

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição – FACFAN
Programa de Pós-Graduação em Farmácia

MIRELLA CARLA GALANA GERLIN

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE
PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE FÁRMACOS EM FORMULAÇÕES
MAGISTRAIS E ESTUDO DE COMPATIBILIDADE ENTRE COMPONENTES DA
FÓRMULA**

CAMPO GRANDE - MS

2021

MIRELLA CARLA GALANA GERLIN

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE
PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE FÁRMACOS EM FORMULAÇÕES
MAGISTRAIS E ESTUDO DE COMPATIBILIDADE ENTRE COMPONENTES DA
FÓRMULA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul como requisito final para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Nájla Mohamad Kassab

CAMPO GRANDE - MS

2021

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Nájlá Mohamad Kassab – Orientador

Prof. Dr. Teófilo Mazon Cardoso

Prof. Dr. João Batista Gomes de Souza

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais, que foram eles que abriram as portas para me encaminhar para a vida e para as minhas conquistas.

Agradeço eternamente todo o apoio e amor que foi dado em todos estes anos em que decidi “seguir a minha vida”.

Aos meus amigos, em especial aqueles que estiveram nos momentos de mais fraqueza onde precisei de apoio para continuar.

Novamente aos meus amigos, que estiveram tão presentes no fim quanto no início de toda esta jornada me ajudando no que foi possível.

Ao meu irmão, que junto nesta caminhada demonstrou mais uma vez ser meu anjo maior e não só ajudou com meu trabalho como sempre me incentivou ir além.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFMS - FAFAN, pela oportunidade de me proporcionar este grande aprendizado aperfeiçoando o que foi conquistado em toda a minha graduação.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Nájla Mohamad Kassab pela oportunidade de ingressar no programa logo após minha graduação e por todo o apoio, incentivo e confiança depositado em mim. Sem esta oportunidade, com certeza, não teria realizado este estudo à fim de ir em busca de um sonho maior.

As alunas da pós-graduação que no dia a dia sempre estiveram ali presentes para ajudar no que foi preciso.

Ao Caio, aluno de pós-graduação pela paciência, pela disponibilidade e todo o aprendizado que me proporcionou em outro laboratório para que conseguisse concluir este trabalho.

Ao Prof. Dr. Lincoln Carlos Silva de Oliveira e à aluna Joice Ferreira, do Instituto de Química da UFMS, pela dedicação e orientação, e por disponibilizar os equipamentos de análise térmica.

Aos membros da banca examinadora pelo aceite do convite de participação e suas contribuições ao trabalho.

Muito Obrigada!

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”(Marthin
Luther King)

RESUMO

A manipulação de medicamentos permite o tratamento das doenças de forma personalizada, com diferentes dosagens, conforme necessidades individuais de cada paciente, além da possibilidade de associar vários fármacos em um único produto acabado. Estudos mostraram que vários métodos analíticos foram descritos para a análise de atorvastatina (ATO), losartana (LOS) e metformina (MTF) isolados ou associados a outros princípios ativos, porém não foi encontrado na literatura científica nenhum método analítico para quantificação simultânea de ATO, LOS e MTF em formulações farmacêuticas. Dessa forma, um estudo químico-farmacêutico envolvendo esses fármacos foi realizado. As matérias-primas ATO, LOS e MTF foram caracterizadas por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta (UV), infravermelho (IV), Termogravimetria (TG) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). Estas técnicas em conjunto permitiram o uso como padrão secundário de referência. Um método analítico empregando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi desenvolvido e validado para determinação quantitativa e simultânea desses fármacos em formulação farmacêutica magistral (cápsulas), empregando o cromatógrafo a líquido modelo Dionex® Ultimate 3000, com detector de arranjo de diodos (DAD), e a separação cromatográfica foi efetuada na coluna Sigma- Aldrich® C18 (4,6 x 150 mm, 5µm) com vazão de 0,3 mL min⁻¹ e fase móvel composta de MeOH:H₂O (78:22 v/v) ajustado o pH para 3,0 com ácido ortofosfórico. As detecções foram realizadas nos comprimentos de onda de 225 nm (LOS), 236 nm (MTF) e 246 nm (ATO). O método foi validado conforme compêndios de validação, e os seguintes parâmetros foram avaliados: linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), precisão, exatidão, robustez e seletividade. Picos simétricos de MTF, LOS e ATO foram obtidos em tempos de retenção de aproximadamente de 3,05; 4,88; e 6,71 minutos, respectivamente. As curvas de calibração foram lineares nas concentrações que variaram de 1,0 – 9,0 µg mL⁻¹ para ATO, de 1,5 a 6,5 µg mL⁻¹ para LOS e de 12,5 a 62,5 µg mL⁻¹ para MTF. Os coeficientes de correlação linear apresentaram valores (r) >0,99 para todos os fármacos. O estudo de compatibilidade fármaco-fármaco indicou a existência de interações físico-química entre eles. Os resultados obtidos sugerem que o método cromatográfico desenvolvido e validado, poderá ser empregado nas análises de rotina de controle de qualidade de medicamentos contendo esses fármacos isolados ou combinados em formulações farmacêuticas.

Palavras-chave: anti-hipertensivos; antidiabéticos; controle de qualidade; compatibilidade

ABSTRACT

GERLIN, M.C.G. **Development and validation of analytical method by CLAE for simultaneous determination of drugs in magistral formulations and compatibility study between components of the formula.** 2021. 83 f. PhD. Thesis - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição – FACFAN, Universidade Federal De Mato Grosso Do Sul, Campo Grande, 2021.

The compounded drugs allow the treatment of diseases in a personalized way, with different dosages, according to the individual needs of each patient, besides the possibility of combining more than one drug in a single finished product. Studies have shown many analytical methods developed to determine atorvastatin (ATO), losartan (LOS), and metformin (MTF) isolated or together with other active ingredients, however, no analytical method was found in the literature for simultaneous quantification of ATO, LOS, and MTF in pharmaceutical formulations. Thus, a chemical-pharmaceutical study involving these drugs was carried out. The raw materials ATO, LOS, and MTF were characterized by absorption spectroscopy by ultraviolet (UV), infrared (IV), Thermogravimetry (TG), and Differential Scanning Calorimetry (DSC). All these techniques allowed to qualify the raw materials, to become suitable to use them as secondary reference standards. An analytical method employing High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) was developed and validated for quantitative and simultaneous determination of these drugs, in capsules, produced by compounding pharmacies, using the Dionex® Ultimate 3000 model, a liquid chromatographic, coupled with DAD (diode-array detector), and the separation of drugs was carried out on the Sigma-Aldrich® C18 column (4.6 x 150 mm, 5µm) with a flow rate of 0.3 mL min⁻¹ and a mobile phase composed by MeOH: H₂O (78:22 v / v) adjusted the pH to 3.0, with orthophosphoric acid. The detections were performed at wavelengths of 225 nm (LOS), 236 nm (MTF), and 246 nm (ATO). The method was validated according to the official guidelines of validation, and the following criteria were performed: linearity, precision, accuracy, limits of detection (LD) and quantification (LQ), precision, accuracy, robustness, and selectivity. Symmetrical peaks of MTF, LOS, and ATO were obtained at retention times of approximately 3.05; 4.88; and 6.71, minutes, respectively. The calibration curves were linear in ranging intervals from 1.0 - 9.0 µg mL⁻¹ for ATO, from 1.5 to 6.5 µg mL⁻¹ for LOS, and from 12.5 to 62.5 µg mL⁻¹ for MTF. The linear correlation coefficients

values (r) > 0.99 for all drugs. The study of drug-drug compatibility revealed some physico-chemical interactions between them. The results obtained from the chromatographic method developed and validated in this research can be applied to the analysis of these drugs isolated or combined in pharmaceutical formulations in routines of the laboratory of quality control of medicines.

Keywords: antihypertensive drugs; antidiabetics; quality control; compatibility

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da losartana	21
Figura 2 - Gráfico representativo da distribuição das microespécies químicas do Losartana (LOS) versus pH mostrando o comportamento químico do fármaco no intervalo de pH entre	21
Figura 3 - Estrutura química da atorvastatina	24
Figura 4- Gráfico representativo da distribuição das microespécies químicas do Atorvastatina (ATO) versus pH mostrando o comportamento químico do fármaco no intervalo de pH entre 1-14	25
Figura 5 - Estrutura química da metformina	27
Figura 6 - Gráfico representativo distribuição das microespécies químicas do Metformina (MTF) versus pH mostrando o comportamento químico do fármaco no intervalo de pH entre 1-14	28
Figura 7 - Espectro experimental de absorção na região do infravermelho (IV) do Atorvastatina.	39
Figura 8 - Espectro experimental de absorção na região do infravermelho (IV) do losartana	40
Figura 9 - Espectro experimental de absorção na região do infravermelho e estrutura química da matéria-prima de Metformina	41
Figura 10 - Espectro de absorção na região do ultravioleta da matéria-prima de atorvastatina utilizando metanol (Dinâmica®) como solvente, na concentração de $10,0\mu\text{g mL}^{-1}$	43
Figura 11 - Espectro de absorção na região do ultravioleta da matéria-prima de losartana utilizando metanol (Dinâmica®) como solvente, na concentração de $10,0\mu\text{g mL}^{-1}$	44
Figura 12 - Espectro de absorção na região do ultravioleta da matéria-prima de atenolol utilizando metanol (Dinâmica®) como solvente, na concentração de $10,0\mu\text{g mL}^{-1}$	45
Figura 13 - Curvas TG/DTG-DSC do atorvastatina com razão de aquecimento $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ em atmosfera de nitrogênio.....	46
Figura 14 - Curvas TG/DTG-DSC do LOS com razão de aquecimento $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ em atmosfera de nitrogênio	47
Figura 15 - Curvas TG/DTG-DSC do metformina com razão de aquecimento $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ em atmosfera de nitrogênio.....	48
Figura 16 - Cromatograma da amostra comercial magistral obtido na coluna YMC® C18 (4,6 x 150 mm, 5 μm) com vazão de $0,3\text{ mL min}^{-1}$ e fase móvel composta de ACN:H ₃ O+ (75:25 v/v), pH para 3,0 ajustado com ácido fosfórico	52
Figura 17 - Cromatograma da amostra comercial magistral obtido na coluna Kromasil® C18 (4,6 x 150 mm, 5 μm) com vazão de $0,3\text{ mL min}^{-1}$ e fase móvel composta de MeOH:H ₃ O+ (70:30 v/v), pH para 3,0 ajustado com ácido fosfórico.....	52
Figura 18 - Cromatograma da amostra comercial magistral obtido na coluna Kinetex® C18 (4,6 x 150 mm, 5 μm) com vazão de $0,3\text{ mL min}^{-1}$ e fase móvel composta de ACN:H ₃ O+ (70:30 v/v), pH para 3,0 ajustado com ácido fosfórico.....	53

Figura 19 - Cromatograma da amostra comercial magistral obtido na coluna Sigma-Aldrich® C18 (4,6 x 150 mm, 5µm) com vazão de 0,3 mL min ⁻¹ e fase móvel composta de MeOH:H ₃ O ⁺ (78:22 v/v), pH para 3,0 ajustado com ácido fosfórico	54
Figura 20 - Curva de calibração de atorvastatina obtida pela absorção em 246 nm pela fase móvel MeOH:H ₂ O (78:22) com pH ajustado para 3,0 com ácido fosfórico	55
Figura 21 - Curva de calibração de losartana obtida pela absorção em 225 nm pela fase móvel MeOH:H ₂ O (78:22) com pH ajustado para 3,0 com ácido fosfórico	55
Figura 22 - Curva de calibração de metformina obtida pela absorção em 236 nm pela fase móvel MeOH:H ₂ O (78:22) com pH ajustado para 3,0 com ácido fosfórico	56
Figura 23 - Gráfico representativo dos efeitos das alterações testadas para os fármacos ATO, LOS e MTF.....	60
Figura 24 - Cromatograma da amostra 1 comercial obtido na coluna Sigma-Aldrich® C18 (4,6 x 150 mm, 5µm) vazão de 0,3 mL min ⁻¹ e fase móvel MeOH:H ₂ O (78:22 v/v) com pH 3,0	61
Figura 25 - Gráfico representativo do peso médio de 10 cápsulas da Amostra 1	63
Figura 26 - Gráfico representativo do peso médio de 10 cápsulas da Amostra 2	63
Figura 27 - Gráfico representativo do peso médio de 10 cápsulas da Amostra 3	64
Figura 28 - Gráfico de compatibilidade das curvas DSC dos fármacos LOS + MTF associados com razão de aquecimento 10 °C min ⁻¹ em atmosfera de nitrogênio	65
Figura 29 - Gráfico de compatibilidade das curvas DSC dos fármacos LOS + ATO associados com razão de aquecimento 10 °C min ⁻¹ em atmosfera de nitrogênio	66
Figura 30 - Gráfico de compatibilidade das curvas DSC dos fármacos ATO + MTF associados com razão de aquecimento 10 °C min ⁻¹ em atmosfera de nitrogênio	67
Figura 31 - Gráficos representativos do estudo de compatibilidade das curvas TG dos fármacos associados e isolados.....	68
Figura 32 - Gráficos representativos do estudo de compatibilidade dos espectros de infravermelho de ATO e MTF associados.....	69
Figura 33 - Gráficos representativos do estudo de compatibilidade dos espectros de infravermelho de ATO e LOS associados e isolado	70
Figura 34 - Gráficos representativos do estudo de compatibilidade dos espectros de infravermelho de LOS e MTF associados	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Métodos analíticos por CLAE para determinação do Losartana em diferentes condições cromatográficas	22
Tabela 2 - Métodos analíticos por CLAE para determinação do Atorvastatina em diferentes condições cromatográficas	26
Tabela 3 - Métodos analíticos por CLAE para determinação do Metformina em diferentes condições cromatográficas	29
Tabela 4 - Fatores selecionados para robustez	35
Tabela 5 - Bandas características do espectro de IV do atorvastatina.....	39
Tabela 6 - Bandas características do espectro de IV do losartana.....	40
Tabela 7 - Bandas características do espectro de IV do metformina	42
Tabela 8 - Parâmetros avaliados na conformidade do sistema cromatográfico com a coluna Kinetex®	51
Tabela 9 - Parâmetros avaliados na conformidade do sistema cromatográfico com a coluna Sigma-Aldrich®	54
Tabela 10 - Resultados obtidos da linearidade e limites de detecção e quantificação	56
Tabela 11 - Análise da Variância (ANOVA) da regressão linear dos fármacos do estudo	57
Tabela 12 - Resultados obtidos da precisão do método	57
Tabela 13 - Resultados obtidos da análise de exatidão do método analítico desenvolvido	58
Tabela 14 - Resultados obtidos no ensaio de determinação de peso de 10 unidades de cápsulas das amostra comerciais	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATO - Atorvastatina

