chegando, inclusive, a ultrapassar a média nacional (BRASIL, 2009). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o sedentarismo, o tabagismo e o estresse cotidiano contribuem fortemente para o aparecimento de HAS, causando o surgimento de doenças cardiovasculares (OKSANEN *et al.*, 2012; YARLIOGLUES *et al.*, 2010).

Contudo, os avanços no tratamento anti-hipertensivo, nos últimos 30 anos, possibilitaram a diminuição de mortalidade por doenças relacionadas a HAS (WOLFMAIER *et al.*, 2004). Muitos são os estudos clínicos relacionados à HAS que consideram o tratamento medicamentoso, associado ou não. Devido a somente 60% dos hipertensos responderem bem à monoterapia, a tendência à utilização da terapia combinada como tratamento de primeira escolha é intensa, já que a mesma apresenta benefícios para o paciente, contribuindo para o sucesso do tratamento e, conseqüentemente, melhoria da qualidade de vida (BROWN *et al.*, 2003; KOHLMANN *et al.*, 2006; ESCOBAR; BARRIOS, 2009; NIEMEIJER; CLEOPHAS, 2009; GRADMAN *et al.*, 2010). Deste modo, a associação terapêutica tem sido cada vez mais utilizada a fim de potencializar a ação do fármaco, principalmente em estágios mais avançados da HAS (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, 2010).

Atualmente, existem diversas associações reconhecidas como eficazes no mercado. Dentre as associações, a que está entre as recomendadas pelas diretrizes nacionais e internacionais para o controle da HAS (VI Diretrizes Brasileiras de HAS, 2010; ESH, 2013), é a associação composta por ramipril, um inibidor da enzima

conversora de angiotensina, e anlodipino, um bloqueador dos canais de cálcio, disponíveis nas concentrações 2,5 mg + 5,0 mg, 5,0 mg + 5,0 mg, 10,0 mg + 5,0 mg e 10,0 mg + 10,0 mg, respectivamente.

A qualidade de qualquer medicamento deve sempre ser assegurada, para garantir a eficácia e segurança do tratamento, além de avaliar e aperfeiçoar os processos de produção. Até o presente momento, para a associação em estudo, não há método para o controle de qualidade de produto acabado descrito nas farmacopeias (Farmacopeia Britânica, 2007; Farmacopeia Europeia, 2008; Farmacopeia Americana, 2009; Farmacopeia Brasileira, 2010).

Na literatura, foram encontrados trabalhos de quantificação simultânea para estes fármacos, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (BUSHAN *et al.*, 2006, BABU *et al.*, 2011; MASTE *et al.*, 2011; PRAVEEN *et al.*, 2012; KUMAR *et al.*, 2012; VENKATESH *et al.*, 2013), cromatografia em camada delgada de alta performance (SHAH *et al.*, 2012) e espectroscopia na região do ultravioleta (PATIL *et al.*, 2009a), utilizando métodos univariados para a quantificação.

Uma ferramenta muito útil e que vem sendo bastante difundida na química analítica é a calibração multivariada, a qual permite correlacionar os diferentes fatores que estão presentes em uma amostra, especialmente quando trabalhamos com amostras complexas, como um medicamento. As espectroscopias são grandemente beneficiadas dessa ferramenta, pois com o seu uso, é possível utilizar mais de um comprimento de onda, por exemplo, para a quantificação de uma substância ou mais substâncias, sendo comum o uso de grandes regiões do espectro, ou até mesmo o espectro inteiro, o que representa uma maior confiabilidade para a quantificação (FERREIRA *et al.*, 1999).

Adicionalmente, tem-se buscado alternativas para o controle de qualidade de medicamentos que ofereçam maior rapidez na análise, baixo consumo de solventes e conseqüente menor geração de resíduos, mínimo preparo da amostra e baixo custo (DOU *et al.*, 2007; PASQUINI, 2003; ROSSIGNOLI *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2009). Portanto, esse trabalho se justifica pela necessidade de desenvolver um método para a quantificação simultânea dos fármacos ramipril e anlodipino em associação medicamentosa anti-hipertensiva, utilizando a espectroscopia na região do infravermelho médio e próximo associado à calibração multivariada.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Desenvolver e validar métodos para a quantificação simultânea dos fármacos anlodipino e ramipril em associação farmacêutica utilizando a espectroscopia na região do infravermelho (próximo e médio) e calibração multivariada.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver métodos espectroscópicos, na região do infravermelho médio e próximo, empregando calibração multivariada, para quantificação simultânea dos fármacos em estudo;
- Validar os métodos desenvolvidos, baseando-se nas normas vigentes para validações de métodos analíticos que utilizam modelos univariados e multivariados de calibração;
- Quantificar os fármacos presentes na associação industrial e magistral pelos métodos desenvolvidos e por método já estabelecido na literatura (CLAE) para fins de comparação.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA (HAS)

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial. No Brasil, o indivíduo é considerado hipertenso quando apresenta níveis de PA acima de 140/90 mmHg, de modo que a classificação é feita baseando-se nos valores constantes na TABELA 01, definidos nas Diretrizes Brasileiras de HAS (VI Diretrizes Brasileiras de HAS, 2010).

A HAS associa-se, frequentemente, às alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo (coração, cérebro, rins e vasos sanguíneos) e às alterações metabólicas, com aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não fatais (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010). Essa multiplicidade de consequências coloca a HAS na origem de muitas doenças crônicas não transmissíveis e, portanto, caracteriza-a como uma das causas de maior redução da expectativa e da qualidade de vida dos indivíduos (DUNCAN; SCHMIDT; GIUGLIANI, 2006).

A HAS tem alta prevalência e baixas taxas de controle, de modo que a mortalidade por doença cardiovascular (DCV) aumenta progressivamente com a elevação da PA a partir de 115/75 mmHg de forma linear, contínua e independente (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010; LEWINGTON et al., 2002; CHOBANIAN et al., 2003). Por este fato, um alto número de internações decorre não somente da doença em si, mas de suas complicações, gerando uma elevação dos custos de tratamento para o Sistema de Saúde (BRASIL, 2009).

No Brasil, a prevalência média de HAS na população acima de 18 anos é de 22,7%, sendo maior em mulheres (25,4%) do que em homens (19,5%) (BRASIL, 2011).

TABELA 01 - CLASSIFICAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL PARA ADULTOS

CLASSIFICAÇÃO	PRESSÃO SISTÓLICA (mmHg)	PRESSÃO DIASTÓLICA (mmHg)
Ótima	< 120	< 80
Normal	< 130	< 85
Limítrofe*	130-139	85-89
Hipertensão estágio 1	140-159	90-99
Hipertensão estágio 2	160-179	100-109
Hipertensão estágio 3	≥ 180	≥ 110
Hipertensão sistólica isolada	≥ 140	< 90

FONTE: VI Diretrizes Brasileiras de HAS (2010)

* Pressão normal-alta ou pré-hipertensão são termos que se equivalem na literatura

De acordo com uma pesquisa realizada em 2008, estima-se que cerca de 33 milhões de brasileiros acima de 18 anos sejam portadores diagnosticados de HAS. Por isto, o Ministério da Saúde desenvolveu um sistema informatizado (DATASUS) para o cadastro e acompanhamento dos pacientes hipertensos, objetivando quantificação e a avaliação das informações em saúde (BRASIL, 2009). Entretanto, dados mundiais trazem evidências de que a HAS tem sido subdiagnosticada, assim como subtratada (NIEMEIJER; CLEOPHAS, 2009).

Os principais fatores de risco que podem levar ao aumento da PA referem-se à idade (quanto maior a idade maior a pressão), sexo, etnia (mulheres afrodescendentes tem maior probabilidade de HAS), fatores socioeconômicos (no Brasil, pessoas com níveis mais baixos de escolaridade tem maior prevalência de HAS, segundo CESARINO *et al.*, 2008), sedentarismo, consumo de álcool por períodos prolongados de tempo, tabagismo, consumo elevado de sal, obesidade, predisposição genética e fatores ambientais (VI Diretrizes Brasileiras de HAS, 2010).

Vários estudos comprovaram que a manutenção de limites de pressão arterial inferiores a 130/85 mmHg contribuem na prevenção de doenças cardiovasculares, acidentes vasculares cerebrais, infartos do miocárdio, entre outros, contribuindo para a diminuição dos gastos do Sistema de Saúde, além de melhorar a qualidade de vida dos pacientes e seus familiares (LINDHOLM *et al.*, 2002; BROWN *et al.*, 2003; CHOBANIAN *et al.*, 2003; LAW *et al.*, 2003; KOHLMANN *et al.*, 2006; MANCIA *et al.*, 2007; ESCOBAR; BARRIOS, 2009; GRADMAN *et al.*, 2010; PAREEK *et al.*, 2010;

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2010).

3.2 TRATAMENTOS DA HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA

A HAS quando não controlada pode caracterizar uma situação de risco cardiovascular, pois a força excessiva de bombeamento enfraquece o músculo cardíaco (CARRETERO; OPARIL, 2000), além de desencadear o aparecimento de outras doenças, como diabetes e insuficiência renal aguda, podendo levar o indivíduo à óbito (MESSERLI *et al.*, 2007; NOSADINI; TONOLO, 2002).

Deste ponto de vista, o objetivo primordial do tratamento da HAS é a redução da morbidade e mortalidade cardiovasculares (VI Diretrizes Brasileiras de HAS, 2010).

A terapêutica a ser adotada varia para cada paciente e leva em conta uma estratificação de risco, que avalia os valores da PA, a presença de fatores de risco cardiovascular, lesões em órgãos-alvo, as DCV presentes e, também, a meta mínima de valores de pressão arterial que deve ser atingida com o tratamento (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2010).

Em todos os estágios de hipertensão, o tratamento não medicamentoso é indicado e está relacionado com hábitos alimentares saudáveis, prática de exercícios físicos, diminuição da obesidade e evitar o consumo de álcool e tabaco. Entretanto, esse tipo de tratamento é indicado como único controle para PA somente quando não há riscos cardiovasculares adicionais presentes. Conforme TABELA 02, quando o risco adicional é baixo, o tratamento não medicamentoso é indicado durante seis meses. Após esse período, uma nova avaliação deve ser realizada e se a meta não foi atingida, inicia-se o tratamento medicamentoso (VI Diretrizes Brasileiras de HAS, 2010).

TABELA 02 - DECISÃO TERAPÊUTICA PARA HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA

CATEGORIA DE RISCO	TRATAMENTO
Ausente	Não-medicamentoso isolado
Baixo	Não-medicamentoso isolado por até 6 meses. Se não atingir a meta, associar tratamento medicamentoso
Médio ou alto	Não-medicamentoso isolado + medicamentoso

FONTE: VI Diretrizes Brasileiras de HAS (2010)

A monoterapia é indicada como terapia de primeira escolha por diferentes guias nacionais e internacionais (CHOBANIAN *et al.*, 2003; MANCIA *et al.*, 2007; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2010). Entretanto, estudos demonstraram que em cerca de dois terços dos pacientes hipertensos a terapia não combinada não foi suficiente para atingir as reduções de PA, observando-se uma tendência à introdução precoce da terapia associada como tratamento de primeira escolha, especialmente para pacientes com HAS em estágios 2 e 3 ou onde os riscos cardiovasculares são maiores (KOHLMANN JR *et al.*, 2006; ESCOBAR; BARRIOS, 2009; GRADMAN *et al.*, 2010).

As IV Diretrizes Brasileiras para o Tratamento da Hipertensão Arterial (DBH) já recomendavam, em 2002, o uso da terapia combinada para o controle adequado da PA, em muitos casos já como conduta inicial. As VI DBH de 2010 reforçaram essa recomendação (VI Diretrizes Brasileiras de HAS, 2010). Diretrizes internacionais, como JNC 8 (2014) e ESH (2013), também enfatizam a necessidade do uso da terapia combinada para a maioria dos hipertensos. São vários os estudos que afirmam a eficácia da associação de fármacos (LAW *et al.*, 2003; KOHLMANN *et al.*, 2006; ESCOBAR; BARRIOS, 2009; NIEMEIJER; CLEOPHAS, 2009; GRADMAN *et al.*, 2010; PAREEK *et al.*, 2010).

A escolha dos fármacos anti-hipertensivos em associação deve levar em conta os mecanismos de ação das diferentes classes anti-hipertensivas disponíveis. Esses mecanismos de ação, sempre que possível, devem ser complementares, o que acarreta doses menores dos fármacos, diminuindo os efeitos adversos de cada fármaco (PAREEK *et al.*, 2010). Praticamente todas as associações de anti-hipertensivos têm efeito aditivo na redução da pressão e presumivelmente na prevenção de eventos cardiovasculares (LAW; WALD; MORRIS, 2009). Dentro deste contexto, algumas das

associações de classes de anti-hipertensivos podem ser consideradas preferenciais (mais aceitáveis e efetivas e com menor risco de efeitos adversos) e as menos efetivas (devem ser evitadas e/ou utilizadas com precauções) (FIGURA 01) (BROWN *et al.*, 2003; ESH, 2013; LAW *et al.*, 2003; KOHLMANN *et al.*, 2006; ESCOBAR; BARRIOS, 2009; GRADMAN *et al.*, 2010; PAREEK *et al.*, 2010).

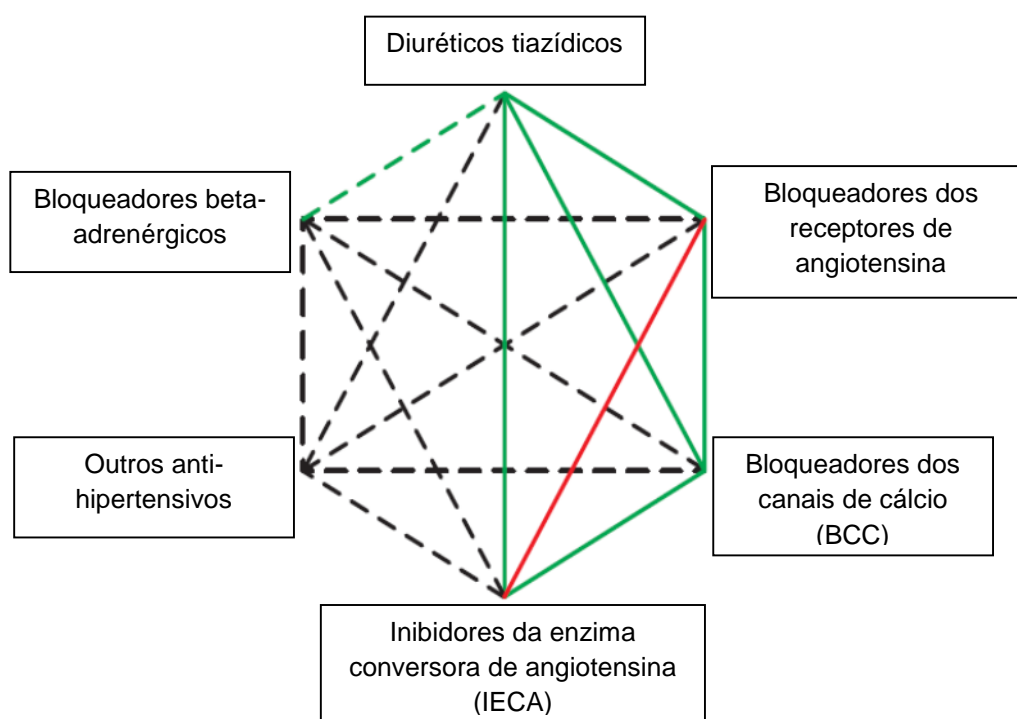


FIGURA 01 – POSSÍVEIS COMBINAÇÕES DAS CLASSES DE ANTI-HIPERTENSIVOS. LINHAS CONTÍNUAS VERDES: COMBINAÇÕES PREFERENCIAIS. LINHA TRACEJADA VERDE: COMBINAÇÃO UTILIZADA COM ALGUMAS RESTRIÇÕES. LINHAS TRACEJADAS PRETAS: POSSÍVEL COMBINAÇÃO, MAS NÃO TÃO SEGURA. LINHA VERMELHA: COMBINAÇÃO NÃO RECOMENDADA

FONTE: Adaptado do ESH (2013)

Medicamentos contendo associações de fármacos em dose fixa já existem no mercado e são reconhecidos como eficazes, visando reduzir o número de administrações pelo paciente. Nesses casos, dois ou mais fármacos com ação anti-hipertensiva estão associados, numa única forma farmacêutica. Os benefícios relacionados a essas combinações fixas vão desde a melhora na adesão ao tratamento, um controle mais efetivo da pressão arterial, diminuição da necessidade de visitas ao médico para controlar os valores da pressão arterial, além de economia financeira (BROWN *et al.*, 2003; ESCOBAR; BARRIOS, 2009; GRADMAN *et al.*, 2010).

Qualquer medicamento dos grupos de anti-hipertensivos comercialmente disponíveis, desde que resguardadas as indicações e contraindicações específicas,

pode ser utilizado para o tratamento da hipertensão arterial, já que a combinação de dois agentes de quaisquer classes de medicamentos anti-hipertensivos reduzem muito mais a pressão arterial do que o aumento da dose de um agente anti-hipertensivo (WALD *et al.*, 2009)

A combinação de um inibidor da enzima conversora de angiotensina (IECA) com um bloqueador dos canais de cálcio (BCC) está entre as associações recomendadas pelas diretrizes brasileiras e internacionais. O impacto do tratamento com a combinação fixa de um fármaco da classe IECA associado a um BCC, tendo sido demonstrado que para o mesmo grau de redução de controle da PA a combinação do IECA com o BCC foi mais eficaz em reduzir a morbidade e mortalidade cardiovascular e a progressão da doença renal, quando comparado a terapia combinado utilizando um IECA e um diurético (VI Diretrizes Brasileiras de HAS, 2010).

3.2.1 Besilato de anlodipino

O besilato de anlodipino (BA) é constituinte da classe das di-hidropiridinas, as quais são assim chamadas por apresentarem um anel di-hidropiridínico ligado a um anel fenila contendo substituintes.

Quimicamente, é o benzenossulfonato de (4*R,S*)-2-(2-aminoetoximetil)-4-(2-clorofenil)-6-metil-1,4-di-hidropiridina-3,5-dicarboxilato de 3-etil-5-metila (FIGURA 02). Sua fórmula molecular é $C_{26}H_{31}ClN_2O_8S$ e o peso molecular é $567,1 \text{ g.mol}^{-1}$ (PORTUGAL, 2002). Sua estrutura contém a cadeia longa denominada 2-aminoetoximetila, que protege o anel di-hidropiridínico da oxidação promovida pela enzima citocromo P450 (KATOH *et al.*, 2000). Foi introduzido na terapêutica em meados da década de 1980 pela Pfizer Inc. (EPSTEIN, 1999).

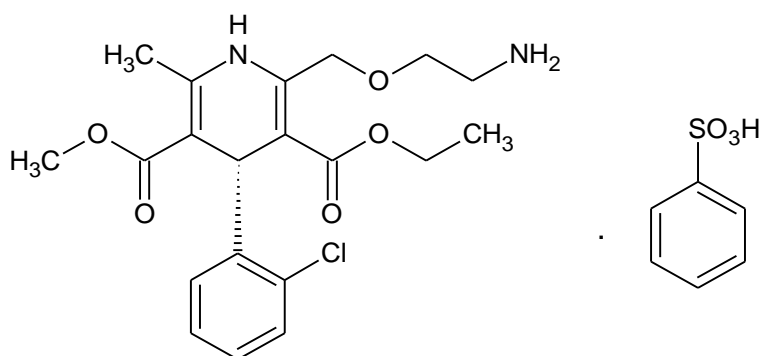


FIGURA 02 – ESTRUTURA QUÍMICA DO BESILATO DE ANLODIPINO
FONTE: European Pharmacopeia (2008)

Apresenta-se como um pó branco ou quase branco, pouco solúvel em água, facilmente solúvel em metanol, ligeiramente solúvel em etanol e pouco solúvel em 2-propanol (European Pharmacopeia, 2008). O fármaco, na forma do sal besilato, apresenta faixa de fusão de 195°C a 204°C (MERCK, 2001).

É um bloqueador seletivo dos canais de cálcio, o qual atua inibindo o influxo de íons cálcio pela membrana através da subunidade alfa 1 do canal L dependente de voltagem (despolarização), presente em praticamente todas as células da musculatura lisa vascular e miocárdio, resultando na diminuição de cálcio intracelular e, como consequência farmacodinâmica, ocorre a dilatação das artérias periféricas e oferta de sangue rico em oxigênio (ELLIOT; RAM, 2011; BASAVIAH; CHANDRASHEKAR; NAGEGOWDA, 2006; EDRAKI *et al.*, 2009). Essa dilatação reduz a resistência das artérias e, conseqüentemente, a pressão sistêmica (AMERICAN SOCIETY OF HEALTH-SYSTEM PHARMACISTS, 2006). Além disso, seus efeitos farmacológicos estão relacionados, em alguns casos, com a atividade antiarrítmica e fortalecimento do endotélio coronariano (LUSCHER *et al.*, 2009),

Contudo, o BA não promove a mesma vasodilatação venosa, fato esse que resulta em desequilíbrio de forças hidrostáticas no capilar periférico, extravasando líquido no espaço intersticial que, por gravidade, provoca a formação de edemas nos membros inferiores, sendo esse o principal efeito adverso e responsável pelo abandono do tratamento (LAW *et al.*, 2003, KOHLMANN; GOMES, 2006; WEBSTER *et al.*, 1987). Logo, a prática terapêutica comum para diminuir a incidência desses efeitos adversos é a administração inicial de baixa dosagem com posterior aumento progressivo (WEBSTER *et al.*, 1987).

