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

Desenvolvimento de Métodos para Análise do Besilato de Anlodipino
para inclusão da Monografia na Farmacopéia Brasileira

Helen Dutra Leite

Dissertação para obtenção de Grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof^a. Titular Érika Rosa Maria Kedor-Hackmann

São Paulo
2009

DEDALUS - Acervo - CQ

30100015115

Ficha Catalográfica

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

Leite, Helen Dutra

L533d Desenvolvimento de métodos para análise do besilato de
anlodipino para inclusão da monografia na farmacopéia
brasileira / Helen Dutra Leite. -- São Paulo, 2009.
103p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
de São Paulo. Departamento de Farmácia.

Orientador: Kedor-Hackmann, Érika Rosa Maria

1. Fármaco : Controle de qualidade 2. Cromatografia em
líquido de alta eficiência : Análise química : Farmacologia
3. Espectrofotometria no visível : Análise de drogas I. T. II.
Kedor-Hackmann, Érika Rosa Maria, orientador.

615.19015 CDD

Helen Dutra Leite

**Desenvolvimento de Métodos para Análise do Besilato de Anlodipino para Inclusão
da Monografia na Farmacopéia Brasileira**

Comissão julgadora
da
Dissertação para obtenção do Grau de Mestre

Prof^a. Titular Érika Rosa Maria Kedor-Hackmann
Orientador/Presidente

1º Examinador

2º Examinador

São Paulo
Março 2009

*Agradeço à Deus pois
sem ele nada é possível*

Ao meu pai Temistocles Leite

in memoriam, pois sem ele não teria chegado até aqui.

AGRADECIMENTOS

A minha maravilhosa família que tanto me apoiou e soube entender minha ausência durante todo esse tempo. marido (Carlos), Mãe (Maria da Penha Dutra) Irmã (Luciene), Sérgio (cunhado), sobrinhos (Sérgio e Luana) e cachorrinhos Meg e Bidu.

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

A pesquisadora pós Doutora Fernanda Calheta Vieira Portaro e a professora pós doutora Silvia Helena Pires Serrano pela grande contribuição na banca de qualificação.

A banca examinadora: prof^a. Doutora Eliane Maria de Almeida Orsine e a prof^a. Doutora Magali Benjamim de Araújo.

Aos queridos alunos do Laboratório de Controle Físico-Químico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo: Angel, Carla, Cibeles, Daniela, Fábio, Helena, Ivani, Joyce, Mariana, Ricardo, Pedro, Renata, Ricardo e Vanessa.

Aos funcionários Regina Rojas, Iria da Silva, Elizabete Paiva, Elaine Ychico, Jorge Lima, Raquel, Leila Bonadio, Adriana e Angelo.

Ao laboratório Medley[®] pelo fornecimento de matéria-prima e amostras de anlodipino besilato

Enfim, a todos que contribuíram para realização deste trabalho.

Muito Obrigada!!!!

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi desenvolver e validar métodos analíticos para o fármaco besilato de anlodipino (ABC) em comprimidos. O método espectrofotométrico no ultra violeta e o método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) desenvolvidos foram considerados simples, exatos e precisos. Foram analisadas amostras contendo 5 mg, 10 mg e uma amostra formulada de 5mg de ABC/comprimido. Para o método espectrofotométrico, a primeira diluição das amostras foi feita em metanol e as subseqüentes em água. A leitura foi efetuada a 364,4 nm. A linearidade para ABC foi estabelecida na faixa de 41,0-61,0 mg/mL e o coeficiente de correlação foi $R = 0,9996$. O limite de detecção e o de quantificação foram respectivamente 0,54 e 1,8 mcg/mL. A exatidão e a precisão foram 98,99% e 0,37%, respectivamente. Nas análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), foram utilizadas as seguintes condições: coluna LiChrospher® 100 RP-18 Merck® (250 mm x 4,6 mm, 5µm), fase móvel constituída por metanol: água: (35:65) com 1% de TEA e pH ajustado para 5.0 com ácido fosfórico; fluxo de 1,0 mL/min; detecção UV a 238 nm e temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Tempo de retenção (RT) ABC foi de 3,7 min. Foi obtida linearidade no intervalo de 50 a 350 mcg/mL e coeficiente de correlação = 0,9999. O limite de detecção e o de quantificação foram respectivamente de 2,26 mcg/mL e 7,52 mcg/mL. A exatidão foi de 100,18% e a precisão foi de 0,37% para a CLAE. Ambos os métodos podem ser usados na rotina de análise para o controle de qualidade de comprimidos contendo ABC.

Palavras-chave: Validação. Besilato de anlodipino. CLAE. Espectrometria.

ABSTRACT

The objective of this research was to develop and validate analytical methods for the amlodipine besylate (ABC) determination in tablets. Simple, accurate and precise spectrophotometric and HPLC methods were validate for ABC determination in samples containing 5.0 and 10.0 mg of ABC / tablet. For the spectrophotometric method, the first dilutions of samples were made in methanol and the consecutive in distilled water. Determination was made at 364.4 nm. Linearity was in the range of 41.0-61.0 $\mu\text{g/mL}$ and $r = 0.9996$. The detection and quantitation limits were respectively, 0.54 $\mu\text{g/mL}$ and 1.80 $\mu\text{g/mL}$. Accuracy and precision were respectively, 98.99% and 0.37%. For HPLC analysis, the following conditions were used: a LiChrospher ®100 RP-18 Merck® (250 mm x 4,6 mm, 5 μm) column; methanol: water with 1% of triethylamine adjusted to pH 5.0 with phosphoric acid (35:65), as mobile phase; a flow rate of 1.0 mL /min; UV detection at 238 nm and temperature of 22 ± 1 °C . Retention time was 3.7 min. Linearity was in the range of 50.0 – 350.0 $\mu\text{g/mL}$ and $r = 0.9999$. The detection and quantitation limits were respectively, 2.26 $\mu\text{g/mL}$ and 7.52 $\mu\text{g/mL}$. Accuracy and precision were respectively, 100.18% and 0.37%. Both methods can be used in routine analysis for quality control of tablets containing ABC.

Key-words: Validation. Amlodipine besilate. HPLC. Spectrophotometric.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da molécula do besilato de anlodipino	27
Figura 2. Espectro de absorção da solução do placebo em MeOH/H ₂ O 5:95, na primeira diluição e na segunda diluição somente água	61
Figura 3. Espectro de absorção da solução padrão na concentração de 49mcg/mL em MeOH/H ₂ O 5:95, na primeira diluição e na segunda diluição somente água	62
Figura 4. Cromatograma da amostra de solução do padrão do besilato de anlodipino. Condições cromatográficas: fase móvel metanol e água (35:65v/v), λ 210 nm, Coluna C18 Synergi hydro RP, Phenomenex®, 250 x 4,6 mm, fluxo 1mL/min concentração 24 mcg/mL	63
Figura 5. Cromatograma de uma solução do padrão do besilato de anlodipino de concentração 24 mcg/mL. Condições cromatográficas: fase móvel metanol e água (35:65v/v), λ 238 nm Coluna LiChrospher ® 100RP-18 (5 μ m) Merck®; fluxo 1mL/min e tempo de retenção 3,7min	65
Figura 6. Curva analítica para a determinação de besilato de anlodipino, nas concentrações de 41 mcg/mL, 45 mcg/mL, 49 mcg/mL, 53 mcg/mL, 57 mcg/mL, 61 mcg/mL em metanol:água destilada (5:45v/v). Equação da reta $a=0,0118x+0,005$ $R^2=0,9995$	67
Figura 7. Espectro de absorção das soluções padrão nas concentrações de 41 mcg/mL, 45 mcg/mL, 49 mcg/mL, 53 mcg/mL, 57 mcg/mL, 61 mcg/mL das soluções padrão de besilato de anlodipino em metanol e H ₂ O (5:45v/v)	68
Figura 8. Espectro de absorção das soluções (padrão+amostra) nas concentrações de 22,5 mcg/mL, 22,5 mcg/mL, 45 mcg/mL, 49 mcg/mL e 53 mcg/mL da solução padrão de besilato de anlodipino em metanol 5:95 MeOH/H ₂ O, na primeira diluição e na segunda somente água.	70
Figura 9. Espectro de absorção das soluções da amostra de comprimido de besilato de anlodipino 5 mg nas concentrações de 49 mcg/mL em metanol 5:95 MeOH/H ₂ O, na primeira diluição e na segunda somente água.	73

Figura 10. Espectro de absorção das soluções da amostra de comprimido de besilato de anlodipino 5 mg nas concentrações de 49 mcg/mL em metanol 5:95 MeOH/H₂O, na primeira diluição e na segunda somente água.77

Figura 11. Gráfico da linearidade das concentrações de 50 mcg/mL, 100 mcg/mL, 150 mcg/mL, 200 mcg/mL, 250 mcg/mL, 300 mcg/mL, e 350 mcg/mL, da solução padrão de besilato de anlodipino sendo utilizados 5mL de metanol para a diluição e o restante de fase móvel78

Figura 12. Cromatogramas desenvolvidos em coluna LiChrospher® 100RP-18 (5µm) Merck®. Amostras de 0,5 mcg/mL de besilato de anlodipino em H₂O (a), em H₂O₂ (b), em NaOH (c) e em HCl (d) todos com a segunda diluição com fase móvel (35:65 MeOH/H₂O TEA 1%. acidificada com ácido fosfórico para um pH 5,0), concentração final 22 mcg/mL e comprimento de onda de 238nm.78

Figura 13. Cromatogramas desenvolvidos em coluna LiChrospher® 100RP-18 (5µm) Merck®. Amostras de 0,5 mg/mL de besilato de anlodipino em H₂O(a), em H₂O₂ (b), em NaOH (c) e em HCl (d) todos com a segunda diluição com fase móvel (35:65 MeOH/H₂O TEA 1% acidificada com ácido fosfórico para um pH 5,0), concentração final 22 mcg/mL e comprimento de onda de 238nm.....88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros de conformidade do sistema e recomendações.....	31
Tabela 2. Resultados experimentais, da solução padrão besilato de anlodipino, utilizados na curva analítica pelo método espectrofotométrico	67
Tabela 3. Análise estatística dos resultados obtidos na determinação da curva analítica de besilato de anlodipino. Leituras efetuadas em comprimento de onda 364,4nm. Intervalo de concentração 41-61mcg/mL	68
Tabela 4. Resultados experimentais obtidos na recuperação, de solução padrão de besilato de anlodipino adicionada as soluções amostra de besilato de anlodipino 5 mg (A), 10 mg (B), e formulado 5 mg (C) empregando o método espectrofotométrico	71
Tabela 5. Resultados experimentais, das soluções da amostra de besilato de anlodipino, utilizados para precisão do método espectrofotométrico em metanol 5:95 MeOH/H ₂ O, na primeira diluição e na segunda diluição somente água para a amostra de 5 mg (A).....	72
Tabela 6. Resultados experimentais, das soluções das amostras de besilato de anlodipino, utilizados para precisão do método espectrofotométrico em metanol 5:95 MeOH/H ₂ O, na primeira diluição e na segunda diluição somente água para a amostra de 10 mg (B).....	73
Tabela 7. Resultados experimentais, das soluções das amostras de besilato de anlodipino, utilizados para precisão do método espectrofotométrico em metanol 5:95 MeOH/H ₂ O, na primeira diluição e na segunda diluição somente água para a amostra de 5 mg (C) formulado.....	74
Tabela 8. Resultados obtidos na determinação do teor de besilato anlodipino nas amostras 5 mg (A), 10 mg (B) e formulado 5 mg (C), intra-dia e inter-dia empregando o método espectrofotométrico.	74

Tabela 9. Resultados experimentais, das soluções da amostra de besilato de anlodipino, em metanol 5:95 MeOH/H₂O, na primeira diluição e na segunda diluição somente água, utilizados para robustez do método espectrofotométrico....76

Tabela 10. Análise estatística dos resultados obtidos na determinação da curva analítica pelo método cromatográfico de besilato de anlodipino. Leituras efetuadas em comprimento de onda 238nm. Intervalo de concentração 50-350 mcg/mL.79

Tabela 11. Resultados experimentais, da solução padrão besilato de anlodipino, utilizados na curva analítica pelo método cromatográfico79

Tabela 12. Resultados experimentais obtidos na recuperação, de solução padrão de besilato de anlodipino adicionada as soluções amostra de besilato de anlodipino, 5 mg (A), 10 mg (B), e formulado 5 mg (C) empregando o método cromatográfico.....82

Tabela 13. Resultados experimentais, das soluções da amostra de 5 mg (A) de besilato de anlodipino, utilizadas para precisão do método cromatográfico em metanol 5:95 MeOH/H₂O, na primeira diluição fase móvel (35:65 MeOH/H₂O, tampão TEA a 1% acidificada com ácido fosfórico pH 5,0).83

Tabela 14. Resultados experimentais, das soluções da amostra de 10 mg (B) de besilato de anlodipino, utilizadas para precisão do método cromatográfico em metanol 5:95 MeOH/H₂O, na primeira diluição fase móvel (35:65 MeOH/ H₂O, tampão TEA a 1% acidificada com ácido fosfórico pH 5,0).84

Tabela 15. Resultados experimentais, das soluções da amostra de 5 mg (C) formulado de besilato de anlodipino, utilizadas para precisão do método cromatográfico em metanol 5:95 MeOH/H₂O, na primeira diluição fase móvel (35:65 MeOH/H₂O, tampão TEA a 1% acidificada com ácido fosfórico pH 5,0).84

Tabela 16. Resultados obtidos na determinação do teor de besilato de anlodipino nas amostras 5 mg (A), 10 mg (B) e formulado 5 mg (C), intra-dia e inter-dia empregando o método cromatográfico.....85

Tabela 17. Resultados experimentais, das soluções da amostra de besilato de anlodipino, em metanol 5:95 MeOH/H₂O. Volume injetado de 10mcL...86

Tabela 18. Resultados experimentais, das soluções da amostra de besilato de anlodipino, em metanol 5:95 MeOH/H ₂ O. Volume injetado de 5mCL.....	86
---	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Parâmetros de validação da ANVISA e do INMETRO.	32
Quadro 2. Parâmetros avaliados na robustez	40