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD – Detector de arranjo de diodos

DP – Desvio Padrão

DPR – Desvio Padrão Relativo

DSC – Differential Scanning Calorimetry (Calorimetria Exploratória Diferencial)
DTA – Differential Thermal Analysis (Análise Térmica Diferencial)

FTIR – Fourier transform infrared spectroscopy (Espectroscopia por transformada de Fourier)

HA – Hipertensão Arterial

ICH – Internacional Conference on Harmonization
IV – Infravermelho

LD – Limite de detecção
LOS - Losartana

LQ – Limite de quantificação
MTF - Metformina

r – Coeficiente de correlação linear

SCB – Sistema de Classificação Biofarmacêutica

SQC - Substância Química Caracterizada

SQR – Substância Química de Referência

TG/DTG - Thermogravimetry/Thermogravimetry Derivative (Termogravimetria/
Termogravimetria derivada)

TR – Tempo de retenção

UV – ultravioleta

VIS – visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 USO DE MEDICAMENTOS PARA DOENÇAS CRÔNICAS NÃO TRANSMISSÍVEIS (DCNT) NO BRASIL	17
2.2 O PAPEL DA FARMÁCIA MAGISTRAL NA PRODUÇÃO DE MEDICAMENTOS PARA O CONTROLE DAS DCNTS	18
2.3 SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS DE REFERÊNCIA	19
2.4 INFORMAÇÕES GERAIS SOBRE OS FÁRMACOS EMPREGADOS NESTE ESTUDO	20
2.4.1 Losartana	20
2.4.2 Atorvastatina	24
2.4.3 Metformina.....	27
3. OBJETIVOS	30
3.1 OBJETIVO GERAL	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 MATERIAL: MATÉRIAS-PRIMAS, AMOSTRAS COMERCIAIS, EXCIPIENTES E SOLVENTES.....	31
4.2 MÉTODOS – ANÁLISES QUALITATIVAS.....	31
4.2.1 Temperatura de Fusão	31
4.2.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	31
4.2.3 Espectrofotometria de absorção na região do Ultravioleta (UV)	32
4.2.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	32
4.2.5 Termogravimetria (TG) e Termogravimetria derivada (DTG)	32
4.3 MÉTODOS – ANÁLISES QUANTITATIVAS	32
4.3.1 Condições cromatográficas	32
4.3.2 Conformidade do sistema cromatográfico e otimização do método analítico	33
4.3.3 Validação do Método Analítico	33
4.3.3.1 Linearidade.....	33
4.3.3.2 Precisão	34
4.3.3.3 Exatidão.....	34
4.3.3.4 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	35
4.3.3.5 Robustez.....	35
4.3.3.6 Seletividade	36

4.3.3 CONTROLE DE QUALIDADE DAS AMOSTRAS COMERCIAIS	36
4.3.3.1 Determinação do peso médio	36
4.3.3.2 Determinação do teor	37
4.4 COMPATIBILIDADE ENTRE OS COMPONENTES DA FORMULAÇÃO	37
4.4.1 Preparação das misturas de fármacos	37
4.4.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	37
4.4.3 Termogravimetria (TG) e Termogravimetria derivada (DTG)	37
4.4.4 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 Análises Qualitativas.....	38
5.1.1 Temperatura de fusão	38
5.1.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	38
5.1.2.1 Atorvastatina	38
5.1.2.2 Losartana	40
5.1.2.3 Metformina.....	41
5.1.3 Espectrofotometria de absorção na região do Ultravioleta (UV).....	42
5.1.3.1 Atorvastatina	42
5.1.3.2 Losartana	43
5.1.3.3 Metformina.....	44
5.1.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Termogravimetria (TG) e Termogravimetria derivada (DTG)	45
5.1.4.1 Atorvastatina	45
5.1.4.2 Losartana	46
5.1.4.3 Metformina.....	47
5.2 ANÁLISES QUANTITATIVAS	48
5.2.1 Conformidade do sistema cromatográfico e otimização do método	48
5.2.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	54
5.2.2.1 Linearidade, Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	54
5.2.2.2 Precisão	57
5.2.2.3 Exatidão.....	58
5.2.2.4 Robustez	59
5.2.2.5 Seletividade	61
5.2.3 CONTROLE DE QUALIDADE DAS AMOSTRAS COMERCIAIS	62
5.2.3.1 Determinação do peso	62
5.2.4 COMPATIBILIDADE ENTRE COMPONENTES DA FORMULAÇÃO	64

5.2.4.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria (TG).....	64
5.2.4.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)	68
6 CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS	73

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares, doenças respiratórias crônicas, diabetes mellitus e neoplasias são consideradas as principais doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs) (SAÚDE, 2018). O Plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs) no Brasil entre 2021 e 2030, prevê um aumento de mais de 50% das mortes no Brasil. Visto que alcançou, em 2008 uma taxa de aproximadamente 54,7% de mortes pelas doenças e 11,5% por agravos decorrentes delas (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2011).

Dentre essas, a Hipertensão Arterial (HA), conforme a Pesquisa Nacional de Saúde realizada em 2013, atingiu cerca de 21,4% da população maior de 18 anos de idade (LOBO et al., 2017). Além disso, revelou uma maior prevalência em mulheres, por possuírem melhor percepção de sinais e sintomas físicos, buscando mais frequentemente o serviço de saúde para a realização do tratamento (VITOI et al., 2015). Além da HA, a Diabetes Mellitus (DM) é considerada um problema de saúde global, afetando aproximadamente 8,8% da população mundial entre 20 a 79 anos de idade conforme relatado em 2017 pela Federação Internacional de Diabetes (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017)(DIRETRIZES SBD, 2015)(LYRA et al., 2020).

Estudos relatam que tratamento medicamentoso da DM deveria ser iniciado após três a seis meses e, quando os objetivos metabólicos não forem alcançados somente com a mudança do estilo de vida. Quando um medicamento de primeira escolha como a Metformina não atingir o objetivo terapêutico, as metodologias farmacológicas recentes, que dependem do uso de uma combinação de classes diferentes, podem ser aplicadas. Dessa forma, fármacos análogos precisam ser adicionados ao regime terapêutico (ATIA et al., 2019)(EL-ZAHER et al., 2019)

Assim, pacientes portadores dessas doenças necessitam de tratamento através de diversas farmacoterapias. Porém, poucos métodos para a quantificação de Metformina usando cromatografia líquida de alta eficiência foram relatados na literatura, assim como a associação de fármacos anti-hipertensivos com antidiabéticos. Sendo assim, combinar medicamentos de dose fixa se tornou uma evolução de tratamento, dentro desse contexto Laporta et al. (2013), dando-se maior importância ao preparo de medicamentos por farmácias magistrais, com dosagem personalizada, menor custo e aquisição de novos medicamentos (ANDERSON, 2016).

Um exemplo é a associação de classes farmacológicas distintas em uma mesma forma farmacêutica (AZEVEDO; RIBEIRO; DE ARAÚJO, 2008).

O tratamento medicamentoso, a custo aceitável possibilita controlar DCNT, reduzindo a taxa de mortalidade e melhorando a qualidade de vida das pessoas (MALTA; SILVA JR, 2013). Fármacos anti-hipertensivos e antidiabéticos associados em uma mesma formulação, têm sido frequentemente prescritos e preparados na farmácia magistral (NART, 2015). Porém, potenciais interações podem afetar a natureza química dos fármacos e excipientes, a solubilidade, a estabilidade das formulações e, ainda, afetar a segurança, eficácia e biodisponibilidade do medicamento (SANTOS, 2012).

Com isso, várias pesquisas relacionadas ao controle de qualidade vêm sendo realizadas, com o desenvolvimento de métodos analíticos eficazes e confiáveis (ROCHA; GALENDE, 2014). No entanto, não existe na literatura o desenvolvimento de métodos analíticos de uma associação terciária envolvendo antidiabéticos, anti-hipertensivos e medicações para dislipidemias na mesma formulação. Dessa forma, um método analítico por Cromatografia Líquida de Alta eficiência foi investigado para a quantificação simultânea de Atorvastatina, Losartana e Metformina, em uma mistura terciária em solventes adequados, visando a validação da metodologia.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 USO DE MEDICAMENTOS PARA DOENÇAS CRÔNICAS NÃO TRANSMISSÍVEIS (DCNT) NO BRASIL

O acesso aos medicamentos em conjunto com as estratégias implementadas para a melhoria da saúde pública tem como objetivos o controle das doenças, redução da morbimortalidade portadores de diversas condições de saúde que se encaixam nas DCNTs (TAVARES et al., 2015).

Na Assembléia Mundial da Saúde, os governos adotaram como meta global a redução inicial de 25% das mortes por DCNTs até 2025. Da mesma forma que, as políticas sociais e econômicas garantem redução de risco de doença e promoção do acesso universal e igualitário às ações e serviços para promoção, proteção e recuperação da saúde (MALTA; SILVA JR, 2013).

No Brasil 81,4% dos hipertensos fazem o uso de medicamentos, sendo apenas 21,4% do total dos brasileiros diagnosticados com hipertensão. O acesso aos medicamentos apresenta-se sob desigualdade entre as grandes regiões. A região norte tem menor prevalência de diagnóstico e tratamento medicamentoso às DCNTs enquanto no Sul e Sudeste o uso de medicamentos tem maior prevalência. Esta desigualdade está associada ao diagnóstico prévio e o controle do uso destes medicamentos que, em muitos casos, é falho por envolver maior ou menor acesso aos serviços de saúde e de diagnóstico (OLIVEIRA et al., 2016)

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que no mundo há 422 milhões de pessoas com diabetes. No Brasil, segundo a Pesquisa Nacional de Saúde, realizada pelo Ministério da Saúde, 9 milhões de brasileiros estão com diabetes, o que corresponde a mais de 6% da população. Porém, dados da Sociedade Brasileira de Diabetes, sugerem que este índice é ainda maior, ou seja, cerca de 12 milhões de brasileiros estão com diabetes (NOVARTIS).

O tratamento medicamentoso, colabora na redução do número de mortes por DCNTs. Na Hipertensão Arterial (HA) o tratamento tem como resposta a redução de 40% de diagnósticos de acidente vascular cerebral e de 15% por infarto agudo do miocárdio. Dessa forma, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda o diagnóstico precoce e o monitoramento populacional da HA (LESSA, 2004; TAVARES et al., 2015).

2.2 O PAPEL DA FARMÁCIA MAGISTRAL NA PRODUÇÃO DE MEDICAMENTOS PARA O CONTROLE DAS DCNTS

As Farmácia de Manipulação ou Farmácias Magistrais vêm crescendo anualmente no Brasil, com ou sem crise econômica no país. Mesmo com o advento da pandemia por COVID-19, o setor apresentou crescimento de 10,4%, o qual contratou mão-de-obra por causa do aumento da demanda. Na verdade, desde o início dessa pandemia as farmácias magistrais atenderam muitos profissionais de saúde e pacientes que outrora nunca tiveram contato com esse serviço, mostrando sua importância social. As pessoas necessitam de atendimento personalizado de acordo com suas condições clínicas (TEIXEIRA; BUZUTTI, 2015)

A Farmácia de Manipulação vem se adequando, ao longo do tempo, mudanças técnicas, científicas, cognitivas, críticas e políticas para que o medicamento magistral tenha a qualidade conforme regulamentada pela ANVISA e literaturas oficiais (MIGUEL et al., 2002).