O BA possui uma diferença fundamental em comparação com as duas gerações anteriores de BCC, pois, devido ao pKa elevado (8,6) (MERCK, 2001), o fármaco encontra-se ionizado e completamente dissolvido nos meios fisiológicos, sendo prontamente distribuído (MADDI *et al.*, 2010). O mecanismo de ação do fármaco é explicado pela ligação iônica do grupo amino protonado com o oxigênio aniônico presente na membrana fosfolipídica (AUSTIN *et al.*, 2005; MASON *et al.*, 1989).

Quando administrado via oral, a dose usual de BA para adultos varia de 2,5 mg a 10 mg ao dia. Após administração de uma dose ao dia, apresenta alto tempo de meia-vida, cerca de 45 horas, o que resulta em níveis plasmáticos elevados e consequente ação prolongada. É lentamente metabolizado no fígado, em metabólitos inativos, sendo sua eliminação majoritariamente através das vias renais. Aparentemente, não há alteração da absorção em função do estado alimentar do indivíduo, o que indica que a dose pode ser administrada antes ou depois das refeições (LIU *et al.*, 2009; PICO *et al.*, 2008; FLYNN *et al.*, 2006; VINCENT *et al.*, 2000; FAULKNER *et al.*, 1986; AMERICAN SOCIETY OF HEALTH-SYSTEM PHARMACISTS, 2006; ROHATAGI *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2009).

Além do mais, o BA possui notável sensibilidade frente à luz. Estudos de fotoestabilidade demonstraram que o anel di-hidropiridínico sofre oxidação quando irradiado com luz ultravioleta, o que leva o fármaco a uma rápida degradação. Nesse sentido, a complexação com β -ciclodextrinas promove uma significativa melhora na fotoestabilidade do ativo, reduzindo sua quantidade degradada a 3% após 9 horas de ensaio (FASANI *et al.*, 2008; RAGNO *et al.*, 2003).

De modo geral, para quantificação do BA, os compêndios oficiais descrevem a metodologia por CLAE com detector UV para a matéria-prima (BRITISH PHARMACOPEIA, 2007; EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2008; USP 32, 2008; Farmacopeia Brasileira, 2010).

Até o presente momento, há somente uma metodologia farmacopeica descrita para quantificação de BA em comprimidos ou cápsulas (Farmacopeia Americana, 2014). Na literatura científica, a quantificação de anlodipino em comprimidos, isolado ou em associação com outros fármacos, já foi descrita, utilizando diversos métodos analíticos, os quais estão descritos no QUADRO 01, entre outros.

FÁRMACO	MÉTODO	REFERÊNCIA
Besilato de anlodipino	CLAE-UV	Farmacopeia Americana, 2014
Besilato de anlodipino	Eletroforese capilar	JANKOVICS <i>et al.</i> , 2008
Besilato de anlodipino Olmesartan	UV	DHABALE; BHAGADE, 2011
Besilato de anlodipino Losartano potássico Hidroclorotiazida	CLAE-UV	WANKHEDE <i>et al.</i> , 2010
Besilato de anlodipino Losartano potássico	CLAE	PATIL <i>et al.</i> , 2009a PEDROSO <i>et al.</i> , 2009
Besilato de anlodipino Losartano potássico	UV	PATIL <i>et al.</i> , 2009b RAKESH <i>et al.</i> , 2010
Besilato de anlodipino Losartano potássico Hidroclorotiazida	UV	NAGAVALLI <i>et al.</i> , 2010

QUADRO 01 - MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS AO FÁRMACO BESILATO DE ANLODIPINO E SUAS ASSOCIAÇÕES EM COMPRIMIDOS
 FONTE: O AUTOR (2014)

3.2.2 Ramipril

O ramipril (RA) é um inibidor da enzima de conversão de angiotensina (IECA) (GOODMAN, 1996). É ingerido na forma de um pró-fármaco, sendo hidrolisado pelo fígado, após a absorção pelo trato gastrointestinal, originando o ramiprilato, que é o metabólito ativo inibidor da dipeptidilcarboxipeptidase I. O efeito anti-hipertensivo é observado de 1 a 2 horas após sua administração e a meia-vida de eliminação plasmática é de 50 horas. A dose recomendada é de 2,5 mg a 10 mg ao dia em tomada única diária (CHOBANIAN, 2000; BECKER; SCHOLKENS, 1987; ZANNAD; MATZINGER; LARCHÉ, 1996).

Quimicamente, o ramipril é o ácido (2S,3aS,6aS)-1-[(2S)-2-[[[(2S)-1-(etoxicarbonyl)-3-fenilpropil]amino}propanoil]-octa-hidrociclopenta[b]pirrol-2-carboxílico (FIGURA 03). Sua fórmula molecular é $C_{23}H_{32}N_2O_5$ e peso molecular de $416,5 \text{ g.mol}^{-1}$. Apresenta-se como pó cristalino branco ou quase branco. É fracamente solúvel em água e solúvel em metanol (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2008). O ramipril possui dois pKa (3,30, relacionado ao grupo ácido carboxílico, e 5,75, relacionado ao grupo amino) (KRAEMER; GAUTIER; SAUDEMOM, 1998).

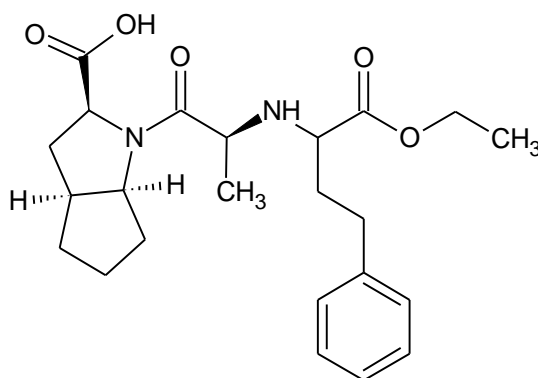


FIGURA 03 – ESTRUTURA QUÍMICA DO RAMIPRIL
FONTE: European Pharmacopeia (2008)

Como metodologia para quantificação da matéria-prima, de modo geral, as farmacopeias recomendam o método potenciométrico (BRITISH PHARMACOPEIA, 2007; USP 32, 2008).

Em produtos acabados, a Farmacopeia Britânica (2009) recomenda o método cromatográfico (CLAE-UV). Em periódicos científicos foram encontrados métodos quantitativos para determinação do RAM, em combinação ou isolado, conforme QUADRO 02, entre outros.

FÁRMACO	MÉTODO	REFERÊNCIA
Ramipril Enalapril	UV	AYAD <i>et al.</i> , 2002
Ramipril Benazepril Fosinopril Hidroclorotiazida	CLAE	MANNA <i>et al.</i> , 2001
Ramipril	CLAE-UV	BONAZZI <i>et al.</i> , 1997
Ramipril	UV	AL-MAJED <i>et al.</i> , 2001
Ramipril Hidroclorotiazida	HPLC	ZARAPAKAR; RANE, 2000
Ramipril Hidroclorotiazida Telmisartan	UV	BANKEY <i>et al.</i> , 2009

QUADRO 02 - MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS AO FÁRMACO RAMIPRIL E SUAS ASSOCIAÇÕES EM COMPRIMIDOS
 FONTE: O AUTOR (2014)

3.2.3 Associação Anlodipino-Ramipril

Atualmente os fármacos usados em terapia combinada são formulados em SPCs (*single-pill combinations*), que são formas farmacêuticas que contém todos os princípios ativos necessários para o tratamento. Além de aumentar a segurança e eficácia, o uso dessas formulações (comprimidos ou cápsulas) representa uma queda no custo financeiro para o paciente, aumentando, assim, sua adesão ao tratamento (HUSSEIN *et al.*, 2010; BURNIER *et al.*, 2009).

A combinação de um IECA com um BCC promove, além do efeito anti-hipertensivo sinérgico, a redução de eventos adversos, notadamente, redução do edema periférico causado pelos BCC (DAHLOF *et al.*, 2005; VI Diretrizes Brasileiras de HAS, 2010; ESH, 2013; GRADMAN *et al.*, 1997; KOHLMANN *et al.*, 2000; KUSCHNIR,

et al., 1996), já que existe uma relação direta entre a dose do fármaco e a frequência e intensidade dos efeitos adversos (LAW *et al.*, 2003, KOHLMANN e GOMES, 2006).

Os IECA e os BCC se encontram, na atualidade, entre os fármacos mais utilizados para o tratamento da hipertensão, uma vez que os mesmos têm demonstrado significativa redução da mortalidade cardiovascular, efetiva proteção aos órgãos-alvo, em combinação com relativa baixa incidência de reações adversas (NEAL; MACMAHON; CHAPMAN, 2000), bem como efeito sinérgico na regulação do consumo de oxigênio miocárdico e na produção de óxido nítrico coronário (MITAL *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 2000). Segundo Miranda e colaboradores (2008), a associação anlodipino e ramipril foi a melhor alternativa para tratamento da HAS em sete dos oito centros clínicos estudados.

3.3 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

A espectroscopia é a ciência que estuda as interações da radiação com a matéria (SKOOG *et al.*, 2000) e os processos que utilizam a luz para medir as concentrações químicas são conhecidos como espectrofotometria (HARRIS, 2001). É uma técnica analítica bastante utilizada na quantificação de fármacos, a qual é baseada na absorção da luz ou, melhor definindo, na absorção seletiva da radiação eletromagnética pelas substâncias, em determinados comprimentos de onda/frequências (HARRIS, 2001). Tem como vantagem, oferecer resultados satisfatórios, com custos, trabalho no preparo das amostras e geração de resíduos diminuídos (SKOOG *et al.*, 2000; PASQUINI, 2003).

O espectro eletromagnético compreende uma ampla faixa de energia e comprimentos de onda, conforme demonstrado na FIGURA 04.

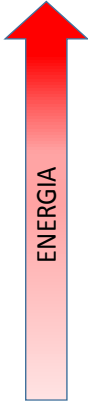
Frequência maior Comprimento de onda mais curto	Comprimento de onda (λ) cm	Região	Energia kJ/mol	Efeitos moleculares
	10^{-9}	raios gama	10^7	ionização
	10^{-7}	raios X	10^5	
		UV vácuo	10^3	transições eletrônicas
	10^{-5}	UV próximo		
	10^{-4}	visível	10^2	vibrações moleculares
	10^{-3}	Infravermelho (IV)	10 1	
	10^{-1}	micro-ondas	10^{-2}	movimento de rotação
	10^2	rádio	10^{-4}	transições no spin nuclear
Frequência menor Comprimento de onda mais longo	10^4		10^{-6}	

FIGURA 04 - Regiões do espectro eletromagnético com suas respectivas energias e alterações moleculares

FONTE: Adaptado de WADE (2008)

3.3.1 Espectroscopia na região do infravermelho

A radiação infravermelha (IV) induz transições em estados vibracionais e rotacionais associados com o estado eletrônico fundamental das moléculas (SKOOG *et al.*, 2000). Os átomos, ou grupo de átomos, dos compostos orgânicos vibram com maior rapidez e com maior amplitude em torno das ligações covalentes que os unem. Estas vibrações são quantizadas e, quando ocorrem, os compostos absorvem energia IV em certas regiões do espectro (SOLOMONS, 1996).

A radiação IV compreende a faixa de 780 a 100.000 nm. O espectro do IV é dividido em infravermelho próximo (IVP), infravermelho médio (IVM) e infravermelho distante (IVD). A TABELA 03 apresenta os limites aproximados para cada região (SKOOG *et al.*, 2002).

TABELA 03 - REGIÕES ESPECTRAIS DO INFRAVERMELHO

REGIÃO	INTERVALO EM NÚMERO DE ONDAS (cm ⁻¹)	INTERVALO EM COMPRIMENTO DE ONDAS (nm)
Próximo (IVP)	12.800-4.000	780-2.500
Médio (IVM)	4.000-200	2.500-5.000
Distante (IVD)	200-10	5.000-100.000

FONTE: SKOOG *et al.* (2002)

A deformação axial e a deformação angular são os tipos de vibrações moleculares observados nos espectros no IV. A deformação axial ou estiramento é um movimento rítmico ao longo do eixo de ligação em que a distância entre os átomos aumenta ou diminui enquanto que a deformação angular é um movimento em que ocorrem variações nos ângulos das ligações químicas (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

A interação de uma molécula com a radiação infravermelha só é possível quando o campo eletromagnético oscila na mesma frequência do momento dipolar dessa molécula, ou seja, ao absorver a radiação de infravermelho a molécula converte esta energia em vibração, gerando um espectro vibracional que costuma aparecer como bandas. Assim, a formação do espectro na região do infravermelho será resultado da frequência de absorção, que depende da massa dos átomos, do arranjo geométrico dos átomos e da força de ligação entre eles (SCHARDER, 1995).

O IV tem sido amplamente usado em análises qualitativas e quantitativas, sendo importante para a avaliação de matérias-primas e produtos (STUART, 2004). As principais vantagens da espectroscopia de IV são a possibilidade de análises rápidas, não destrutivas, não invasivas, de baixo custo e também podem ser realizadas em tempo real tanto em produto acabado quanto na fase de processo. Além disso, a técnica tornou-se extremamente atrativa, pois não há necessidade de utilizar solventes orgânicos, não gerando resíduos e assim, podendo ser chamada de sustentável. Outro grande atrativo da técnica é a menor intervenção humana na análise, com menor manipulação da amostra, o que proporciona resultados sensíveis e exatos (PASQUINI, 2003; LIMA *et al.*, 2009; FERREIRA; BRAGA; SENA, 2012).

Existem dois tipos de instrumentos: os clássicos que possuem um prisma (técnica dispersiva) e os por Transformada de Fourier (FT). Os espectrômetros de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) são atualmente os mais utilizados, pois proporcionam um espectro de melhor qualidade que é adquirido mais rapidamente (STUART, 2004). O FTIR coleta simultaneamente os dados em todas as frequências do espectro e isto só é possível devido ao interferômetro. O interferômetro de Michelson converte a radiação multifrequência, que é constante com o tempo, em um interferograma que é dado não em função da frequência, mas do tempo. Posteriormente, através do processo matemático de transformação de Fourier, o interferograma é convertido em um espectro (HESSE; MEIER; ZEEH, 2008).

Os espectros na região do IV podem ser adquiridos por meio de métodos de transmissão ou por métodos de reflectância. Os métodos de transmissão baseiam-se na absorção da radiação em números de ondas específicos enquanto passam pela amostra, que pode ser líquida, gasosa ou sólida. Os métodos de reflectância podem ser por meio de reflexão interna, como a reflectância total atenuada (ATR) ou por reflexão externa que pode ser especular ou difusa (STUART, 2004). O método de reflectância difusa ou DRIFTS (*diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy*) consiste na reflexão da radiação incidente sobre as partículas da superfície da amostra de forma difusa, ou seja, em múltiplas direções uma vez que a superfície da amostra é irregular. Após o espalhamento, a radiação é coletada por espelhos que a direcionam ao detector (PARISOTTO *et al.*, 2009) (FIGURA 05).8

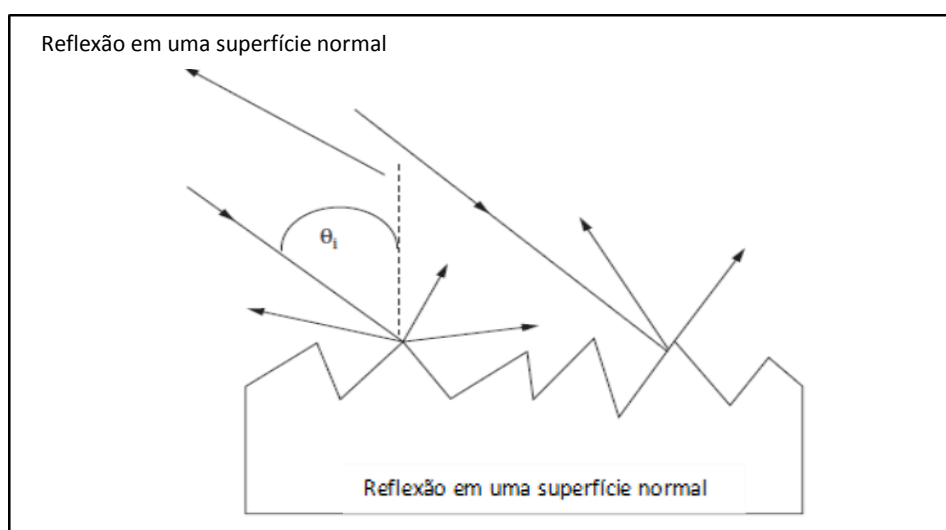


FIGURA 05 - REFLECTÂNCIA DIFUSA EM UMA AMOSTRA DE SUPERFÍCIE IRREGULAR
FONTE: Adaptado de SMITH (2011)

O método DRIFTS, nos últimos anos, tem se tornado uma ferramenta de confiável valor para a implementação nas rotinas de análise e controle de qualidade dos ingredientes farmacêuticos ativos, em função de características como baixo custo (instrumental e operacional), rapidez e necessidade de mínimo preparo de amostra (KIPOUROS *et al.*, 2005). Por estes motivos, métodos fundamentados em espectroscopia no IV tornaram-se populares na indústria e na pesquisa (PASQUINI, 2003). Tanto a espectroscopia no IVP (FERREIRA; GOMES; SENA, 2009; XIANG *et al.*, 2009; ROCHA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2012) IVM (SILVA *et al.*, 2009; BUNACIU; ABOUL-ENEIN; FLESchIN, 2010; MAZUREK; SZOSTAK, 2011; MÜLLER *et al.*, 2012) tem sido recentemente usadas para o desenvolvimento de métodos por DRIFTS.

No entanto, a complexidade de sinal e a pouca seletividade observada na espectroscopia no IV (SARRAGUÇA; LOPES, 2009) impedem o desenvolvimento de métodos de quantificação fundamentados em procedimentos univariados (relação direta entre intensidade de absorção de um dos sinais do espectro com a concentração do analito). Em amostras complexas, contendo mais que uma substância (fármacos e excipientes) ocorre sobreposição intensa das bandas espectrais. Essa sobreposição faz com que a determinação direta seja quase impossível. Para contornar esta limitação da espectroscopia no IV, ferramentas quimiométricas são cada vez mais utilizadas, de maneira a permitir a utilização de toda a informação espectral relevante para a obtenção do dado quantitativo (POLLANEN *et al.*, 2005).

3.4 CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

A quimiometria é a parte da química que utiliza métodos matemáticos e estatísticos para definir ou selecionar as condições ótimas de medidas e experimentos, bem como extrair o máximo de informações a partir da análise de dados químicos (BRUNS *et al.*, 2006).

O desenvolvimento simultâneo de novos equipamentos analíticos, mais modernos e que produzem dados que requerem métodos de análises mais efetivos, somados à melhora da tecnologia dos computadores pessoais atuais, principalmente sua capacidade de permitir análises sofisticadas de dados, criaram novas

oportunidades para a melhoria dos métodos de análises de dados. Partindo deste aspecto, a quimiometria tem emergido com papel significativo na química analítica, tendo mesmo sido incorporada nos sistemas operacionais de equipamentos analíticos (HOPKE, 2003).

Dentro deste contexto, métodos de calibração multivariada têm sido cada vez mais utilizados em química analítica, principalmente quando os componentes presentes numa mistura necessitam ser determinados, mas a informação analítica disponível não apresenta seletividade (BRO, 2003; HOPKE, 2003).

Atualmente, a maioria das metodologias propostas para determinação de fármacos é baseada em técnicas cromatográficas e determinações univariadas. Apesar dessas metodologias estarem bem estabelecidas e serem reconhecidas pelos órgãos reguladores, elas podem apresentar desvantagens em certas situações, tais como custo e tempo de análise relativamente alto. Desta forma, a partir da última década, o emprego de espectroscopia molecular associada à calibração multivariada passaram a representar uma alternativa promissora na determinação direta de fármacos e o desenvolvimento deste tipo de método tornou-se importante, tendo como objetivo sua futura aceitação pelas agências reguladoras (SENA *et al.*, 2007).

Em situações nas quais a determinação de um analito é dificultada ou impedida devido à presença de interferentes, o uso de calibração multivariada permite a modelagem desses interferentes junto ao analito de interesse (SENA *et al.*, 2004). Isso faz dela uma ferramenta muito útil para o estudo dos sinais produzidos por um espectro de absorção, pronunciadamente em espectros obtidos nas regiões do ultravioleta e infravermelho (FERREIRA *et al.*, 1999; FEUDALE *et al.*, 2002).

As características espectrais, como a sobreposição de bandas, demonstram a dificuldade de determinação simultânea de mais de um fármaco por métodos univariados (MAGGIO; CASTELLANO; KAUFMAN, 2008). Além disso, as variáveis em sistemas químicos geralmente apresentam fortes correlações, gerando interações importantes, com efeitos sinérgicos e antagônicos, que precisam ser levados em consideração (PERALTA-ZAMORA; MORAIS; NAGATA, 2005).