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CE	Capillary Electrophoresis
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
°C	Grau Celsius
EPA	Environmental Protection Agency
FDA	Food and Drug Administration
g	Grama
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ISO/IEC	International Standardization Organization / international Electrotechnical Commission
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MeOH	Metanol
MEKC	micellar electrokinetic chromatography
mL	Mililitro
pH	Logarítmo negativo da atividade do íon hidrogênio
SD	“Standard Deviation” (Desvio Padrão)

TEA	Trietilamina
USP	United States Pharmacopoeia
UV	Ultravioleta
VIS	Visível
λ	Comprimento de onda
μL	Microlitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Objetivo geral	23
1.1.1 Objetivos específicos	23
2 REVISÃO DA LITERATURA	24
2.1 PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS	24
2.1.1 Mecanismo de ação	24
2.1.2 Absorção destino e excreção	25
2.1.3 Farmacocinética	26
2.1.4 Toxicidade e respostas indesejadas	26
2.2 CARACTERÍSTICAS DO FÁRMACO	26
2.3 FORMAS FARMACÊUTICAS COMERCIALIZADAS	28
2.4 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	29
2.4.1 Especificidade	33
2.4.2 Linearidade	34
2.4.3 Intervalo	36
2.4.5 Limite de detecção (Sensibilidade)	36
2.4.6 Limite de quantificação	37
2.4.7 Exatidão	37
2.4.8 Precisão	38
2.4.9 Robustez	39
2.5 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO BESILATO DE ANLODIPINO	40

2.5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência	40
2.5.1.1 Composição do cromatógrafo	41
2.5.1.2 Medições fundamentais	43
2.5.1.3 Fases estacionárias e principais mecanismos de separação	44
2.5.1.4 Seletividade da fase móvel	44
2.5.1.5 Método da Farmacopéia Britânica	45
2.5.1.6 Métodos por cromatografia líquida de alta eficiência	45
2.5.2 Espectrometria de massa	47
2.5.2.1 Método por espectrometria de massa	48
2.5.3 Eletroforese	49
2.5.3.1 Método por eletrocinética micelar	50
2.5.4 Espectrofotometria	51
2.5.5 Método por Espectrofotometria	52
2.5.6 Outros métodos de quantificação e identificação	53
3 JUSTIFICATIVA	55
4 MATERIAL E MÉTODOS	56
4.1 Material	56
4.1.1 Solventes e reagentes	56
4.1.2 Substância química de referência	57
4.1.3 Amostras	57
4.1.4 Equipamentos e acessórios	58
4.2 MÉTODOS ANALÍTICOS	60
4.2.1 Espectrofotometria com detector visível	60
4.2.2 Ensaios realizados no cromatógrafo CG	62
4.2.3 Ensaios realizados no cromatógrafo Shimadzu	63

4.2.3.1 Ensaio realizado com a coluna Lichrospher® 100rp-18 (5µM) Merck®; fluxo 1mL/min concentração 200 mcg/mL.....	64
---	----

5 RESULTADOS 66

5.1 RESULTADOS OBTIDOS POR ESPECTROFOTOMETRIA.....66

5.1.1 Identificação.....66

5.1.2 Linearidade66

5.1.3 Limite de detecção e limite de quantificação.....66

5.1.4 Exatidão69

5.1.5 Precisão72

5.1.6 Robustez.....75

5.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)77

5.2.1 Linearidade77

5.2.2 Limite de detecção e limite de quantificação.....80

5.2.3 Exatidão80

5.2.4 Precisão83

5.2.5 Robustez.....85

5.2.6 Teste de estresse.....86

6 DISCUSSÃO 89

6.1 Identificação.....91

6.2 Doseamento.....91

6.3 Metodologia analítica92

6.3.1 Curva analítica92

6.3.1.2 Determinação do teor de besilato de anlodipino nas amostras manipuladas e industrializadas.....93

6.3.1.3	Teste de recuperação	93
6.3.1.4	Limite de detecção e quantificação	94
6.3.1.5	Robustez	94
6.3.2	Método cromatográfico	95
6.3.2.1	Construção da curva analítica	96
6.3.2.2	Determinação do teor nas amostras manipuladas e industrializadas	96
6.3.2.3	Teste de recuperação	96
6.3.2.4	Limite de detecção e quantificação	97
6.3 2.5	Robustez	97
7-CONCLUSÃO		98
REFERÊNCIAS		99
ANEXOS		103

1 INTRODUÇÃO

O crescente surgimento de novos fármacos, sejam eles sintéticos ou não, traz a necessidade do desenvolvimento de novos métodos analíticos, uma vez que a análise dessas substâncias precisa ser confiável e reprodutível. Alguns desses métodos já estão descritos em farmacopéias, seja a brasileira ou internacionais. Porém como boa parte dos fármacos ainda não consta nesses compêndios oficiais, a validação torna-se cada vez mais freqüente e necessária.

A importância da validação em análise química tornou-se mais acentuada a partir da constatação, na década de setenta, da enorme variabilidade de resultados obtidos em análise toxicológica de amostras submetidas a estudos interlaboratoriais por órgãos do governo americano (CHASIN, 1994). A partir de iniciativas de instituições do governo americano, como o Food and Drug Administration (FDA) e a Environmental Protection Agency (EPA), e a partir de resultados de estudos para assegurar a integridade dos dados laboratoriais, criou-se o sistema denominado ISO/IEC-25 (do inglês International Standardization Organization /International Electrotechnical Commission) (ISO, 1990), cujo objetivo principal é a padronização dos resultados dos laboratórios, para que o resultado possa ser reproduzido em outros laboratórios e ser internacionalmente aceito.

O Brasil, país que tem como órgão regulador a ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003), possui uma legislação específica para validação de métodos analíticos, RE 899 de 29 de maio de 2003, a qual coloca como objetivo para validação de métodos analíticos a demonstração de que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação

qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos.

Como a exigência de mercado por produtos de qualidade está cada vez mais ostensiva, aumentou a necessidade da inserção de métodos analíticos na Farmacopéia Brasileira, código oficial farmacêutico do país, cuja função é estabelecer requisitos de qualidade a que os medicamentos devem obrigatoriamente obedecer. Esses requisitos incluem todas as substâncias empregadas na fabricação dos medicamentos.

Como o besilato de anlodipino é um dos próximos medicamentos a ser incluído na Farmacopéia Brasileira, este trabalho será de grande valia para a comissão do referido código.

O medicamento em estudo é um anti-hipertensivo classificado no grupo dos bloqueadores seletivos do canal de cálcio.

Os métodos de análise hoje existentes são muitos, como espectrofotometria uv-vis, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), eletroforese capilar (CE), infravermelho, porém são objetos de estudo dessa dissertação somente os dois primeiros, pois grande maioria dos laboratórios possuem os equipamentos necessários para a aplicação dos mesmos e como o objetivo é disponibilizar métodos Farmacopéicos acessíveis, somente os dois primeiros serão disponibilizados. Para tal serão analisados os parâmetros de validação exatidão, linearidade, robustez, precisão, limite de quantificação e limite de detecção.

1.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo desta pesquisa foi desenvolver e validar métodos analíticos para a quantificação do medicamento besilato de anlodipino, de modo a inserí-lo, sob a forma de monografia de matéria-prima e de produto acabado, na Farmacopéia Brasileira, já que, a necessidade de produtos de qualidade é cada vez maior, tanto na fabricação de fórmulas magistrais como de medicamentos industrializados.

1.1.1 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar método por espectrofotometria de absorção no VISÍVEL.
- Desenvolver e validar método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para produto formulado no laboratório da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e em produto acabado do laboratório Medley®.
- Executar os testes de estresse em meio ácido básico, ácido e com peróxido.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS

2.1.1 Mecanismo de ação

Os bloqueadores de canal de cálcio, grupo ao qual pertence o fármaco besilato de anlodipino, são assim chamados porque agem primariamente, embora não exclusivamente, inibindo o fluxo de cálcio extracelular para o interior das células através de canais lentos das membranas celulares (KLINKENBERG, R.; STREEL.; B.; CECCATO, A,2003). Do bloqueio do canal de cálcio resultam redução na concentração do mesmo dentro da célula e dilatação das artérias e arteríolas periféricas e vasos cerebrais. Os bloqueadores seletivos do canal de cálcio se dividem em dois grupos dihidropiridínicos e diversos.

Dihidropiridínicos: são assim chamados, por terem, na sua estrutura, um anel diidropiridínico substituído ligado a um anel fenila contendo um ou dois átomos ou grupos.

O anlodipino é um dihidropiridínico com absorção lenta e efeito prolongado, com uma meia-vida plasmática de 35 a 50 horas .Produz vasodilatação arterial periférica e dilatação coronariana (GILMAN,;et al, 1996).

Os dihidropiridínicos são diésteres do ácido 3,5 piridinodicarboxílico. Esses fármacos são seletivos para a musculatura lisa vascular comparada com o miocárdio

e, atuam, portanto, primariamente como vasodilatadores. A redução da resistência vascular periférica total é resultado da vasodilatação. São seletivos para a musculatura lisa vascular comparada com o miocárdio atuando primariamente como vasodilatadores. A vasodilatação promove a diminuição da resistência vascular periférica. Possuem efeito anginoso ocasionado pela dilatação dos vasos periféricos, que reduzem a pressão sistêmica (KOROLKOVAS, 2005; ZANINI, 1995).

O principal uso dos medicamentos bloqueadores dos canais de cálcio é o controle da angina pectoris e da hipertensão (MARTINDALE, 2002). Em alguns casos são empregados em arritmias cardíacas.

2.1.2 Absorção, destino e excreção

Durante a administração oral repetida a meia vida e a biodisponibilidade aumentam devido à saturação do metabolismo hepático. Os metabólitos são fracamente ativos ou inativos. Nos pacientes com cirrose hepática, a biodisponibilidade e a meia-vida dos dihidropiridínicos estão aumentadas e as dosagens devem ser reduzidas de acordo. As meias vidas apresentam-se maiores em pacientes idosos (GILMAN, et al, 1996).

2.1.3 Farmacocinética

Administrado por via oral, ou intravenosa, atinge concentração plasmática máxima em 5,6 a 6,4 horas. Sofre biotransformação intensa, apresentando como metabólitos, principalmente derivados piridínicos, com atividade mínima. É excretado pela urina, principalmente na forma de metabólitos (KOROLKOVAS, 2005).

2.1.4 Toxicidade e respostas indesejadas

Os efeitos colaterais mais comuns são ocasionados pela vasodilatação excessiva. Tais efeitos expressam-se como tonturas, hipotensão, cefaléia, rubor, náuseas, constipação, tosse, edema periférico e pulmonar e sibilo (é um ruído característico da asma brônquica) (GILMAN, et al, 1996).

2.2 CARACTERÍSTICAS DO FÁRMACO

Algumas características do fármaco de nome químico 5-metil-3-etil- 2-(2-aminoetóximetil)-4-(2-clorofenil)-1,4dihidro-6-metil-3,5-piridinacarboxilato benzenosulfonato são: fórmula molecular: $C_{20}H_{25}ClN_2O_5$ $C_6H_6O_3S$ (NIAZI, 2004),

massa molar: 567,1 g/mol (NIAZI, 2004), nome oficial: anlodipino besilato (PEREIRA, 2003; SWISS PHARMACEUTICAL SOCIETY, 2000; REMINGTON, 2000).

- O produto Referência comercializado por laboratório Pfizer[®] é o Norvasc[®] (DEF, 2004).
- O nome da substância segundo a Denominação Comum Brasileira (DCB) é besilato de anlodipino e sua solubilidade está descrita como levemente solúvel em água e álcool isopropílico, pouco solúvel em álcool dihidratado e facilmente solúvel em álcool metílico (BRITISH, 2005; NIAZI, 2004; SUSAN, 2001).
- Está descrito como pó branco a quase branco (BRITISH, 2005; NIAZI, 2004).
- O besilato de anlodipino, matéria-prima, está descrito na British Pharmacopoeia, 5ª Ed.2005 (BRITISH, 2005).

Figura 1- Estrutura química do besilato de anlodipino

* carbono quirático

2.3 FORMAS FARMACÊUTICAS COMERCIALIZADAS

O fármaco é comercializado na forma racêmica, assim como a maioria dos fármacos quirais obtidos por vias sintéticas, seja por razões econômicas ou dificuldades de ordem prática nos processos de produção. O racemato é uma mistura contendo quantidades iguais dos dois enantiômeros (BONATO; JABOR E GAITANI, 2005). Enantiômeros são isômeros que se apresentam estruturalmente como imagens refletidas no espelho. Apresentam propriedades químicas idênticas, diferindo na interação com reagentes opticamente ativos e, em especial na medicina, com algumas enzimas e membranas, assim como com alguns receptores biológicos. A uma mistura de partes iguais de enantiômeros dá-se o nome de racemato e a conversão de um enantiômero a um racemato chama-se racemização (THOMPSON; JUDITH, 2006). As substâncias compostas por dois isômeros a partir do denominado centro quiral, sendo um dextrógiro e o outro levógiro. Podem apresentar atividade biológica diferente (BERMUDEZ; BARRAGAT, 1996).

LUKSA e colaboradores isolaram os dois enantiômeros de anlodipino utilizando uma coluna preparativa quiral chiral GGP e obtiveram sais de benzenosulfonato de anlodipino isentos de racemização. Os enantiômeros puros foram analisados em relação à sua pureza e atividade óptica por CLAE e eletroforese capilar (LUKSA, et al,1997).

Atualmente, a tendência a produzir alterações nas misturas racêmicas vem crescendo em importância. Um exemplo é a comercialização do analgésico ibuprofeno, sob várias marcas e por várias empresas como mistura racêmica.

O desenvolvimento do (S)-(+)-enantiômero o transformou em produto a ser comercializado como medicamento de venda livre ("over-the-counter" ou OTC) (BERMUDEZ; 1996).

É apresentado para a via oral sob as seguintes formas farmacêuticas: cápsulas e comprimidos de 2,5 mg, 5 mg e 10 mg. E ainda pode estar associado a outros fármacos como atenolol, atorvastatina, valsartan, losartan e enalapril.