Com o crescimento desta atividade no Brasil, houve maior preocupação com a qualidade dos medicamentos manipulados por parte da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que em 08 de outubro de 2007, publicou a segunda regulamentação específica para o setor, a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 67. Esta resolução instituiu as boas práticas de manipulação em farmácias magistrais normatizando procedimentos que visam a obtenção de medicamentos com qualidade, eficácia de segurança (BONFILIO, 2009).

A garantia de qualidade dos medicamentos magistrais envolve desde a aquisição de insumos de fornecedores idôneos com comprovação de regularidade junto às autoridades sanitárias, laudos de qualidades de cada matéria-prima até a comprovação, por meios de testes de controle de qualidade nos medicamentos manipulados realizados na farmácia (BAIENSE et al., 2017).

Os medicamentos manipulados possibilitam a associação de fármacos não comercializados industrialmente, tornando assim, uma vantagem não só econômica, mas também em uma estratégia terapêutica personalizada como flexibilidade de dosagem (POMBAL; BARATA; OLIVEIRA, 2010).

Os medicamentos magistrais são produtos que estão sujeitos a riscos durante o todo o processo de produção, se não preparados corretamente, podendo causar danos aos usuários (COSTA, 2003). Além disso, os medicamentos manipulados trazem consigo riscos associados à formulação, isto é, a incerteza sobre a biodisponibilidade (BRAGA, 2009), podendo ainda, resultar em incompatibilidades entre os fármacos ou com os excipientes e, dessa forma,

comprometer a estabilidade do produto e conseqüentemente o efeito terapêutico (GRAZIELA RAMOS, 2013).

A RDC n° 67/2007 determina que todo o processo de fabricação do medicamento seja feito na farmácia magistral, sendo que para preparações sólidas, como capsulas gelatinosas duras, sejam os ensaios de controle de qualidade como peso médio, desvio padrão e coeficientes de variação em relação ao peso médio, que apesar de importantes, não avaliam a uniformidade no preenchimento das cápsulas com a mistura de pós, isto é, fármacos com os excipientes. Ademais, estes testes não fornecem informação sobre a homogeneidade da mistura depois de encapsulada, uma vez que não há determinação de teor (ANVISA, 2007).

Todavia os testes de quantificação do teor de ativos das formulações são facultados nas farmácias magistrais, podendo ceder à terceirização, mediante contrato direto estabelecido com o estabelecimento farmacêutico e o laboratório prestador desse serviço. A RDC n° 67/2007 recomenda que este acordo seja feito, preferencialmente, com laboratórios pertencentes a Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos (ANVISA, 2007).

Dessa forma, a garantia da qualidade dos medicamentos manipulados frequentemente é questionada por profissionais da área da saúde. A falta de informação a respeito do controle de qualidade dos medicamentos magistrais levou a Sociedade Brasileira de Cardiologia a não recomendar o uso dos anti-hipertensivos manipulados (BONFILIO *et al.*, 2013). Assim, as farmácias magistrais conquistarão total credibilidade no mercado se a qualidade for percebida como estratégia para a sustentabilidade do setor, na produção de medicamentos seguros e eficazes (ALMEIDA; FILHO, 2011).

2.3 SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS DE REFERÊNCIA

As Substâncias Químicas de Referência da Farmacopeia Brasileira (SQR) são padrões de referência farmacopeicos de alto grau de pureza, cujo valor atribuído a uma ou mais de suas propriedades é aceito sem necessitar comparação com outro padrão. As SQR são destinadas ao uso em ensaios específicos descritos nas monografias farmacopeicas. Contudo, uma Substância Química de Referência Caracterizada (SQC) pode ser utilizada, quando da inexistência de uma SQR farmacopeica (ANVISA, 2017).

Segundo a RDC 166/2017, uma SQC pode ser uma substância ou mistura de substâncias químicas ou biológicas, onde a identidade, a qualidade, a pureza, o teor/potência tenham sido assegurados por processo de caracterização. Para a validação de métodos analíticos o uso de uma SQC poderá ser admitido mediante a apresentação de relatório de caracterização

conclusivo para o lote em estudo, incluindo as razões técnicas para escolha dos ensaios utilizados.

A caracterização de SQC é dada pelo conjunto de ensaios que garante inequivocamente a autenticidade e qualidade da substância a partir de técnicas aplicáveis à caracterização de cada substância como, por exemplo, termogravimetria, ponto de fusão, calorimetria exploratória diferencial, espectroscopia no infravermelho, ensaios cromatográficos, entre outras;

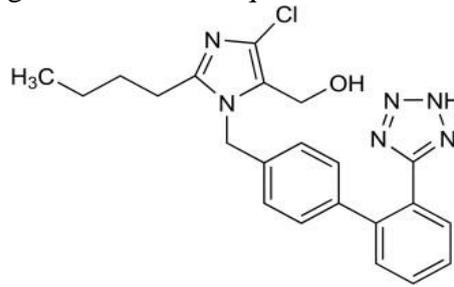
2.4 INFORMAÇÕES GERAIS SOBRE OS FÁRMACOS EMPREGADOS NESTE ESTUDO

2.4.1 Losartana

O losartana (LOS) é um fármaco da classe dos antagonistas do receptor de angiotensina II (tipo AT1) utilizado para o tratamento da hipertensão, que tem como ação a redução da pressão arterial pela diminuição da resistência periférica total e retorno venoso cardíaco (BONFILIO et al., 2009)(TENGLI; GURUPADAYYA; SONI, 2013). Pertencente a Classe III no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), apresenta alta solubilidade e baixa permeabilidade sendo o processo de permeação do fármaco pela membrana intestinal a etapa limitante na absorção do fármaco (VILLANOVA, J.C.O.; SA, V.R, 2009).

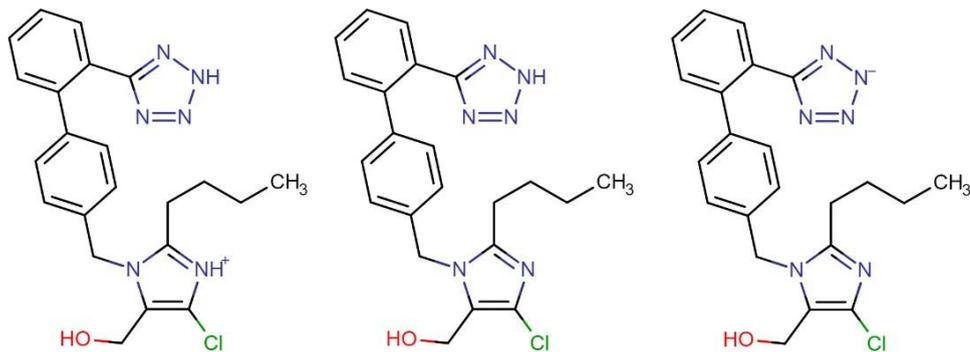
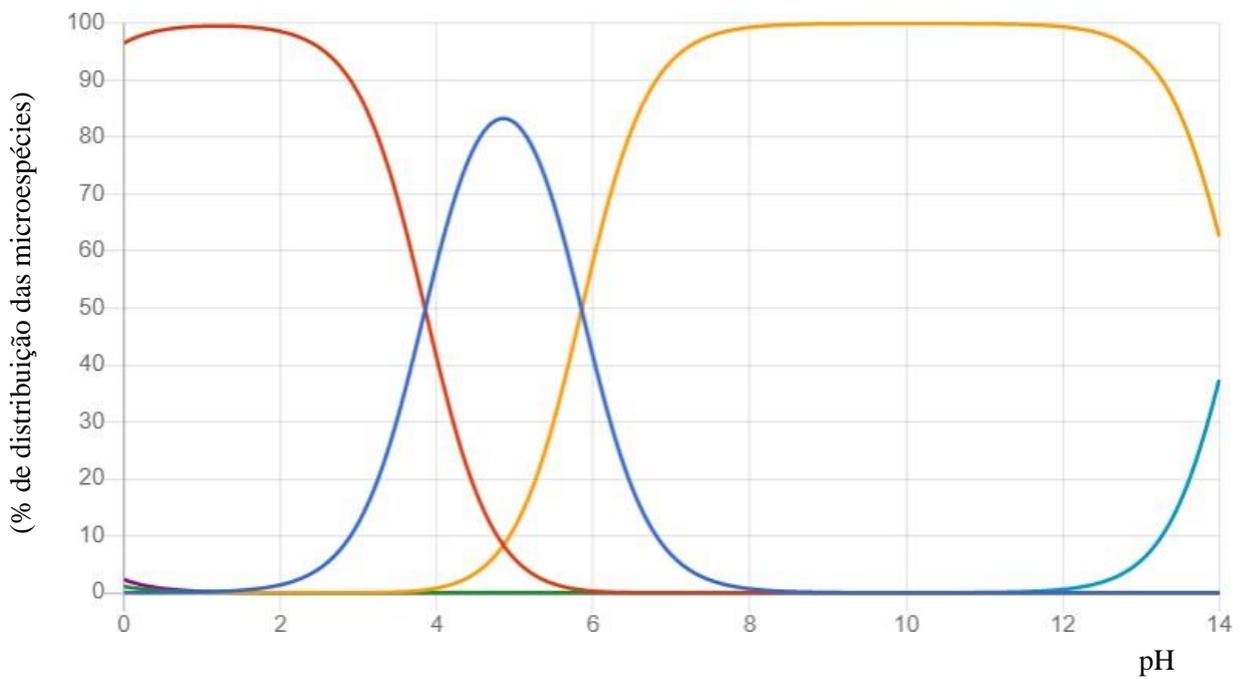
Trata-se de um fármaco que possui dois pKas: $pK_{a1} = 3,85$ (base) e $pK_{a2} = 5,85$ (ácido), com aparência de um pó branco cristalino ou quase branco, facilmente solúvel em água, ligeiramente solúvel em isopropanol e pouco solúvel em acetonitrila. O comportamento deste fármaco próximo ao pH 3,0, há aproximadamente 10% na forma neutra em representado pela curva azul e aproximadamente 85% na forma protonada, em meio aquoso, representado pela curva vermelha da Figura 2, porém, em pH 7,0, há predominância em 90% da forma iônica do LOS no anel representado pela curva amarela. Possui porcentagem de umidade $\leq 0,5\%$, com faixa de fusão em torno de 263°C a 265°C (PHARMACOPEIAL, 2014). A forma molecular do losartana é $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{ClKN}_6\text{O}$ e massa molar de 422,91 g/mol (FARMACOPEIA, 2019). A Figura 1 ilustra a estrutura química do losartana, a Figura 2 demonstra o comportamento deste fármaco em relação a alteração do pH e a Tabela 1 mostra os métodos analíticos desenvolvidos por CLAE para determinação de losartana em diferentes matrizes.

Figura 1 - Estrutura química da losartana



(Fonte: MOFFAT, 2011)

Figura 2 - Gráfico representativo da distribuição das microespécies químicas do Losartana (LOS) versus pH mostrando o comportamento químico do fármaco no intervalo de pH entre 1-14



Fonte: adaptado de Chemicalize.com (2020) no intervalo de pH entre 1-14

Tabela 1 - Métodos analíticos por CLAE para determinação do Losartana em diferentes condições cromatográficas

Matriz	Coluna	Fase móvel	Vazão (mL min⁻¹)	Deteção	Tempo (min)	Referência
Plasma	C8 (250 mm × 4.6 mm, 5 µm)	tampão de fosfato (pH 4,3), acetonitrila (75:25, v/v)	0,9	UV	13	JALALIZADEH, 2003
Plasma	C18 (50 x 4.6 mm, 2.7µm)	0,1% de ácido fórmico em metanol e 0,1% de ácido fórmico	1.0	UV	3	DUBEY, 2015
Medicamento	C8 (150 x 4.6, 5-µm)	trietanolamina 0,5% pH 2,4 : acetonitrila (60:40)	1.0 Isocrático	PDA	3	MAIO, 2005
Medicamento	C8 (100 × 4,6 mm , 5 µm)	Tampão fosfato 58 mmol L-1 pH 6,2 e acetonitrila (65:35 v/v)	1.0 Isocrático	UV	3	BONFILIO, 2009
Medicamento	C18 (4.6×250 mm, 5 µm)	ACN: MeOH: hidrogenossulfato de tetra	1.0	UV	6	RAO, 2010
Medicamento	C18 (250 × 4.6 mm, 5-µm)	acetonitrila, água e 0,4% de tampão de dihidrogenofosfato de potássio, pH 2,7 ajustado com ácido ortofosfórico (45:35:20)	1.0 Isocrático	UV	8	TENGLI et al., 2013
Medicamento	C8 (150 mm × 4.6 mm, 5 µm)	MeOH: ACN: tampão acetato (45:20:35)	0,82	UV	6	SMAJÍČ, 2013
Medicamento	C18 (100 mm x 2,1 mm, 3 µm)	água pura e acetonitrila acidificada com 1% de ácido fórmico	0,2 Gradiente	UV	14	DRIGO, 2013
Medicamento	C18(50 mm x 2,1 mmx 1,8 µm)	água:acetonitrila; trietillamina:ácido ortofosfórico (pH=3,0)	0,9 Isocrático	UV	3	OLIVEIRA, 2015
Medicamento	C18 (250x4.6 mm, 5µm)	Acetonitrila, 0,05% de ácido ortofosfórico + 0,05% de trietalamina (40:60 v/v)	1.0	UV	20	MOHAMMED, 2017
Medicamento	C18 (250 × 4.6 mm, 5-µm)	metanol: tampão formiato de amônio 10 mmol L ⁻¹ (pH 3,5)	1.0 Gradiente	PDA	40	SACCHI, 2018

Medicamento	C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm)	acetonitrila/água (35:65)	1,0 Isocrático	UV	10	SILVA, 2018
Medicamento	C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm)	acetonitrila:água (50:50, v/v)	0,6 Isocrático	UV	4	MELO, 2018
Medicamento	C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm)	Metanol: acetonitrila		UV		JAIN, 2018
Medicamento	C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm)	ACN: H2O (60:40, v/v)	0,8 Isocrático	UV	5	FERREIRA, 2019

2.4.2 Atorvastatina

O Atorvastatina (ATO) é um fármaco da classe das estatinas, sendo um inibidor seletivo e competitivo da HMG-CoA redutase que reduz a produção do colesterol limitando a sua formação (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2017). É empregado para baixar os níveis de colesterol e tem se destacando como terapia adjuvante com antidiabéticos, propiciando redução de eventos cardiovasculares indesejáveis (DIRETRIZES SBD, 2015). Esse fármaco pertence a classe II do SCB, possui baixa solubilidade e alta permeabilidade tendo como resultado a diminuição da velocidade na absorção oral, etapa esta limitante da absorção (VILLANOVA, J.C.O.; SÁ, 2009).