O método de calibração multivariada mais amplamente usado em quimiometria é o dos mínimos quadrados parciais, PLS (*Partial Least Squares*) (TAN *et al.*, 2011), usado na construção de modelos de regressão baseados em uma decomposição dos dados originais em variáveis latentes. Para dados espectrofotométricos, os dados

instrumentais medidos são organizados na matriz de variáveis independentes (matriz X), representada na FIGURA 06 (a) apresentando uma amostra em cada linha e em cada coluna, as respostas instrumentais medidas (valores de absorvância) para cada comprimento de onda. Em outra matriz de variáveis dependentes (matriz Y), os dados de concentração do analito de interesse serão inseridos, sendo que cada linha corresponde à uma amostra (correspondente à matriz X) e cada coluna corresponde à concentração do analito em pesquisa, conforme FIGURA 06 (b) (FERREIRA *et al.*, 1999; SENA *et al.*, 2007).

$$(a) \quad X = \begin{bmatrix} X_{11} & X_{12} & \dots & X_{1m} \\ X_{21} & X_{22} & \dots & X_{2m} \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ X_{n1} & X_{n2} & \dots & X_{nm} \end{bmatrix} \quad (b) \quad Y = \begin{bmatrix} X_{11} \\ X_{21} \\ \vdots \\ X_{n1} \end{bmatrix}$$

FIGURA 06 - (a) MATRIZ DE VARIÁVEIS INDEPENDENTES, GERADA POR DADOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS E (b) MATRIZ DE VARIÁVEIS DEPENDENTES
 FONTE: FERREIRA *et al.*, 1999

Quando um modelo PLS é montado, utilizando na matriz Y dois ou mais componentes, ou seja, quando se busca a quantificação de dois ou mais componentes, esse método é chamado PLS2. Da mesma forma, quando a matriz Y é composta por apenas um componente de interesse, esse modelo é chamado PLS1 (BRERETON, 2000; SENA *et al.*, 2004). Utilizando os mesmos dados experimentais e montando diferentes modelos, verificam-se diferenças na previsão das concentrações estimadas para os analitos em estudo, quando se utiliza PLS1 e PLS2, o que demonstra a influência da concentração nesse tipo de modelo. Em alguns casos, a estimativa da concentração no PLS2 é pior do que aquela estimada por PLS1. Entretanto, PLS2 fornece informações úteis, como a faixa espectral que pode ser mais significativa e quais concentrações podem ser determinadas com maior grau de confiança. Dessa forma, utilizar PLS2 para montar um modelo multivariado inicial pode ser uma boa estratégia para, posteriormente, montar modelos utilizando PLS1 que forneçam melhores resultados de previsão (PASQUINI, 2003).

Ao montar um modelo de calibração multivariada, deve-se tomar cuidado com a escolha do número de variáveis latentes. Essa escolha, que pode ser realizada pelo

software utilizado, deve ser avaliada pelo operador, para evitar que um grande número de variáveis latentes seja escolhido e cause prejuízo nas previsões realizadas pelo modelo. Durante a montagem do modelo, cada número de variáveis latentes explica uma porção dos dados utilizados, chamada de variabilidade. Com o aumento do número de variáveis latentes, a explicação dessa variabilidade aumenta, incluindo aqui, a chance de um ruído ser explicado por uma variável latente, por exemplo. Dessa forma, a avaliação do operador é indispensável. Para essa avaliação, o uso de um conjunto de amostras externa pode ser utilizado, a fim de garantir a capacidade preditiva do modelo. A avaliação das diferenças entre os resultados finais previstos pelo modelo e os valores de referência é uma forma segura de otimizar o número de variáveis latentes a serem escolhidos (PASQUINI, 2003). Quando o modelo for utilizado para a previsão de novas amostras, estas devem estar na faixa de concentração das amostras utilizadas para a construção do modelo (FERREIRA *et al.*, 1999).

Além da utilização de um conjunto de amostras externas ao modelo, uma validação cruzada pode ser utilizada na busca da otimização do número de variáveis latentes a ser escolhido para a montagem do modelo (PASQUINI, 2003). Na validação cruzada, cada amostra é retirada do modelo, o modelo é construído novamente e essa amostra que foi retirada é utilizada para uma previsão da concentração do analito. O erro de previsão é calculado. Esse procedimento é feito para todas as amostras do modelo. A soma dos quadrados dos erros de previsão é feita (RMSECV). Quando o valor dessa soma apresentar o menor valor, este pode ser avaliado como o melhor número de variáveis latentes (FERREIRA *et al.*, 1999).

Outro fator importante é a detecção das anomalias, a qual é um fator determinante para a capacidade preditiva do modelo de calibração (FERREIRA *et al.*, 1999; PASQUINI, 2003). Essa análise das amostras anômalas pode ser mais facilmente feita usando um gráfico de resíduos de Student *versus Leverage*.

A *Leverage* determina a influência da amostra no modelo multivariado, podendo ser interpretada, geometricamente, como a distância de uma amostra ao centróide do conjunto de dados. Valores pequenos de *Leverage* indicam que a amostra em questão influi pouco na construção do modelo de calibração, ou seja, não requer mais uma variável latente para sua explicação (FERREIRA *et al.*, 1999). É importante ressaltar que amostras com alto valor de *Leverage* podem ser amostras de concentrações extremas ou o valor extremo pode ser causado pela presença de um interferente.

No caso de uma amostra ultrapassar os limites de *Leverage* ou Resíduos de *Student* a amostra não deve ser automaticamente eliminada do modelo, somente deve ser descartada se ultrapassar ambos simultaneamente.

O resíduo de *Student* verifica se a amostra está ou não dentro de uma distribuição normal dos dados, com um nível de confiança de 95%. Como a unidade de desvio padrão do valor médio é utilizada para definir esse parâmetro, os valores para o resíduo de *Student* são definidos como $\pm 2,5\%$. Valores acima destes indicam que alguma amostra possui um valor da propriedade de interesse (Y) significativamente diferente do valor esperado ou apresentado pela técnica de referência, sendo então considerados anomalias ou *outliers* (FERREIRA *et al.*, 1999).

O modelo desenvolvido deve ser verificado periodicamente, para avaliar a flutuação que pode ser inerente ao equipamento. O uso rotineiro de um modelo também pode requerer a inclusão de novas amostras de referência, assim como a verificação da otimização para garantir a robustez deste modelo (PASQUINI, 2003).

Dessa forma, a calibração multivariada tornou-se uma ferramenta poderosa para a determinação simultânea, porque extrai mais informações dos dados, possibilitando realizar análises sem o uso de métodos de extração e separação, e permite construir modelos mais robustos (SENA *et al.*, 2004).

3.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Um método é considerado validado se suas características estiverem de acordo com os pré-requisitos estabelecidos em farmacopeias ou formulários oficiais, devidamente reconhecidos pela ANVISA (ANVISA, 2003; BRITO *et al.*, 2003; RIBANI, *et al.*, 2004). De maneira geral, a validação consiste na averiguação da garantia de um desempenho adequado para as condições de trabalho através de estudos estatísticos (ANVISA, 2003).

A validação analítica tem como objetivo demonstrar que um método é apropriado para a finalidade pretendida. No caso de determinação de metodologia analítica para controle de qualidade, mais especificamente na questão de determinação de concentrações, tem o objetivo de garantir que a análise quantitativa do fármaco, quando

realizada através de ensaios experimentais, permita chegar a resultados confiáveis (ANVISA, 2003).

Quando realizada por indústrias ou laboratórios, a validação deve estar descrita em um procedimento, tendo também todos os dados obtidos durante a validação, devidamente registrados (INMETRO, 2010). Os objetivos do processo de validação devem estar claramente definidos neste procedimento, onde também devem constar quais os parâmetros a serem avaliados na validação (ICH, 2005).

A validação de métodos cromatográficos e espectrofotométricos com dados de natureza univariados já é bem consolidada por órgãos reguladores nacionais e internacionais, como a ANVISA, INMETRO, ICH, entre outros. Entretanto, a validação de modelos multivariados ainda é pouco descrita e quase não se tem documentos oficiais para auxiliar na validação. Nos últimos anos, vem sendo publicados trabalhos que descrevem procedimentos e propostas de como esta validação deve ser realizada. A norma E-1655-05 da ASTM (*American Society for Testing and Materials*), descreve especificamente o desenvolvimento e a validação de modelos de calibração multivariada a partir da espectroscopia no IV (ASTM, 2012).

No Brasil, os dois órgãos que regulamentam a validação de métodos analíticos são a ANVISA e o INMETRO. O INMETRO (2010) possui um documento orientativo para a validação de procedimentos analíticos, o DOQ-CGCRE-008 – Orientação sobre validação de métodos analíticos, que contém informações bastante claras sobre o assunto. Esse documento é baseado em normas internacionais, como as descritas pelo ICH.

A legislação brasileira que determina quais figuras de mérito devem ser analisadas e em quais categorias de produtos é a Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003, da ANVISA, sendo esta o “Guia para validação de métodos analíticos e bionalíticos”. Essa resolução se assemelha ao descrito pelo ICH (ICH, 2005, ANVISA, 2003). Ainda, cada categoria de testes exige uma série de ensaios, conforme a TABELA

04

TABELA 04 - ENSAIOS NECESSÁRIOS PARA VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO, SEGUNDO SUA FINALIDADE

Parâmetro	Categoria I	Categoria II Quantitativo	Categoria II Ensaio Limite	Categoria III	Categoria IV
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão (Repetibilidade)	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Precisão (Intermediária)	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

FONTE: ANVISA (2003)

* Pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico

** Se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária à comprovação da precisão intermediária

3.5.1 Figuras de mérito multivariadas

Os parâmetros pelos quais a validação de um processo analítico pode ser atestada são chamados figuras de mérito (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009). As figuras de mérito descritas a seguir estão de acordo com normas específicas, como a E-1655-05 da ASTM (2012) para validação em calibração multivariada a partir de espectroscopia de infravermelho, e trabalhos científicos.

Alguns parâmetros como exatidão, precisão e robustez podem ser estimados de maneira bastante similar aos métodos de calibração univariada. Por outro lado, a estimativa de parâmetros como linearidade, sensibilidade, razão sinal/ruído e seletividade não pode ser comparada a esses métodos tradicionais (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009).

3.5.1.1 Seletividade

A seletividade (SEL) corresponde ao grau de sobreposição entre o sinal do analito e o sinal dos interferentes presentes na amostra. Assim, a SEL é determinada para cada amostra e o valor médio é utilizado para caracterizar o método.

Para modelos multivariados de calibração, a SEL pode ser estimada a partir do cálculo do Sinal Analítico Líquido (*Net Analyte Signal* - NAS). O NAS é definido como a fração do sinal analítico que é ortogonal ao sinal dos demais compostos presentes na amostra (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009) e sua representação geométrica pode ser observada na FIGURA 07.

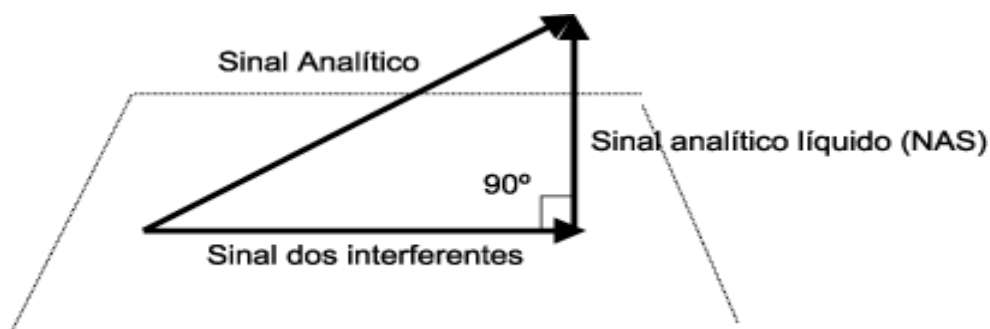


FIGURA 07 - REPRESENTAÇÃO GEOMÉTRICA DA PROPRIEDADE DE ORTOGONALIDADE DO NAS

FONTE: VALDERRAMA; BRAGA; POPPI (2009)

Como o método de infravermelho e calibração multivariada não necessitam de resolução de sinal, não é adequado estabelecer um valor limite para SEL (VALDERRAMA, 2005; FERREIRA; BRAGA; SENA, 2012). Portanto, o resultado obtido não se refere ao sentido geralmente empregado para a SEL para modelos, mas uma forma de estimar quanto do sinal espectroscópico é perdido por ortogonalidade (VALDERRAMA, 2005).

3.5.1.2 Linearidade

Nos modelos univariados, a linearidade pode ser avaliada num gráfico que correlaciona a concentração com a medida instrumental (FERREIRA; GOMES; SENA, 2009). Entretanto, nas técnicas multivariadas, em especial naquelas que utilizam PLS (*Partial Least Squares*) esse cálculo é problemático, devido à decomposição das variáveis pelas variáveis latentes (BRAGA; POPPI, 2004; VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009).

Qualitativamente é possível avaliar a linearidade através do gráfico de resíduos das amostras do conjunto de calibração e validação, que deve ter um comportamento aleatório (BRAGA; POPPI, 2004). A aleatoriedade dos resíduos também pode ser observada através do gráfico da concentração dos valores de referência *versus* os valores preditos pelo modelo de PLS (FERREIRA; BRAGA; SENA, 2012).

3.5.1.3 Sensibilidade

A sensibilidade (SEN) é definida como a capacidade de um método em distinguir, com determinado nível de segurança, duas concentrações próximas (ICH, 1996).

Para a calibração univariada, a sensibilidade é a inclinação da curva de calibração. Consequentemente, a sensibilidade é o inverso da inclinação para o modelo multivariado (OLIVIERI *et al.*, 2006).

Na calibração multivariada, a SEN corresponde à fração do sinal analítico responsável pelo acréscimo de uma unidade de concentração à propriedade de interesse (BRAGA; POPPI, 2004). Pode ser expressa como (SENA *et al.*, 2007):

$$SEN = 1/b \quad (\text{Equação 1})$$

em que, b é o vetor dos coeficientes de regressão estimados pelo PLS.

3.5.1.3.1 Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica (γ), a qual não é abordada em normas ou guias de validação, representa a sensibilidade do método em função da unidade de concentração utilizada, podendo ser definida como a razão entre a sensibilidade e o ruído instrumental (ε) (SENNA *et al*, 2007), podendo ser representada pela equação:

$$\gamma = \text{SEN} / |\varepsilon| \quad (\text{Equação 2})$$

O vetor ε pode ser estimado por replicatas avaliando os valores do desvio padrão do sinal para cada comprimento de onda.

3.5.1.4 Precisão

A precisão mede quanto os resultados obtidos de uma mesma amostra, em uma série de medidas, sobre as mesmas condições de análise, se aproximam entre si (BRASIL, 2003).

A precisão é geralmente expressa através do coeficiente de variação (CV%), também conhecido como desvio padrão relativo (DPR), comumente expressos em percentual, de uma série de medidas. O desvio padrão relativo pode ser calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{CV} = \text{DPR} = \frac{\text{DP} \times 100}{\text{CMD}} \quad (\text{Equação 3})$$

onde DP = estimativa do desvio padrão e CMD = concentração média determinada (BRASIL, 2003; INMETRO, 2010).

O valor aceitável deve ser definido levando-se em consideração a metodologia empregada, a concentração do analito da amostra, o tipo de matriz empregada e a

finalidade do método (BRASIL, 2003; ICH, 2005; INMETRO, 2010). A ANVISA (2003) recomenda que essa variação não deva ser superior a 5%.

A precisão é dividida em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade (BRASIL, 2003).

- Repetibilidade: avalia a concordância dos dados em um curto período de tempo, sendo esses ensaios realizados por um único analista. A repetibilidade pode ser avaliada com três amostras de concentrações diferentes cobrindo a faixa útil do modelo de calibração, sendo que cada amostra deve ser determinada em triplicata ou seis determinações da concentração aceita como nominal (BRASIL, 2003; ICH, 2005).
- Precisão intermediária: concordância entre resultados do mesmo laboratório, porém, obtidos por analistas e/ou equipamentos diferentes e em dias diferentes. Portanto, podemos afirmar que a precisão intermediária representa a variabilidade dos dados obtidos em um mesmo laboratório (RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, 2010). A ANVISA (2003) recomenda um mínimo de dois dias, com dois diferentes analistas para a determinação da precisão intermediária.
- Reprodutibilidade: É obtida por meio de ensaios interlaboratoriais. Esse tipo de precisão é importante em casos de padronização de procedimentos analíticos para a inclusão em farmacopéias (BRASIL, 2003).

3.5.1.5 Limite de detecção

O limite de detecção (LD) é definido como a menor quantidade do analito presente na amostra, que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado, sob condições analíticas determinadas (BRASIL, 2003; ICH, 2005; INMETRO, 2010).

Como, para um mesmo procedimento analítico, o limite de detecção pode variar em função do tipo de amostra, é fundamental que todas as etapas de processamento do método analítico estejam incluídas na determinação deste parâmetro (INMETRO, 2010).

O LD pode ser avaliado de diferentes formas, dependendo do método analítico utilizado (BRASIL, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; ICH, 2005; INMETRO, 2010). Alguns dos métodos mais frequentes são os baseados na avaliação visual dos instrumentos gráficos obtidos, como espectros, por exemplo, os baseados na relação sinal-ruído, conseguidos somente para procedimentos que mostrem o ruído da linha de base e através de cálculos matemáticos, e os baseados em parâmetros da curva analítica, obtidos também através de cálculos matemáticos (BRASIL, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; ICH, 2005; INMETRO, 2010). É calculado pela equação:

$$LD = 3 \times \text{ruído} / \text{SEN} \quad (\text{Equação 4})$$

no qual o ruído é a estimativa do ruído instrumental calculada a partir do branco (aparato sem amostra) e SEN é a sensibilidade calculada para cada analito.

3.5.1.6 Limite de quantificação (LQ)

É a menor concentração do analito que pode ser quantitativamente determinada numa amostra, com precisão e exatidão, sob condições experimentais definidas (BRASIL, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; ICH, 2005).

Como se trata de uma relação entre concentração e sua precisão e exatidão, deve ser observado o fato de que quando o nível de concentração do LQ decresce, sua medida se torna menos precisa. Dessa forma, se uma maior precisão for requerida, uma maior concentração do analito como limite de quantificação deve ser levada em consideração (RIBANI *et al.*, 2004).

Pode ser avaliado da mesma forma que o limite de detecção, ou seja, pelo método visual, pelo método baseado na relação sinal-ruído e pelo método baseado em parâmetros da curva analítica (BRASIL, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; ICH, 2005; INMETRO, 2010), calculado segundo a equação:

$$LQ = 10 \times \text{ruído} / \text{SEN} \quad (\text{Equação 5})$$

no qual o ruído é a estimativa do ruído instrumental calculada a partir do branco (aparato sem amostra) e SEN é a sensibilidade calculada para cada analito.

3.5.1.7 Exatidão

A exatidão demonstra o quanto um método analítico permite que os resultados encontrados estejam próximos dos resultados aceitos como valores reais convencionais ou valores de referência (ANVISA, 2003).

Na calibração multivariada a exatidão é expressa através da raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão (*Root Mean Squares Error of Prediction*, RMSEP), que é uma aproximação do erro médio de previsão para as amostras do conjunto de validação. O RMSEP é dado pela equação:

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\sum[(y' - y)^2/n]} \quad (\text{Equação 6})$$

onde, n representa o número de amostras do conjunto de validação, y' e y correspondem, respectivamente, aos valores de referência e aos previstos pelo modelo.

3.5.1.8 Robustez

A robustez de um método analítico mede a capacidade deste método em resistir a deliberadas e pequenas variações nos parâmetros analíticos, indicando sua confiabilidade no uso corriqueiro. O objetivo de avaliar este parâmetro é controlar e prevenir variações que possam interferir no resultado final (BRASIL, 2003).

Esses parâmetros analíticos devem ser avaliados durante a fase de desenvolvimento da metodologia e dependem do tipo de metodologia em estudo. Essas variações, se constatadas, devem ser inseridas em procedimentos operacionais padrão e devidamente alertadas aos analistas que realizem o ensaio (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Quando, durante o processo de desenvolvimento e validação de um procedimento analítico, houver mudanças de fornecedores, marcas de reagentes ou equipamentos, sem alterações significativas dos resultados, pode-se dizer que o método possui uma robustez intrínseca, pois a resposta foi mantida, mesmo perante essas pequenas alterações (RIBANI *et al.*, 2004).

3.5.1.9 Teste para erro sistemático (*Bias*)

O erro sistemático é o somatório das componentes do erro que não são aleatórias, afetando assim algumas figuras de mérito como exatidão e precisão (BRAGA; POPPI, 2004). A norma E1655-05 da ASTM (2012) recomenda a investigação de erros sistemáticos em modelos de calibração multivariada através de um teste t com 95% de confiança, para as amostras de validação. Com o teste é possível avaliar se o *bias* presente no modelo é significativo. Para esse teste, primeiro calcula-se um *bias* médio para o conjunto de validação através da equação:

$$Bias = \sum_{i=1}^{n\theta} \frac{(y_i^{ref} - \hat{y}_i)}{n\theta} \quad (\text{Equação 7})$$

onde y_i^{ref} são os valores de concentração das amostras de referência, \hat{y}_i são os valores de concentração das amostras preditas e $n\theta$ o número de amostras do conjunto de validação.

3.5.1.10 Desvio Padrão de Previsão (*Residual Prediction Deviation* - RPD)

O desvio residual de previsão (DRP, ou *residual prediction deviation* - RPD) representa quão preciso o modelo de calibração prevê o conjunto de amostras, sendo a forma mais apropriada para avaliar o desempenho do modelo. O DRP é determinado como a variação natural das amostras de calibração e validação em relação aos

prováveis erros que ocorrem durante a previsão e que é mais útil para a comparação de modelos de diferentes conjuntos de dados (FERREIRA; BRAGA; SENNA, 2013). O DRP é calculado para os conjuntos de calibração e validação de acordo com as seguintes equações:

$$\text{DRP}_{\text{cal}} = \text{DP}_{\text{cal}} / \text{RMSECV} \quad (\text{Equação 8a})$$

$$\text{DRP}_{\text{val}} = \text{DP}_{\text{val}} / \text{RMSEP} \quad (\text{Equação 8b})$$

onde, DP_{cal} representa o desvio padrão do conjunto de amostras de calibração e DP_{val} o desvio padrão do conjunto de amostras de validação.