O besilato de anlodipino está disponível em 88 países e sobre ele já foram feitos mais de 700 estudos médicos. No Brasil, é comercializado por mais de 30 laboratórios como genérico, similar ou de referência, portanto a importância desse trabalho.

2.4 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Validação significa provar e documentar resultados que indiquem que o método é confiável, dentro dos limites estabelecidos, conseguindo-se com sua aplicação os resultados desejados (GIL, 2007).

O objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos. A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar precisão, exatidão, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, especificidade, reprodutibilidade, estabilidade e

recuperação adequadas à análise. Desse modo, é importante ressaltar que todos os equipamentos e materiais devem apresentar-se devidamente calibrados e os analistas devem ser qualificados e adequadamente treinados (ANVISA, 2003).

Estudos de validação de método dependem fundamentalmente da determinação dos parâmetros totais de desempenho do método. Esses parâmetros são obtidos durante o desenvolvimento do método e estudos interlaboratoriais ou segundo protocolos de validação interna (ELLISON; ROSSLEIN; WILLIAMS, 2002).

O analista deve obter resultados que sejam os mais próximos possíveis dos valores verdadeiros através da utilização correta de métodos analíticos. O nível de confiança (que é uma faixa de valores no qual existe uma determinada probabilidade de se encontrar um certo valor de uma variável) que os analistas podem ter nos resultados é relativamente pequeno se eles não conhecerem a exatidão e a precisão do método que usaram, e se não tiverem consciência das fontes de erros que podem afetar os resultados (VOGEL, et al, 2002).

Todo laboratório envolvido com o controle de qualidade precisa garantir que suas análises sejam corretas, exatas e precisas. Para isso, medidas de qualidade devem ser efetuadas como o teste do equipamento (instrumento e computador); a validação do método no equipamento testado e o teste de adequação do sistema (system suitability), envolvendo o equipamento e os métodos validados (LANÇAS, 2004).

A conformidade do sistema pode causar dúvidas quanto aos resultados e, por isso, deve-se levar em consideração, que a resolução e a repetitividade do sistema sejam adequadas para a análise a ser realizada. Assim, a conformidade do sistema deve ser verificada antes que o desenvolvimento do método e a validação tenham sido completados. E, ainda, considerar o sistema como um todo incluindo, além do

sistema de quantificação, seja ele cromatográfico, espectrofotométrico, entre outros, a calibração e manutenção dos equipamentos e instrumentos utilizados em todo o procedimento analítico, dentro das especificações. Neste caso, a conformidade do sistema baseia-se em que os componentes eletrônicos, equipamento de quantificação, operações analíticas e amostras constituem um sistema que pode ser avaliado como um todo (RIBANI et al., 2004).

TABELA 1

Parâmetros de conformidade do sistema e recomendações.

Parâmetro	Recomendação
Fator de retenção (k)	O pico deve estar bem separado de outros picos e do pico correspondente ao tempo de retenção de um composto não retido (t_M), $k > 2$
Repetitividade (RSD) Resolução (R_s)	$RSD < 1\%$ para $n > 5$ $R_s > 2$ entre o pico de interesse e o interferente potencial mais próximo (impureza, produto de degradação)
Fator de alargamento (TF)	$TF \leq 2$

Fonte: USP, 30.

Validar significa confiabilidade analítica no método escolhido ou desenvolvido, para se obter um resultado. Não existe um modelo pronto de como fazer validação. O analista deve validar o método de acordo com a literatura utilizada e as suas necessidades (LEITE, 2002).

Podem ser utilizadas Farmacopéias como a USP (United States Pharmacopoeia), conferências como o ICH (International Conference on

Harmonization), normas como as do INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) artigos de revisão, Guias de validação como o da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) entre outras.

O guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos anexo a resolução 899 de 29 de Maio de 2003 avalia que uma metodologia será considerada validada se atender os parâmetros descritos na tabela 1. O INMETRO possui outros parâmetros descritos no quadro 1.

QUADRO 1

Parâmetros de validação da ANVISA e do INMETRO.

ANVISA	INMETRO
Especificidade e Seletividade	Especificidade e Seletividade
Linearidade	Linearidade
Intervalo	Faixa de trabalho e Faixa linear de trabalho
	Sensibilidade
Limite de detecção (sensibilidade)	Limite de detecção
Limite de quantificação	Limite de quantificação
Exatidão	Exatidão e tendência (<i>bias</i>)
Precisão	Precisão
Repetibilidade (precisão intra-corrída)	Repetitividade
Precisão intermediária (precisão inter - corrída)	Precisão Intermediária
Reprodutibilidade (precisão inter- laboratorial)	Reprodutibilidade
Robustez	Robustez
	Incerteza de medição

Fonte: ANVISA, 2003; INMETRO, 2007.

A Farmacopéia Brasileira é uma entidade que faz parte da ANVISA, portanto os parâmetros analisados serão os que constam na RE 899 de 29 de Maio de 2003.

2.4.1 Especificidade

Uma amostra, de maneira geral, consiste dos analitos a serem medidos, da matriz, e de outros componentes que podem ter algum efeito na medição, como impurezas mas que não são desejáveis quantificar. Quando o método produz resposta para uma substância dentre várias existentes na amostra é chamado específico, e quando o método responde a várias substâncias e consegue responder a uma de cada vez é chamado seletivo.

A especificidade de um método, em uma análise cromatográfica, deve levar em conta parâmetros tais como: resolução, retenção relativa (fator de separação), fator de capacidade (fator de retenção), fator de simetria e número de pratos teóricos (INMETRO, 2007).

Esse ensaio é muito útil para o teste de identificação. É necessário demonstrar a capacidade de seleção do método entre compostos com estruturas semelhantes que podem estar presentes. Isto deve ser confirmado pela obtenção de resultados positivos (preferivelmente em relação ao material de referência conhecido) em amostras contendo o fármaco, comparativamente com resultados negativos obtidos com amostras que não contém o fármaco, mas compostos estruturalmente semelhantes (ANVISA, 2007).

A especificidade para análise quantitativa (teor) e análise de impurezas, pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes e amostras não contaminadas, para demonstrar que o resultado do teste não é afetado por esses materiais. Quando a impureza ou o padrão do produto de degradação não estiverem disponíveis, pode-se comparar os resultados do teste das amostras contendo impurezas ou produtos de degradação com os resultados de um segundo procedimento bem caracterizado (por exemplo metodologia farmacopéica ou outro procedimento validado). Estas comparações devem incluir amostras armazenadas sob condições de estresse (por ex. luz, calor umidade, hidrólise ácida/básica, oxidação).

A linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas se a seletividade não for assegurada (RIBANI, 2004).

2.4.2 Linearidade

É a continuidade na curva de calibração, em que a resposta do método que corresponde de forma diretamente proporcional a concentração da amostra em exame. Para a determinação da linearidade é necessário uma curva de calibração (GIL, 2007). O número de pontos necessários em uma curva de calibração não precisa ser superior a 6 segundo estatísticos dedicados a problemas analíticos. Isto porque a faixa de confiabilidade a nível de 95% de confiança de uma curva de calibração não diminui de maneira significativa quando o analista utiliza mais que

seis pontos. No entanto, o alargamento da faixa de confiabilidade aumenta acentuadamente quando menos de seis pontos são usados para a curva de calibração (VALENTE, 2001).

A proporcionalidade visual da curva de calibração implica que os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de correlação (r), intersecção com o eixo Y, coeficiente angular e desvio padrão relativo. Se não houver relação linear, realizar transformação matemática. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser = 0,99 (ANVISA, 2007).

Um gráfico é construído com as respostas da análise no eixo y e as concentrações correspondentes em escala logarítmica no eixo x. A linha obtida deve ser horizontal sobre toda a faixa linear. São desenhadas outras linhas horizontais paralelas no gráfico, para 95 e 105% da linha da faixa linear. Conclui-se que o método é linear até o ponto onde a resposta relativa intercepta a linha de 95 ou 105% (RIBANI et. al, 2004).

Os fatores limitantes do limite inferior e superior da faixa de concentração são respectivamente os valores dos limites de detecção e de quantificação e o sistema de resposta do equipamento de medição.

A faixa linear de trabalho de um método de ensaio é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível a determinação com a precisão, exatidão e linearidade exigidas, sob as condições especificadas para o ensaio. A faixa linear é definida como a faixa de concentrações na qual a sensibilidade pode ser considerada constante e é normalmente expressa nas mesmas unidades do resultado obtido pelo método analítico (INMETRO, 2007).

2.4.3 Intervalo

O intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Para o teste de teor a faixa de linearidade deve estar compreendida entre 80-120% do valor teórico (ANVISA, 2003).

2.4.5 Limite de detecção (sensibilidade)

Capacidade de um método de avaliar baixas concentrações. O limite de detecção do equipamento (*LDE*) é definido como a concentração do analito que produz um sinal de três a cinco vezes a razão sinal/ruído do equipamento. O limite de detecção do método (*LD*) é definido como a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95% ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero (INMETRO, 2007). É aplicado para ensaios limite calculado pela fórmula:

$$\frac{DP}{b} \times 3$$

DP= desvio padrão

b= inclinação da reta

2.4.6 Limite de quantificação

O limite de quantificação é um parâmetro determinado, principalmente, para ensaios quantitativos de impurezas, produtos de degradação em fármacos e produtos de degradação em formas farmacêuticas e é expresso como concentração do analito (por exemplo, porcentagem p/p ou p/v, partes por milhão) na amostra (ANVISA, 2007). É aplicado para testes de teor. Pode ser calculado pela fórmula:

$$\frac{DP}{b} \times 10$$

DP= desvio padrão

b= inclinação da reta

2.4.7 Exatidão

Parâmetro que relaciona os resultados encontrados pelo método proposto com um valor conhecido (padrão). Deve-se usar concentrações conhecidas de padrão e comparar com a amostra. A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança. A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações contemplando o

intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (ANVISA, 2007). Tal parâmetro está relacionado com a seletividade, linearidade do método, validade dos padrões utilizados, calibração dos instrumentos e condições da recuperação. Pode ser calculado pela fórmula:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

2.4.8 Precisão

A precisão é a repetibilidade dos resultados obtidos em uma série de análises de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis.

Repetibilidade (precisão intra-corrida): concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. Na repetibilidade do método é verificado por, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas, cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste;

Precisão intermediária (precisão inter-corridas): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes.

Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial): concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopéias. Estes dados não precisam ser apresentados para a concessão de registro. A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas. A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a fórmula,

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

em que, DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada.

O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5%.

2.4.9 Robustez

Relaciona a capacidade do método de ser afetado por pequenas variações, indica sua confiança durante o uso normal. Os principais parâmetros que podem resultar em variação na resposta do método estão relacionadas no quadro 2:

QUADRO 2

Parâmetros avaliados na robustez

Preparo das Amostras	<ul style="list-style-type: none"> · Estabilidade das soluções analíticas · Tempo de extração
Espectrofotometria	<ul style="list-style-type: none"> · Variação do pH da solução · Temperatura · Diferentes fabricantes de solventes
Cromatografia Líquida	<ul style="list-style-type: none"> · Variação do pH da fase móvel · Variação na composição da fase móvel · Diferentes lotes ou fabricantes de colunas · Temperatura · Fluxo da fase móvel
Cromatografia Gasosa	<ul style="list-style-type: none"> · Diferentes lotes ou fabricantes de colunas · Temperatura · Velocidade do gás de arraste

Fonte: ANVISA, 2003.

2.5 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO BESILATO DE ANLODIPINO

2.5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é um importante membro de toda família de técnicas de separação, uma vez que consegue separar misturas que contêm um grande número de compostos similares.

A CLAE utiliza instrumentos que podem ser totalmente automatizados. É um tipo de cromatografia líquida que emprega colunas recheadas com materiais especialmente preparados e uma fase móvel, eluída sob altas pressões. A técnica tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande variedade de compostos presentes em diversos tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e detectabilidade (COLLINS, 2006).

A cromatografia líquida apresenta vantagens em relação aos outros métodos de análise pois o procedimento é simples e razoavelmente rápido; exige conhecimento do efeito das variáveis cromatográficas sobre as interações intermoleculares, que conduzem à separação. Necessita, portanto, para uma utilização eficiente, de bastante experiência por parte do analista. A análise instrumental permite maior resolução, automação de operações, registro e processamento da informação obtida, são requeridas apenas pequenas quantidades de material. O método tem sido utilizado com êxito na separação e isolamento de grupos de metais difíceis de tratar pela análise qualitativa de rotina (cromatografia por troca iônica) e ainda o isolamento de frações enriquecidas em certos analitos para posterior recristalização, purificação e análise (AQUINO, 2003).

2.5.1.1 Composição do cromatógrafo

O cromatógrafo a líquido é constituído por reservatórios de solvente, filtros, bombas, misturador para fase móvel, amortecedores de pulso, pré-coluna, injetor, forno da coluna, detectores e sistema de tratamento dos sinais (SOARES, 2006).

- reservatórios de solvente: são recipientes para a fase móvel;
- filtros: são colocados nos reservatórios de solventes, na saída das bombas e na tubulação do instrumento (filtro de linha) para evitar a entrada de partículas que poderiam causar entupimento ou formação de depósitos em razão de produtos de corrosão das bombas;
- sistemas de bombeamento: são usadas para levar a fase móvel até a coluna;
- misturador da fase móvel: usado para homogeneizar as diferentes quantidades de solventes utilizados na fase móvel;
- amortecedores de pulso: instalado entre a bomba e o injetor para manter a fase móvel sem pulsos;
- pré-coluna: manter a fase móvel saturada com sílica, evitando a dissolução do empacotamento quando sua base for de sílica ou de sílica modificada, prolongando o tempo de uso da coluna;
- Injetor: pode ser manual ou automático;
- forno da coluna: permite manter a temperatura controlada, quando necessário;
- detectores: dispositivos sensíveis que emitem um sinal proporcional à concentração;
- sistema de tratamento de sinais: registram os sinais do detector. Podem ser integradores ou microcomputadores que registram e realizam cálculos.