O ATO é uma estatina sintética e relativamente lipofílica, possui grupamentos laterais ao anel pirrol que definem sua solubilidade (NUNES, 2010). Apresenta-se como pó branco a quase branco, possui pKa 4,31 (CHEMICALIZE, 2020), sendo muito pouco solúvel em água, pouco solúvel em etanol, levemente solúvel em acetonitrila e facilmente solúvel em metanol, com faixa de fusão entre 159,2 e 160,7 °C e apresenta massa molar de 558,64 g/mol e fórmula molecular $C_{66}H_{68}CaF_2N_4O_{10}$ (MOFFAT, 2011).

A Figura 3 ilustra a estrutura química do ATO, e a Figura 4 demonstra distribuição das microespécies químicas do ATO em função do pH, mostrando o comportamento químico do fármaco (CHEMICALIZE, 2020). Em pH 3,0, a forma neutra encontra-se aproximadamente 95% distribuída em meio aquoso, representado pela linha azul da figura 4. Enquanto que em pH 7,0 a forma ionizada encontra-se disponível no meio representada pela linha vermelha da figura 4. A Tabela 2 expõe os métodos analíticos desenvolvidos por CLAE para determinação de ATO em diferentes matrizes.

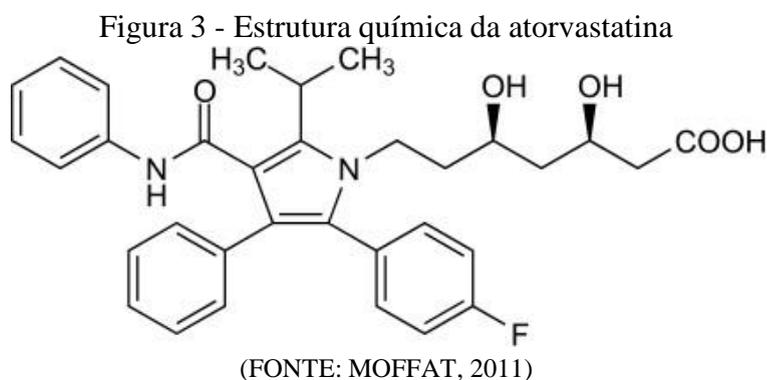
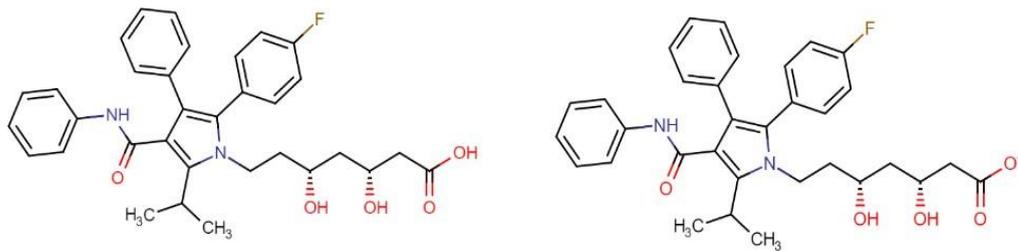
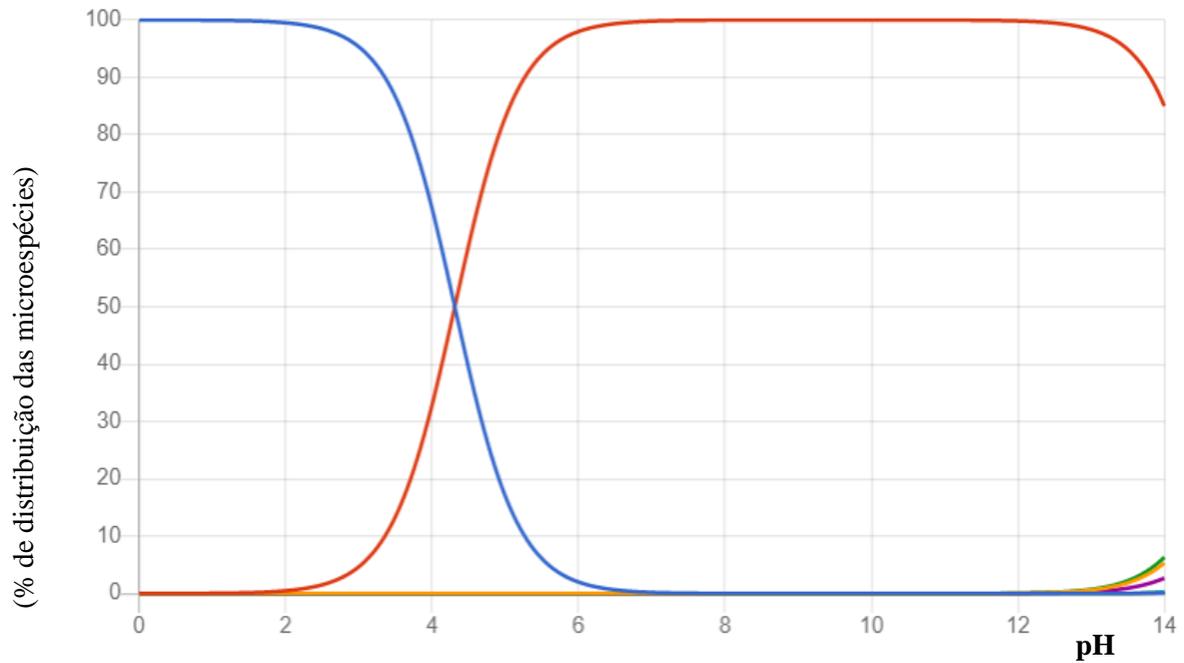


Figura 4- Gráfico representativo da distribuição das microespécies químicas do Atorvastatina (ATO) versus pH mostrando o comportamento químico do fármaco no intervalo de pH entre 1-14



Fonte: adaptado de Chemicalize.com (2020) no intervalo de pH entre 1-14

Tabela 2 - Métodos analíticos por CLAE para determinação do Atorvastatina em diferentes condições cromatográficas

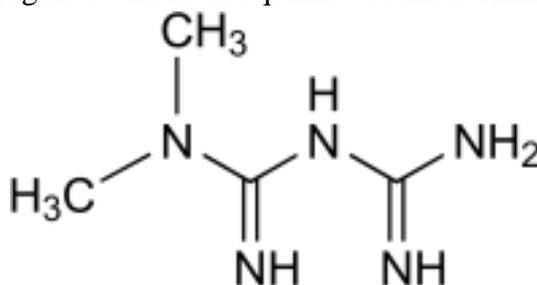
Matriz	Coluna	Fase móvel	Vazão (mL min ⁻¹)	Deteção	Tempo(min)	Referência
Medicamento	C18 (150 x 3,9 mm, 4 µm)	ACN: Tampão acetato de amônia (40:60)	1.3 Isocrático	UV	8	MENDES, 2010
Medicamento	C18 (150 x 3,9 mm; 4µm)	tampão acetato de amônio 0,02 mol.L-1 (ajustado a pH 3,0) e acetonitrila (60:40 %v/v)	1.3 Isocrático	UV	15	NUNES, 2010
Medicamento	C18 (125 x 4 mm, 5µm)	metanol: água (70:30 v/v): Trietilamina 5 mM, pH ajustado para 3,0 com ácido orto-fosfórico	1.4 Isocrático	UV	3	TEJERINA, 2011
Medicamento	C18 (150 x 4.6 mm, 3.5 µm)	Acetonitrila: água destilada (85:15) a pH 4,5 (ajustado com ácido fosfórico)	1.0 Isocrático	UV	7	SANGSHETTI et al.,2012
Medicamento	C18 (250 × 4.6 mm, 5 µm)	tampão acetato de sódio (pH 4,2): acetonitrila (45:55)	1.0 Isocrático	UV	6	MACHADO et al., 2013
Medicamento	C18 (2.1 x 100 mm 2.7 µm)	A: acetronitrila, tampão e tetra-hidrofurano B: acetonitrila, tampão e tetra-hidrofurano na proporção de 61:27:12	0.5-1.0 Gradiente	UV	17	RAMESHA et al., 2014
Medicamento	C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm)	0,025 M potássio dihidrogeno-fosfato (pH 6.0):acetonitrila (60:40)	1.5 Isocrático	UV	8	ELSHANAWANE et al.,2014
Medicamento	C18 (4.6 x 150mm, 5µm)	Tampão OPA:acetonitrila	1.0 Gradiente	PDA	8	VARAPRASAD et al.,2015
Nanopartículas	C18 (4.6 x 250 mm)	A: tampão fosfato (pH 2,9) (70%)B: fase orgânica (30%)	1.0 Isocrático	UV	8	GITE et al., 2015
Medicamento	C18 (75 x 4.6 mm; 3.5 µm)	tampão de acetato de amônio (10mM: pH 4,0) e acetonitrila em uma proporção de 40:60	2.0 Isocrático	UV	7.5	ALHAZMI et al., 2017

2.4.3 Metformina

O Metformina (MTF) é um fármaco hipoglicemiante da classe das biguaninas empregado no tratamento de diabetes mellitus não insulino-dependente para controle glicêmico, que age através da diminuição da absorção intestinal de glicose (THOMAS et al., 2011). Além de manifestar efeito moderador do apetite, o metformina é utilizado para o tratamento dos diabéticos obesos, pois não estimula o aumento da síntese de insulina e nem de ácidos graxos (PERES, 2013).