3.5.1.11 Intervalo

Intervalo é a faixa entre a maior e a menor concentração utilizada para o desenvolvimento do método, incluindo estas, onde se pode quantificar um analito em uma amostra, com exatidão, precisão e linearidade adequados (BRASIL, 2003; ICH, 2005), ou seja, o intervalo onde é possível conseguir resultados com confiabilidade.

Segundo Ribani e colaboradores (2004), somente dentro do intervalo, ou faixa de trabalho, é que a curva analítica apresenta resultados confiáveis.

A faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser utilizado deve estar coberta pelo intervalo. É indicado que a concentração mais esperada da amostra esteja sempre que possível, no centro do intervalo (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO, 2010).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Equipamentos e consumíveis

- Balança analítica Mettler TOLEDO, modelo Excellence Plus XP 205, precisão analítica de 0,01 mg (Columbus, EUA);
- Espectrômetro na região do infravermelho Bruker com módulos Alpha FT-IR (Ettlingen, Alemanha) (IVM);
- Espectrômetro na região do infravermelho Bruker FT-IR Vertex 70/70v (IVP);
- Potenciômetro digital (Hanna HI 4521);
- Cromatógrafo a líquido marca Agilent, 1100 series, equipado com bomba quaternária G1379A, degasser G1316A, forno de coluna elétrico, detector diodo G1315B, software ChemStation (Wilmington, EUA);
- Coluna XBridge C18 250 x 4,6 mm, 5 µm de tamanho de partícula (Waters Corporation);
- Filtro de membrana Millipore Millex PVDF 0,22 µm e 0,45 µm de poro (Billerica, EUA);
- Papel de filtro quantitativo Quanta, JP 41, faixa preta, 12,5 cm de diâmetro e 28 µm de poro, J Prolab (São José dos Pinhais, Brasil);
- pHmetro Mettler TOLEDO, Sever Easy AG 8603 (Switzerland);
- Purificador de água Milli-Q-Millipore, A10 Gradiente (Milford, EUA);
- Banho de ultrassom Branson 2510 (Danbury, EUA);
- Agitador de amostras Mixer Glas-Col (Terre Haute, EUA);
- Pipetas volumétricas ou micropipetas calibradas

4.1.2 Reagentes

- Acetonitrila grau CLAE (99,9%);
- Metanol grau CLAE (99,9%);
- Trietilamina grau CLAE (99,9%);
- Fosfato de potássio monobásico PA (99%);
- Ácido fosfórico grau CLAE (85%);
- Biftalato de potássio PA (99,5%);
- Hidróxido de sódio PA (97%).

4.1.3 Padrões analíticos

O padrão analítico do fármaco BA foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich, na quantidade de 200 mg.

4.1.4 Amostras comerciais

A amostra industrial (na forma de cápsulas), que continha *pellets* dos fármacos anlodipino (na forma do sal besilato) e ramipril, nas apresentações de 5,0 mg (6,94 mg de besilato de anlodipino) e 10,0 mg, respectivamente, foi adquirida em farmácia comercial local. As cápsulas magistrais, que continham pós dos fármacos e dos excipientes, nas mesmas concentrações que as amostras industriais, foram obtidas em farmácias de manipulação do município de Curitiba-PR.

4.1.5 Matérias-primas

Os fármacos (BA e RAM) e os excipientes sacarose (SAC), amido (AMD) e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) foram adquiridos em farmácia de manipulação na cidade de Curitiba-PR.

4.2 DESENVOLVIMENTO DOS MÉTODOS POR ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (MÉDIO E PRÓXIMO) E CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

4.2.1 Seleção de excipientes

A seleção dos excipientes foi realizada tendo como base a composição relatada na bula do medicamento industrial, considerando os três constituintes majoritários e definidos como sendo sacarose (SAC), amido (AMD) e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC).

As misturas 1 a 5 (TABELA 05) foram preparadas pesando-se os excipientes nas proporções definidas, homogeneizadas em gral e tamisadas para uniformização do pó obtido. Em seguida, de cada mistura foi obtido o espectro na região do IVM, utilizando o acessório de reflectância difusa.

Para fins de comparação, o conteúdo de cinco cápsulas do medicamento industrial foi triturado e tamisado e do pó resultante foi obtido o espectro na região do IVM. Os espectros foram então comparados para avaliação da melhor mistura preparada.

TABELA 05 – MISTURAS DE EXCIPIENTES PREPARADAS E TESTADAS PARA COMPOR AS AMOSTRAS PARA CONSTRUÇÃO DO MODELO MULTIVARIADO, COM DIFERENTES PROPORÇÕES DE SACAROSE, AMIDO E HPMC (P/P)

MISTURA	SACAROSE (%)	AMIDO (%)	HPMC (%)
1	50	25	25
2	60	20	20
3	70	15	15
4	80	10	10
5	90	5	5

FONTE: O AUTOR (2014)

4.2.2 Planejamento experimental

O planejamento experimental escolhido para o desenvolvimento do IV-PLS foi do tipo composto central. A faixa de variação dos fármacos foi estabelecida em $\pm 15\%$ da concentração do produto industrial (ponto central). A mistura de excipientes variou na faixa de $\pm 5\%$. Para construção dos modelos de calibração, a quantidade de excipientes no ponto central (aproximadamente 197,0 mg) foi estabelecida através do peso médio das cápsulas do medicamento industrial (213 mg), desconsiderando o peso dos dois fármacos (10 mg de RAM + 6,94 mg de BA).

As amostras para os conjuntos de calibração e validação foram obtidas com o auxílio do software *Statistica 8.0* (StatSoft, Oklahoma, Estados Unidos), distribuídas de acordo com a FIGURA 08. Tais amostras foram obtidas a partir de três fatores: RAM, BA e mistura dos excipientes (EXC). Os níveis de concentração e as quantidades proporcionais dos fatores nas amostras dos conjuntos de calibração e de validação estão relacionados nas TABELAS 06 e 07. Os níveis fora da variação estabelecida correspondem aos pontos axiais de rotabilidade e ortogonalidade.

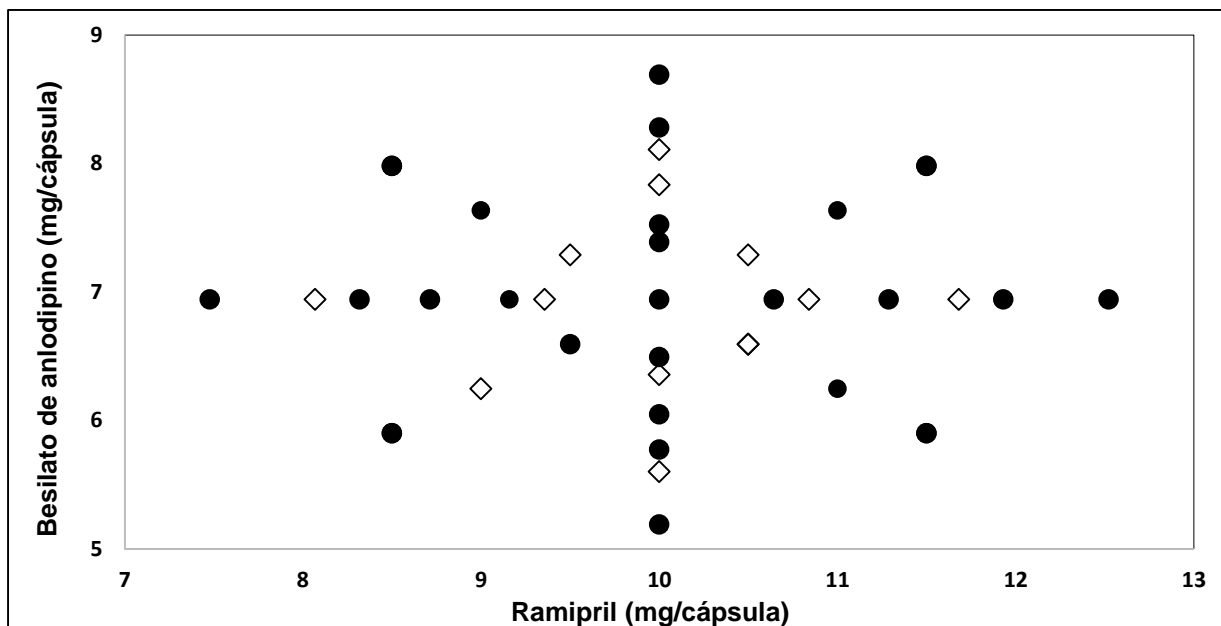


FIGURA 08 - Representação gráfica do planejamento do tipo composto central das amostras de BA e RAM (círculos negros: amostras do conjunto de calibração; losangos brancos: amostras do conjunto de validação)
 FONTE: O AUTOR (2014)

TABELA 06 - NÍVEIS DE VARIAÇÃO E QUANTIDADES DE BESILATO DE ANLÓDIPINO (BA), RAMIPRIL (RAM) E MISTURA DE EXCIPIENTES (EXC) NA COMPOSIÇÃO DAS AMOSTRAS DO CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO (29 AMOSTRAS) (mg/CÁPSULA)

AMOSTRA	RAM		BA		EXC*	
	NÍVEL	QTD (mg)	NÍVEL	QTD (mg)	NÍVEL	QTD (mg)
1	15	11,50	-15	5,90	5	206,49
2	15	11,50	-15	5,90	-5	186,83
3	-15	8,50	15	7,98	5	206,49
4	25	12,52	0	6,94	0	196,66
5	-15	8,50	-15	5,90	5	206,49
6	0	10,00	25	8,69	0	196,66
7	-25	7,48	0	6,94	0	196,66
8	0	10,00	-25	5,19	0	196,66
9	15	11,50	15	7,98	-5	186,83
10	15	11,50	15	7,98	5	206,49
11	-15	8,50	15	7,98	-5	186,83
12	19	11,93	0	6,94	0	196,66
13	0	10,00	19	8,28	0	196,66
14	0	10,00	0	6,94	6,4	209,32
15	-19	8,07	0	6,94	0	196,66
16	0	10,00	-19	5,60	0	196,66
17	10	11,00	10	7,63	5	206,49
18	0	10,00	13	7,83	0	196,66
19	13	11,29	0	6,94	0	196,66
20	-8	9,16	0	6,94	0	196,66
21	0	10,00	8	7,52	0	196,66
22	5	10,50	-5	6,59	-5	186,83
23	5	10,50	5	7,29	5	206,49
24	0	10,00	-8,4	6,36	0	196,66
25	8,4	10,84	0	6,94	0	196,66
26	5	10,50	-5	6,59	5	206,49
27	0	10,00	6,5	7,39	0	196,66
28	0	10,00	-6,5	6,49	0	196,66
29	6,4	10,64	0	6,94	0	196,66

*Mistura de Excipientes (EXC): 80% sacarose, 10% amido e 10% HPMC

FONTE: O AUTOR (2014)

TABELA 07 - NÍVEIS DE VARIAÇÃO E QUANTIDADES UTILIZADAS DE BESILATO DE ANLODIPINO (BA), RAMIPRIL (RAM) E MISTURA DE EXCIPIENTES (EXC) NA COMPOSIÇÃO DAS AMOSTRAS DO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO (14 AMOSTRAS) (mg/CÁPSULA)

AMOSTRA	RAM		BA		EXC*	
	NÍVEL	QTD (mg)	NÍVEL	QTD (mg)	NÍVEL	QTD (mg)
30	-15	8,50	-15	5,90	-5	186,83
31	-17	8,32	0	6,94	0	196,66
32	-10	9,00	-10	6,25	-5	186,83
33	0	10,00	17	8,11	0	196,66
34	-10	9,00	10	7,63	5	206,49
35	0	10,00	-17	5,77	0	196,66
36	17	11,68	0	6,94	0	196,66
37	10	11,00	-10	6,25	5	206,49
38	-13	8,71	0	6,94	0	196,66
39	0	10,00	-13	6,05	0	196,66
40	-5	9,50	-5	6,59	-5	186,83
41	-5	9,50	5	7,29	-5	186,83
42	-5	9,50	5	7,29	5	206,49
43	-6,4	9,36	0	6,94	0	196,66

*Mistura de Excipientes (EXC): 80% sacarose, 10% amido e 10% HPMC
 FONTE: O AUTOR (2014)

4.2.3. Análise do teor do ramipril na matéria-prima

O teor da matéria-prima ramipril foi realizada de acordo com o método potenciométrico farmacopeico descrito na Farmacopeia Europeia (2008).

4.2.4 Análise do teor do besilato de anlodipino na matéria-prima

O teor da matéria-prima besilato de anlodipino foi realizada de acordo com o método cromatográfico descrito na Farmacopeia Americana (2009).

4.2.5 Preparo das amostras para a construção do modelo multivariado

Para cada amostra, foram pesadas massas de BA, RAM e EXC correspondente a cinco vezes as quantidades expressas nas TABELA 06 e TABELA 07. A mistura de pós foi homogeneizada em gral e pistilo de ágata pelo método de diluição geométrica para garantir a distribuição uniforme das matérias-primas na mistura total. As concentrações dos fármacos foram corrigidas de acordo com a análise do teor das matérias-primas dos fármacos.

4.2.6 Aquisição dos espectros de infravermelho

As amostras foram transferidas para o aparato (porta amostra) do módulo de reflectância difusa (*DRIFT*) do espectrômetro na região do infravermelho (médio e próximo) para a aquisição dos espectros.

Os espectros foram adquiridos com auxílio do *software* OPUS (*version* 6.0 - *Brucker Optik*) na região de 4.000 a 400 cm^{-1} (Laboratório de Centro de Bioequivalência - CEB da UFPR), para as análises na região do infravermelho médio (IVM), e na região de 10.000 a 4.000 cm^{-1} (Laboratório de Infravermelho no Departamento de Química da UFPR), para as análises na região do infravermelho próximo (IVP), ambos com resolução de 4 cm^{-1} e 32 *scans*. A aquisição foi realizada sob temperatura ($20,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$) e umidade (45-55%) controladas.

4.2.7 Desenvolvimento do modelo multivariado de calibração

Os modelos multivariados de calibração foram desenvolvidos utilizando o programa *PLS-Toolbox* 3.0 (*Eigenvector Research, Inc.*) operando em ambiente *Matlab* 7.0.1 (*Math Work Inc.*).

Diversos modelos foram construídos através da combinação de diferentes pré-processamentos e da técnica de validação cruzada *leave-one-out*.

A escolha dos melhores modelos de calibração multivariada foi realizada com base nos valores de RMSEC, RMSECV, RMSEP e erro percentual médio de predição.

Na seleção de variáveis (iPLS), primeiramente utilizou-se o espectro inteiro e posteriormente utilizou-se regiões do espectro através da seleção de regiões consideradas importantes, as quais continham bandas específicas de cada analito. Por fim, deve-se estabelecer o intervalo de números de onda que deve ser adotado como referência para a realização do iPLS. No entanto, há um intervalo numérico diferente entre os valores dados pelo software (3600 pontos entre 400-4000 cm^{-1} e 6000 pontos entre 4000-10000 cm^{-1} , considerando um valor dado pelo instrumento para cada número de onda), e os valores adquiridos pelo espectrômetro (2559 pontos entre 400-4000 e 3111 pontos para o intervalo entre 4000-10.000, para IVM e IVP, respectivamente). Por isso, antes da realização do iPLS deve-se informar ao software qual a faixa mínima que se deseja dividir o espectro a fim de separá-lo em porções espectrais que contemplem a maior parte absoluta do espectro. Assim, os espectros adquiridos foram divididos pelos números inteiros 8, 10, 12, 14 e 16, gerando intervalos de 387, 310, 259, 222 e 194 cm^{-1} para o IVP e 319, 255, 213, 182 e 159 cm^{-1} para o IVM.

No software, para obtenção dos modelos por iPLS, foram definidos o número de variáveis latentes (máximo igual a 3) e modo *forward*.

Outro ponto avaliado foi a presença de amostras consideradas *outliers*, uma vez que estas podem afetar adversamente a capacidade preditiva do modelo. Isto foi feito analisando os valores dos resíduos de *Student* e *Leverage*.

4.2.8 Validação dos modelos desenvolvidos

O processo de validação foi realizado considerando as figuras de mérito aplicáveis a modelos de calibração multivariada e pelas recomendações nacionais (BRASIL, 2003; INMETRO, 2010) e internacionais (ICH, 2005; ASTM, 2012).

4.2.8.1 Seletividade, Sensibilidade e Sensibilidade analítica

Os valores de seletividade (SEL), sensibilidade (SEM) e sensibilidade analítica (γ) foram estimados com base no conceito de NAS através de comandos do software Matlab.

4.2.8.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada através aleatoriedade do gráfico da concentração dos valores de referência *versus* os valores preditos pelo modelo de PLS. O conjunto de dados utilizados para avaliar este parâmetro foi o conjunto de calibração.

4.2.8.3 Precisão

A precisão foi avaliada em dois níveis (repetitividade e precisão intermediária) e em função do DPR (desvio padrão relativo) das valores de cada ponto (85%, 100% e 115% - sextuplicata) e através de um teste t para as 18 amostras independentes (de cada nível).

4.2.8.4 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os valores inerentes ao LD e LQ foram obtidos conforme a equação do item 3.5.1.5 e 3.5.1.6, respectivamente.

4.2.8.5 Exatidão

A exatidão foi expressa através do valor de RMSEP (*Root Mean Squares Error of Prediction* - Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático de Previsão).

4.2.8.6 Robustez

Para os métodos desenvolvidos, a robustez foi avaliada verificando a influência da variação da concentração de cada item presente na mistura de excipientes, sem comprometer os dados da concentração dos fármacos.

A robustez foi avaliada frente à variação na concentração de SAC em +5% e +10%, AMD em -2,5% e -5%, e HPMC em -2,5% e -5%, conforme TABELA 08.

TABELA 08 - COMPOSIÇÃO DAS MISTURAS PARA AVALIAÇÃO DA ROBUSTEZ

MISTURA	SAC	AMD	HPMC
Padrão	80%	10%	10%
1	85%	7,5%	7,5%
2	90%	5%	5%

FONTE: O AUTOR (2014)

4.2.8.7 Bias

O valor de *Bias* considerado foi obtido pela software Matlab, o qual foi calculado de acordo com a equação do item 3.5.1.9.

4.2.8.8 Desvio Padrão de Previsão (*Residual Prediction Deviation* - RPD)

Este parâmetro foi calculado conforme equação do item 3.5.1.10.

4.3 ANÁLISE DE AMOSTRAS COMERCIAIS

4.3.1 Preparo das amostras

O conteúdo de 30 cápsulas (industriais ou magistrais) foi, individualmente, triturado, tamisado e homogeneizado. Os valores rotulados dos fármacos foram 6,94 mg de BA (equivalente a 5,0 mg de anlodipino) e 10,0 mg de RAM por cápsula.

4.3.2 Análise por espectroscopia no infravermelho médio e próximo com calibração multivariada

O pó misturado de três cápsulas (industriais ou magistrais) foi colocado no aparato (porta amostra) do módulo de reflectância difusa (*DRIFT*) do espectrômetro na região do infravermelho (médio e próximo) para a aquisição dos espectros. Os dados espectrais obtidos foram inseridos nos modelos multivariados desenvolvidos para determinação quantitativa dos analitos.

4.3.3 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para a comparação dos resultados obtidos a partir dos modelos de calibração desenvolvidos por espectroscopia no infravermelho (médio e próximo), foi realizada a

quantificação de BA e RAM, tanto do medicamento magistral quanto do medicamento industrializado, por outro método validado, sendo escolhido a CLAE, conforme descrito por *Babu* e colaboradores (2011).

4.3.3.1 Condições cromatográficas

O sistema foi operado de forma isocrática com fluxo de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ a $25^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Foi utilizada coluna C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μm) com volume de injeção de 20 μL . A detecção foi realizada por UV no comprimento de onda de 230 nm.

4.3.3.2 Fase móvel

Solução tampão fosfato: Dissolveu-se 1,36 g de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e transferiu-se para um balão volumétrico de 1000 mL. Acrescentou-se 1,00 mL de trietilamina e completou-se o volume com água ultrapura. O pH da solução foi ajustado para 6,5 com ácido fosfórico 5%.

A fase móvel consistiu de uma mistura de acetonitrila:solução tampão fosfato 55:45 (v/v). A fase móvel foi filtrada a vácuo em filtro membrana Millipore Millex PVDF 0,45 μm de poro e sonicada por 5 minutos.