2.5.1.2 Medições fundamentais

Tempo de retenção: t_R tempo que leva um composto qualquer para eluir (sair) da coluna por unidade de tempo. Inclui o tempo em que passou sendo arrastado pela fase móvel e o tempo que passou retido na fase estacionária. Se um composto apresenta o mesmo tempo de retenção nas mesmas condições (fase móvel, fase estacionária, temperatura, e vazão) que outro composto pode se tratar de compostos iguais, porém se o tempo de retenção não for o mesmo certamente são compostos diferentes (SOARES, 2006).

Tempo morto: T_m ou t_0 = tempo que um composto que não possui afinidade com a fase estacionária leva para percorrer a coluna. Geralmente é expresso em minutos. É representado pela primeira perturbação na linha de base (SOARES, 2006).

Volume morto: V_m ou V_0 = o volume de fase móvel que cabe em uma coluna, geralmente expresso em mL ou cm^3 . Pode ser calculado dividindo-se a vazão da fase móvel pelo tempo morto. A vazão é fixada pelo analista, mas, pode ser medida coletando-se a fase móvel em uma proveta, por um determinado período de tempo (SOARES, 2006).

2.5.1.3 Fases estacionárias e principais mecanismos de separação

O tamanho e a forma da partícula usada como fase estacionária ou como suporte para a fase estacionária, vai afetar a quantidade de amostra que pode ser separada no processo cromatográfico (SOARES, 2006).

Os adsorventes mais utilizados em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) são a sílica e a alumina. A sílica suporta pH entre 2 e 8, enquanto a alumina deve ser usada com valores de pHs entre 2 e 12. A sílica é o material mais utilizado em CLAE.

De acordo com os solventes utilizados como fase móvel, pode-se classificar tal fase como reversa e normal.

A fase reversa caracteriza-se por presença de água e solventes miscíveis em água e a fase estacionária é mais apolar que a fase móvel. A fase normal utiliza-se de solventes apolares e a fase estacionária é mais polar que a fase móvel.

2.5.1.4 Seletividade da fase móvel

Para um bom resultado a substância analisada deverá ser solúvel na fase móvel e a viscosidade do solvente também deverá ser observada, pois compostos muito viscosos apresentaram altas pressões mesmo em fluxos baixos.

2.5.1.5. Método da Farmacopéia Britânica

A Farmacopéia Britânica V edição descreve a análise quantitativa do besilato de anlodipino.

Método para determinação da concentração:

Fase móvel: 15 volumes de acetonitrila R, 35 volumes de metanol e 50 volumes da solução 7 mL de trietilamina R em um litro de água, e ajustar o pH $3,0 \pm 0,1$ com ácido fosfórico R.

Deteção: comprimento de onda 237 nm UV

Injeção: 10 mL, injeção da solução teste e soluções de referência.

Tempo de retenção: cerca de 7 min

2.5.1.6 Métodos por cromatografia líquida de alta eficiência

- Malesuik e colaboradores utilizaram coluna RP18 usando uma fase móvel composta de 0,1% (v/v) de ácido ortofosfórico (pH 3,0) e acetonitrila (60 + 40, v/v) em uma taxa de fluxo de 1,0 mL/min, nas concentrações de 10-30 mcg/mL. Foi obtido desvio padrão menor que 2% e exatidão maior que 98%. Este método pode ser usado para quantificar o besilato de anlodipino presente em cápsulas e comprimidos (MALESUIK et al., 2006).

- WU, PAN e ZENG desenvolveram um método para quantificação do besilato de anlodipino. em coluna C18 com fase reversa e uma fase móvel composta do tampão fosfato e acetonitrila (45:55, v/v, pH 4,5) com detecção UV 250 nm. O propranolol foi usado como o padrão interno. A curva padrão mostrou-se linear sobre a escala da concentração de 0,2 – 30,0 mcg/mL ($r=0.9993$), e os limites da determinação eram 20 ng/mL. (WU ; PAN; ZENG, 2003).
- Zarghi e colaboradores descreveram um método que permite a medida do besilato de anlodipino em plasma humano para um limite detectável mínimo de 0,2 ng/mL. O método envolve o procedimento simples, baseado em uma etapa da extração e recuperação analítica de aproximadamente 97%. Coluna de Nucleosil C8, comprimento de onda em 239 nm. A fase móvel é uma mistura do tampão de dihidrogenofosfato de sódio 0,01 M e acetonitrila (63:37, v/v) ajustado para um pH de 3,5 em uma taxa de fluxo de 1,5 mL/min. (ZARGHI et al., 2005).
- O besilato de anlodipino em soro humano pode ser quantificado pela coluna C18 e uma fase móvel de tampão fosfato de sódio (pH 2,5) que contém 1 mL/L de metanol e trietilamina, e um de fluxo de 2,8 mL/min. O propranolol foi usado como o padrão interno. A curva padrão se apresenta linear na faixa de 0,25-16 ng/mL do besilato de anlodipino. O método apresenta boa reprodutibilidade e bom coeficiente de variação, mais ou menos de 12% para todos os resultados (BAHRAMI, 2004).
- A separação de estereoisômeros do besilato de anlodipino por HPLC foi realizada com uma coluna (AGP). A preparação apropriada da amostra e o uso de uma técnica de coluna-switching conduziram a uma separação de enantiômeros. Uma coluna quiral-AGP 150x10 mm foi usada para separar os enantiômeros do anlodipino racêmico. Para 16 mg de uma mistura racêmica do besilato de anlodipino foram encontrados 10,4 mg da forma dextrógira D (+), em 20 mL de etanol 20% e

7,2 da forma L (-), em 20 mL de etanol 20%. O anlodipino racêmico foi preparado dissolvendo a substância padrão pura em 20 mL de etanol 20%.

A fase móvel para a separação quiral de enantiômeros do anlodipino foi um tampão de acetato de 10 mM (pH 4.5) com 1% (v/v) de propanol.

Foi usada uma coluna analítica quiral de AGP (ChromTech, Hægersten, Sweden) 150 x 4,0 mm I.D . O fluxo foi de 0,9 mL/min A separação foi realizada acima de 30°C. O primeiro detector ($\lambda=240$ nm) foi usado somente para testar o sistema, ajustando-se o comprimento de onda conforme a estabilização.

Após a separação dos diastereoisômeros, uma coluna analítica simetria C8 de 4 mm (Waters®) foi usada na segunda etapa.

A fase móvel foi tampão de acetato de 10 mM, (pH 4,5) e acetonitrila (55: 45, v/v). A temperatura estabiliza em 30°C e em 240 nm no detector UV (LUKSA et al.,1997).

2.5.2 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas é um método para identificar os diferentes átomos que compõem uma substância. Um espectrômetro de massa bombardeia uma substância com elétrons para produzir íons, ou átomos eletricamente carregados. Os íons atravessam um campo magnético cujas trajetórias apresentam curvas diferentes, dependendo de suas massas. O campo separa os íons em um

padrão chamado espectro de massa. A massa e a carga dos íons podem ser medidas por sua posição no espectro.

A espectrometria de massas fragmenta um composto isolado por técnicas como a cromatografia gasosa ou líquida, coleta os fragmentos que possuem carga e fornece um histograma (representação gráfica de retângulos justapostos) (SOARES, 2006).

A técnica de impacto de elétrons (EI) mais utilizada consiste em um espectrômetro de massa bombardeando moléculas na fase de vapor com um feixe de elétrons de alta energia; o resultado do impacto dos elétrons é registrado como um espectro de íons separados na base de acordo com a razão massa carga (m/z). (SILVERSTEIN, 1994).

2.5.2.1 Método por espectroscopia de massa

Massaroti e colaboradores desenvolveram um método por espectroscopia de massa para a determinação do besilato de anlodipino. Foi utilizado um sistema LC Agilent munido de bomba isocrática. A solução padrão possuía concentração de 100 mcg/mL de besilato de anlodipino em acetonitrila. Foram utilizados fase móvel composta por ácido fórmico 0,1% (v/v) em acetonitrila e água (80:20 v/v), uma coluna C18 (50X20 mm) Phenomenex®, fluxo 0,5 mL/min, injeção 15 mcL e encontrado um tempo de retenção de 1,9 min. A temperatura variou 100 a 300°C. A curva possuía pontos com as concentrações de 0,2 mcg/mL, 0,5 mcg/mL, 1,0 mcg/mL, 5,0 mcg/mL e 10 mcg/mL (MASSAROTI et al., 2005).

2.5.3 Eletroforese

As técnicas eletroforéticas empregadas em controle de qualidade são a eletroforese em gel e a eletroforese capilar. Ambas empregam a aplicação de uma diferença de potencial sobre uma solução ou gel onde se encontra solubilizado o analito. Essa diferença de potencial faz com que os elementos carregados migrem em direção ao pólo de carga oposta. Caso o analito apresente carga ele poderá migrar sozinho para o eletrodo. Caso seja neutro, precisará formar um complexo com algum elemento carregado que servirá como um carreador. O dodecil sulfato de sódio (SDS) é muito utilizado na forma de micelas carregadas.

A eletroforese emprega géis dispostos em placas. As placas são mantidas na horizontal e os eletrodos mantidos na extremidade da placa de gel. Devido à baixa resistência elétrica, voltagens muito altas, superiores a 200 volts, não podem ser aplicadas, pois aqueceria muito o sistema. Uma saída para o problema foi o surgimento da eletroforese capilar (CE), que possui capilares ocos suportando uma voltagem de até 30 kvolts (GIL, 2007).

Na eletroforese capilar (EC), a solução contendo eletrólitos e moléculas neutras é movida através do capilar, impulsionada pelo fenômeno denominado eletrosmose. O chamado fluxo eletrosmótico é causado pela carga que se forma na parede do capilar e mesmo capilares de teflon exibem esse fenômeno. No caso de capilares de sílica fundida, a superfície de contato com o líquido contido no capilar contém grupos silanol (Si-OH), que podem sofrer ionização formando grupos silanoato (SiO^-) (SOARES, 2006).

2.5.3.1 Método por cromatografia eletrocinética micelar (mekc)

A cromatografia eletrocinética micelar (MEKC) é uma adaptação da eletroforese capilar, principalmente empregada na análise eletrocinética de compostos neutros, mas é também eficaz na separação de compostos iônicos que tem mobilidades eletroforéticas similares.

A MECK requer a adição de surfactantes carregados, formando micelas, para que os eletrólitos retornem com um nível maior do que a concentração crítica da micela. As micelas têm sua própria mobilidade eletroforética, que é diferente da fase aquosa que a envolve.

A MEKC foi executada em um sistema electroforético capilar HP CE equipado com um detector UV.

A solução padrão foi preparada dissolvendo o besilato de anlodipino em acetonitrila e água (50:50, v/v) na concentração de 1000 mcg/mL. A solução padrão foi diluída em tampão de borato de 50 mM e pH 8,2, contendo 20 mM de dodecil sulfato de sódio. Todas as soluções foram preparadas nos balões volumétricos de vidro âmbar devido à fácil fotodegradação do anlodipino, e armazenadas sob refrigeração.

As amostras foram injetadas pela pressão (4 s, 50 mbar) em um capilar de sílica fundida (serviços compostos do metal, Worcester, Inglaterra) de 58.5 cm×75 µm I.D.×375 µm O.D. com uma faixa de detecção de 50 mcg/mL. A temperatura capilar foi mantida constante a 23,0 ±0,01°C e uma tensão de +25 quilovolts

(corrente, 30 μ A) foi aplicada. O detector UV foi ajustado entre 200 a 236 nm. A temperatura foi mantida em $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ (LUKSA et al., 1997).

2.5.4 Espectrofotometria

A espectrometria de absorção molecular está baseada na medida da transmitância T ou absorbância A de soluções contidas em células transparentes tendo percorrido um caminho óptico (EWING, 1997).

A absorção molecular na região ultravioleta ou visível do espectro depende da estrutura eletrônica da molécula. A absorção de energia é quantizada, e conduz a passagem dos elétrons de orbitais do estado fundamental para orbitais em um estado excitado de maior energia (SILVERSTEIN, 1994).

As informações estruturais fornecidas por um espectro no ultravioleta e no visível são mais do tipo negativo, ou seja, mais por exclusão do que afirmação. Quando não há absorção entre 220 e 800nm, o composto não contém cromóforos de conjugação, ou anel benzênico, ou grupos do tipo cetônico, aldeído, nitro, ou halogênios (SOARES, 2006).

A absorção de radiação eletromagnética vai ser observada quando a radiação atravessar uma solução que contenha moléculas capazes de absorvê-la. A absorção será diretamente proporcional ao número de centros absorventes (SKOOG, 2002).

Esse comportamento possibilita a quantificação de compostos e é descrito pela Lei de Beer: "Incrementos sucessivos no número de moléculas de igual poder de absorção, situadas no percurso do feixe de radiação monocromática, absorvem

iguais porções da energia radiante que as atravessa”. A absorvância é proporcional ao número de partículas que efetivamente absorvem a radiação em um determinado comprimento de onda. Desta forma a lei de Beer permite medir a concentração de duas substâncias na mesma amostra desde que não haja interação entre as mesmas (SOARES, 2006).

Um espectro de ultravioleta que abrange a faixa de comprimento de onda entre 200-380 nm é produzido na forma de um gráfico onde o eixo x representa as concentrações estudadas, e o eixo y as absorvâncias do composto em análise. Compara-se o resultado da leitura do padrão com o resultado da leitura da amostra. É um método de fácil execução, rápido, e de baixo custo (HARRIS, 2005).

2.5.4.1 Método por espectrofotometria

BASAVIAH e colaboradores desenvolveram um método baseado na redução de ferro (III) por parte dos fármacos estudados em meio ácido e subsequente interação de ferro (II) com ferricianeto para formar azul prussiano. O produto apresenta absorção máxima a 760 nm. Concentração de 5-15 mcg/mL de besilato de anlodipino, 2 mL FeCl_3 (0,2%) e de ferricianeto (0,2%) foram adicionados a cada balão, bem misturado e deixados em repouso durante 10 min. Por último, 1,0 mL de H_2SO_4 10 M foi adicionado a cada balão e o volume completado para 10mL com água. A absorvância da solução resultante foi medida a 760 nm mediante um

branco preparado de forma semelhante (BASAVAIAH, K.; CHANDRASHEKAR, U.; PRAMEELA, H.C., 2003).