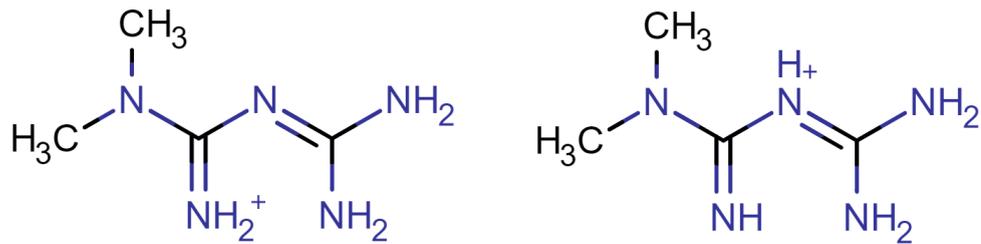
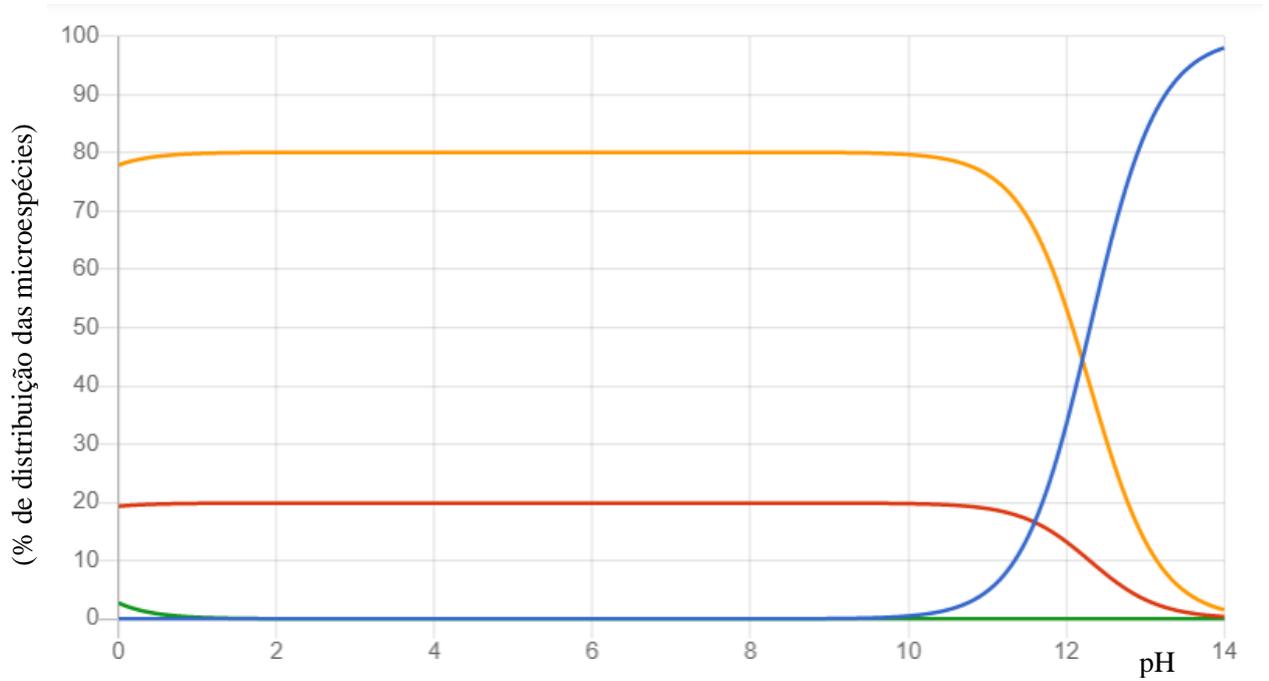
Esse fármaco é descrito como um pó branco cristalino, facilmente solúvel em água, pouco solúvel em álcool etílico e com faixa de fusão de 222 °C a 226 °C (FARMACOPEIA, 2017). Segundo o SCB, o MTF pertence a classe III, isto é, de alta solubilidade e baixa permeabilidade pelo SCB, tendo como etapa limitante a absorção pela membrana intestinal (VILLANOVA, J.C.O.; SÁ, 2009). A Figura 5 mostra a estrutura química da metformina e a Figura 7, a distribuição das microespécies químicas do ATO em função do pH, mostrando o comportamento químico do fármaco (CHEMICALIZE, 2020). Em pH abaixo de 12, o MTF está disponível em 80% na sua forma amina primária protonada e 20% em sua forma amina secundária protonada representadas pelas curvas amarela e vermelha na Figura 6, respectivamente. Tabela 3 apresenta os métodos analíticos por CLAE para determinação desse fármaco em matriz biológica e medicamentosa.

Figura 5 - Estrutura química da metformina



(FONTE: MOFFAT, 2011)

Figura 6 - Gráfico representativo distribuição das microespécies químicas do Metformina (MTF) versus pH mostrando o comportamento químico do fármaco no intervalo de pH entre 1-14



Fonte: adaptado de Chemicalize.com (2020) no intervalo de pH entre 1-14

Tabela 3 - Métodos analíticos por CLAE para determinação do Metformina em diferentes condições cromatográficas

Matriz	Coluna	Fase móvel	Vazão (mL min ⁻¹)	Detecção	Tempo (min)	Referência
Plasma	C18(150x4.6 mm, 5 µm)	acetonitrila:Metanol (1:1)	1.0 Isocrático	UV	20	RANETTI, 2009
Medicamento	Sílica gel pré-revestida HPTLC	clorofórmio: acetato de etila:ácido acético (4:6:0,1)	1.0	UV	10	THOMAS et al., 2011
Medicamento	C18 (250 mm x 4.6 mm, 5.0 µm)	Metanol:água (65:35 v/v)	1.0	DAD	15	STENGER, 2011
Plasma	C18 (250 × 4.6 mm, 5 µm)	Acetonitrila: fase aquosa (34:66) Fase aquosa: 10 mM de KH ₂ PO ₄ e 10 mM delauril sulfato de sódio	1.3 Isocrático	UV	13	CHHETRI, 2013
Medicamento	C8 (250 × 4.6 mm, 5-µm)	acetonitrila: tampão fosfato(pH 3,0) (60:40)	1.0 Isocrático	UV	10	RAMESH et al., 2014
Plasma	C8 (250 x 4.6 mm, 5 µm)	ACN: tampão fosfato de sódio 10mM pH 4,0 (60:40)	1.0 Isocrático	UV	10	BEN-HANDER, 2015
Plasma	C18(150 x 4,6 mm; 5 µm)	acetonitrila e ácido fosfórico 0,1% (pH 3,0)	1.0–1.5 Gradiente	UV	7	PORWAL et al., 2017
Medicamento	C18 (250 mm x 4.6 mm, 5.0 µm)	Acetonitrila: fase aquosa (34:66) Fase aquosa: 10 mM de KH ₂ PO ₄ e 10 mM delauril sulfato de sódio	1.3 Isocrático	UV	10	CHHETRI, 2017

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar um método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para determinação simultânea de atorvastatina, losartana e metformina em formulações farmacêuticas magistrais, e também, realizaro estudo de compatibilidade entre os componentes da formulação.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a caracterização das matérias-primas: ATO, MTF e LOS, a fim de comprovar sua identidade como padrões de referência, por meio da Espectrofotometria na Região do Ultravioleta (UV) e do Infravermelho (IV);
- Desenvolver e validar método analítico empregando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) para a determinação quantitativa e simultânea da associação ATO, LOS e MTF;
- Realizar o controle de qualidade das amostras comerciais contendo os fármacos acima mencionados, empregando métodos analíticos validados e oficiais.
- Realizar o estudo de compatibilidade fármaco-fármaco empregando técnicas termoanalíticas (TG/DTG e DSC);

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL: MATÉRIAS-PRIMAS, AMOSTRAS COMERCIAIS, EXCIPIENTES E SOLVENTES

As matérias-primas de Atorvastatina cálcica (ATO) com pureza de 98,75% e Cloridrato de Metformina (MET) com 100,02% de teor, foram adquiridas da distribuidora Gemini[®], enquanto Losartana potássica (LOS) foi adquirida da SM Empreendimentos Farm LTDA[®] com pureza 99,12%, conforme relatado em laudos emitidos pelos fornecedores.

As amostras comerciais de cápsulas gelatinosas duras foram adquiridas em três farmácias de manipulação do comércio local da cidade de Campo Grande – Mato Grosso do Sul. A composição das três fórmulas continha a associação dos mesmos fármacos nas mesmas dosagens teóricas: ATO (40 mg), LOS (50 mg) e MTF (500 mg). As formulações continham, como os excipientes mais comuns declarados em amostras manipuladas o lauril sulfato de sódio, aerosil, celulose microcristalina, amido e carbonato de cálcio.

Todos os solventes empregados foram de grau espectroscópico. Acetonitrila (ACN) da marca J.T.Baker[®], Dinâmica[®] e Sigma-Aldrich[®] e metanol (MeOH) da marca Sigma-Aldrich[®] e Dinâmica[®].

A água ultrapura foi obtida por sistema de filtração Direct-Q 3 UV[®] (18,2 $\mu\Omega$ cm⁻¹, 25°C - Merck Millipore[®]) e empregada para o preparo de água acidificada a pH 3,0 com ácido ortofosfórico, verificado com o peagâmetro HANNA INSTRUMENTS[®] modelo pH/ORP edge[®].

4.2 MÉTODOS – ANÁLISES QUALITATIVAS

4.2.1 Temperatura de Fusão

Para a verificação das temperaturas de fusão das SQCs, foi utilizado o equipamento PF 1500 Gehaka[®] e tubos capilares com 1,6 mm de espessura e 7,5 cm de comprimento. As análises foram determinadas em triplicata, com razão de aquecimento que variaram de 2,0 a 10,0 °C min⁻¹, até completa fusão dos fármacos. O ponto de fusão de um sólido é útil tanto na identificação de uma substância como também é uma indicação de sua pureza.

4.2.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia na região do infravermelho (IV) foi realizada utilizando a pastilha de brometo de potássio (KBr), no espectrofotômetro Thermo Scientific modelo Nicolet IS5[®]. Foram obtidos espectros na faixa de 4000 – 400 cm⁻¹ com resolução de 4 cm⁻¹ e então, interpretados e

comparados com dados da literatura.

4.2.3 Espectrofotometria de absorção na região do Ultravioleta (UV)

A espectroscopia na região do ultravioleta foi realizada no espectrofotômetro UV/Vis da Thermo Scientific modelo Evolution 60®. Foram preparadas soluções em metanol na concentração de 10 µg/mL de ATO, LOS e MTF em metanol e água (1:1 v/v) como solvente. Os espectros de absorção foram registrados em comprimentos de onda na faixa entre 200 e 400 nm. Foram obtidos os espectros em triplicata e comparados com os perfis como descritos na literatura.

4.2.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Foram obtidas as curvas de DSC pelo equipamento DSC-Q20 com sistema de refrigeração RDS-90 da TA *Instruments* em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mLmin⁻¹ e razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹ na faixa de temperatura de -70 °C a 270 °C, em cadinhos de alumínio fechados (um de alumínio com tampa perfurada e um cadinho similar), empregando cerca de 4,0 mg de amostra.

4.2.5 Termogravimetria (TG) e Termogravimetria derivada (DTG)

As curvas TG/DTG foram obtidas no sistema TGA-Q50 da TA *Instruments*, em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL min⁻¹ e razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹ até a temperatura de 900 °C, em cadinhos de platina empregando amostras com massas em torno de 4,0 mg.

4.3 MÉTODOS – ANÁLISES QUANTITATIVAS

4.3.1 Condições cromatográficas

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência foram realizadas em cromatógrafo equipado com detector de arranjo de diodos (DAD), do modelo Ultimate 3000 conectado ao software Chromeleon® 7.1 – Chromatography Data System, com “loop” fixo de 20 µL.

As condições experimentais para a separação cromatográfica foram otimizadas com uma coluna Sigma-Aldrich® C18 (100 mm x 4,6 mm, 5,0 µm) no modo isocrático e em temperatura ambiente (25,0 ± 1,0 °C) com vazão de 0,3 mL min⁻¹. A fase móvel foi constituída por MeOH:H₂O (78:22 v/v) com pH ajustado para 3,0 com ácido ortofosfórico. Os comprimentos de onda

empregados foram 246 nm para ATO, 225 nm para LOS e 236 nm para MTF. A injeção foi de 20 μL e o tempo de corrida analítica foi de 8 minutos.

4.3.2 Conformidade do sistema cromatográfico e otimização do método analítico

No desenvolvimento do método foram testadas as colunas cromatográficas Kinetex[®], IneSustain[®], Kromasil[®], YMC[®], Gl Science[®] e Sigma-Aldrich[®] com diferentes composições e proporções de fase móvel, como MeOH:H₂O em pH 3,0 (75:25; 80:20 e 70:30 v/v); MeOH:H₂O em pH 3,0 (75:25; 80:20 e 70:30) e ACN:H₂O (75:25, 80:20, 50:50), sem alterar o pH.

A melhor condição cromatográfica foi determinada pela análise da conformidade do sistema, avaliando os parâmetros de pureza dos picos, o número de pratos, os fatores de assimetria, resolução e o tempo de retenção, conforme preconizado nos guias de validação de métodos cromatográficos (ICH, 2005)

4.3.3 Validação do Método Analítico

Para a validação do método cromatográfico desenvolvido neste trabalho, foram utilizados os seguintes guias como embasamento: RDC 166/2017 (ANVISA, 2017), a qual dispõe sobre a Validação de Métodos Analíticos, a *Internacional Conference on Harmonization* (ICH, 2005) e a *Association of Official Analytical Chemists International* (AOAC, 2005), seguindo os parâmetros de linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), robustez e seletividade como na RDC 166/2017 (ANVISA, 2017).

4.3.3.1 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada através de curvas analíticas de calibração. Foram preparadas soluções de cada SQC em MeOH:H₂O (78:22 v/v) com pH ajustado para 3,0, sendo de concentração 100,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para ATO, para LOS 150,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e MTF 125,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Posteriormente, alíquotas de 5 mL, 10 mL para LOS, respectivamente, foram transferidas para balões de 50 mL e 100 mL, atingindo concentração de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para ATO, 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para LOS e 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para MTF. E então, alíquotas desta última solução foram precisamente transferidas para balões volumétricos de 10 mL e os volumes foram completados com fase móvel MeOH:H₂O (78:22 v/v) com pH da água ajustado para 3,0. Para ATO, obteve-se soluções na faixa de concentração de 1,0 a 9,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para LOS de 1,5 a 6,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e de 12,5 a 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para MTF.