Curva de calibração

Primeiramente, foi preparada a solução estoque na concentração de $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de RAM e $0,349 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de BA, utilizando a matéria-prima analisada do ramipril, o padrão de besilato de anlodipino e fase móvel como diluente. A partir desta solução foram preparadas cinco soluções diluídas diferentes (cinco pontos para construção da curva), em triplicata, sendo estas:

- 40,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ RAM e 27,92 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de BA
- 80,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ RAM e 55,84 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de BA
- 120,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ RAM e 83,76 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de BA (ponto central)
- 160,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ RAM e 111,68 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de BA
- 200,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ RAM e 139,60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de BA

4.3.3.4 Preparo das amostras

As amostras foram preparadas a partir da pulverização e homogeneização individual de 30 cápsulas industriais e 30 cápsulas magistrais (cada cápsula continha 6,94 mg de BA e 10,0 mg de RAM por cápsula). O conteúdo de três cápsulas foi reunido e determinado o peso médio. A massa equivalente a meio peso médio de cada amostra foi pesada e transferida para um balão volumétrico de 10,0 mL. Após adição de 5,0 mL de fase móvel deixou-se em sonicação por 10 minutos. Após completar o volume com a fase móvel, a solução foi filtrada (0,5 mg.mL^{-1} de RAM e 0,347 mg.mL^{-1} de BA). O filtrado foi diluído para obtenção da concentração final de 120,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de RAM e 83,28 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de BA. Posteriormente, foram obtidos os cromatogramas para obtenção das áreas dos picos correspondentes ao RAM e ao BA.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE DO TEOR DO RAMIPRIL E BESILATO DE ANLODIPINO NAS MATÉRIAS-PRIMAS

Os teores de RAM e BA nas matérias-primas empregadas para o preparo das amostras para a construção dos modelos multivariados foram 98,44% e 99,74%, respectivamente, estando estes resultados dentro das faixas estabelecidas pelos compêndios oficiais (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2008; USP 32, 2008).

Os resultados obtidos foram utilizados para a correção dos valores de concentração utilizados na montagem dos conjuntos de calibração e validação dos modelos de calibração multivariada.

5.2 MODELOS DESENVOLVIDOS POR CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

5.2.1 Seleção dos excipientes

Para construir um modelo de calibração multivariada é necessária a inclusão dos interferentes presentes na amostra, que neste caso são os excipientes.

Segundo informação do fabricante, os excipientes presentes no medicamento industrial seriam carbonato de sódio, amido, sacarose, hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), macrogol, copovidona, povidona, dióxido de titânio, gelatina e óxido férrico amarelo. Devido ao elevado número de excipientes, definiu-se empregar os três majoritários (excipientes em maior concentração na amostra industrial), ou seja, aqueles que poderiam apresentar maior potencial de influência no espectro de IV, e conseqüentemente, no modelo multivariado. No entanto, a ausência de informações com relação à composição quantitativa dos excipientes, a princípio, dificultou a definição de quais excipientes comporiam as amostras. Assim, a seleção dos três

excipientes ocorreu considerando-se alguns critérios, como características dos princípios ativos e do processo farmacotécnico de produção do medicamento.

Como ambas as formulações (industrial e magistral) são comercializadas com sistema de liberação controlada, foi necessário selecionar o agente promotor de liberação modificada, o HPMC. Como o conteúdo da cápsula industrial era composto por *pellets* (microesferas que contêm os princípios ativos do medicamento), optou-se por escolher um diluente característico do processo de peletização, a sacarose (SAC), a qual também é bastante utilizada como diluente em formulações magistrais. Por fim, escolheu-se outro diluente bastante utilizado nas formulações, o amido (AMD). Logo, a mistura de excipientes definida foi composta por SAC (diluente), AMD (diluente) e HPMC (agente formador de matriz para liberação controlada e agente de revestimento), pois poderiam influenciar mais nos modelos de calibração multivariada.

Considerando os excipientes selecionados, foram preparadas misturas com diferentes proporções de cada excipiente (TABELA 05), a fim de obter a composição que apresentasse o espectro na região do IVM mais semelhante ao espectro da formulação industrial, a fim de gerar o melhor modelo de calibração. A mistura que foi selecionada foi composta de 80% de sacarose, 10% de amido e 10% de HPMC (TABELA 05, mistura 4), conforme a análise dos espectros no IV (FIGURA 09).

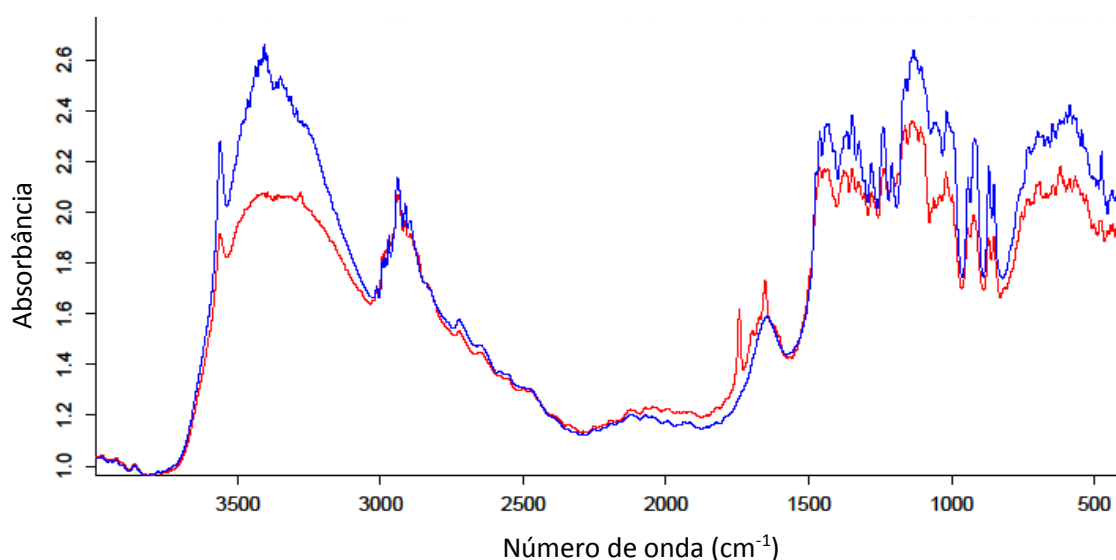


FIGURA 09 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO DOS MEDICAMENTOS COMERCIAIS: INDUSTRIAL (AZUL) E MAGISTRAL (VERMELHO)
FONTE: O AUTOR (2014)

5.2.2 Planejamento experimental

Em todo trabalho de pesquisa experimental é importante planejar os experimentos, com o objetivo de serem reproduzidos sob condições controladas, obtendo-se resultados confiáveis (MONTGOMERY, 1991).

O primeiro passo para a construção de um modelo quimiométrico é fazer a seleção de um número significativo de amostras de calibração e validação que representem o sistema. No caso de medicamentos, o intervalo de concentração a ser considerado deve variar aproximadamente $\pm 20\%$ do ponto central (concentração em que os fármacos são encontrados nos medicamentos) (ANVISA, 2003), ou então, mais especificamente, dos valores descritos em metodologias em compêndios oficiais. Segundo a Farmacopeia Americana (2014), cápsulas que contém besilato de anlodipino podem variar entre 90 e 110%. Já a Farmacopeia Europeia (2008) afirma que cápsulas compostas por ramipril podem variar de 90 a 105%.

Neste trabalho, a faixa de variação dos fármacos foi estabelecida em $\pm 15\%$ da concentração do produto industrial (ponto central). A mistura de excipientes variou na faixa de $\pm 5\%$.

O planejamento experimental escolhido para o desenvolvimento do IV-PLS foi do tipo composto central. Com esse planejamento é possível obter um pequeno número de experimentos com o mesmo número de fatores que em um planejamento fatorial completo e, além disso, têm-se as vantagens de rotabilidade e ortogonalidade (pontos axiais) (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

A seleção das amostras de calibração e de validação foram escolhidas em função da norma ASTM E1655-05 (2012), a qual recomenda que o número de amostras de calibração deve estar entre 30 e 50, dependendo da complexidade da matriz e do número de VL. Assim, o número de amostras para a calibração deve no mínimo $6 \times (VL+1)$ e o número de amostras de validação no mínimo $4 \times (VL)$.

5.2.3 Obtenção de modelos multivariados no infravermelho próximo (IVP)

Os espectros na região do IVP das 43 amostras preparadas estão representados na FIGURA 10. Os dados espectrais foram tabulados para inserção no software *Matlab*, sendo os dados de número de onda e absorbância relacionados na matriz X (composta por 3111 números de onda nas linhas e 29 amostras nas colunas) e os dados de concentração teórica de ambos os analitos na matriz Y (composta por 3111 números de onda nas linhas e 14 amostras nas colunas).

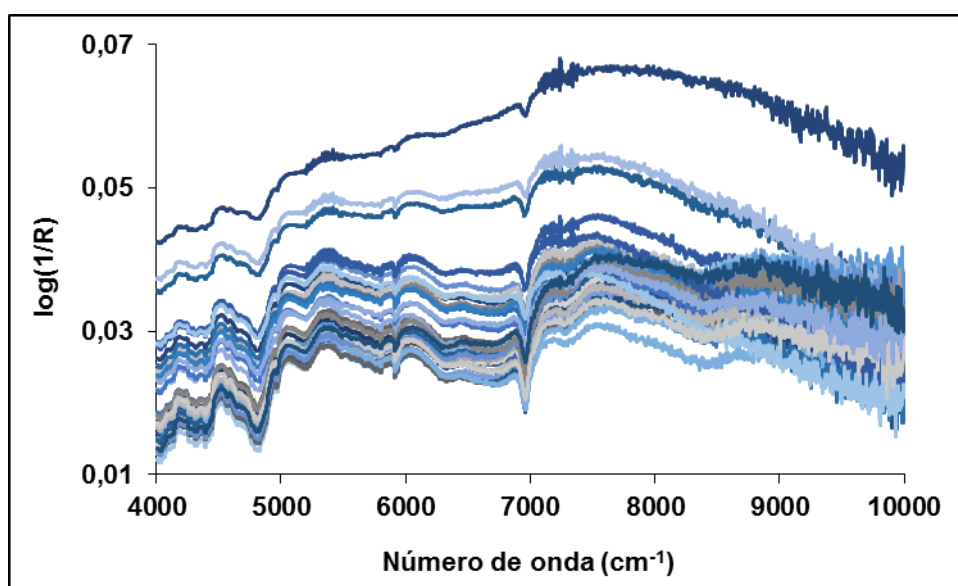


FIGURA 10 - ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO PRÓXIMO DAS AMOSTRAS DOS CONJUNTOS DE CALIBRAÇÃO (29 AMOSTRAS) E VALIDAÇÃO (14 AMOSTRAS) DA ASSOCIAÇÃO RAM E BA
FONTE: O AUTOR (2014)

Modelos PLS preliminares foram testados, indicando diferenças significativas entre os resultados de PLS1 e PLS2. Assim, PLS1 foi escolhido por apresentar melhores resultados de RMSEC, RMSECV, RMSEP e erro percentual médio de predição. Não foram encontrados *outliers* para ambos os modelos.

Nos espectros dos padrões BA e RAM (FIGURA 11) pôde-se observar que entre 7000 e 10000 cm^{-1} ocorreram sinais inerentes aos ruídos espectrais, que interferiram negativamente nos modelos desenvolvidos englobando esta faixa espectral. Por este motivo, esta região não foi considerada na construção dos modelos de calibração.

Para RAM, a combinação de pré-processamentos envolvidos foi a primeira derivada e alisamento *Savitzky-Golay*, seguido por dados centrados na média. O modelo mais adequado considerou o intervalo espectral de 7000-4000 cm^{-1} , que incluem absorções específicas deste fármaco. As vibrações da molécula do RAM referem-se ao primeiro sobretom de estiramento da ligação N-H de amina (4878-4830 cm^{-1} e 4587 cm^{-1}), C=O de éster (4694 cm^{-1}) e O-H de ácido carboxílico (6493 cm^{-1}); segundo sobretom de estiramento da ligação C=O de éster, amida e ácido carboxílico (4926, 4672, 4587 e 4545 cm^{-1}); terceiro sobretom de estiramento da ligação C=O de éster, amida e ácido carboxílico (6896 cm^{-1}); estiramento da ligação C-N de amina e amida (4878, 4587 e 4405 cm^{-1}); deformação da ligação C-H/O-H do ácido carboxílico (5617 cm^{-1}) e da ligação C-O/O-H do éster, amida e ácido carboxílico (4405 cm^{-1}); estiramento da ligação C-N-C de amina e amida (4878, 4587 e 4405 cm^{-1}) e combinação da ligação O-H (4830 cm^{-1}) (BURNS;CIURCZAK, 2007). O modelo PLS1 explicou 14,92% da variância para o bloco X e 90,09% para o bloco Y. Os valores de erro referente a calibração (RMSEC), validação cruzada (RMSECV) e predição (RMSEP) foram 1,60 mg.g^{-1} , 5,51 mg.g^{-1} e 2,47 mg.g^{-1} , respectivamente.

Para BA, o melhor modelo obtido foi pela combinação da primeira derivada com alisamento *Savitzky-Golay*, MSC e dados centrado na média, também considerando a faixa espectral de 7000-4000 cm^{-1} . A faixa espectral empregada abrange regiões de vibrações características da molécula do BA (FIGURA 11), como primeiro sobretom de estiramento da ligação N-H de amina (6535, 6369, 4878-4830 e 4587 cm^{-1}), C=O de éster (4694, 4672, 4587 e 4545 cm^{-1}) e S-H (5747 cm^{-1}); segundo sobretom de estiramento da ligação C=O de éster (4926 cm^{-1}); sexto sobretom de estiramento da ligação C-Cl (5376 cm^{-1}); combinação de estiramento da ligação C-N de amina (4878, 4587 e 4405 cm^{-1}), C-O de éter (4405 cm^{-1}), C-N-C (4048 cm^{-1}) e C-O-C (4000 cm^{-1}) (BURNS;CIURCZAK, 2007). O modelo PLS1 para quantificação do BA foi explicado por 15,10% da variância total para o bloco X e 90,35% para o bloco Y. Os valores de erro referente a calibração (RMSEC), validação cruzada (RMSECV) e predição (RMSEP) foram 1,23 mg.g^{-1} , 3,85 mg.g^{-1} e 2,01 mg.g^{-1} , respectivamente.

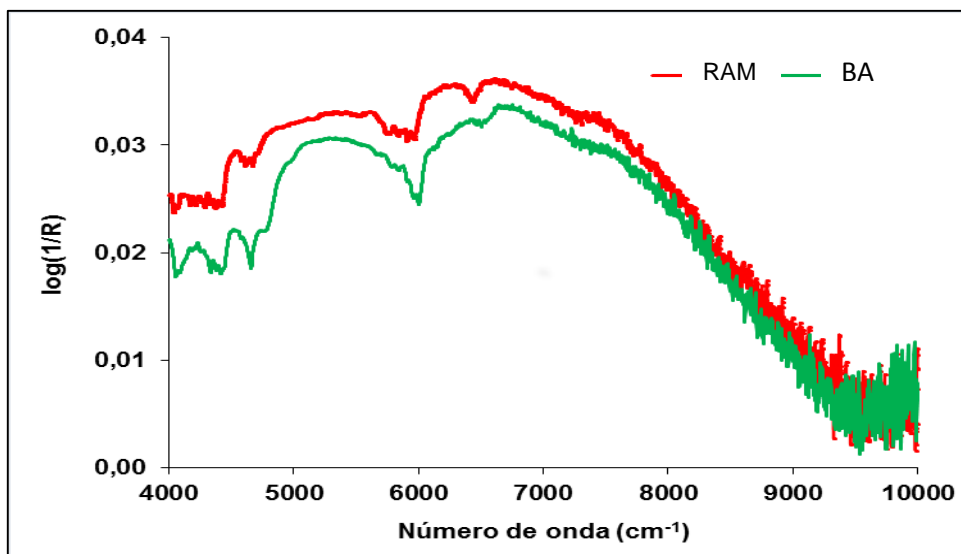


FIGURA 11 - ESPECTROS DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO PRÓXIMO DOS PADRÕES DE RAM E BA
 FONTE: O AUTOR (2014)

As bandas características das amostras (industrial e magistral) podem ser observados através dos espectros de absorção na região do IVP, conforme FIGURA 12.

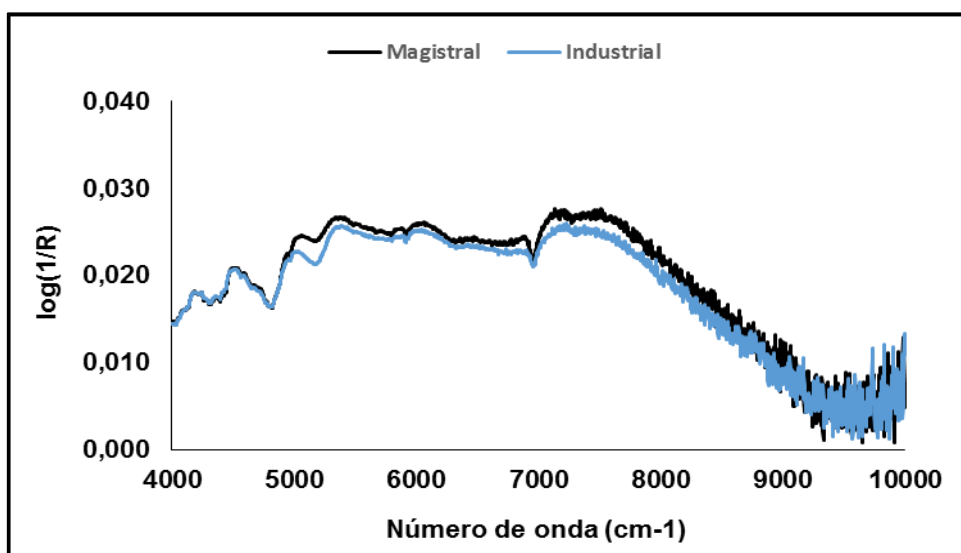


FIGURA 12 - ESPECTROS DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO PRÓXIMO DAS AMOSTRAS COMERCIAIS (INDUSTRIAL E MAGISTRAL)
 FONTE: O AUTOR (2014)

Considerando o número de VL, o gráfico de RMSECV x VL (FIGURA 13 e FIGURA 14) para cada analito e, para ambos os modelos foi analisado e então

selecionado o número de VL igual a dois. Um aumento do número de VL não se justificou para ambos os fármacos, uma vez que o valor do erro predito aumentou (RMSEP= 2,53 mg/g para RAM e 2,13 mg/g para BA utilizando 3 VL). Em função do número mínimo recomendado de amostras de calibração e validação para modelos quantitativos multivariados no infravermelho, o número de VL foi assegurado.

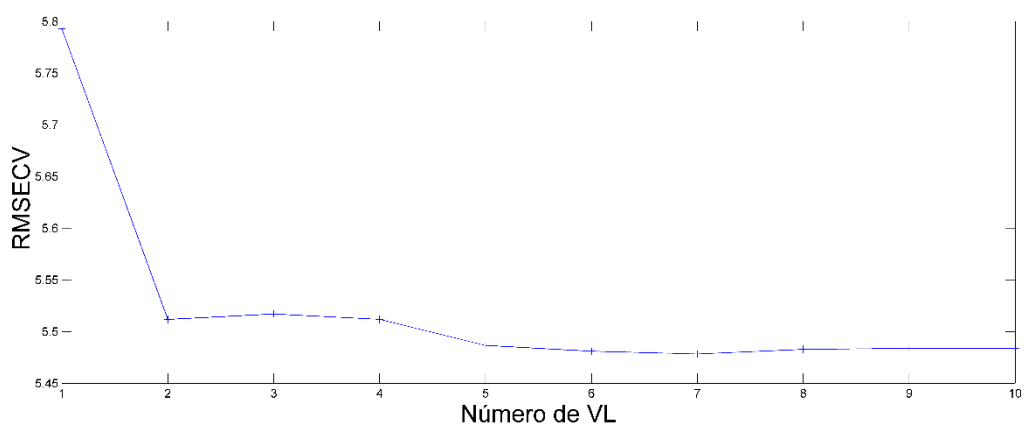


FIGURA 13 - ESCOLHA DO NÚMERO DE VL PARA O MODELO DE QUANTIFICAÇÃO DO RAM NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO PRÓXIMO
FONTE: O AUTOR (2014)

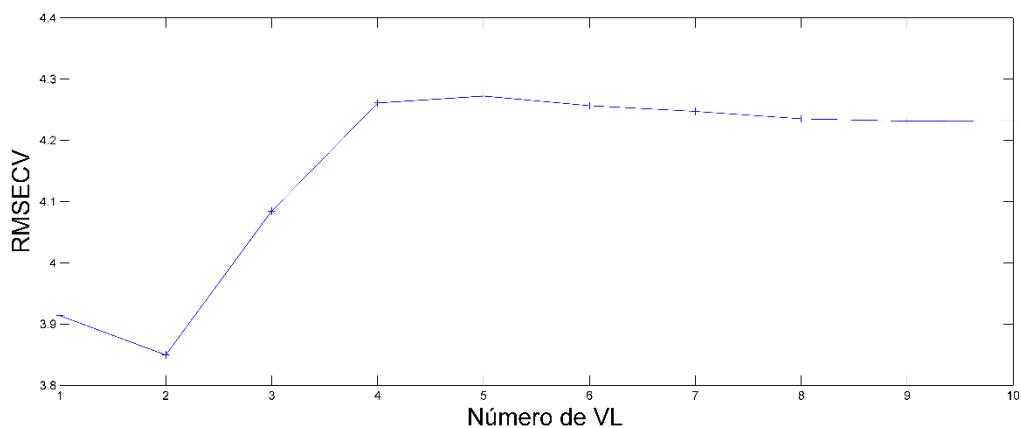


FIGURA 14 - Escolha do número de VL para o modelo de quantificação do BA na região do infravermelho próximo
FONTE: O AUTOR (2014)

Na análise dos *outliers*, considerando o critério para resíduos de *Student* e *Leverage*, nos modelos da associação, não foram identificadas amostras anômalas, uma vez que nenhuma amostra apresentou simultaneamente altos valores destes

critérios, ou seja, valores acima de $\pm 2,5$ para resíduos de *Student* e $3 \times (LV)/n$ (nesse caso o valor máximo é 0,25) para *Leverage*, considerando um limite de confiança de 95% (FIGURA 15 e FIGURA 16).