2.5.5 Outros métodos de quantificação e identificação do besilato de anlodipino

Quantificação

Rahman e Nasrul realizaram metodologia baseada em reação de complexação de transferência da carga do anlodipino besilato com 2,3-dicloro 5,6-diciano 1,4 benzoquinona (DDQ) para dar um produto colorido com absorvância máxima a 580 nm (RAHMAN; NASRUL, 2003).

- O besilato de anlodipino foi determinado através da interação com ácido ascórbico em uma solução com N, N-dimetilformamida (DMF) apresentando absorvância máxima em 530 nm. Sob as circunstâncias experimentais otimizadas, as concentrações das amostras foram de 1,0 a 125,0 e 10,0 a 140,0 mcg/mL com DDQ e ácido ascórbico, respectivamente. Ambos os métodos foram aplicados com sucesso para a análise do besilato de anlodipino em formulações farmacêuticas (RAHMAN; NASRUL, 2003).
- Foi verificada a interação do besilato de anlodipino com tetrahidrato de heptamolibdato de amônio, resultando na formação do azul de molibdênio (λ_{max} 825 nm). Os resultados dos procedimentos propostos foram validados estatisticamente e comparados com aqueles obtidos pelo método de referência. Os métodos propostos foram aplicados com sucesso à determinação do besilato de anlodipino em comprimidos (RAHMAN, 2004).

Identificação

- O besilato de anlodipino pode ser identificado dissolvendo-se 5 µg em solução de 1% de HCl 0,1M em metanol. Completa-se o volume para 100 mL com a solução ácida. Efetuar a leitura entre 300 nm e 400 nm. A solução mostra absorção máxima em 400 nm (BRITISH, 2005).
- Absorção espectrofotométrica no infravermelho comparada com o padrão (teste A).
- Examinar cromatogramas obtidos no teste A para relatar substâncias na luz ultravioleta 366nm.
- Dissolver 5.0 mg de besilato de anlodipino em solução 1% v/v de ácido clorídrico 0,1M em metanol e diluir para 100 mL com a mesma solução ácida. Ao examinar entre 300 nm e 400 nm, a solução mostra absorção máxima em 360 nm. A absorbância máxima específica é de 113 a 121 (PHARMACOPOEIA E, 2004; PHARMACOPOEIA B.2005.)

3 JUSTIFICATIVA

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas através de métodos precisos, exatos, reprodutíveis e robustos, tem aumentado nos últimos anos. A legislação em vigor e o mercado cada vez mais competitivo e exigente, tornam obrigatória a validação de métodos analíticos.

A Farmacopéia Brasileira, carente de novas monografias, necessita que sejam inseridos novos fármacos assim como métodos de análise, portanto a importância deste trabalho, cujo objetivo é a inserção da monografia do besilato de anlodipino no referido compêndio.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Todos os reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico.

4.1.1 Solventes e reagentes

- Matéria-prima do besilato de anlodipino
- Amostras de comprimidos de 5 mg e 10 mg, doadas pelo laboratório Medley[®], amostra e placebo;
- Acetonitrila (Merck[®]) grau cromatográfico;
- Ácido fosfórico;
- Água destilada;
- Água ultrapurificada através do sistema Mili-Q[®] Plus; com resistividade igual a 18,2 Ωcm a 25°C;
- Metanol (Merck[®]) grau cromatográfico;
- Metanol grau espectrofotométrico;
- Soluções tampão fosfato pH 4,0 e 7,0 (Digimed[®]);
- Trietilamina (TEA);

4.1.2 Substância química de referência

Substância química de referência besilato de anlodipino lote AB21821LT05, teor 99,6%.

O fármaco empregado como substância química de referência, assim como as amostras utilizadas nessa dissertação foram gentilmente cedidos por laboratório farmacêutico.

4.1.3 Amostras

Foram utilizadas amostras de comprimidos de 5 mg e 10 mg, doadas pelo laboratório Medley® e amostra e placebo preparados no Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo cujas fórmulas são descritas a seguir:

Formulado de besilato de anlodipino de 5 mg

Excipiente	Quantidade
	%P/P
Estearato de magnésio	2,33
Celulose microcristalina	7,69
Fosfato dibásico de Cálcio	5,64
Besilato de anlodipino	5,0
Amido glicolato de sódio	qsp 100g

Placebo

Excipiente	Quantidade
	%P/P
Estearato de magnésio	2,33
Celulose microcristalina	7,69
Fosfato dibásico de Cálcio	5,64
Amido glicolato de sódio	qsp 100g

4.1.4 Equipamentos e acessórios

- Aparelho de ultra-som, Thornton[®], modelo T-14;
- Agitador mecânico modelo 103 (Nova Ética[®]);

- Balança Analítica – Marca Sartorius®, capacidade 100 g, precisão $\pm 0,0001$;
- Cromatógrafo a líquido CG 480C. com válvula injetora com volume fixo de 20 μL , detector UV, modelo CG 435, Integrador CG modelo 200;
- Sistema cromatográfico HPLC 10 vp Shimadzu®: degaseificador DGU-14A; bomba binária LC-10ADvp; injetor automático com Loop de 50 μL Sil-10ADvp; compartimento de coluna CTO-10ACvp; detector de arranjo de diodos UV-Vis SPD-M10Avp; controlador do sistema SCL-10Avp; software LC Workstation Class-Vp 5.1.2; computador com Windows Millennium;
- Espectrofotômetro ultravioleta/visível Shimadzu® UV - 1601, munido de cubetas de quartzo, de 1 cm de caminho óptico e acoplado a computador e impressora Epson – FX 850;
- Coluna LiChrospher® 100RP-18 (5 μm) Merck®;
- Coluna Synergi hydro RP, Phenomenex®, 250 x 4,6 mm
- Medidor de pH Digimed®, modelo TE-91;
- Balança analítica eletrônica BG-2000 Gehaka®;
- Aparelho MiliQ-Plus, Milipore® para obtenção da água purificada;
- Membranas filtrantes HV 0,45 μm de poro e 13 mm de diâmetro (Milipore®);
- Vidraria usual do laboratório;

4.2 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.2.1 Espectrofotometria no visível

Ensaio preliminar

19/06/11
Pesou-se analiticamente 50 mg de besilato de anlodipino padrão e transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL. Utilizou-se 5 mL de metanol para dissolver o fármaco e a seguir o volume foi completado com água destilada. Transferiu-se 2,45 mL para balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com água destilada, sendo a concentração final 49 mcg/mL.

Fez-se varredura na região de 190-500 nm para o placebo e o padrão. A substância apresentou melhor absorção em 364,40 nm. O placebo não apresentou absorbância significativa.

Figura 2- Espectro de absorção da solução do placebo em MeOH/H₂O 5:95, na primeira diluição e na segunda diluição somente água.

Do balão de 50 mL contendo a solução padrão de 1mg/mL transferiu-se 6 alíquotas (2,05 mL; 2,25 mL; 2,45 mL; 2,65 mL; 2,85 mL; 3,05 mL) para diferentes balões volumétricos de 50 mL completando-os com água destilada. Foram obtidas soluções com concentração de 41mcg/mL, 45 mcg/mL, 49 mcg/mL, 53 mcg/mL, 57 mcg/mL e 61 mcg/mL do padrão de besilato de anlodipino.

Figura 3- Espectro da solução padrão na concentração de 49 mcg/mL em MeOH/H₂O 5:95, na primeira diluição e na segunda diluição somente água.

4.2.2 Ensaios realizados no cromatógrafo CG

Ensaio 1. Testou-se a amostra de besilato de anlodipino padrão no cromatógrafo CG a líquido CG 480C com válvula injetora com volume fixo de 20 mL, detector UV, modelo CG 435, integrador CG modelo 200 utilizando a fase móvel tampão fosfato e acetonitrila (45:55), pH 4,5 (acidificado com ácido fosfórico), comprimento de onda 250 nm, detector UV, fluxo de 1mL/min e coluna C18. A substância apresentou um tempo de retenção de 3,2 min.

O teste foi repetido com fase móvel metanol e água em diversas proporções (60:40; 65:35; 55:45), mas sem tampão; a concentração usada de padrão de besilato de anlodipino foi de 30,0 mcg/mL.

Em algumas injeções a água da fase móvel também foi acidificada para pH 3,5 com ácido fórmico, mas não se observou alterações significativas.

Também foi testada uma fase móvel composta de trietilamina 0,1% em água e álcool isopropílico (65:35 v/v), coluna C18 e comprimento de onda 220 nm. Não foi obtido cromatograma satisfatório.

4.2.3 Ensaio realizado no cromatógrafo Shimadzu

Condições: coluna C18 Synergi hydro RP, Phenomenex®, 250 x 4,6 mm, fase móvel metanol e água nas proporções (25:75, 30:70, 35:65, 20:80 v/v) e solução acidificada com ácido fosfórico pH 2,0. A melhor relação estabelecida foi de 35:65v/v com um tempo de retenção 4,45 min para um T_0 de 2,44 min.

Figura 4 - Cromatograma da solução padrão do besilato de anlodipino de concentração 24 mcg/mL. Condições cromatográficas: fase móvel metanol e água (35:65v/v), detecção λ 210 nm, coluna C18 Synergi hydro RP, Phenomenex®, 250 x 4,6 mm, fluxo 1mL/min.

4.2.3.1 Ensaios realizados com a coluna LiChrospher® 100RP-18 (5µm) Merck®: condições: fluxo de 1mL/min e concentração de 200 mcg/mL.

Ensaio 1 Tampão (800 mL de água + 7mL de trietilamina) acidificado para pH 3,0 com ácido fosfórico, ACN e metanol (50:35:15) v/v, λ = 238nm, tempo de retenção 10 min, t_0 = 1,33 minutos

Ensaio 2 Tampão (800 mL de água + 7 mL de trietilamina) acidificado para pH 3,0 com ácido fosfórico e metanol (45:55) v/v, λ = 238nm, tempo de retenção 9,22 min, t_0 = 1,33 minutos

Ensaio 3 Tampão (800 mL de água + 7mL de trietilamina) acidificado para pH 3,0 com ácido fosfórico e metanol (35:65) v/v, λ = 238nm, tempo de retenção 3,41 min, t_0 = 1,23 minutos

Ensaio 4 Tampão (800 mL de água + 8 mL de trietilamina) acidificado para pH 3,0 com ácido fosfórico e metanol (35:65) v/v, λ = 238nm, tempo de retenção 3,58min, t_0 = 1,25 minutos

Ensaio 5 Tampão (800 mL de água + 8 mL de trietilamina) acidificado para pH 5,0 com ácido fosfórico e metanol (35:65) v/v, λ = 238nm, tempo de retenção 3,58min, t_0 = 1,25 minutos

O método de escolha foi o ensaio 5, pois a solução é menos ácida danificando menos a coluna.

Figura 5- Cromatograma de uma solução do padrão do besilato de anlodipino de concentração 24 mcg/mL. Condições cromatográficas: fase móvel metanol e água, com TEA 1% acidificada com ácido fosfórico pH 5.0, (35:65v/v), detecção λ 238 nm Coluna LiChrospher® 100RP-18 (5 μ m) Merck®;fluxo 1mL/min e tempo de retenção 3,7min.

5 RESULTADOS

5.1 RESULTADOS OBTIDOS POR ESPECTROFOTOMETRIA

5.1.1 Identificação

O resultado realizado para identificação do besilato de anlodipino, segundo a British Farmacopoeia, mostrou-se satisfatório apresentando absorbância máxima a 360 nm.

5.1.2 Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (ANVISA, 2003). Foi determinada por meio de curvas padrão, obtidas em 6 níveis de concentração: 41 mcg/mL, 45 mcg/mL, 49 mcg/mL, 53 mcg/mL, 57 mcg/mL, 61 mcg/mL.

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

TABELA 2

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

Concentração de leitura mcg/mL	absorbância	absorbância	absorbância	absorbância *	DP
41	0,4827	0,4850	0,4830	0,4835	0,00125
45	0,5332	0,5313	0,5326	0,5323	0,00097
49	0,5778	0,5850	0,5750	0,5791	0,00020
53	0,6261	0,6202	0,6202	0,6222	0,00055
57	0,6761	0,6747	0,6732	0,6747	0,00025
61	0,7222	0,7218	0,7214	0,7217	0,00021
MÉDIA				0,59679	0,00044

* Média de três determinações para cada concentração

LINEARIDADE

Figura 6 - Curva analítica para determinação de besilato de anlodipino, nas concentrações de 41, 45, 49, 53, 57 e 61 mcg/mL em metanol : água destilada (5:45v/v). Equação da reta $a = 0,0118x + 0,005$ $R^2 = 0,9995$.

Figura 7- Sobreposição dos espectros de absorção das soluções padrão nas concentrações de 41, 45, 49, 53, 57 e 61 mcg/mL de besilato de anlodipino em metanol e água (5:45).

TABELA 3

Análise estatística dos resultados obtidos na determinação da curva analítica de besilato de anlodipino. Leituras efetuadas em comprimento de onda 364,4nm.

Intervalo de concentração	41-61 mcg/mL
Coefficiente de correlação	0,9995
Inclinação da reta	0,0119
Teste F	2,4769
Desvio padrão relativo	0,007372
LD (mcg/mL)	0,5407
LQ (mcg/mL)	1,803
Coefficiente linear	19717,12
Erro padrão	0,002145

5.1.3 Limite de detecção e limite de quantificação

$$\text{Limite de detecção} = \frac{DP}{b} \times 3 = \frac{0,002145}{0,0119} \times 3 = 0,5407 \text{ mcg/mL}$$

$$\text{Limite de quantificação} = \frac{DP}{b} \times 10 = \frac{0,002145}{0,0119} \times 10 = 1,803 \text{ mcg/mL}$$

Em que DP = desvio padrão

b = coeficiente linear

5.1.4 Exatidão

A exatidão foi determinada através de teste de recuperação em três concentrações distintas. Quantidades conhecidas de padrão foram adicionadas a quantidades fixas de amostras e fez-se o cálculo de recuperação de padrão adicionado.

$$\text{Exatidão} = \left[\frac{(LT - LA)}{LP} \times CP \right] \div PA \times 100\%$$

em que LT é o valor da leitura total, LA é o valor de leitura da amostra, LP é o valor de leitura do padrão e PA é a quantidade de padrão adicionado.