Todas as análises foram feitas em triplicata e em temperatura ambiente ($24 \pm 1^\circ\text{C}$). A

linearidade foi comprovada por análise das curvas de calibração, e coeficientes de correlação (r) para cada fármaco, separadamente.

4.3.3.2 Precisão

A precisão do método foi avaliada pela repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi obtida pela análise no mesmo dia e pelo mesmo analista em sextuplicatas da mesma solução preparada a partir da amostra comercial nas concentrações de 37,5 µg mL⁻¹ de Metformina, 3,75 µg mL⁻¹ de Losartana e 3,0 µg mL⁻¹ de Atorvastatina conforme faixa linear do método.

A precisão intermediária foi realizada por dois analistas em três dias diferentes nas mesmas concentrações utilizadas pela repetibilidade. Os resultados do ensaio geral de precisão foram obtidos pelos cálculos do desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR).

4.3.3.3 Exatidão

Foram preparadas soluções a partir das amostras comerciais manipuladas contendo MTF, LOS e ATO em concentrações de 625, 62,5 e 50 µg mL⁻¹, respectivamente. Em seguida, foram transferidas alíquotas da solução padrão preparada com as SQC dos fármacos, a fim de obter soluções de concentração de 37,5, 50 e 62,5 µg mL⁻¹ de MTF; 3,75, 5,0 e 6,25 µg mL⁻¹ de LOS e 3,0, 4,0 e 5,0 µg mL⁻¹ de ATO. Os volumes foram completados com a fase móvel do método e as porcentagens de recuperações de cada fármaco foram calculadas conforme a equação abaixo de acordo com o guia *Association of Official Analytical Chemists International* (AOAC, 2005).

$$\%R = [Ca - Cs. (Ct)^{-1}] \times 100$$

Onde:

R: recuperação

Ca: concentração de fármaco encontrada na amostra adicionada de padrão

Cs: concentração de fármaco encontrada na amostra não adicionada de padrão

Ct: concentração teórica de padrão adicionada à amostra

4.3.3.4 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os limites foram determinados teoricamente através das equações:

$$LD = 3,3 \sigma / c$$

$$LQ = (10 \times \sigma) / c$$

sendo LD para limite de detecção e LQ para limite de quantificação, onde σ representa o desvio padrão do intercepto com o eixo y e c é o coeficiente angular que representa a inclinação da curva de calibração.

4.3.3.5 Robustez

A robustez foi determinada em triplicata de injeções da solução amostra com as concentrações de 37,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de MTF, 3,75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de LOS e 3,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ATO. Os fatores e os respectivos níveis testados estão apresentados na Tabela 4 conforme preconizado na RDC166/17(ANVISA).

Tabela 4 - Fatores selecionados para robustez

Fatores	Unidade	Limite	Modo normal	Modo variado
Fluxo da fase móvel	$\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$	$\pm 0,05$	0,3	$\pm 0,02$
pH da fase móvel	---	$\pm 0,15$	3,0	$\pm 0,05$
Composição da fase móvel	%	± 2	78:22	$\pm 2\%$
Marca da coluna cromatográfica	---	---	Sigma aldrich®	Kinetex®, Gl Science®
Temperatura da coluna cromatográfica	°C	± 2	25	± 2

*Limite: variação que poderia ser realizada; Modo normal: modo realizado durante o estudo; Modo variado: variação que foi realizada

Foram avaliadas as áreas cromatográficas e características dos picos cromatográficos onde o DPR das áreas não poderia ultrapassar 2%. A média obtida com os parâmetros normais foi comparada com a média correspondente aos níveis modificados para assim determinar o impacto das variações propostas nos resultados obtidos.

4.3.3.6 Seletividade

A seletividade foi avaliada pela análise de uma solução de mistura de excipientes lauril sulfato de sódio, aerosil, celulose microcristalina, amido e carbonato de cálcio utilizados na formulação manipulada, nas concentrações usuais, no preparo de cápsulas gelatinosas duras, na concentração de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em comparação com o cromatograma obtido da solução de amostra, em 225 nm, 236 nm e 246 nm a fim de determinar possíveis interferências dos excipientes contidos nesta formulação em relação a metodologia analítica desenvolvida.

4.3.3 CONTROLE DE QUALIDADE DAS AMOSTRAS COMERCIAIS

4.3.3.1 Determinação do peso médio

Conforme RDC 67/2011, a determinação do peso médio foi realizada em três etapas: determinação do peso do invólucro, determinação do peso médio teórico e determinação da média e o desvio padrão relativo (DPR).

A determinação do peso do invólucro foi realizada pesando 20 cápsulas vazias separadamente e calculada a média. A determinação do peso médio teórico se dá pelo cálculo abaixo:

$$P_{\text{teórico}} = P_{\text{cápsulas vazias}} + P_{\text{excipientes}} + P_{\text{fármacos}}$$

Em seguida, foram pesadas 10 unidades das cápsulas da amostra comercial na balança analítica da Shimadzu® AY 220, individualmente, sabendo-se que o DPR para cápsulas iguais ou maior que 300 mg não podem ter uma variação maior que 7,5%. Utilizando a equação abaixo para cálculo do peso médio e DPR, respectivamente.

$$P_{\text{médio}} = \frac{P_{\text{cáp1}} + P_{\text{cáp2}} + \dots + P_{\text{cáp10}}}{10}$$

$$\text{DPR} = \frac{\text{DP}}{P_{\text{médio}}} \times 100$$

4.3.3.2 Determinação do teor

A determinação do teor foi realizada por CLAE-UV/DAD através do equipamento cromatógrafo a líquido de alta eficiência Dionex® modelo Ultimate 3000. A partir do valor do peso médio de cada amostra foram preparadas soluções em fase móvel contendo teoricamente 37,5 µg mL⁻¹ de MTF, 3,75 µg mL⁻¹ de LOS e 3,0 µg mL⁻¹ de ATO. O cálculo do teor dos fármacos foi obtido utilizando as respectivas curvas de calibração.

4.4 COMPATIBILIDADE ENTRE OS COMPONENTES DA FORMULAÇÃO

4.4.1 Preparação das misturas de fármacos

Para o preparo da mistura ternária de fármacos, foram pesados 10 mg, separadamente, de

SQC. Cada SQC foi transferida para um gral de porcelana para serem misturadas uniformemente. Com auxílio de um pistilo, os fármacos foram triturados e misturados até obtenção de uma mistura homogênea. Em seguida, essa mistura na proporção de 1:1:1 foi acondicionada em microtubos cônicos de centrifugação tipo ependorf[®]. De modo semelhante, foram também preparadas misturas de dois a dois fármacos na proporção de 1:1, ambas para posterior análise.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises Qualitativas

5.1.1 Temperatura de fusão

A média da temperatura de fusão experimental obtida pelas técnicas empregadas com tubo capilar do ATO foi de 159 °C, após esta temperatura, observou-se que a matéria-prima começou a se decompor. Segundo a literatura, o ponto de fusão é em torno de 160 °C com decomposição. Assim, pode-se dizer que há conformidade entre a matéria-prima analisada com a literatura oficial (CLARKE'S, 2004).

A LOS teve sua fusão completada em 264 °C com posterior decomposição da matéria-prima. Embora este fármaco esteja incrito na Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2019), não há dados sobre a temperatura de fusão. O resultado aqui encontrado é condizendo com a Farmacopeia Americana (USP, 2014).

A temperatura de fusão do MET foi de 226°C, valoresté condizente com a literatura, isto é, a Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2019), traz faixa de fusão para esse fármaco temperaturas entre 222 e 226°C, indicando, portanto, conformidade com a monografia inscrita do fármaco.

Quando o sólido é impuro, funde em uma temperatura mais baixa e em uma faixa mais ampla do que este composto puro. Desta forma, a análise do ponto de fusão teve importância sobre a identificação e determinação da pureza do composto.

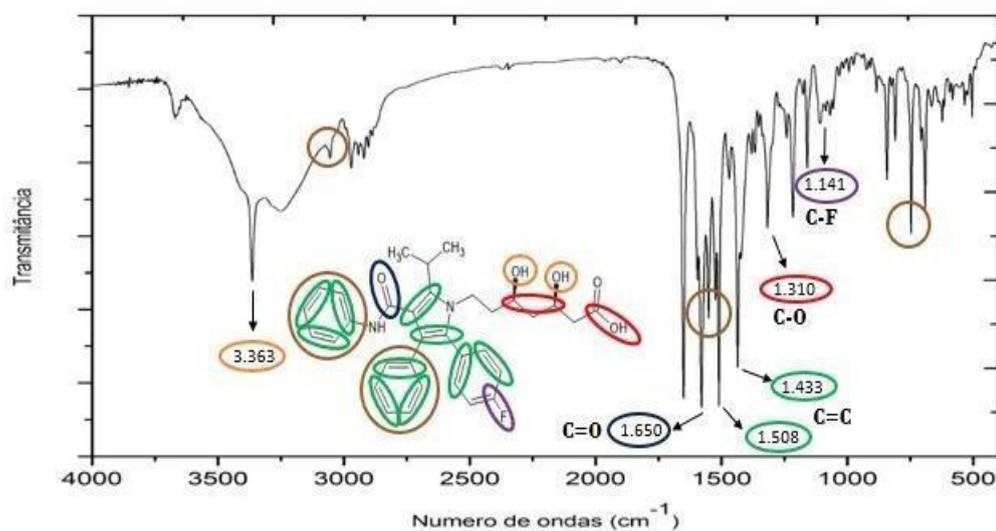
5.1.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

5.1.2.1 Atorvastatina

O espectro de absorção na região do infravermelho (IV) do atorvastatina está ilustrado na Figura 7 e as bandas características dos principais grupos funcionais presentes na molécula

estão na Tabela 5.

Figura 7 - Espectro experimental de absorção na região do infravermelho (IV) do Atorvastatina



Fonte: Origin Pro 8

Tabela 5 - Bandas características do espectro de IV do atorvastatina

Número de onda (cm ⁻¹)	Característica	Atribuição
1141	Banda larga	v C=F
1300, 1400	Bandas de forte intensidade	v C-O
1310	Banda de média intensidade	δ CH3 simétrico
1433 e 1508	Banda de forte intensidade	v C=C do anel aromático
1650	Banda de forte intensidade	v C=O
3300 +/-	Banda larga	v OH de ácido carboxílico
3363	Banda de média intensidade	v NH2 do anel pirimidina

v: estiramento; δ: dobramento.

A substância apresentou o espectro de absorção na região do IV vibrações moleculares no espectro IV que permitiu sua caracterização como: bandas em 1650,3 cm⁻¹ pode ser atribuído à deformação axial de C=O de banda de amida e provavelmente a ligação de água (1750-1500cm⁻¹), uma banda característica em 1469,3 cm⁻¹ correspondente ao alongamento C=C, e duas outras bandas em 1381,6 e 1159,6 cm⁻¹ correspondente do trecho C=C. Uma banda de intensidade média em 3400 +/- corresponde v NH₂ do anel pirimidina, enquanto que a banda larga em 1141 correspondeu ao alongamento C=F. Semelhante ao encontrado por Silva (2009) em seu estudo.

Gomes e colaboradores (2020), ao analisar os espectros de três amostras de Atorvastatina tri-hidratada de farmácia de manipulação, verificaram espectros parecidos com o da literatura porém não idênticos, de acordo com este estudo, provavelmente tem a presença de água e também a espessura da amostra que pode ter provocado as alterações.

Esta análise tem como fundamento a identificação das vibrações obtidas específicas para os determinados grupos funcionais, sendo assim de grande importância quando dá origem as bandas de absorção conforme as estruturas moleculares.

5.1.2.2 Losartana

O espectro de absorção da região do infravermelho do LOS está demonstrado na Figura 8 e as bandas características dos grupos funcionais presentes na molécula estão apresentadas na Tabela 6.

Figura 8 - Espectro experimental de absorção na região do infravermelho (IV) do losartana

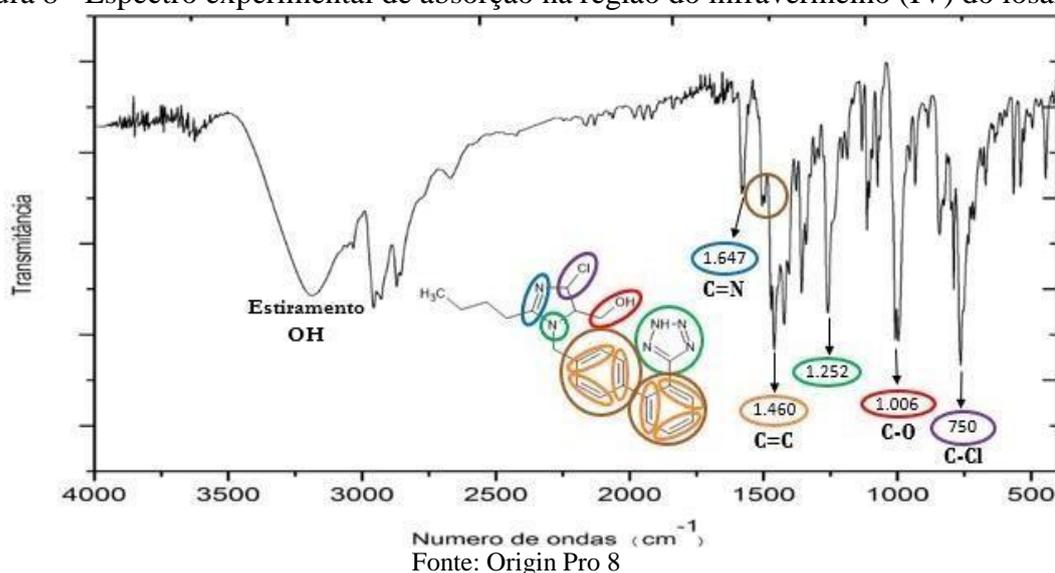


Tabela 6 - Bandas características do espectro de IV do losartana

Número de onda (cm ⁻¹)	Característica	Atribuição
3245	Banda larga	v OH, v NH e v CHsobrepostos
2957 até 2851	Banda de média intensidade	v C-H de carbono sp ³
1647	Banda de média intensidade	C=N
1472, 1460	Banda de forte intensidade	v C=C
1456, 1301, 1252 aminas aromáticas	Banda de média intensidade	anel benzóico com o imidazóico
1006	Banda de forte intensidade	v OH
1006	Banda de forte intensidade	v C-O

v: estiramento; δ : dobramento.