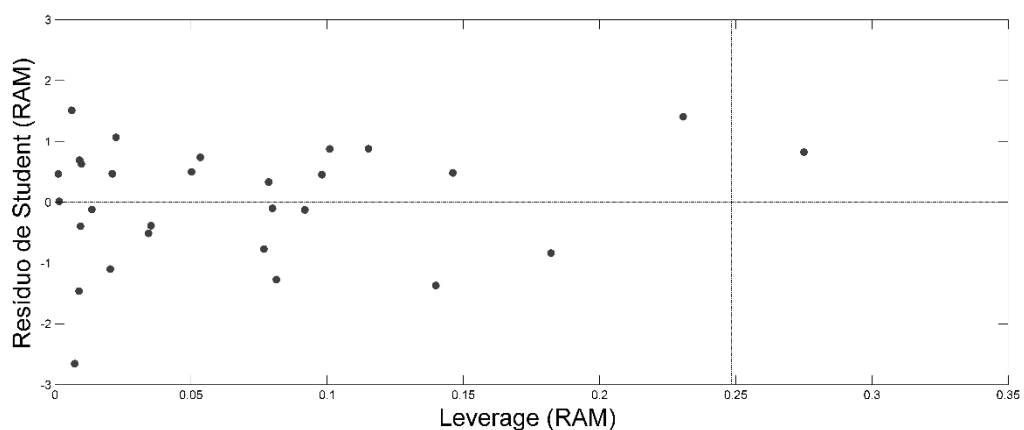


FIGURA 15 - AVALIAÇÃO DE *OUTLIERS* NO MODELO DE QUANTIFICAÇÃO DO RAM NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO PRÓXIMO
FONTE: O AUTOR (2014)

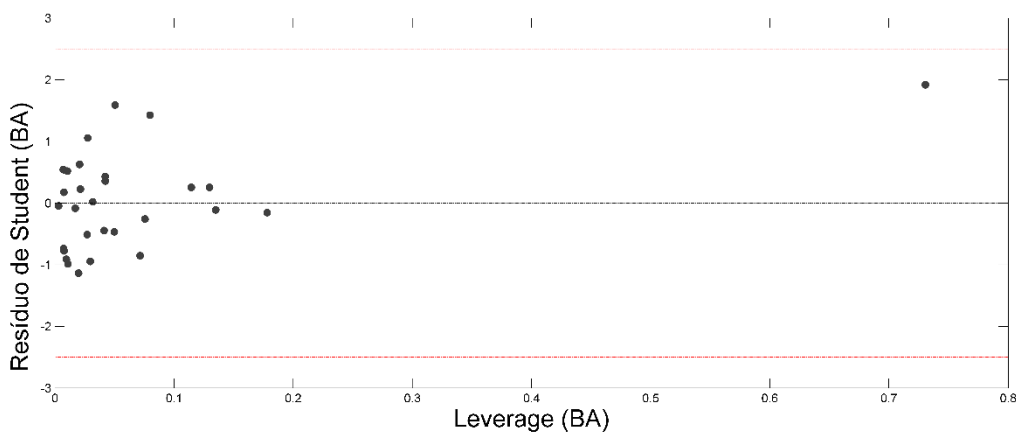


FIGURA 16 - AVALIAÇÃO DE *OUTLIERS* NO MODELO DE QUANTIFICAÇÃO DO BA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO PRÓXIMO
FONTE: O AUTOR (2014)

5.2.4 Obtenção de modelos multivariados no infravermelho médio (IVM)

Os espectros na região do IVM (4000-400 cm^{-1}) das 43 amostras preparadas estão representados na FIGURA 17. Semelhante ao realizado para a obtenção do modelo de calibração utilizando o infravermelho próximo, os dados espectrais foram tabulados para inserção no software *Matlab*, sendo os dados de número de onda e absorvância relacionados na matriz X (composta por 2559 números de onda nas linhas e 29 amostras nas colunas) e os dados de concentração teórica de ambos os analitos na matriz Y (composta por 2559 números de onda nas linhas e 14 amostras nas colunas).

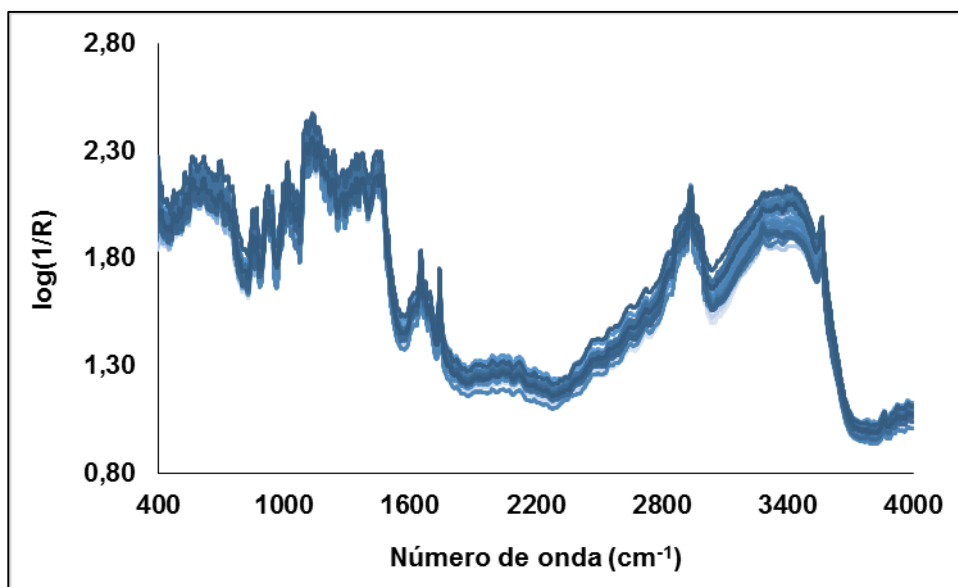


FIGURA 17 - ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO DAS AMOSTRAS DOS CONJUNTOS DE CALIBRAÇÃO (29 AMOSTRAS) E VALIDAÇÃO (14 AMOSTRAS) DA ASSOCIAÇÃO RAM E BA
FONTE: O AUTOR (2014)

Para esta faixa espectral, o método por PLS2 apresentou valores melhores que modelos por PLS1. A combinação dos pré-processamentos *Standard Normal Variate* (SNV) seguido por dados centrados na média gerou o modelo mais satisfatório, utilizando o espectro inteiro de absorção (4000-400 cm^{-1}).

Nos espectros dos padrões de RAM e BA (FIGURA 18), foi evidenciada a presença de bandas de absorção características de ambos os analitos. Para o RAM, os sinais característicos são relacionados às vibrações nas ligações N-H (primária: 3463 cm^{-1} ; secundária: 3280 cm^{-1}) e C-N de amina (1187 , 1093 e 1064 cm^{-1}); C=O de amida (1653 cm^{-1}); C=O (1760 - 1710 cm^{-1}) e C-O (1279 cm^{-1}) de ácido carboxílico; C=O (1747 cm^{-1}) e C-O de éster (1279 , 1228 e 1187 cm^{-1}). Para o BA, observou-se a presença de bandas de absorção relativas a vibrações de ligações de grupos funcionais específicos, como N-H de amina (primária: 1619 cm^{-1} ; secundária: 3161 cm^{-1}), C-O de éster (1304 , 1266 , 1271 e 1130 cm^{-1}), C-O de éter (1130 cm^{-1}) e cloroalcanos (869 - 563 cm^{-1}) (BURNS; CIURCZAK, 2007).

Os valores de erro referente a calibração (RMSEC), validação cruzada (RMSECV) e predição (RMSEP) para o RAM foram $3,03\text{ mg.g}^{-1}$, $4,07\text{ mg.g}^{-1}$ e $1,36\text{ mg.g}^{-1}$, respectivamente, e para o BA foram $2,43\text{ mg.g}^{-1}$, $3,49\text{ mg.g}^{-1}$ e $1,23\text{ mg.g}^{-1}$, respectivamente.

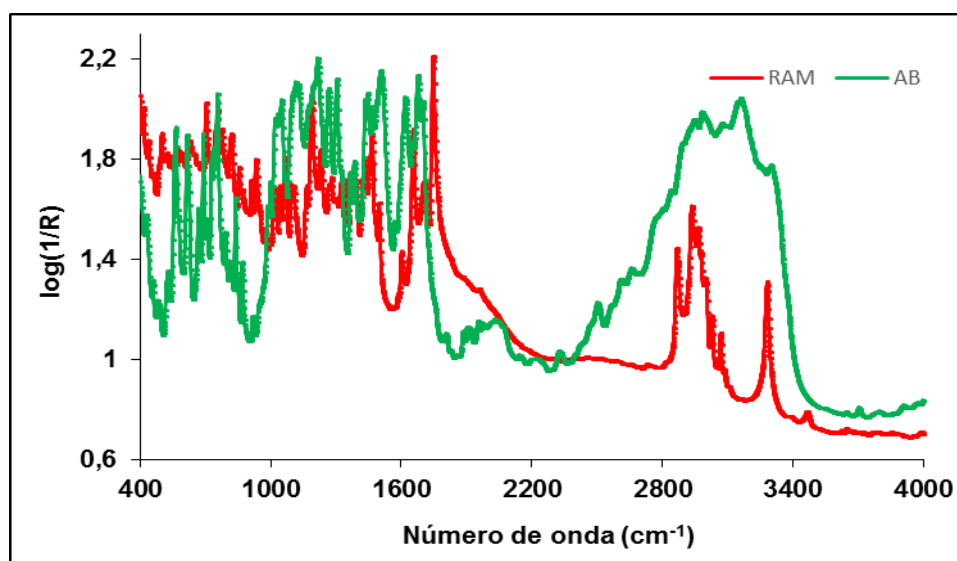


FIGURA 18 – ESPECTROS DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO DOS PADRÕES DE RAM E BA
FONTE: O AUTOR (2014)

Através da FIGURA 19 pode-se observar as bandas características das amostras (industrial e magistral) na região do IVM.

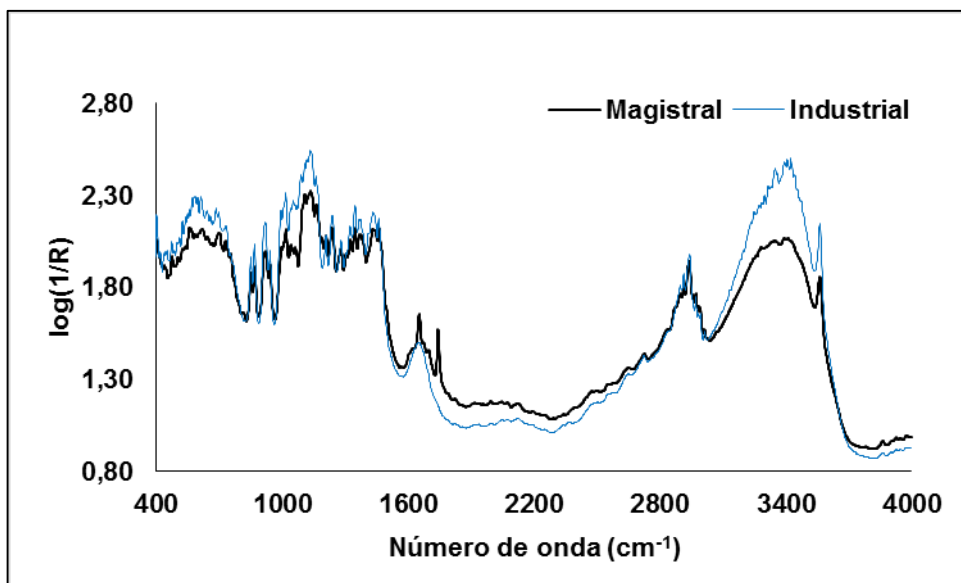


FIGURA 19 - ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO DAS AMOSTRAS COMERCIAIS (INDUSTRIAL E MAGISTRAL)
 FONTE: O AUTOR (2014)

Considerando os dois analitos, o melhor modelo multivariado foi determinado através de 3 VL (FIGURA 20). O aumento para quatro ou mais VL aumentou os valores de erro preditivo dos modelos ($RMSEP = 1,53 \text{ mg.g}^{-1}$ para RAM e $1,26 \text{ mg.g}^{-1}$ para BA utilizando 4 VL).

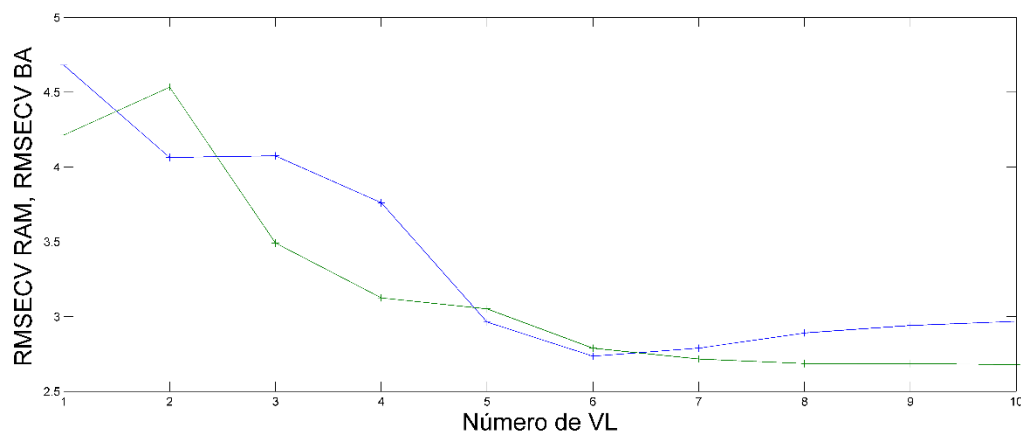


FIGURA 20 - ESCOLHA DO NÚMERO DE VL PARA O MODELO DE QUANTIFICAÇÃO DO RAM E BA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO
 FONTE: O AUTOR (2014)

Considerando os parâmetros resíduo de Student e *Leverage*, no modelo desenvolvido para a associação RAM-BA não foram encontrados *outliers*, já que os valores de resíduo de *Student* encontrados não ultrapassaram a faixa de $\pm 2,5\%$, e os valores de *Leverage* foram menores que 0,25 (FIGURA 21 e 22).

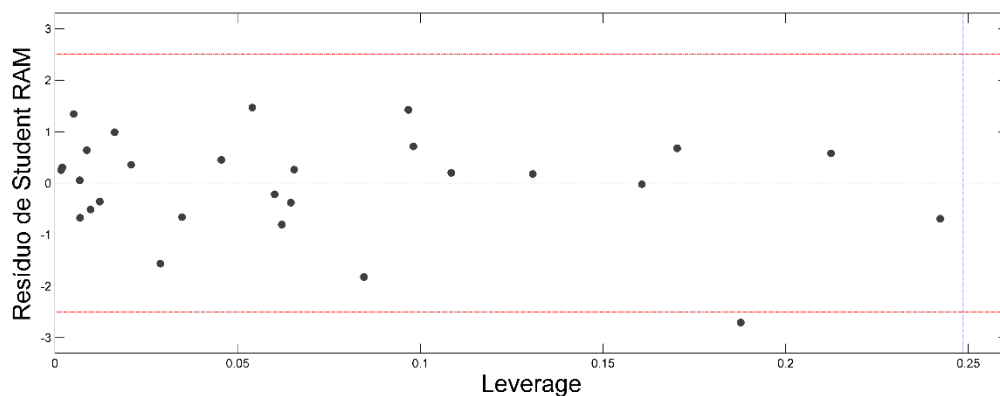


FIGURA 21 - AVALIAÇÃO DE *OUTLIERS* NO MODELO DE QUANTIFICAÇÃO DO RAM NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO
FONTE: O AUTOR (2014)

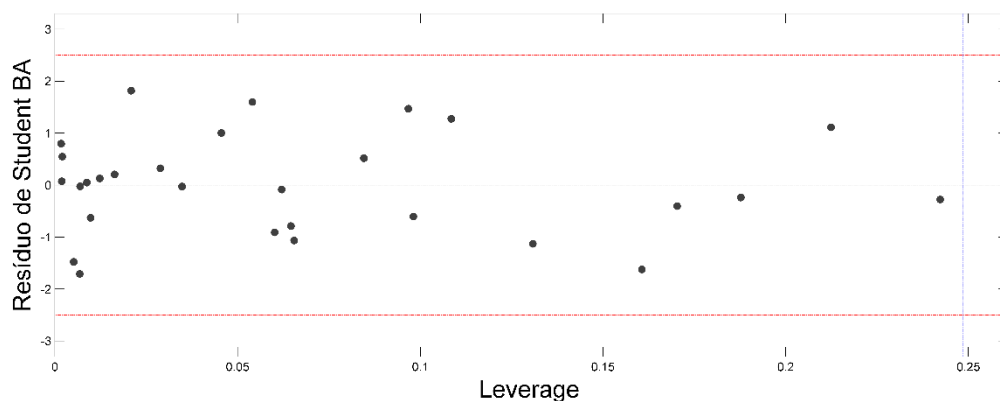


FIGURA 22 - AVALIAÇÃO DE *OUTLIERS* NO MODELO DE QUANTIFICAÇÃO DO BA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO
FONTE: O AUTOR (2014)

O modelo PLS2 foi explicado através da variância total, 73,28% para o bloco X e 63,67% para o bloco Y.

5.3 Validação dos modelos multivariados

Os métodos desenvolvidos neste trabalho enquadram-se, segundo sua finalidade, na categoria I (teste quantitativo para determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas), a qual exige quais figuras de mérito são necessárias para a validação de métodos univariados (ANVISA, 2003).

O processo de validação também foi realizado considerando as figuras de mérito aplicáveis aos modelos multivariados de calibração.

Todos os dados para esta validação (para os modelos no IVP e para o modelo no IVM) estão apresentados na TABELA 09 (p. 85).

5.3.1 Precisão

Para os métodos de IVP-PLS1, os valores de DPR para o RAM na determinação da repetibilidade ficaram entre 0,46% e 2,93%, enquanto que para precisão intermediária entre 0,29% e 1,44%. O DPR para o BA apresentou valores entre 1,20% e 2,23% para a repetibilidade e valores entre 0,53% e 1,20% para a precisão intermediária. Logo, em todas as concentrações testadas, o valor de DPR foi menor que o limite especificado pela norma vigente da ANVISA, que preconiza 5%. Isso satisfaz o critério para a repetibilidade e indica que o método apresentou boa precisão intra-dia.

Para o método IVM-PLS2, o DPR para o RAM ficou na faixa de 1,23% a 1,83%, enquanto que para precisão intermediária 1,11% a 4,42%. O DPR para o BA entre 0,80% e 2,22% (repetibilidade) e entre 0,70% e 4,70% (precisão intermediária). Através desses valores percebe-se que, em todas as concentrações testadas, o valor de DPR não ultrapassou o exigido pela norma nacional vigente (5%), indicando que o método apresentou boa precisão inter-dia.

Deste modo, através destes ensaios, os métodos desenvolvidos são considerados precisos. O teste t para amostras independentes foi feito pela comparação entre os dois conjuntos de valores obtidos pelos analistas e os valores

reais e os valores de “p” encontrados foram superiores a 0,05, por isso foram considerados estatisticamente iguais.

5.3.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada através da verificação do comportamento aleatório da distribuição dos erros de predição para cada um dos analitos. Isso pode ser verificado nas FIGURAS 23 e 24 para os modelos IVP-PLS1 e na FIGURA 25 e 26 para o modelo IVM-PLS2, onde os valores estão distribuídos tanto para cima do zero quanto para baixo, podendo-se concluir que há linearidade nos modelos multivariados desenvolvidos.