Para a preparação das soluções-mãe de padrão e de amostras de besilato de anlodipino adotou-se o seguinte procedimento:

Para a preparação das soluções padrão de besilato de anlodipino, pesaram-se 50 mg de matéria-prima de besilato de anlodipino, transferiram-se para um balão de 50 mL, adicionou-se 5 mL de metanol e completou-se o volume com água e filtrou-se, em seguida (solução-mãe padrão, 1 mg/mL).

No caso dos comprimidos, pesaram-se massas equivalentes a 50 mg de besilato de anlodipino e transferiram-se para balões de 50 mL. Adicionaram-se 5 mL de metanol e completou-se o volume água (soluções-mãe das amostras, 1 mg/mL).

Foram, então, preparadas as soluções em triplicata contendo padrão e amostra de besilato de anlodipino, conforme a tabela 4. As diluições foram feitas com água destilada.

Figura 8- Espectro de absorção das soluções (padrão+amostra) nas concentrações de 22,5; 22,5; 45; 49 e 53 mcg/mL da solução padrão de besilato de anlodipino MeOH/H₂O 5:95, na primeira diluição e na segunda diluição somente água.

TABELA 4

Resultados experimentais obtidos na recuperação de solução padrão de besilato de anlodipino adicionada às soluções amostra de besilato de anlodipino 5 mg(A), 10 mg (B), e formulado 5 mg (C) empregando o método espectrofotométrico.

Amostra	Concentração de leitura da amostra mcg/mL	Concentração de leitura mcg/mL Padrão	Concentração total	Absorbâncias médias*	Concentração encontrada na amostra	Recuperação (%)
		22,5	22,5	0,2661		
	22,5		22,5	0,2596		
A	22,5	22,5	45	0,5276	22,66	100,7
	26,5	22,5	49	0,5725	26,45	99,8
	30,5	22,5	53	0,6199	30,44	99,8
	22,5			0,2610		
B	22,5	22,5	45	0,5216	22,03	97,9
	26,5	22,5	49	0,5702	26,13	98,6
	30,5	22,5	53	0,6135	29,6	97
	22,5			0,2605		
C	22,5	22,5	45	0,5240	22,25	98,9
	26,5	22,5	49	0,5718	26,31	99,3
	30,5	22,5	53	0,6142	29,92	98,01

* Média de três determinações para cada concentração

5.1.5 Precisão

Foi utilizado o ponto médio da linearidade. Foram analisadas 10 amostras durante três dias consecutivos nas concentrações de 49 µg/mL das amostras 5 mg (A), 10 mg (B) e formulado 5 mg (C). As amostras foram obtidas pesando-se 1,426 mg correspondente ao peso médio de 20 comprimidos de 5 mg. Transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL, acrescentou-se 5 mL de metanol e completou-se o volume com água destilada. O procedimento para a obtenção das soluções na concentração de 49 mg/mL é o mesmo descrito na linearidade. Os resultados dos comprimidos analisados, 5 mg (A), 10 mg (B) e formulado 5 mg (C), estão apresentados nas tabelas 5, 6, e 7 respectivamente.

TABELA 5

Resultados experimentais das soluções da amostra (A) de besilato de anlodipino, utilizados para determinação da precisão do método espectrofotométrico MeOH/H₂O 5:95 na primeira diluição e na segunda diluição somente água para a amostra de 5 mg (A).

Concentração de leitura mcg/mL	Amostra A*	Desvio padrão em relação as três medidas
49	0,5729	0,002443
49	0,5747	0,000737
49	0,5752	0,005237
49	0,5775	0,000400
49	0,5756	0,004053
49	0,5784	0,001266
49	0,5751	0,000954
49	0,5726	0,001952
49	0,5768	0,001450
49	0,5758	0,002281
Média	0,5759	0,001457
DPR(%)		0,3518

* Média de três determinações para cada concentração

Figura 9- Espectro de absorção das soluções da amostra de comprimido de besilato de anlodipino 5 mg (A) nas concentrações de 49 mcg/mL em metanol 5:95 MeOH/H₂O, na primeira diluição e na segunda diluição somente água.

TABELA 6

Resultados experimentais das soluções da amostra 10 mg (B) de besilato de anlodipino, utilizados para determinação da precisão do método espectrofotométrico MeOH/H₂O 5:95 na primeira diluição e na segunda diluição somente água para a amostra de 10 mg (B).

Concentração de leitura mcg/mL	Amostra B*	Desvio padrão em relação as três medidas
49	0,5760	0,001365
49	0,5759	0,004822
49	0,5764	0,003356
49	0,5757	0,000346
49	0,5727	0,002848
49	0,5746	0,002470
49	0,5749	0,002800
49	0,5741	0,002811
49	0,5758	0,000473
49	0,5762	0,001350
Média	0,5752	0,002264
DPR(%)	0,3936	

* Média de três determinações para cada concentração

TABELA 7

Resultados experimentais das soluções da amostra de 5 mg (C) formulada de besilato de anlodipino, utilizados para determinação da precisão do método espectrofotométrico MeOH/H₂O 5:95, na primeira diluição e na segunda diluição somente água.

Concentração de leitura mcg/mL	Amostra C*	Desvio padrão em relação as três medidas
49	0,5745	0,002301
49	0,5767	0,001250
49	0,5781	0,001656
49	0,5765	0,003925
49	0,5752	0,002011
49	0,5775	0,003669
49	0,5744	0,001762
49	0,5768	0,004058
49	0,5761	0,000173
49	0,5741	0,005300
Média	0,5760	0,002611
DPR(%)	0,04532	

* Média de três determinações para cada concentração

TABELA 8

São apresentados resultados obtidos na determinação do teor de besilato de anlodipino nas amostras 5 mg (A), 10 mg (B) e formulado 5 mg (C), intra-dia e inter-dia empregando o método espectrofotométrico.

Intra-dia*	amostra A	amostra B	amostra C
Dia 1	5,04±0,02	9,79±0,04	4,95±0,02
DPR (%)	0,31	0,40	0,36
Dia 2	4,99±0,03	9,86±0,03	4,97±0,01
DPR (%)	0,57	0,26	0,22
Dia3	4,99±0,02	9,7±0,04	4,9±0,01
DPR (%)	0,46	0,43	0,16
Inter-dia**	5,01±0,00	9,78±0,06	4,94±0,01
DPR (%)	0,08	0,58	0,23

*Média aritmética dos valores (n=10)

** ANOVA (n=10)

A precisão foi calculada através do desvio padrão dividido pela concentração média determinada.

$$\text{Precisão} = \frac{DP}{CMD} \times 100\% = \frac{0,001457 + 0,002264 + 0,002611}{0,5759 + 0,5752 + 0,5760} \times 100\% = 0,3662\%$$

em que, DP é o desvio padrão e CMD a concentração média determinada. O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5% (ANVISA, 2003).

5.1.5 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal.

Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método a variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento (ANVISA, 2003).

Preparou-se três amostras do padrão de besilato de anlodipino na mesma concentração 49 mcg/mL. Pesou-se analiticamente 50 mg do padrão, transferiu-se para um balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com metanol. Uma

alíquota de 2,45 mL foi retirada e transferida para um balão volumétrico de 50 mL e o volume completado com água destilada. A variação feita foi a mudança de fabricante do solvente de metanol.

TABELA 9

Resultados experimentais das soluções da amostra de besilato de anlodipino, MeOH/H₂O 5:95, na primeira diluição e na segunda diluição somente água, utilizados para robustez do método espectrofotométrico.

Concentração de leitura mcg/mL (amostra)	absorbância*	Desvio padrão
49	0,5774	0,004313
49	0,5835	0,001909
49	0,5925	0,000424
DP		0,004277
Média	0,5844	

* Média das três determinações

$$\text{robustez} = \frac{DP}{CMD} \times 100\% = \frac{0,0043}{0,5844} \times 100\% = 0,7358\%$$

Figura 10- Espectros de absorção, registrados consecutivamente, das soluções padrão de besilato de anlodipino na concentração de 49 mcg/mL MeOH/H₂O 5:95 na primeira diluição e na segunda diluição somente água.

5.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

5.2.1 Linearidade

A linearidade foi calculada a partir do preparo de amostras da solução padrão. Pesou-se 50 mg de padrão de besilato de anlodipino e diluiu-se em balão de 50 mL com 5 mL de metanol e o restante com fase móvel (35:65 MeOH/H₂O, trietilamina a 1%, acidificada com ácido fosfórico para um pH5.0) Retirou-se 6 alíquotas de 0,5mL; 1,0mL; 1,5mL; 2,0 mL; 2,5 mL; 3,0 mL e 3,5 mL e transferiu-se para um balão volumétrico de 10 mL obtendo-se concentrações de 50 mcg/mL, 100 mcg/mL, 150 mcg/mL, 200 mcg/mL, 250 mcg/mL, 300 mcg/mL e 350 mcg/mL, respectivamente.

Figura 11- Gráfico da linearidade. Concentrações entre 50 mcg/mL e 350 mcg/mL, da solução padrão de besilato de anlodipino sendo utilizados 5mL de metanol para a diluição e o restante de fase móvel.

Figura 12- Cromatogramas da solução padrão (a), e da amostra (b). Concentração de 200 mcg/mL. Condições cromatográficas: fase móvel MeOH e H₂O, com TEA 1% acidificada com ácido fosfórico pH 5,0, (35:65 v/v). Coluna LiChrospher® 100RP-18 (5µm) Merck®, detecção 238nm e fluxo de 1,0mL /min.

TABELA 10

Análise estatística dos resultados obtidos na determinação da curva analítica de besilato de anlodipino. Leituras efetuadas em comprimento de onda 248 nm.

Intervalo de concentração	50-350 mcg/mL
Coeficiente de correlação	0,9999
Inclinação da reta	54947
Teste F	3,4032
Desvio padrão relativo	0,547
LD	2,6
LQ	8,68
Coeficiente linear	19708
Erro padrão	16396

TABELA 11

Resultados experimentais da solução padrão de besilato de anlodipino, utilizados na curva analítica pelo método cromatográfico.

Concentração de leitura mcg/mL	Área*	DP
50	950519	5975,76
100	1910943	310,42
150	2881121	6219,00
200	3877140	5050,86
250	4872923	13048,95
300	5851310	13454,83
350	6854955	31382,81
Média		6118,619929

5.2.2 Limite de detecção e limite de quantificação

$$\text{Limite de detecção} = \frac{DP}{b} \times 3 = \frac{14819}{19704} \times 3 = 2,27 \text{ mcg/mL}$$

$$\text{Limite de quantificação} = \frac{DP}{b} \times 10 = \frac{14819}{19704} \times 10 = 7,521 \text{ mcg/mL}$$

DP = desvio padrão

b = coeficiente linear

5.2.3 Exatidão

A exatidão foi determinada através de teste de recuperação em três concentrações distintas. Quantidades conhecidas de padrão foram adicionadas a quantidades fixas de amostras e calculou-se a recuperação de padrão adicionado pela expressão:

$$\text{Exatidão} = \left[\frac{(LT - LA)}{LP} \times CP \right] \div PA \times 100\%$$

em que LT é o valor da leitura total, LA é o valor de leitura da amostra, LP é o valor de leitura do padrão e PA é a quantidade de padrão adicionado.

Para a preparação das soluções-mãe de padrão e de amostras de besilato de anlodipino adotou-se o seguinte procedimento:

Para a preparação das soluções padrão de besilato de anlodipino, pesaram-se 50 mg de matéria-prima de besilato de anlodipino, transferiu-se para um balão de

50 mL, adicionou-se 5 mL de metanol, completou-se o volume com água e filtrou-se, em seguida (solução-mãe padrão, 1 mg/mL).

Para os comprimidos, pesou-se massas equivalentes a 50 mg de besilato de anlodipino e transferiu-se para balões de 50 mL. Adicionaram-se 5 mL de metanol e completou-se o volume com água (soluções-mãe das amostras, 1 mg/mL).

Foram, então, preparadas as soluções em triplicata contendo padrão e amostra de besilato de anlodipino, conforme a tabela 6. A primeira diluição foi feita com 5 mL de metanol e o restante completou-se com água. E a segunda diluição com fase móvel constituída de MeOH e H₂O, com TEA 1% acidificada com ácido fosfórico pH 5.0, (35:65 v/v).

TABELA 12

Resultados experimentais obtidos na recuperação de solução padrão de besilato de anlodipino adicionada as soluções amostra de besilato de anlodipino 5 mg(A), 10 mg (B), e formulado 5 mg (C) empregando o método cromatográfico.

Amostra	Concen- tração de leitura da amostra mcg/mL	Concen- tração de leitura mcg/mL Padrão	Concen- tração total	Áreas	Concen- tração encontrada na amostra	Recupe- ração (%)
		75	75	1416005		
	75		75	1335398		
A	75	75	150	2743663	74,59	99,45
	125	75	200	3705151	125,51	100,41
	175	75	250	45993683	172,57	98,6
	75		75	1357433		
B	75	75	150	2773360	74,99	99,99
	125	75	200	3735995	125,99	100,79
	175	75	250	4728002	178,52	102,01
	75		75	0,2605		
C	75	75	150	0,5240	22,25	98,9
	125	75	200	0,5718	26,31	99,3
	175	75	250	0,6142	29,92	98,01

* Média de três determinações para cada concentração

5.2.4 Precisão

Foi utilizado o ponto médio da linearidade. Foram preparadas 10 amostras durante três dias consecutivos na concentração de 200 mcg/mL das amostra de 5 mg (A), 10 mg (B) e 5 mg (C) formulado de besilato de anlodipino.

As amostras foram obtidas pesando-se 1460,4 mg do pó da apresentação de 10 mg que corresponde a 50 mg de besilato de anlodipino. Transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL acrescentou-se 5 mL de metanol e completou-se o volume com água destilada. O procedimento para a obtenção da solução na concentração de 200 mcg/mL é o mesmo descrito na linearidade. Os resultados estão apresentados nas tabelas 13, 14 e 15.

TABELA 13

Resultados experimentais das soluções da amostra de 5 mg (A) de besilato de anlodipino, utilizadas para precisão do método cromatográfico MeOH/H₂O 5:95, na primeira diluição, e fase móvel (35:65 MeOH/H₂O, tampão TEA a 1% acidificada com ácido fosfórico pH 5,0) posteriormente.