Observa-se acima no espectro de absorção na região do IV do Losartana representado na Figura 8 semelhante ao estudo feito por Anderson (2016). Essa substância apresentou vibrações moleculares características no espectro de IV tornando possível sua identificação: bandas características em 3600-3060 confirmando \square (OH), \square (NH) e \square (CH)do anel benzoico sobrepostos, bandas em 2957-2851 da ligação C-H e banda em 1647 da ligaçãoC=N, e as bandas em 1573, 1494, 1472, 1456 cm⁻¹ da ligação C=C do anel benzóico com oimidazóico, bandas

características também em 1307-1295 referente a amins aromáticas, em 1257 banda referente à ligação O-H e N-H, em 1006 cm^{-1} uma banda característica de ligação C-O. Apesar de Teixeira (2015) indicar a banda 1007 cm^{-1} atribuída ao estiramento C-O de álcoois primários ligados a um carbono adjacente insaturado (anel imidazol), a banda forte em 1252 cm^{-1} representa os modos vibracionais referentes ao anel tetrazol juntamente com as bandas de média intensidade entra 1070 cm^{-1} e 1100 cm^{-1} de estiramento N-N, N-C-N.

5.1.2.3 Metformina

O espectro de absorção da região do infravermelho do Metformina está foi demonstrado na Figura 9 e as bandas características dos grupos funcionais presentes na molécula estão apresentadas na Tabela 7.

Figura 9 - Espectro experimental de absorção na região do infravermelho e estrutura química da matéria-prima de Metformina **Tabela 7 - Bandas**

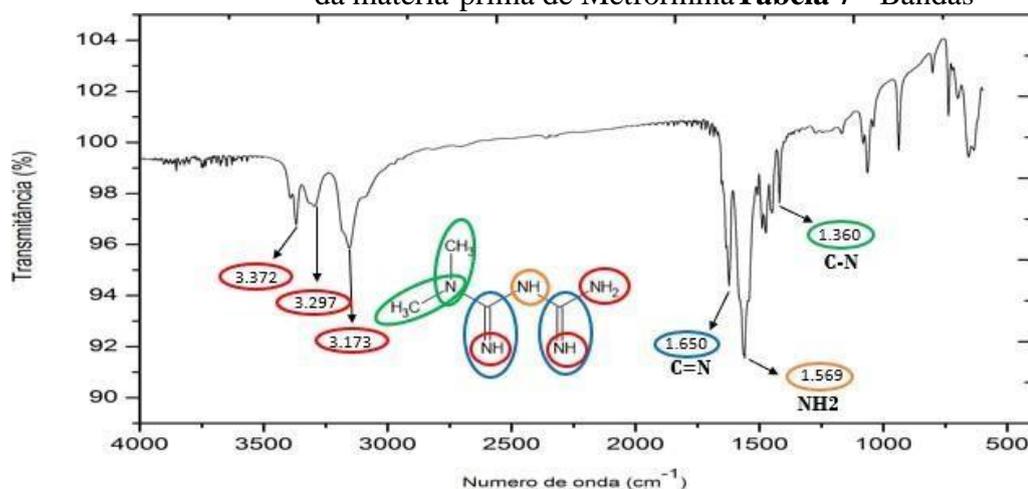


Tabela 7 – Bandas características do espectro de IV do metformina

Número de onda (cm-1)	Característica	Atribuição
3372, 3297 e 3173	Bandas de média intensidade	v NH ₂
1650	Bandas de média intensidade	C=N
1360	Banda de baixa intensidade	v C-N
2835 – 2815	Banda de média intensidade	v C-H de carbono sp ³
1569	Banda de alta intensidade	v NH ₂ amina secundária

v: estiramento; δ: dobramento.

Semelhante ao encontrado por PERES (2013), a MTF apresentou várias vibrações moleculares no espectro de absorção na região do IV. Estas vibrações foram caracterizadas como: bandas no comprimento de onda de $3400 - 3100\text{ cm}^{-1}$ apresenta-se N-H na molécula, assim como nas bandas dos comprimentos entre $1685 - 1580\text{ cm}^{-1}$ a presença de C=N. O

Cloridrato de Metformina possui bandas características entre $2835 - 2815\text{cm}^{-1}$ relatando a presença do nitrogênio próximo ao grupamento metil.

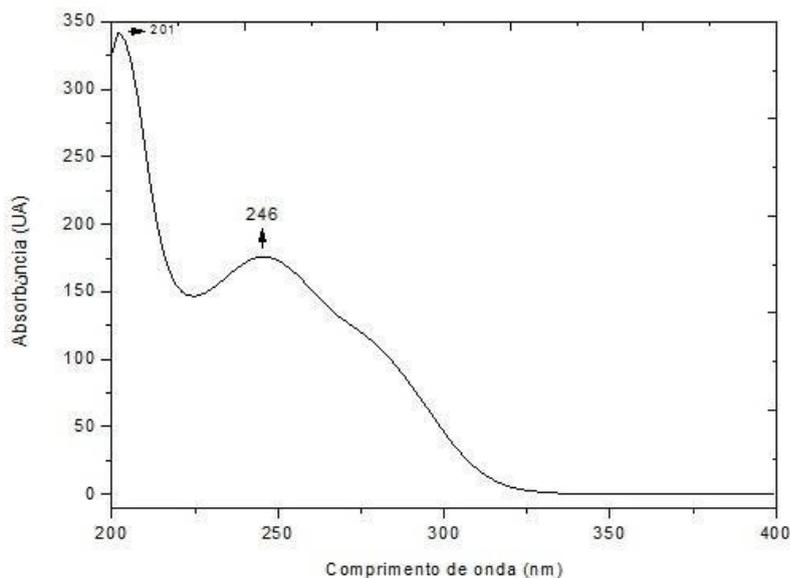
Foi observado uma banda de forte intensidade característica de deformação angular N-H em nosso estudo, assim como Farago (2007) ao estudar micropartículas contendo Cloridrato de Metformina identificando a mesma banda característica.

5.1.3 Espectrofotometria de absorção na região do Ultravioleta (UV)

5.1.3.1 Atorvastatina

Na espectroscopia na região do ultravioleta, o ATO apresentou um máximo de absorção em torno de 246 nm, conforme ilustrado na Figura 10.

Figura 10 - Espectro de absorção na região do ultravioleta da matéria-prima de atorvastatina utilizando metanol (Dinâmica®) como solvente, na concentração de $10,0\mu\text{g mL}^{-1}$



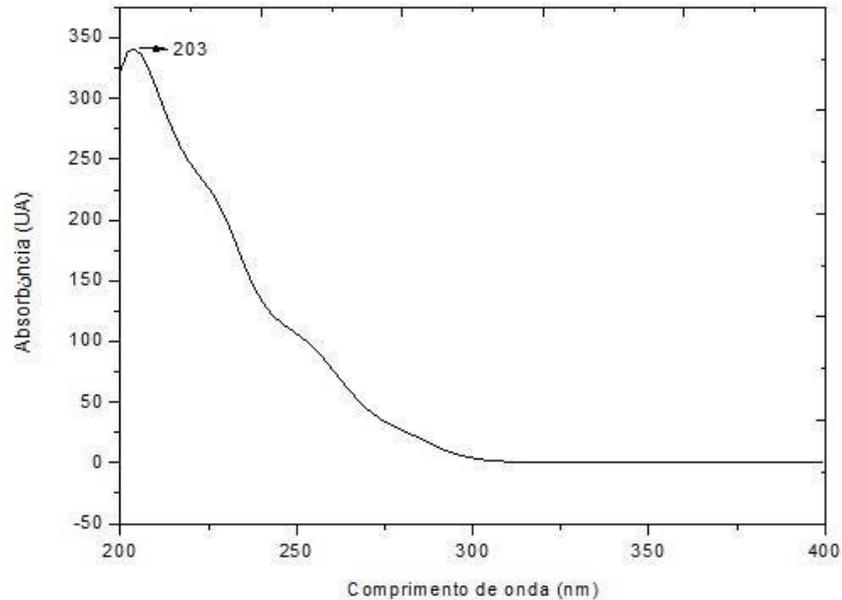
Na espectrofotometria na região do ultravioleta, o ATO na forma de sal de cálcio apresentou absorção máxima na região do ultravioleta em λ 245 nm em metanol (Jt. Baker®) por Silva (2009). Em um estudo realizado por Gomes e colaboradores (2020), o λ_{max} do atorvastatina encontrado, empregando metanol como solvente, foi de 241 nm (GOMES, 2020).

5.1.3.2 Losartana

O LOS foi a matéria-prima que apresentou absorbância máxima no comprimento de onda de 203 nm em metanol conforme ilustrado na Figura 11. O seu espectro no UV foi semelhante ao perfil descrito na literatura (MOFFAT, 2011). A Farmacopeia Brasileira tem como metodologia à observação em 220 nm quando empregado álcool metílico como solvente

no preparo da solução, esta variação de absorção com a leitura em 225 nm tendo como máxima absorção como demonstrado na Figura 11 se justifica pelo solvente influenciar nas ligações iônicas alterando os pontos de absorção.

Figura 11 - Espectro de absorção na região do ultravioleta da matéria-prima de losartana utilizando metanol (Dinamica®) como solvente, na concentração de $10,0\mu\text{g mL}^{-1}$

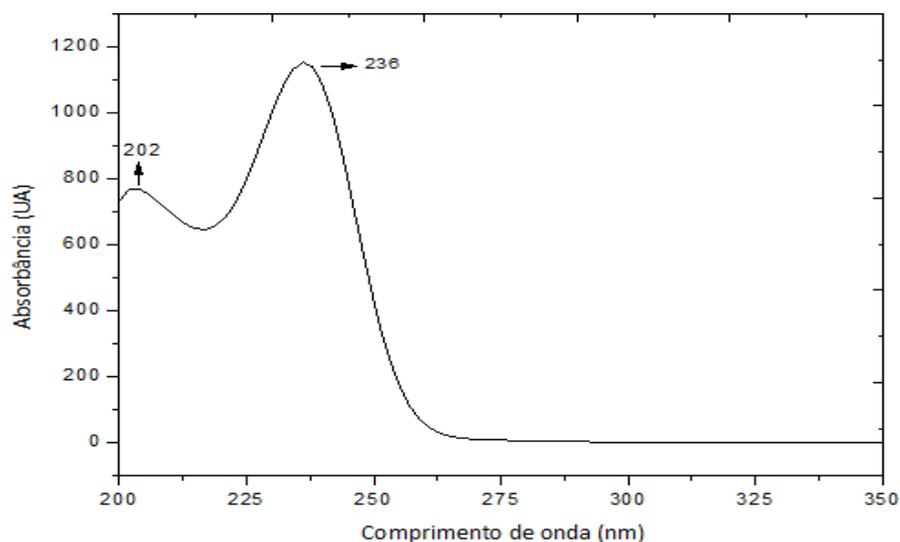


Não há λ max descrito na literatura para o espectro de UV para o fármaco losartana (MOFFAT, 2011). Anderson e colaboradores (2015) determinou o λ max do losartana em 205 nm utilizando metanol como solvente, tal como o espectro experimental obtido para a matéria-prima LOS em investigação.

5.1.3.3 Metformina

O MTF apresentou absorção em 202.7 nm, porém um máximo de absorção em torno de 236 nm na espectrofotometria na região do UV, conforme ilustrado na Figura 12 (MOFFAT, 2011).