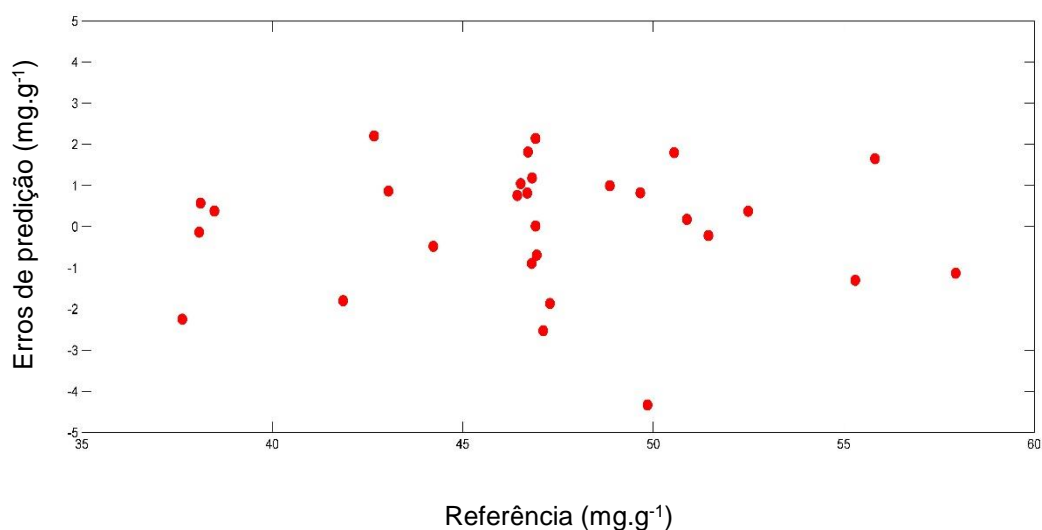


FIGURA 23 - AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE PELA DISTRIBUIÇÃO DOS RESÍDUOS NO MODELO IVP-PLS1-RAM
FONTE: O AUTOR (2014)

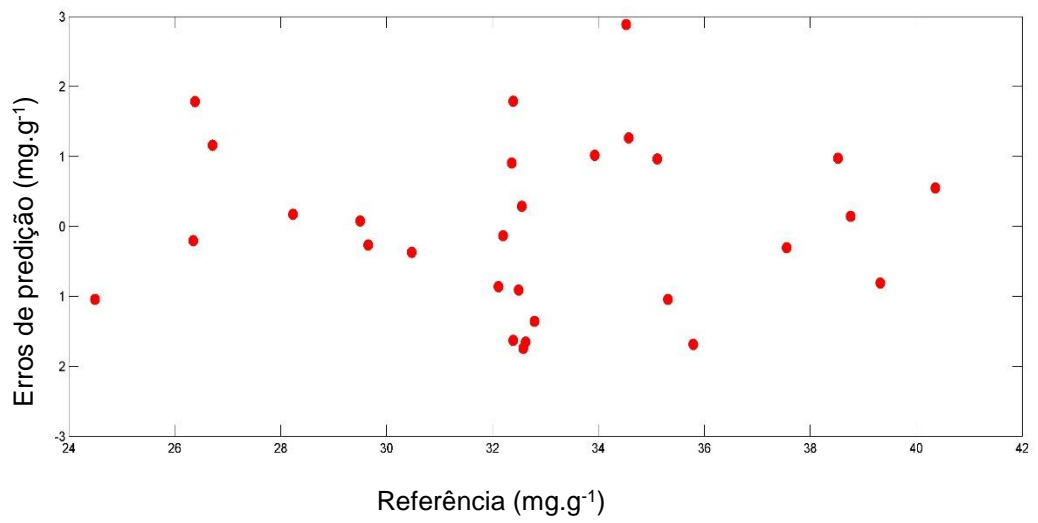


FIGURA 24 - AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE PELA DISTRIBUIÇÃO DOS RESÍDUOS NO MODELO IVP-PLS1-BA
 FONTE: O AUTOR (2014)

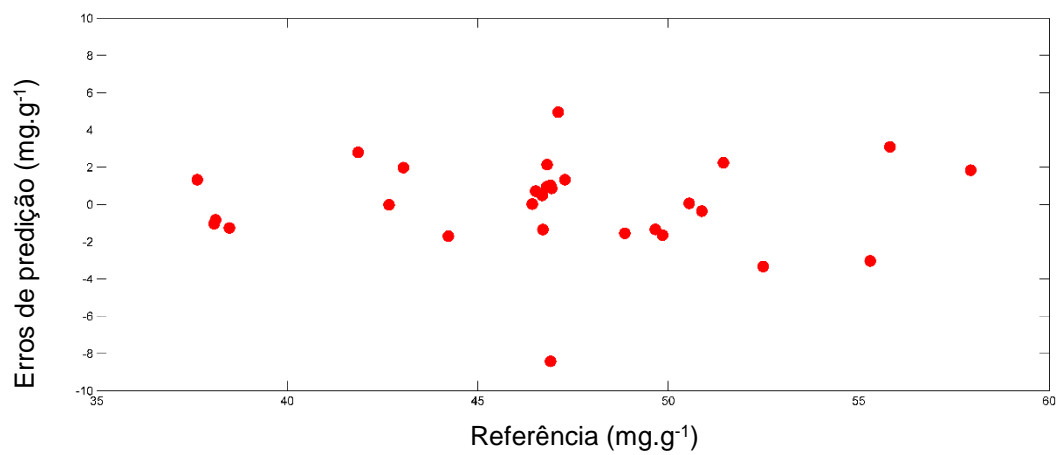


FIGURA 25 - AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE PELA DISTRIBUIÇÃO DOS RESÍDUOS NO MODELO IVM-PLS2-RAM
 FONTE: O AUTOR (2014)

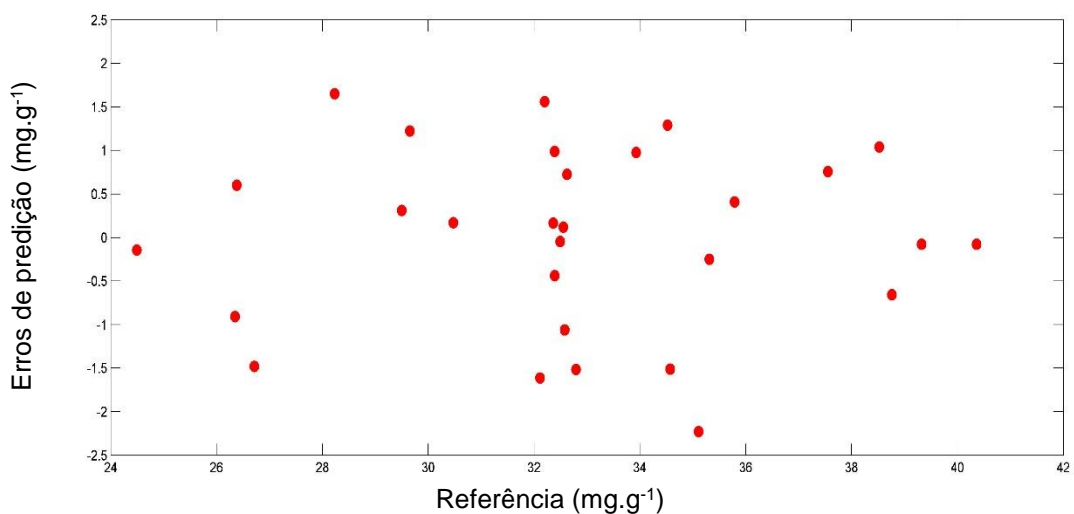


FIGURA 26 - AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE PELA DISTRIBUIÇÃO DOS RESÍDUOS NO MODELO IVM-PLS2-BA
 FONTE: O AUTOR (2014)

5.3.3 Seletividade, Sensibilidade e Sensibilidade analítica

A interpretação do conceito de SEL para métodos multivariados é diferente dos univariados e não tem interesse prático para fins de controle de qualidade. A determinação da SEL só é útil dentro de um determinado grupo de amostras de composição semelhante. Para os métodos desenvolvidos foram estimados que cerca de 18,35% e 14,65% no IVP, e 25,74% e 38,59% no IVM, do sinal analítico foram usados para prever RAM e BA, respectivamente.

Como o valor puro da sensibilidade (SEN) não é apropriado para a comparação com outros métodos, os seus valores foram divididos pela estimativa do ruído instrumental (IVP $\varepsilon = 6,10 \times 10^{-4}$; IVM $\varepsilon = 7,6 \times 10^{-3}$) e a sensibilidade analítica foi estimada. O ruído em todos os modelos também apresentou valores baixos, não comprometendo os resultados obtidos.

O inverso da γ indica a mínima diferença de concentração que o método é capaz de discriminar considerando o ruído instrumental aleatório como única fonte de erro. No método desenvolvido no IVM, valores de γ para IVP e IVM estão descritos na TABELA 09 (p. 85) .

5.3.4 Exatidão

Para a verificação da exatidão do método, para quantificação dos fármacos nas associações, utilizou-se os valores de RMSEP, os quais foram considerados baixos para todos os modelos, indicando que os métodos são exatos (TABELA 09, p. 85).

5.3.5 Robustez

A robustez avaliou o aumento de sacarose e a diminuição do amido e do HPMC. Foi verificado que não houve diferença significativa nos valores de concentração dos fármacos nas duas misturas preparadas, indicando que os métodos foram robustos, em relação à variação na concentração de SAC em +5% e +10%, AMD em -2,5% e -5%, e HPMC em -2,5% e -5%.

5.3.6 *Bias*

O valor de *bias* foi estimado para as amostras de validação e a avaliação foi feita através de um teste t. Considerando o valor do *bias* e o seu desvio associado, o intervalo estimado foi zero ou próximo de zero, para os três modelos (TABELA 09, p. 85) e, assim, demonstrou-se ausência de erros sistemáticos nos modelos.

5.3.7 Desvio Padrão de Previsão (*Residual Prediction Deviation* - RPD)

O RPD mínimo para métodos IVP-PLS1 foi estimado para a RAM como 0,94 e 1,79, e para o BA, 1,05 e 1,34, para a previsão na calibração e validação, respectivamente.

Para o método IVM-PLS2, os valores de RPD encontrados foram de 1,27 e 2,22 para a RAM, e 0,99 e 2,11 para a BA, para as amostras de calibração e validação, respectivamente.

Os valores obtidos para RPD de IVP e de IVM foram semelhantes, uma vez que as mesmas amostras foram utilizadas nos métodos desenvolvidos.

5.3.8 Limite de Quantificação (LQ) e Limite de Detecção (LD)

Apesar de não ser necessário para este tipo de método, o LQ e o LD também foram estimados (TABELA 09, p.85). Em todos os modelos desenvolvidos, os valores foram considerados baixos.

TABELA 09 - PARÂMETROS ESTIMADOS PARA DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS IVP-PLS1 E IVM-PLS2

FIGURAS DE MÉRITO	PARÂMETROS	VALORES			
		IVP-PLS1 (7000-4000 cm ⁻¹)		IVM-PLS2 (4000-400 cm ⁻¹)	
		RAM	BA	RAM	BA
Precisão	DPR repetibilidade	0,46%-2,93%	1,20%-2,23%	1,23%-1,83%	0,80%-2,22%
	DPR intermediária	0,29%-1,44%	0,53%-1,20%	1,11%-4,42%	0,70%-4,70%
Exatidão	RMSEC ^a	1,60	1,23	3,03	3,82
	RMSECV ^a	5,51	3,85	4,06	4,53
	RMSEP ^a	2,47	2,01	2,65	2,83
Intervalo ^a		37,64-57,94	24,03-40,44	37,64-57,94	24,03-40,44
Seletividade		15,65%	18,35%	25,74	38,59
Sensibilidade Analítica (γ) ^b		1,96	2,25	631,59	888,78
γ^{-1} ^a		0,51	0,44	1,58x10 ⁻³	1,12x10 ⁻³
RPD	Calibração	0,94	1,05	1,27	0,99
	Validação	1,79	1,34	2,22	2,11
Bias		0,03	0,20	0	0
Robustez		p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
LD ^a		1,53	1,33	0,02	0,003
LQ ^a		5,11	4,45	0,08	0,01

FONTE: O AUTOR (2014)

DPR: Desvio Padrão Residual

RMSEC: Raiz quadrada do erro médio de calibração (*Root Mean Standard Error of Calibration*)

RMSECV: Raiz quadrada do erro médio de calibração cruzada (*Root Mean Standard Error of Calibration*)

RMSEP: Raiz quadrada do erro médio de predição (*Root Mean Standard Error of Prediction*)

RPD: Desvio Padrão de Previsão (*Residual Prediction Deviation*)

LD: Limite de Detecção

LQ: Limite de Quantificação

a mg.g⁻¹

b (mg.g⁻¹)⁻¹

5.4 Quantificação dos fármacos em amostras reais

As mesmas amostras comerciais (industriais e magistrais) foram analisadas por três métodos: os métodos desenvolvidos por IVM-PLS2 e IVP-PLS1 e o método da literatura validado por CLAE, conforme BABU *et al.*, 2011, em triplicata. Os cromatogramas das amostras industrial e magistral podem ser observados através das FIGURAS 27 e 28, respectivamente.

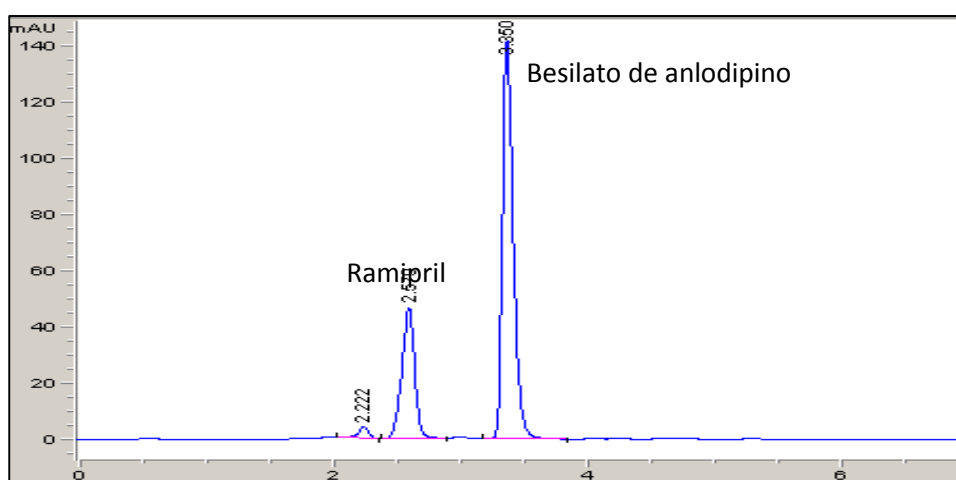


FIGURA 27 - CROMATOGRAMA DA AMOSTRA INDUSTRIAL
FONTE: O AUTOR (2014)

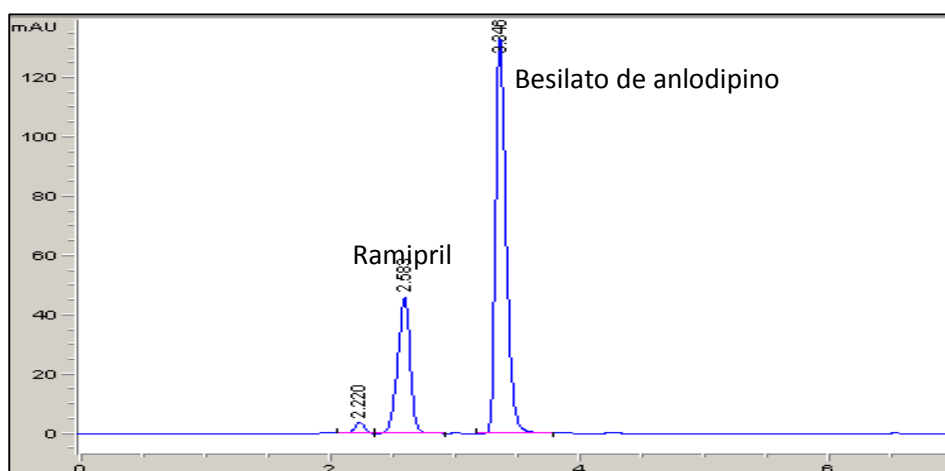


FIGURA 28 - CROMATOGRAMA DA AMOSTRA MAGISTRAL
FONTE: O AUTOR (2014)

Os valores médios encontrados e seus respectivos DP são apresentados na TABELA 10.

TABELA 10 - VALORES MÉDIOS DE CONCENTRAÇÃO E DESVIO PADRÃO (DP) NA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE RAMIPRIL (RAM) E BESILATO DE ANLODIPINO (BA) EM DUAS FORMULAÇÕES COMERCIAIS DISTINTAS ATRAVÉS DE IVP-PLS1, IVM-PLS2 E CLAE (N = 10)

FORMULAÇÃO	FÁRMACOS	VALOR ROTULADO (mg/cápsula)	CONCENTRAÇÃO MÉDIA ± DP (mg/cápsula)		
			IVP-PLS1	IVM-PLS2	CLAE
I (magistral)	RAM	10,00 mg	9,94 ± 0,45	9,87 ± 0,59	9,45 ± 0,60
	BA	6,94 mg	6,55 ± 0,43	6,23 ± 0,04	6,97 ± 0,47
II (industrial)	RAM	10,00 mg	10,17 ± 0,32	7,22 ± 0,39	10,54 ± 0,44
	BA	6,94 mg	7,06 ± 0,28	5,79 ± 0,03	7,26 ± 0,33

FONTE: O AUTOR (2014)

De acordo com o teste t, não houve diferenças significativas entre as previsões dos métodos desenvolvidos para IVP-PLS1 e CLAE, para ambos os analitos, das duas formulações. Porém, ao comparar os métodos IVM-PLS2 e CLAE ou IVM-PLS2 e IVP-PLS1, os resultados de quantificação de ambos os fármacos de uma das formulações (II, amostra industrial) foram considerados diferentes pelo teste t ($p < 0,05$), no nível de confiança de 95%.

Uma possível explicação para esse resultado é que outras substâncias presentes na formulação do medicamento industrial (excipientes), não incluídas nas amostras preparadas para construção do modelo, estariam influenciando nos espectros no infravermelho médio, cujas bandas de absorção estariam se sobrepondo às bandas de absorção importantes dos fármacos. Para confirmar isso e solucionar este problema, seria necessário incluir tais substâncias no planejamento experimental. Para fins industriais seria de fácil resolução, entretanto, a nível acadêmico, com as dificuldades de se obter informações qualitativas e quantitativas isso seria inviável num primeiro momento e, pelos resultados já obtidos, não há necessidade.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho foram obtidas as seguintes conclusões:

- A combinação de PLS e espectroscopia na região do infravermelho (próximo e médio) viabilizaram a determinação simultânea dos fármacos ramipril e besilato de anlodipino, em formulações industriais e magistrais de baixa dosagem em forma farmacêutica sólida.

- Os modelos desenvolvidos e validados foram:

a) IVP-PLS1 RAM: pré-processamentos primeira derivada com alisamento *Savitzky-Golay* e dados centrados na média, 2 VL e intervalo espectral 7000-4000 cm^{-1} ;

b) IVP-PLS1 BA: pré-processamentos primeira derivada com alisamento *Savitzky-Golay*, MSC e dados centrado na média, 2 VL e faixa espectral 7000-4000 cm^{-1} .

c) IVM-PLS2 RAM e BA: pré-processamentos *Standard Normal Variate* (SNV) e dados centrados na média, 2 VL e faixa espectral 4000-400 cm^{-1}).

- A utilização dos algoritmos iPLS não melhorou os resultados na obtenção de modelos de regressão multivariados para a previsão de amostras.

- Os métodos desenvolvidos foram validados de acordo com orientações nacionais (ANVISA) e internacionais, demonstrando o potencial para a futura aceitação por agências reguladoras.

- Em amostras comerciais industriais e magistrais, os métodos desenvolvidos na região do IVP-PLS1 (RAM e BA) forneceram resultados estatisticamente iguais ao método descrito da literatura (CLAE), isto mesmo sem o acesso à composição quantitativa dos excipientes (amostra comercial industrial), o que poderia ser um fator limitante da técnica.

- No entanto, o modelo desenvolvido para a região do infravermelho médio e utilizando PLS2 não se mostrou adequado para a quantificação dos fármacos na associação industrial, cujos resultados foram estatisticamente diferentes dos outros métodos (CLAE e IVP-PLS1). Isto ocorreu provavelmente devido à presença de

excipientes não incluídos na construção do modelo na amostra industrial, e que podem interferir nos espectros dos fármacos nesta região espectral.

- Os métodos multivariados desenvolvidos são simples, rápidos, de baixo custo e uma excelente alternativa para o controle de qualidade em laboratórios de indústrias, no controle de processo de fabricação, e em farmácias magistrais para os fármacos estudados. Cabe destacar que os métodos no IV tem também a vantagem de não usar solventes orgânicos, não gerando resíduos e podem ser até dez vezes mais rápidos que a técnica por CLAE (400 minutos).

REFERÊNCIAS

AL-MAJED, A. A.; BELAL, F.; AL-WARTHAN, A. A. Spectrophotometric determination of ramipril (a novel ACE inhibitor) in dosage forms. **Spectroscopy Letters**, 2001; 34: 211–220.

AMERICAN SOCIETY OF HEALTH-SYSTEM PHARMACISTS. **AHFS Drug Information**. Bethesda: ASHP, 2006.

ANVISA. **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos - Resolução - RE no 899**. ed, 2003.

ASTM. **E1655-05: Standard Practices for Infrared Multivariate Quantitative Analysis**. ed. West Conshohocken, 2012.

AUSTIN, R.P.; BARTON, P.; DAVIS, A.M.; FESSEY, R.E.; WENLOCK, M.C. The thermodynamics of the partitioning of ionizing molecules between aqueous buffers and phospholipid membranes. **Pharmaceutical Research**. v.22, n.10, p.1649-57. 2005.

AYAD, M. M.; SHALABY, A. A.; ABDELLATEF, H. E.; HOSNY, M. M. Spectrophotometric and AAS determination of ramipril and enalapril through ternary complex formation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2002; 28: 311–332.

BABU K.A.; KUMAR, G.V; SIVASUBRAMANIAN, L. Simultaneous estimation of ramipril and amlodipine in pharmaceutical dosage form by rp-hplc method **International Journal of Pharmaceutical Sciences**,196-198, 2011.

BANKEY, S.; TAPADIYA, G. G.; SABOO, S. S., *et al.* Simultaneous Determination of Ramipril, Hydrochlorothizide and Telmisartan by Spectrophotometry. **International Journal**. 2009; 1(2):183-188.

BECKER RA, Scholkens B. Ramipril: review of pharmacology. **Am J Cardiol**. 1987;59:3D-10D.

BLACK, H.R.; WEINBERGER, M.H.; PURKAYASTHA, D.; LEE, J.; SRIDHARAN, K.; ISRAEL, M.; HILKERT, R.; IZZO, J. Comparative efficacy and safety of combination aliskiren/amlodipine and amlodipine monotherapy in African Americans with stage 2 hypertension. **Journal of Clinical Hypertension**. v.13, n.8, p.571-581. 2011.

BHUSHAN, R.; GUPTA, D.; KUMAR S. S. Liquid chromatographic separation and UV determination of certain antihypertensive agents. **Biomed. Chromatogr**. 20: 217–224 (2006).