Concentração de leitura mcg/mL	Amostra A *	Desvio padrão em relação às três medidas
200	4025532	2827,72
200	4013473	1317,34
200	4077026	1927,573
200	4066629	6804,489
200	4083854	2607,103
200	4034248	22,62742
200	4036847	27311,29
200	4080425	18053,85
200	4041902	47936,18
200	4011411	262,3366
Média	4047134	10907,05
DPR(%)	0,2695	

* Média das três determinações

TABELA 14

Resultados experimentais das soluções da amostra de 10 mg (B) de besilato de anlodipino, utilizadas para precisão do método cromatográfico MeOH/H₂O 5:95, na primeira diluição e fase móvel (35:65 MeOH/H₂O, tampão TEA a 1% acidificada com ácido fosfórico pH 5,0) posteriormente.

Concentração de leitura mcg/mL	Amostra B *	Desvio padrão em relação às três medidas
200	3913922	4022,73
200	3908764	8963,993
200	3871527	29110,88
200	3946228	2879,339
200	3963412	1412,092
200	3951565	6583,871
200	3861324	11775,45
200	3851427	24222,65
200	3826403	28852,79
200	4206802	3597,759
Média	3930137	12142,15
DPR(%)	0,3089	

* Média das três determinações

TABELA 15

Resultados experimentais das soluções da amostra de 5 mg (C) formulado de besilato de anlodipino, utilizadas para precisão do método cromatográfico MeOH/H₂O 5:95, na primeira diluição e fase móvel (35:65 MeOH/H₂O, tampão TEA a 1% acidificada com ácido fosfórico pH 5,0) posteriormente.

Concentração de leitura µg/mL	Amostra C *	Desvio padrão em relação às três medidas
200	3993853	2742,2
200	3952051	58329,9
200	3810725	12506,6
200	3831431	9233,4
200	3905619	4988,6
200	3805011	1055,7
200	3911716	314,7
200	3869015	37288,6
200	3951481	23650,6
200	3859174	2076,1
Média	3889007	15218,6
DPR(%)	0,3913	

* Média das três determinações

TABELA 16

São apresentados resultados obtidos na determinação do teor de besilato de anlodipino nas amostras de 5 mg (A), 10 mg (B) e formulado 5 mg (C), intra-dia e inter-dia empregando o método cromatográfico.

Intra-dia*	amostra A	amostra B	amostra C
Dia1	5,20±0,00	10,19±1,10	5,10±0,04
DPR (%)	0,01	1,10	0,82
Dia 2	5,23±0,04	10,30±0,19	5,10±0,00
DPR (%)	0,67	0,18	0,02
Dia 3	5,20±0,04	10,02±0,15	4,95±0,01
DPR (%)	0,83	1,47	0,03
Intra-dia**	5,20±0,00	10,17±0,07	5,05±0,04
DPR (%)	0,03	0,69	0,75

*Média aritmética dos valores (n=10)

** ANOVA (n=10)

precisão do método de acordo com as amostras A., B, e C=

$$\frac{DP}{CMD} \times 100\% = \frac{10907,05 + 12142,155 + 15218,6}{4047134 + 3930137 + 3889007} \times 100\% = 0,3224\%$$

5.2.5 ROBUSTEZ

A robustez foi medida utilizando-se a concentração de 200 mcg/mL . Variou-se o volume injetado de 20 mcL para 10 e para 5 microlitros e os resultados foram os seguintes.

TABELA 17

Resultados experimentais das soluções da amostra de besilato de anlodipino em MeOH/H₂O 5:95. Volume injetado 10mL.

Concentração de leitura mcg/mL	Amostra 10 mL injetados *	Desvio padrão em relação às três medidas
200	3972903	725,52
200	3818727	2755,47
200	3810845	3307,59
Média	3867491	2262,86
DPR (%)	0,06	

TABELA 18

Resultados experimentais das soluções da amostra de besilato de anlodipino em MeOH/H₂O 5:95. Volume injetado 5 mL.

Concentração de leitura mcg/mL	Amostra 5mL injetados *	Desvio padrão em relação às três medidas
200	1896054	54,44722
200	1905118	825,1936
200	1921104	11881,52
Média	1907425	4253,719
DPR (%)	0,223	

5.2.6 Teste de estresse

Em quatro balões volumétricos (1, 2, 3, 4) de 25 mL colocou-se 12,5 mg de besilato de anlodipino e diluiu-se com 25mL de metanol chegando-se a uma

concentração de 0,5 mg/mL. Transferiu-se para quatro balões volumétricos (5), (6), (7) e (8) de 10 mL, 1 mL da solução 0,5 mcg/mL e a seguir completou-se o volume (5) com H₂O, (6) com H₂O₂, (7) com NaOH 1M e (8) HCl 1M. Os quatro frascos foram mantidos em banho maria a 80°C por 4h. De cada frasco retirou-se uma amostra de 220 mcL e transferiu-se para balões volumétricos de 5 mL (9, 10, 11 e 12), os quais foram completados até o menisco: solução contendo (35:65 MeOH/H₂O, TEA 1%. acidificada com ácido fosfórico para um pH 5.0). As soluções resultantes foram analisadas por HPLC em coluna LiChrospher® 100RP-18 (5µm) Merck®, detecção 238nm e fluxo de 1,0mL /min, sendo a concentração final de 22 mcg/mL. Os cromatogramas obtidos estão apresentados na figura 13.

Figura 13- Cromatogramas desenvolvidos em coluna LiChrospher® 100RP-18 (5µm) Merck®. Amostras de 0,5 mg/mL de besilato de anlodipino em H₂O(a), em H₂O₂ (b), em NaOH (c) e em HCl (d) todos com a segunda diluição com fase móvel (35:65 MeOH/H₂O TEA 1% acidificada com ácido fosfórico para um pH 5,0), concentração final 22 mcg/mL e comprimento de onda de 238nm.

6 DISCUSSÃO

A Farmacopéia Brasileira quarta edição busca inserir novos fármacos. Antes de iniciar este trabalho de pesquisa a Farmacopéia Brasileira foi consultada para que fossem informados quais seriam os fármacos de interesse para desenvolver uma monografia. Três foram sugeridos e o escolhido foi o besilato de anlodipino.

Trata-se de uma molécula de pKa básico, classificada como antipertensivo, mais especificamente, bloqueador do canal de cálcio.

As amostras usadas para o desenvolvimento do trabalho foram besilato de anlodipino 5 mg (A), 10 mg (B) e amostra formulada no próprio laboratório (C) equivalente a 5 mg. Os parâmetros avaliados, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão, recuperação e robustez, estão de acordo com a resolução da ANVISA 899 de 29 de Maio de 2003. Dois métodos foram otimizados e validados.

Foram avaliados seis parâmetros para a validação do método espectrofotométrico no visível: Linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão exatidão, recuperação e robustez. Para o método desenvolvido através do espectrofotômetro no visível, a varredura mostrou que a substância possui absorção máxima em comprimento de onda de 364,4 nm. Para comprimento de onda de 240 nm UV também foi observada absorbância da substância em estudo, mas não foi utilizada visto que, é uma região menos específica que o comprimento de onda 364,4 nm. O método apresentou ótimo coeficiente de correlação, $r = 0,9999$ e limite de quantificação e detecção 1,8 mcg/mL e 0,541 mcg/ mL, respectivamente.

Utilizando o cromatógrafo CG os resultados obtidos não foram satisfatórios, pois, foram quase os mesmos de T₀ (tempo da amostra não retida). O tempo de retenção obtido = 3,18 min, não foi suficiente para haver separação. E o equipamento não estabiliza em comprimentos de onda baixos como 240 nm e como o comprimento de onda de escolha foi 238nm, não foi possível a utilização do referido equipamento.

Para o cromatógrafo Shimadzu foi possível obter tempos de retenção em torno de 3,57 min para um T₀ de 1,23. O método cromatográfico de escolha para a validação consiste em coluna C18 Coluna LiChrospher® 100RP-18 (5µm) Merck®, fase móvel metanol e água (35:65v/v), λ 238 nm, fluxo 1mL/min e concentração 200 mcg/mL. Através dos cálculos pode-se confirmar que o método é exato, preciso e robusto.

Trabalhar-se-á com metanol e água na composição da fase móvel com a trietilamina a 1%(TEA). Esta possui fundamental importância para proporcionar a saída do fármaco da coluna C18 LiChrospher® 100RP-18 (5µm) Merck® pois o besilato de anlodipino é um composto básico, e após vários testes apenas com metanol/água e metanol/ acetonitrila constatou-se que a molécula não consegue eluir num tempo ideal. A escolha da coluna c18 deveu-se a mesma ser bastante comum em métodos de análise tornando, portanto, o método bastante acessível, uma vez que o objetivo é inseri-lo na Farmacopéia Brasileira. Mas não sendo necessária para métodos com a coluna C18 Synergi hydro RP, Phenomenex®, 250 x 4,6 mm.

A coluna C18 synergi hydro RP (coluna capeada) conseguiu reter melhor o anlodipino besilato quando testada no cromatógrafo Shimadzu, porém o método foi validado com a coluna LiChrospher® 100RP-18 (5µm) Merck®, pois possui um custo muito menor.

O método validado apresentou em seus cromatogramas um pico muito caudado que justifica-se para solutos básicos em presença de silanóis.

6.1 Identificação

Primeiramente a amostra foi identificada pelo método espectrofotométrico no visível descrito nas Farmacopéias Britânica 2005 e Européia 2004. Observou-se que a amostra apresentou absorção máxima em 360 nm, como descrito nestas farmacopéias.

6.2 Doseamento

A determinação do besilato de anlodipino como matéria-prima foi realizada utilizando o método espectrofotométrico e o cromatográfico, sendo que os resultados foram satisfatórios para ambos.

6.3 Metodologia analítica

O besilato de anlodipino é facilmente solúvel em metanol. Outros solventes foram utilizados, porém em ambos os métodos foi necessário solubilizar o fármaco em metanol para, a seguir, usar outro solvente de escolha.

6.3.1 Curva analítica

As concentrações utilizadas para determinação da curva analítica para desenvolvimento e validação do método espectrofotométrico (41-61 mcg/mL) foram escolhidas a partir de testes com várias concentrações, a partir da absorbância da concentração de 45 mcg/mL que foi em torno de 0,5 justificam-se as concentrações. A curva deve ser obtida com no mínimo cinco pontos (ANVISA), O coeficiente de correlação (r) deve ser calculado para que se tenha uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI, 2004).

A figura 7 apresenta a sobreposição dos espectros obtidos para a curva de calibração nas concentrações de 41-61 mcg/mL. A representação gráfica da curva analítica está apresentada na figura 6. Verifica-se boa linearidade com coeficiente de regressão 0,9995. Realizou-se a leitura a 364,4nm e a medida em que se aumentava a concentração também aumentava a amplitude de maneira

proporcional, apresentando um coeficiente de correlação próximo de 1. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 (RIBANI, 2004).

6.3.1.2 Determinação do teor de besilato de anlodipino nas amostras manipuladas e industrializadas

A aplicação do método espectrofotométrico no visível foi satisfatório. O coeficiente de variação (desvio padrão relativo) que indica a precisão do método está dentro das normas estabelecidas (menor que 2%). Foram efetuadas 10 leituras com concentrações de 49 mcg/mL durante três dias consecutivos. O desvio padrão foi calculado e, ainda, as médias dessas absorbâncias. Pelo método ANOVA calculou-se a precisão intra-dia.

6.3.1.3 Teste de recuperação

O teste de recuperação demonstra a exatidão de um método analítico. A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Várias metodologias para a determinação da exatidão estão disponíveis. Executou-se a metodologia analítica proposta na análise de uma substância de pureza conhecida, padrão de referência

(ANVISA, 2003). Adicionou-se quantidade conhecida de padrão (22,5 mcg/mL) a amostras de (22,5, 26,5 e 30,5 mcg/mL). A tabela 4 mostra os resultados obtidos no teste de recuperação nas amostras pesquisadas. Pode-se observar que os resultados apresentam pouca dispersão estando entre 97,0 e 100,7%.

6.3.1.4 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção é calculado como sendo correspondente à concentração que produziria um valor do sinal medido 3 vezes maior que o nível de ruído médio, medido com a solução de controle ou branco (LEITE, 2002). O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003). Os limites de detecção e quantificação foram respectivamente 0,54 mcg/mL e 1,8 mcg/mL.

6.3.1.5 Robustez

Durante o desenvolvimento da metodologia deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método a variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento (ANVISA, 2003). Segundo a ANVISA diferentes parâmetros podem

ser avaliados para o método espectrofotométrico, como temperatura, diferentes fabricantes de solventes, variação do pH da fase móvel e variação na composição da fase móvel. A variação feita foi a mudança de fabricante do solvente de metanol. Não foram observadas mudanças significativas tabela 9.

6.3.2 Método cromatográfico

O segundo método desenvolvido foi a cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV, fase reversa, coluna LiChrospher® 100RP-18 (5µm) Merck®, fluxo de 1mL/min, concentração de 200 mcg/mL, correspondente ao ensaio n 5.

Com o propósito de desenvolver uma metodologia simples, rápida, de baixo custo e toxicidade, optou-se por utilizar metanol e água como fase móvel por sua fácil obtenção. Porém somente com água e metanol não foi possível obter um pico com boa assimetria. Portanto ao invés da água foi usado um tampão contendo TEA a 1% com pH corrigido para 5,0 com ácido ortofosfórico.

6.3.2.1 Construção da curva analítica

A curva analítica foi construída no intervalo de 50 a 350 mcg/mL. Obteve-se boa linearidade pois o coeficiente de correlação foi de 0,9999.

6.3.2.2 Determinação do teor nas amostras manipuladas e industrializadas

A determinação do teor é expresso através da precisão e neste trabalho foi calculado em três dias consecutivos para cada amostra com, no mínimo, dez repetições. O desvio padrão relativo calculado para cada amostra ficou entre 0,01 e 1,47 %. Desta forma pode-se concluir que o método é preciso.