BONAZZI, D.; GOTTI, V.; ANDRISANO, V.; CAVRINI, V. Analysis of ACE inhibitors in pharmaceutical dosage forms by derivative UV spectroscopy and liquid chromatography (HPLC). **J. Pharm. Biomed. Anal.** 1997; 16: 431–438.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de gestão clínica de hipertensão arterial e diabetes mellitus da atenção básica - **SISHIPERDIA**. 2009. Disponível em: <http://hiperdia.datasus.gov.br/>. Acesso em: 05/05/2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. **Vigitel Brasil 2011**: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Ministério da Saúde, 2011. Disponível em: <http://apsredes.org/site2012/wp-content/uploads/2012/09/VIGITEL-SAUDE-SUPLEMENTAR_2011.pdf>. Acesso em: 30 out. 2013.

BRITISH Pharmacopoeia, 2007. 5. London: The Stationnery Office on behalf of the Medicines and Healthcare products Regulatory Agency, 2007.

BRITO, N.M.; AMARANTE JUNIOR, O.P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. Pesticidas: **Rev. Ecotox. Meio Amb.** 13, 2003.

BRO, R.; Multivariate calibration. What is in chemometrics for the analytical chemist. **Anal. Chim. Acta**, 500, 2003, 185.

BROWN, M. J. et al. Better blood pressure control: how to combine drugs. **J Hum Hypertens**, v. 17, n. 2, p.81-86, 2003.

BRUNS, R.E.; Neto, B.B.; Scarminio, I.S.; “25 Anos de quimiometria no Brasil”, Quím. Nova 29:1401 (2006).

BRUNTON, L. L.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman’s – manual of pharmacology and therapeutics**. BLUMENTHAL, D. K. B., I. L. O., 2008. Acesso em: 2010/03/10.

BURNIER, M.; BROWN, R.E.; ONG, S.H.; KESKINASLAN, A.; KHAN, Z.M. Issues in blood pressure control and the potential role of single-pill combination therapies. **International Journal of Clinical Practice**. v.63, n.5, p.790-798. 2009

BURNS D. A. AND E. W. CIURCZAK. Handbook of Near-infrared Analysis. Vol 35, 3 ed, 2007.

CESARINO, C. B.; CIPULLO, J. P.; MARTIN, J. F. V.; CIORLIA, L. A.; GODOY, M. R. P.; CORDEIRO, J. A.; RODRIGUES, I. C. Prevalência e fatores sociodemográficos em hipertensos de São José do Rio Preto. **Arq Bras Card** 2008; 91(1): 31–35.

CARRETERO, O.A.; OPARIL, S. **Essential hypertension. Part I: definition and etiology.** *Circulation*. v.101, n.3, p.329-35. 2000.

CHOBANIAN, A. V. et al. Seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. *Hypertension*, v. 42, n. 6, p.1206-1252, 2003.

DATASUS - Consulta realizada nos dias 13, 14, 22, 23 e 24 de Janeiro de 2013 <http://w3.datasus.gov.br/datasus/index.php?area=0203>.

DAHLOF B, SEVER PS, POULTER NR, et al; for the ASCOT Investigators. Prevention of cardiovascular events with an antihypertensive regimen of amlodipine adding perindopril as required versus atenolol adding bendroflumethiazide as required, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-Blood Pressure Lowering Arm (ASCOT-BPLA): A multicentre randomised controlled trial. *Lancet*. 2005;366:895-906.

DHABALE, P. N.; BHAGADE, S. R. Simultaneous UV spectrophotometric methods for estimation of amlodipine besilate and olmesartan medoxomil in tablet dosage form. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, v. 3, n. 2, p.650-656, 2011.

DOU, Y.; QU, N.; WANG, B.; CHI, Y.Z.; REN, Y.L. Simultaneous determination of two active components in compound aspirin tablets using principal component artificial neural networks (PC-ANNs) on NIR spectroscopy. *Euro. J. Pharm. Sci.* 32, 2007, 193.

DUNCAN, B.; SCHMIDT, M. I.; GIUGLIANI, E. R. J. **Medicina ambulatorial: condutas de atenção primária baseada em evidências.** 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

EDRAKI, N.; MEHDIPOUR, A.R.; KHOSHNEVISZADEH, M.; MIRI, R. Dihydropyridines: evaluation of their current and future pharmacological applications. *Drug Discovery Today*. v.14, n.21-22, p.1058-1066. 2009.

ELLIOTT, W.J.; RAM, C.V.S. Calcium channel blockers *The Journal of Clinical Hypertension*. v.13, n.9, p.687-689. 2011.

EPSTEIN, M. Role of a third generation calcium antagonist in the management of hypertension. *Drugs*. v.57 Suppl 1, p.1-10. 1999.

ESCOBAR, C.; BARRIOS, V. Combined therapy in the treatment of hypertension. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, v. 24, n. 1, p.3-8, 2009.

ESH. Guidelines for the management of arterial hypertension. The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Journal of Hypertension*, 2013.

FASANI, E.; ALBINI, A.; GEMME, S. Mechanism of the photochemical degradation of amlodipine. **International Journal of Pharmaceutics**. v.352, n.1-2, p.197-201. 2008.

FERREIRA, M. M. C. et al. Quimiometria I: Calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v., n. 22, p.724, 1999.

FLYNN, J.T.; NAHATA, M.C.; MAHAN, J.D., JR.; PORTMAN, R.J. Population pharmacokinetics of amlodipine in hypertensive children and adolescents. **Journal of Clinical Pharmacology**. v.46, n.8, p.905-916. 2006.

GOODMAN and Gilman's, in: Gilman A G, Rall T W, Nies A S, Taylor P. The **Pharmacological Basis of Therapeutics**. (Eds.) Pergamon Press: Oxford; 1996. p.743.

GRADMAN, A. H. et al. Combination therapy in hypertension. **Journal of the American Society of Hypertension**, v. 4, n. 2, p.90-98, 2010.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 5. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2001.

HESSE, M.; MEIER, H.; ZEEH, B. **Spectroscopy Methods in Organic Chemistry**.2^a. ed: Thieme, 2008.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Pricípios da Análise Instrumental**.6^a. ed, 2009.

HOPKE, P. K. The evolution of chemometrics. **Analytica Chimica Acta**, v. 500, n. 1-2, p.365-377, 2003.

HUSSEIN, M.A.; CHAPMAN, R.H.; BENNER, J.S.; TANG, S.S.K.; SOLOMON, H.A.; JOYCE, A.; FOODY, J.M. Does a single-pill antihypertensive / lipid lowering regimen improve adherence in US managed care enrollees?: A non-randomized, observational, retrospective study. **American Journal of Cardiovascular Drugs**. v.10, n.3, p.193-202. 2010.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE - ICH. **ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)**, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO. **DOQ-CGCRE-008 - Orientação sobre validação de métodos analíticos**. 2010. Acesso em: 17/02/2013.

JANKOVICS, P. et al. Amlodipine besilate screening in pharmaceutical preparations by CE. **Chromatographia**, v. 68, n. SUPPL. 1, p.S43-S48, 2008.

JNC 8 - Eighth Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. 2013.

KATOH, M.; NAKAJIMA, M.; SHIMADA, N.; YAMAZAKI, H.; YOKOI, T. Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by 1,4-dihydropyridine calcium antagonists: prediction of in vivo drug-drug interactions. **European Journal of Clinical Pharmacology**. v.55, n.11-12, p.843-852. 2000.

KIM, K.A.; PARK, P.W.; PARK, J.Y. Effect of cytochrome P450 3A5*3 genotype on the stereoselective pharmacokinetics of amlodipine in healthy subjects. **Chirality**. v.21, n.5, p.485-491. 2009.

KOHLMANN JR, O. et al. Estudo "LOTHAR": avaliação de eficácia e tolerabilidade da combinação fixa de anlodipino e losartana no tratamento da hipertensão arterial primária. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 86, n., p.39-51, 2006.

KRAEMER, S. D.; GAUTIER, J. C.; SAUDEMON, P. Considerations on the Potentiometric Log P determination. **Pharmaceutical Research**, vol 15, p. 1310-1313, 1998.

KUMAR, A.M.; KUMAR, P.V.; NASARE, M.; RAO, V.; PRASAD, V.V.L.N; DIWAN, P.V. Isocratic Reverse Phase High Performance Liquid Chromatographic Estimation of Ramipril and Amlodipine in Pharmaceutical Dosage Form. **Journal of Advanced Pharmacy Education & Research**, 137-145, 2012.

LAW, M. R. et al. Value of low dose combination treatment with blood pressure lowering drugs: analysis of 354 randomised trials. **BMJ**, v. 326, n. 7404, p.1427-, 2003.

LEWINGTON, S. et al. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a metaanalysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. **The Lancet**, London, v. 360, n. 9349, p. 1903-1913, dec. 2002

LIMA, K. M. G. et al. Sensores ópticos com detecção no infravermelho próximo e médio. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p.1635-1643, 2009.

LINDHOLM, L. H. et al. Cardiovascular morbidity and mortality in patients with diabetes in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. **The Lancet**, v. 359, n. 9311, p.1004-1010, 2002.

LIU, Y.; JIA, J.; LIU, G.; LI, S.; LU, C.; LIU, Y.; YU, C. Pharmacokinetics and bioequivalence evaluation of two formulations of 10-mg amlodipine besylate: an open-label, single-dose, randomized, two-way crossover study in healthy Chinese male volunteers. **Clinical Therapeutics**. v.31, n.4, p.777-783. 2009.

LUSCHER, T.F.; PIEPER, M.; TENDERA, M.; VROLIX, M.; RUTSCH, W.; VAN DEN BRANDEN, F.; GIL, R.; BISCHOFF, K.O.; HAUDE, M.; FISCHER, D.; MEINERTZ, T.; MUNZEL, T. A randomized placebo-controlled study on the effect of nifedipine on coronary endothelial function and plaque formation in patients with coronary artery disease: the ENCORE II study. **European Heart Journal**. v.30, n.13, p.1590-1597. 2009.

MADDI, S.; YAMSANI, M.R.; SEELING, A.; SCRIBA, G.K. Stereoselective plasma protein binding of amlodipine. **Chirality**. v.22, n.2, p.262-266. 2010.

MAGGIO, R.; CASTELLANO, P.; KAUFMAN, T. A multivariate approach for the simultaneous determination of losartan potassium and hydrochlorothiazide in a combined pharmaceutical tablet formulation. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, n. 8, p.2949-2955, 2008.

MANCIA, G.; DE BACKER, G.; DOMINICZAK, A.; CIFKOVA, R., FAGARD R, GERMANO, G., *et al* Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens* 2007.

MANNA, L., VALVO, L.; ALIMONTI, S. A liquid chromatographic ion-pairing method for simultaneous determination of benazepril hydrochloride, fosinopril sodium, ramipril and hydrochlorothiazide in pharmaceutical formulations. **Chromatographia**, 2001; 53: 271–275.

MASON, R.P.; CAMPBELL, S.F.; WANG, S.D.; HERBETTE, L.G. Comparison of location and binding for the positively charged 1,4-dihydropyridine calcium channel antagonist amlodipine with uncharged drugs of this class in cardiac membranes. **Molecular Pharmacology**. v.36, n.4, p.634-640. 1989.

MASTE M.M.; KALEKAR, M.C.; KADIAN, N.; BHAT, A.R. Development of RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Amlodipine and Ramipril in Tablet Dosage form. **Asian Journal Research Chemistry**. 1210-1213, 2011.

MERCK. **The Merck Index**. 13. ed. New Jersey: Merck & Company Incorporated, 2011.

MESSERLI, F.H.; WILLIAMS, B.; RITZ, E. Essential hypertension. **The Lancet**. v.370, n.9587, p.591-603. 2007.

MIRANDA, R.D.; JR, D.M.; ROCHA, J.C.; JR, O.K.; GOMES, M.A.M.; SARAIVA, J.F.K.; AMODEO, C.; FILHO, B.L. An 18-week, prospective, randomized, doubleblind, multicenter study of amlodipine/ramipril combination versus amlodipine monotherapy in the treatment of hypertension: The assessment of combination therapy of amlodipine/ramipril (ATAR) study. **Clinical Therapeutics**. v.30, n.9, p.1618-1628. 2008.

MITAL, S.; LOKE, K. E.; SLATER, J. P.; ADDONIZIO, L.; GERSONY, W. M.; HINTZE, T. H. Synergy of amlodipine and angiotensin-converting enzyme inhibitors in regulating myocardial oxygen consumption in normal canine and failing human hearts. **Am J Cardiol.** 1999,83 (12A):92H-98H.

NAGAVALLI, D. et al. Simultaneous spectrophotometric determination of losartan potassium, amlodipine besilate and hydrochlorothiazide in pharmaceuticals by chemometric methods. **Acta Pharmaceutica**, v. 60, n. 2, p.141-152, 2010.

NIEMEIJER, M.; CLEOPHAS, T. Combination therapy with olmesartan and amlodipine in the treatment of hypertension. **Pharmaceutics**, v. 2, n. 3, p.125-133, 2009.

NOSADINI, R.; TONOLO, G. Cardiovascular and renal protection in type 2 diabetes mellitus: the role of calcium channel blockers. **Journal of American Society of Nephrology**. v.13 Suppl 3, p.S216-223. 2002.

OKSANEN, T.; KAWACHI, I.; JOKELA, M.; KOUVONEN, A.; SUZUKI, E.; TAKAO, S.; VIRTANEN, M.; PENTTI, J.; VAHTERA, J.; KIVIMAKI, M. Workplace social capital and risk of chronic and severe hypertension: a cohort study. **Journal of Hypertension**. v.30, n.6, p.1129-1136. 2012.

ÖZDEMİR, D.; ÖZTÜRK, B. Genetic Multivariate Calibration Methods for Near Infrared (NIR) Spectroscopic Determination of Complex Mixtures. **Turk J Chem**, 28, 2004, 497.

PAREEK, A. et al. Efficacy and tolerability of a fixed-dose combination of metoprolol extended release/amlodipine in patients with mild-to-moderate hypertension: a randomized, parallel-group, multicentre comparison with losartan plus amlodipine. **Clinical Drug Investigation**, v. 30, n. 2, p.123-131 10.2165/11531770-000000000-00000, 2010.

PARISOTTO, G. et al. Desenvolvimento de metodologias no infravermelho aplicadas para a quantificação de cloridrato de metformina em formulações farmacêuticas. **Orbital**, v. 1, n. 1, p.38-48, 2009.

PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p.198-219, 2003.

PATIL, P.R.; RAKESH S.U.; DHABALE, P.N.; BURADE, K.B. Simultaneous Estimation of Ramipril and Amlodipine by UV Spectrophotometric Method. **Research J. Pharm. and Tech.**2 (2): April.-June. 2009a.

PATIL, P. R. et al. RP-HPLC method for simultaneous estimation of losartan potassium and amlodipine besylate in tablet formulation. **International Journal of Chem Tech Research**, v. 1, n. 3, p.464-469, 2009b.

PATIL, P. R. *et al.* Simultaneous UV spectrophotometric method for estimation of losartan potassium and amlodipine besylate in tablet dosage form. **Asian Journal of Research in Chemistry**, v. 2, n. 2, p.183-187, 2009c.

PEDROSO, C. *et al.* A validated RP–LC method for simultaneous determination of losartan potassium and amlodipine besilate in pharmaceutical preparations. **Chromatographia**, v. 69, n. 2, p.201-206, 2009.

PERALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, J. L. D.; NAGATA, N. Por que otimização multivariada? **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 10, n., p.106-110, 2005.

PICO, J.C.; DOMINGUEZ, G.; NEGRI, A.L.; CAUBET, J.C.; TERRAGNO, N.A. Comparative pharmacokinetics of a single oral dose of two formulations of amlodipine. A randomized, single-blind, two-period, two-sequence, crossover study. **Arzneimittelforschung**. v.58, n.7, p.323-327. 2008.

POLLANEN, K., HAKKINEN, A., HUHTANEN, M., REINIKAINEN, S., KARJALAINEN, M., RANTANEN, J., LOUHI-KULTANEN, M., NYSTROM, L. DRIFT-IR for quantitative characterization of polymorphic composition of sulphathiazole. **Anal Chim. Acta** 544, 108-117, 2005.

PRAVEEN, S.; RAJPUT, A.K.; NAVDEEP, K.G.; KARAN, M.; GANTI S. Simultaneous Estimation of Ramipril and Amlodipine in Bulk and tablet Dosage form by RP-HPLC Method. **Journal of Applied Pharmaceutical Science** 02 (07), 160-165, 2012.

RAKESH, S. U. *et al.* New UV spectrophotometric methods applied to the simultaneous estimation of losartan potassium and amlodipine besylate in tablet dosage form. **Indian Drugs**, v. 47, n. 3, p.39-43, 2010.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim Nova**, 27, 2004, 771.

SARRAGUÇA, M.C.; LOPES, J.A. The use of net analyte signal (NAS) in near infrared spectroscopy pharmaceutical applications: Interpretability and figures of merit, **Anal. Chim. Acta** 642, 179–185, 2009.

SCHARDER, B. **Infrared and Raman Spectroscopy: method and applications**. 1. ed: VCH, 1995.

SENA, M. M. *et al.* Direct determination of diclofenac in pharmaceutical formulations containing B vitamins by using UV spectrophotometry and partial least squares regression. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, n. 4, p.743-749, 2004.

SENA, M.M.; FREITAS, C.B.; SILVA, L.C.; PÉREZ, C.N.; DE PAULA, Y.O. Determinação espectrofotométrica simultânea de paracetamol e ibuprofeno em formulações farmacêuticas usando calibração multivariada. **Quim. Nova** 30, 2007, 75.

SHAH, A.D.; JAYDEEP, U.B.; KASHYAP, K.B.; SUNIL, L.B.; USMANGANI, K.C. Simultaneous estimation of amlodipine besylate and ramipril in pharmaceutical formulation by thin layer chromatographic method. **Novel Science International Journal of Pharmaceutical Science** 33-39, 2012.

SILVA, F.E.B.; FERRÃO, M.F.; PARISOTTO, G.; MÜLLER, E.I.; FLORES, E.M.M. Simultaneous determination of sulphamethoxazole and trimethoprim in powder mixtures by attenuated total reflection-Fourier transform infrared and multivariate calibration. **J. Pharm. Biomed. Anal.**,49, 2009, 800.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental**. 5ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. VI Diretrizes brasileiras de hipertensão. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 95, n. 1 supl.1, p.1-51, 2010.

SMITH, B. C., **FUNDAMENTALS OF FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY**, 2º ed, CRC Press, 2011

STUART, B. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**. 1. ed: John Wiley & Sons, Ltd, 2004.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p.338-350, 2006.

The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. The JNC 7 Report. **JAMA** 2003;289(19):2560-72.).

The United States Pharmacopoeia. 32. ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2009.

The United States Pharmacopoeia. 37. ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2014.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. **Química Nova**, v. 32, n., p.1278-1287, 2009.

VENKATESH, J.; CHOWDARY, M.S.; HARITHA, D.; ANUROOP, V.V.L.N.; PRASAD, V.A. Reverse Phase High Performance Liquid Chromatographic Estimation of Ramipril and Amlodipine in Pharmaceutical Dosage Form. **Global Journal of Pharmacology**, 208-211, 2013.

VINCENT, J.; HARRIS, S.I.; FOULDS, G.; DOGOLO, L.C.; WILLAVIZE, S.; FRIEDMAN, H.L. Lack of effect of grapefruit juice on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of amlodipine. **British Journal of Clinical Pharmacology**. v.50, n.5, p.455-463. 2000.

YARLIOGLUES, M.; KAYA, M.G.; ARDIC, I.; CALAPKORUR, B.; DOGDU, O.; AKPEK, M.; OZDOGRU, M.; KALAY, N.; DOGAN, A.; OZDOGRU, I.; OGUZHAN, A. Acute effects of passive smoking on blood pressure and heart rate in healthy females. **Blood Pressure Monitoring**. v.15, n.5, p.251-256. 2010.

WADE, Jr. L. G. **Organic Chemistry**, 6rd ed., Prentice-Hall, New Jersey, 2006

WALD DS, LAW M, MORRIS JK, BESTWICK JP, Wald NJ. Combinationtherapy vs. monotherapy in reducing blood pressure: meta-analysis on 11 000 participants from 42 trials. **Am JMed** 2009; 122:290–300.

WANKHEDE, S. B. et al. Spectrophotometric and HPLC methods for simultaneous estimation of amlodipine besilate, losartan potassium and hydrochlorothiazide in tablets. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 72, n. 1, p.136-140, 2010.

WEBSTER, J. et al. Once daily amlodipine in the treatment of mild to moderate hypertension. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v.24, n.6, p.713-9, 1987.

WILLIAMS, B. The year in hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, New York, v. 55, n. 1, p. 66-73, 2010.

WOLF-MAIER, K. et al. Hypertension treatment and control in five European countries, Canada, and the United States. **Hypertension**, v.43, n.1, p.10-7, 2004.

ZANNAD F, MATZINGER A, LARCHÉ J. Trough/peak ratios of once daily angiotensin converting enzyme inhibitors and calcium antagonists. **Am J Hypertens**.1996;9:633-643.

ZHANG, X.,; XU. X.; NASJLETTI, A.; HINTZE, T. H. Amlodipine enhances NO production induced by an ACE inhibitor through a kinin-mediated mechanism in canine coronary microvessels. **J Cardiovasc Pharmacol**. 2000;35:195-202.

ZARAPAKAR, S. S.; RANE, S. H. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of ramipril and hydrochlorothiazide in tablets. **Indian Drugs** 2000; 37: 589-593.