6.3.2.3 Teste de recuperação

A tabela 12 mostra os resultados obtidos no teste de recuperação das amostras pesquisadas. A análise foi executada acrescentando-se quantidades iguais de solução padrão (75 mcg/mL) a diferentes concentrações de amostra (75 mcg/mL, 125 mcg/mL e 175 mcg/mL). Os valores encontrados ficaram entre 98 e 102% significando um método exato. Na maioria dos procedimentos analíticos de

validação, valores de recuperação dentro da faixa 70-120% são aceitos (LANÇAS, 2004).

6.3.2.4 Limite de detecção e limite de quantificação

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito ou de uma propriedade, como por exemplo, análise de traços, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectado pelo método: tem-se portanto o limite de detecção (LD). O limite de quantificação (LQ) pode ser definido como a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão. Os valores obtidos para o limite de detecção e quantificação foram respectivamente 2,27 e 7,5 mcg/mL.

6.3.2.5 Robustez

Diferentes lotes ou fabricantes de colunas, temperatura, fluxo da fase móvel e diferentes lotes ou fabricantes de colunas.

A robustez para o método cromatográfico foi analisada injetando-se diferentes volumes para análise no cromatógrafo. A quantidade padronizada no método foi de 20 mcL e as variações de injeção foram para 10 mcL e 5 mcL. Mudanças significativas não foram observadas.

7 CONCLUSÃO

Nos testes preliminares pode-se perceber que para o método cromatográfico a TEA (triethylamina) apresentou fundamental importância para eluição do besilato de anlodipino na coluna LiChrospher® 100RP-18 (5µm) Merck®; uma vez que somente com metanol e acetonitrila não foi possível a saída do fármaco.

O método validado por HPLC comparado aos já existentes foi de grande valia pois trabalhou-se com metanol e tampão (35:65 MeOH/H₂O, tampão TEA a 1% acidificada com ácido fosfórico pH 5,0), sendo que os já existentes apresentam porcentagem de solvente orgânico e tempo de retenção maiores, em torno de 7 minutos e além de trabalharem com metanol usam também acetonitrila (USP, 31) e Bristish Pharmacopoeia, 2005)

Para o método espectrofotométrico a vantagem em relação aos métodos já propostos foi a não utilização de ácidos, mas somente metanol e água, sendo que a quantidade de metanol utilizada foi de somente 5% na primeira diluição.

Desta forma o trabalho foi de grande valia pois os métodos validados utilizam solventes menos tóxicos, apresentam menor custo e ainda, para a cromatografia, um tempo de análise menor.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. VisaLegis. **Resolução RE n.899, de 29 de maio de 2003**. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos"; fica revogada a Resolução RE nº 475, de 19 de março de 2002. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word=>. Acesso em: 2 maio 2008.

AQUINO NETO, F.R.; NUNES, D.S.S. **Cromatografia**: princípios básicos e técnicas afins. Rio de Janeiro: Interciência, 2003. p.165.

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

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

BERMUDEZ, J.A.Z.; BARRAGAT, P. Medicamentos quíricos: da dimensão química à discussão política. **Cadernos de Saúde Pública**, v.12, n.1, p.47-51, 1996.

BONATO, P.S.; JABOR, V.A.P.; GAITANI, C.M. Análise enantiosseletiva de fármacos: contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. **Química Nova**, v.28, n.4, p.683-691, 2005.

BRITISH Pharmacopoeia. London: Stationary Office, 2005. p.126-128.

CHASIN, A.A.M.; CHASIN, M.; SALVADORI, M.C. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, n.30, p.49-53, 1994.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.U.L.; BONATO, P.S., orgs. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: UNICAMP, 2006. p.273-276, 289-293.

DEF: Dicionário de especialidades farmacêuticas: 2004/2005. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 2004. p.100, 609.

ELLISON, S.L.R.; ROSSLEIN, M.; WILLIAMS, A., eds. **Guia EURACHEM/CITAC**: determinando a incerteza na medição analítica. 2ed. S.I.: QUAM, 2002. p.14. Disponível em: <http://www.farmacia.ufmg.br/lato/Guia%20Eurachem%20QUAM2000%20Ver%20Brasil.pdf>. Acesso em: 10 Jun. 2007.

EUROPEAN Pharmacopoeia. 5.ed. Strasbourg: Council of Europe, 2004. p.981-983.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NOMAS TÉCNICAS.NBR 6023: informação e documentação: referências: Rio de Janeiro, 2002.

EWING, G.W., ed. **Analytical instrumentation handbook**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1997. p.327.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. Saiba mais sobre a Farmacopéia Brasileira. **O que é a Farmacopéia Brasileira?** Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeia/saiba_mais_farmacopeiahtm.htm Acesso em: 20 out. 2008.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. DCB - Denominações Comuns Brasileiras. Inclusões, alterações e exclusões da atualização da DCB 2004. Tabela completa. **Tabela completa da DCB 2004.** Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeia/dcb.htm>. Acesso em: 20 set. 2006.

GIL, E.S., org. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. 2.ed. São Paulo: Pharmabooks, 2007. p.41.

GILMAN, A.G.; HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; MOLINOFF, P.B.; RUDDON, R.W., eds. **Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapêutica**. 9.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana, 1996. p.571, 561-567.

HARRIS, D.C. **Análise química quantitativa**. 6.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005. p.435-445 e 613.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. Normalização e Qualidade Industrial. **DOQ-CGCRE-008**: orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Revisão 02 – julho/2007. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_02.pdf. Acesso em: 15 Abr. 2007.

INTERNACIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO/IEC Guide 25**: General Requirements for the Competence of Calibration and Testing Laboratories. 3.ed. Geneva: International Electrotechnical Commission, 1990.

KLINKENBERG, R.; STREEL, B.; CECCATO, A. Development and validation of a liquid chromatographic method for the determination of amLodipine residues on manufacturing equipment surfaces. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.32, n.2, p.345-352, 2003.

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

LANÇAS, F.M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Paulo: RiMa, 2004. p.1-2. (Métodos cromatográficos de análise, 6).

LEITE, F. **Validação em análise química**: conceitos, repê, reprô, estatística, calibrações. 4.ed. Campinas: Átomo, 2002. p.25-26, 65-69, 121.

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

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

MARTINDALE: the complete drug reference. 33.ed. London, Chicago: Pharmaceutical Press, 2002. p.788-789, 838.

MASSAROTI, P.; MORAES, L.A.B.; MARCHIORETTO, M.A.M.; CASSIANO, N.M.; BERNASCONI, G.; CALAFATTI, S.A.; BARROS, F.A.P.; MEURER, E.C.; PEDRAZZOLI, J. Development and validation of a selective and robust LC-MS/MS method for quantifying amLodipine in human plasma. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.382, n.4, p.1049-1054, 2005.

NIAZI, S. **Handbook of pharmaceutical manufacturing formulations**: compressed solid products/sarfaraz. Boca Raton: CRC Press, 2004. p.50.

PEREIRA, O.A. **Substâncias farmacêuticas comerciais**. 2.ed. Rio de Janeiro: ABIQUIF, 2003. p.62.

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

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

REMINGTON: the science and practice of pharmacy. 20.ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p.1292-1291.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n.5, p.771-780, 2004.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. p.26.

SOARES, L.V. **Curso básico de instrumentação para analistas de alimentos e fármacos**. São Paulo: Manole, 2006. p.63, 170-176.

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

VALENTE SOARES, L.M. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.60, n.1, p.79-84, 2001.

VOGEL, A.I.; MENDHAN, J.M.A.; DENNEY, R.C.; BARNES, J.D.; THOMAS, M., eds. **Vogel análise química quantitativa**. 6.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002. p.63, 145-159.

SWISS PHARMACEUTICAL SOCIETY. **Index Nominum 2000**. 17.ed. Stuttgart: Medpharm, 2000. p.50.

THOMPSON, J.E. **A prática farmacêutica na manipulação de medicamentos**. Porto Alegre: Artmed, 2006. p.445.

UNITED States Pharmacopoeia. 28.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2007.

WU, Y.J.; PAN, Y.X.; ZENG, S. Determination of amLodipine in CYP3A4 cDNA-expressed cells by HPLC. **Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban**, v.32, n.6, p.510-530, 2003. *apud* MEDLINE. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&listuids=14712515&dopt=Citation>. Acesso em: 28 set. 2006.

ZANINE, A.C.; BASILE, A.C.; MARTIN, M.I.C.; OGA, S. **Guia de medicamentos 1995**. São Paulo: Atheneu, 1995. p.35.

ZARGHI, A.; FOROUTAN, S.M.; SHAFATI, A.; KHODDAM, A. Validated HPLC method for determination of amLodipine in human plasma and its application to pharmacokinetic studies. **Farmaco**, v.60, n.9, p.789-792, 2005.

ANEXOS

MONOGRAFIA DO BESILATO DE ANLODIPÍNO

Estrutura química do besilato de anlodipino

* carbono quirático

$C_{20}H_{25}ClN_2O_5$ $C_6H_6O_3S$ (NIAZI, 2004; BRITISH, 2005).

nome químico 5-metil-3-etil- 2-(2-aminoetóximetil)-4-(2-clorofenil)-1,4dihidro-6-metil-3,5-piridinacarboxilato benzenosulfonato são: fórmula molecular:

DESCRIÇÃO

Caracteres físicos. Pó branco a quase branco.

Solubilidade. Pouco solúvel em água, facilmente solúvel em metanol, ligeiramente solúvel em etanol, pouco solúvel em 2 propanol.

IDENTIFICAÇÃO

Dissolver 5 mg em solução 1%(v/v) de ácido clorídrico 0,1mol/L em metanol e diluir para 100 mL com a mesma solução. Examinar entre 300nm e 400nm. A solução mostra absorbância máxima a 360nm. A absorbância específica no comprimento de onda máximo é de 1,13 a 1,21.

DOSEAMENTO

A. Por espectrofotometria de absorção no visível:

Dissolver 50 mg de besilato de anlodipino em 5 mL de metanol e completar o volume com água destilada em um balão de 50mL. Preparar uma amostra na concentração de 49 mcg/mL. Efetuar leitura a 364nm e comparar com padrão.

B. Por Cromatografia líquida de alta eficiência empregando cromatógrafo provido de detector espectrofotométrico ajustado em 238nm; Coluna de sílica 12,5x4,6x5µm, detecção 238nm . A fase móvel é composta de (35:65 MeOH/H₂O, tampão TEA a 1% acidificada com ácido fosfórico pH 5,0). Ajustar o fluxo do solvente para 1,0mL/min.

Preparar as seguintes soluções:

Solução(1): pesar quantidade de comprimidos, previamente pulverizados, contendo 50mg de besilato de anlodipino e transferir para um balão de 100mL. Completar o volume com o solvente empregado como fase móvel. Preparar uma solução com concentração final de 200mcg/mL, usar fase móvel como diluente.

Solução (2): dissolver 50mg de padrão e completar para 100mL com fase móvel. Preparar uma solução final de 200mcg/mL, usar fase móvel como diluente.

Injetar 20mcL de solução (2) e determinar a assimetria do pico no cromatograma obtido. Utilizando a fórmula: $T=W/2f$, em que :T corresponde ao fator de assimetria. Deve ser, no máximo, 2,5W. W corresponde à largura do pico, em mm, medida em altura de 5% da altura total, f é a distância em mm a 5% da altura entre a frente do pico e a perpendicular que passa pelo ponto máximo. Injetar separadamente 20mcL de cada solução e calcular o conteúdo de besilato de anlodipino a partir das áreas obtidas nos cromatogramas das soluções (1) e (2).

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes perfeitamente fechados e protegidos da luz.

CLASSE TERAPÊUTICA

Antihipertensivo

May 1, 2008

The Scientific Association Dedicated to Analytical Excellence®

Erika Rosa Maria Kedor-Hackmann
Av. Prof. Lineu Prestes 580
São Paulo
Brazil, 05508-900

ABSTRACT TITLE:	Determination of amlodipine besylate in tablets by spectrophotometry and high performance liquid chromatography
AUTHOR(S) AND INSTITUTION(S):	H.D. Leite, P.L. Garcia, J.M. Alves, M.M. Santoro, E.R. Kedor-Hackmann, , University of São Paulo, São Paulo, São Paulo, BRAZIL
ASSIGNED POSTER SESSION:	Pharmaceutical Analysis, Authenticity and Safety

Dear Dr. Kedor Hackmann:

Thank you for submitting an abstract for poster presentation at the 2008 AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting. The meeting will take place September 21-24, 2008 at the Hyatt Regency Dallas in Dallas, Texas, USA. On behalf of AOAC INTERNATIONAL, I would like to cordially invite you to present your poster at this year's meeting.

Please note the poster session(s) that you have been assigned, copied above on this letter. At this time, your abstract has been accepted for publication in the *Preliminary Program*. The Program is mailed to the Association's constituency in mid-June and provides a preview of the Annual Meeting technical program.

Poster authors whose abstracts are accepted for publication in the *Final Program* will be notified of their final acceptance no later than August 7, 2008. The *Final Program* for the 2008 AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting will be distributed to all Meeting registrants upon check-in in Dallas, and will include a full abstract listing and author index of all Poster Presentations accepted for the Annual Meeting. A final poster listing, including assigned poster numbers and detailed presentation information, will be made available by August 7, 2008.

AOAC INTERNATIONAL invites and welcomes scientists from every part of the world to attend and participate in the Annual Meeting. To find out if you need a Visa or qualify for the reduced meeting fee for registrants from developing countries, the AOAC meetings website now includes information regarding International Travel, with links to the World Bank list of developing countries and comprehensive information on obtaining a Visa. For more detailed information on the meeting, including hotel information, visit the 122nd AOAC Annual Meeting & Exposition website via www.aoac.org. Please allow ample time for visa processing, as the application process can take several months in some countries.

Please feel free to contact me at +1-301-924-7077, extension 151, or via e-mail at lcribbin@aoac.org with any questions or concerns. We look forward to you joining us in Dallas.

Sincerely,

Liz Cribbin
Program Manager, Association Activities

481 North Frederick Avenue, Suite 500 Gaithersburg, MD 20877-2417 USA
Telephone: +1-301-924-7077 Fax: +1-301-924-7089
Internet e-mail: aoac@aoac.org
World Wide Web Site: <http://www.aoac.org>