Figura 12 - Espectro de absorção na região do ultravioleta da matéria-prima de atenolol utilizando metanol (Dinamica®) como solvente, na concentração de $10,0\mu\text{g mL}^{-1}$



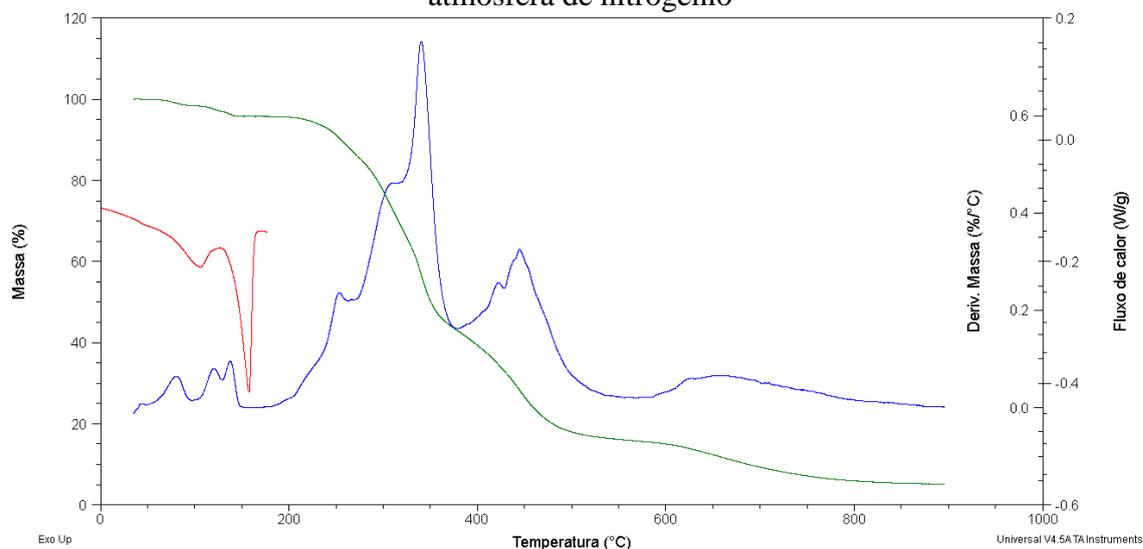
5.1.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Termogravimetria (TG) e Termogravimetria derivada (DTG)

5.1.4.1 Atorvastatina

A curva DSC do ATO (linha vermelha) ilustrada na Figura 13, apresentou dois eventos endotérmicos. Sendo o primeiro em 107°C (pico largo), atribuído a desidratação, em concordância com a primeira perda de massa na curva TG (linha verde) e o segundo evento ocorreu na faixa de 152 a 158°C assim como Silva (2009), ao submeter a razão de aquecimento até 230°C em atmosfera de nitrogênio. A T_{onset} fusão ocorreu em $157,68^{\circ}\text{C}$ atribuído a fusão do fármaco. Os resultados mostrados foram semelhantes aos encontrados por JAHANGIRI e colaboradores (2015). Perda de água de hidratação, é um evento endotérmico que pode ocorrer temperaturas que variam de 100 e 120°C .

Temperaturas a uma vazão de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ tem início de eventos endotérmicos antes do normalmente visualizado deixando os picos mais largos, e desta forma, o explicam que poderá ser devido à reorganização molecular que ocorre em razão de aquecimento mais baixas em maior tempo de análise (GIOLITO, 2004).

Figura 13 - Curvas TG/DTG-DSC do atorvastatina com razão de aquecimento $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ em atmosfera de nitrogênio

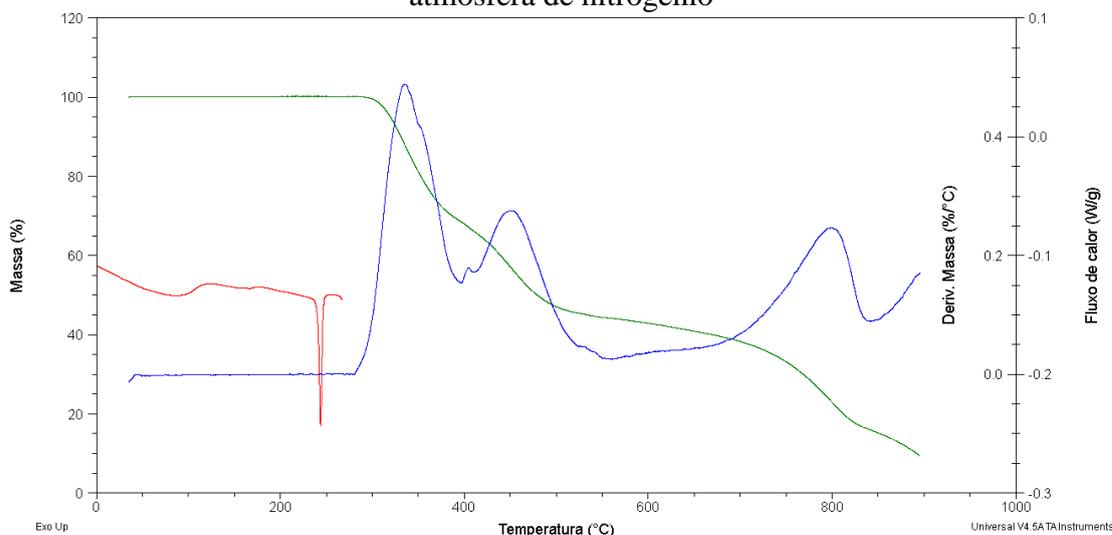


A curva TG representada pela linha verde mostrou um perfil de perda de massa semelhante ao encontrado por Silva e colaboradores (2016), onde a perda começa ocorrer com maior intensidade após $200\text{ }^{\circ}\text{C}$. A perda de massa total foi de aproximadamente 83,30%, que ocorreu entre 200 e $900\text{ }^{\circ}\text{C}$, produzindo cerca de 16,7% de resíduo carbonáceo.

5.1.4.2 Losartana

Na curva DSC da LOS (linha vermelha) apresentou apenas um evento endotérmico em $243\text{ }^{\circ}\text{C}$ identificando a fusão do composto, diferentemente do encontrado nos estudos de Anderson e colaboradores (2016), onde o primeiro evento térmico ocorreu entre $235,82$ e $248,96\text{ }^{\circ}\text{C}$ considerando como fenômeno de polimorfismo e o segundo, a fusão do fármaco $243,67\text{ }^{\circ}\text{C}$. Porém, diferentemente no estudo de Silva (2019), foi encontrado um perfil de fusão do fármaco no segundo evento térmico em $272,6\text{ }^{\circ}\text{C}$. Portanto pode-se dizer que neste caso, o primeiro evento endotérmico não foi tão característico quanto nos outros estudos que identificaram a mudança da forma cristalina em diferentes arranjos ou conformações da molécula, um polimorfismo.

Figura 14 - Curvas TG/DTG-DSC do LOS com razão de aquecimento $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ em atmosfera de nitrogênio

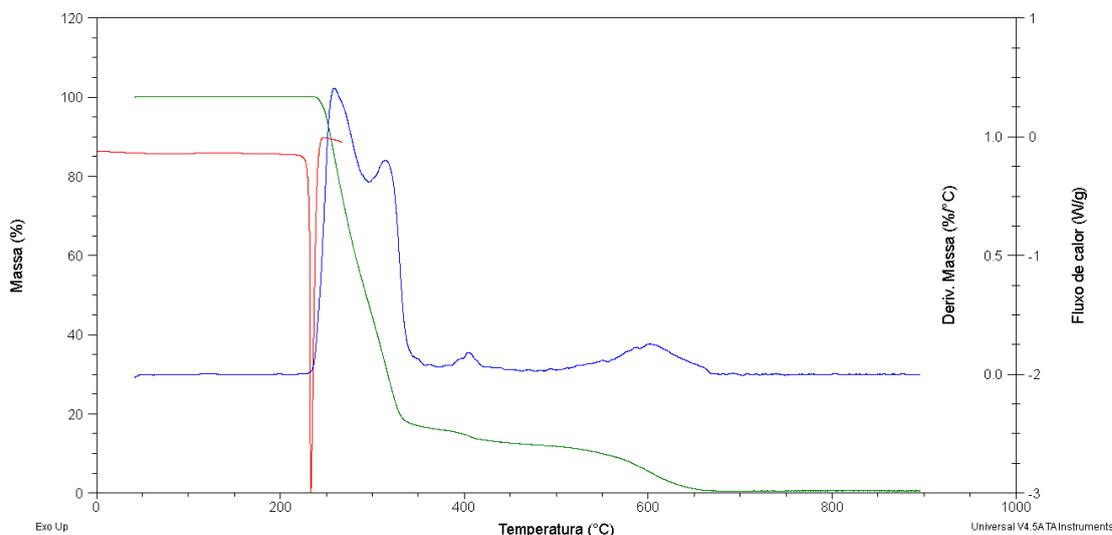


Foi possível observar que nas curvas TG e DTG que a matéria-prima LOS permaneceu estável até 300°C . A partir desta temperatura, observou-se uma perda de massa significativa (93%) e quase total, restando apenas 0,55% de resíduo carbonáceo. Os resultados aqui encontrados foram semelhantes aos de Anderson e colaboradores (2015), o qual mostrou perfil semelhante, isto é, perda de massa de 90,32%, ao final de $900\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.1.4.3 Metformina

A curva DSC da MTF teve seu evento térmico referente ao ponto de fusão do fármaco em $233\text{ }^{\circ}\text{C}$. No estudo de Nardino e colaboradores (2018) dois eventos foram encontrados, característico da fusão do fármaco em $227,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o segundo em $411,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ característico de decomposição. Este pico grande (linha vermelha), do evento térmico observado no presente estudo é característico ao elevado grau de pureza para o fármaco, como relatado por Benmessaoud e colaboradores (2016).

Figura 15 - Curvas TG/DTG-DSC do metformina com razão de aquecimento $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ em atmosfera de nitrogênio



A matéria-prima se manteve estável até $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ e logo após, foi possível observar na curva TG (linha verde) uma perda de massa quase total (100%), semelhante ao trabalho de Nardino e colaboradores (2018).

5.2 ANÁLISES QUANTITATIVAS

5.2.1 Conformidade do sistema cromatográfico e otimização do método

Durante o processo de desenvolvimento e otimização do método cromatográfico, as características físico-químicas de cada fármaco foram levadas em consideração no momento do desenvolvimento do método, bem como a interação dos fármacos com os possíveis solventes e com a fase estacionária. Nesta pesquisa, cujo intuito era a separação de três fármacos com estruturas químicas, polaridades e afinidades diferentes pela fase móvel e fase estacionária, muitos testes foram realizados. ATO é um ácido fraco, MTF, base fraca ao passo que LOS é um fármaco com as duas características.

Entre os três fármacos analisados, o MTF apresenta menor massa molecular e na faixa de pH de 1 a 10, a molécula permanece 80% ionizada, por esse motivo era esperado que na separação cromatográfica usando uma coluna C18, este seria o primeiro fármaco a eluir em uma fase móvel polar. O segundo fármaco esperado foi o LOS, com massa molecular mais elevada comparado ao MTF e por apresentar 2 pKas. Por se tratar de um fármaco muito solúvel em água, pouco solúvel em acetonitrila e em solventes apolares, procurou-se trabalhar com fase móvel bastante polar, composta por metanol e água ao invés de empregar acetonitrila como modificador orgânico. Em pH 3,0, a molécula de LOS encontra-se 87% ionizada, devido a protonação do nitrogênio (posição 2) do anel tetrazólio, tornando-a mais polar.

O fármaco ATO era de se esperar que na separação cromatográfica, usando fase móvel polar, apresentasse maior tempo de retenção, comparado ao MTF e LOS, por ter massa molar maior e ser muito pouco solúvel em água. Além disso, por se tratar de um fármaco ácido fraco, em pH 3,0, apenas uma pequena porção (5%) deste está ionizada, o que fez com ficasse mais retido na fase estacionária devido maior interação desta com o fármaco.

As análises foram iniciadas com testes utilizando como fase móvel a proporção de ACN:H₂O (70:30) sem alteração do pH, mas não foi possível a separação completa de todos os compostos.

Em seguida, as análises foram testadas alterando o pH da água ajustando para 3,0 com ácido fosfórico, obtendo assim apenas a separação de dois compostos com a proporção de ACN:H₃O⁺ (70:30) e em diferentes proporções como ACN:H₃O⁺ (75:25), ACN:H₃O⁺ (60:40), de ACN:H₃O⁺ (50:50). Porém, mesmo com a separação, não foi possível alcançar a conformidade cromatográfica desejada nestas proporções.

Tabela 8 - Parâmetros avaliados na conformidade do sistema cromatográfico com a coluna Kinetex®

Fármaco	Parâmetros			
	Tempo de retenção (min.)	Resolução	Assimetria	Pratos
ATO	3,1 ± 0,05	1,62 ± 0,2	1,08 ± 0,15	3987 ± 1,01
LOS	3,42 ± 0,15	1,4 ± 0,05	1,0 ± 0,01	1874 ± 0,54
MTF	7,1 ± 0,01	n.a	n.a	765 ± 1,4

*Condições cromatográficas: fase móvel composta de MeOH e H₃O⁺ (78:22 v/v) pH 3,0 e vazão de 0,3 mL min⁻¹

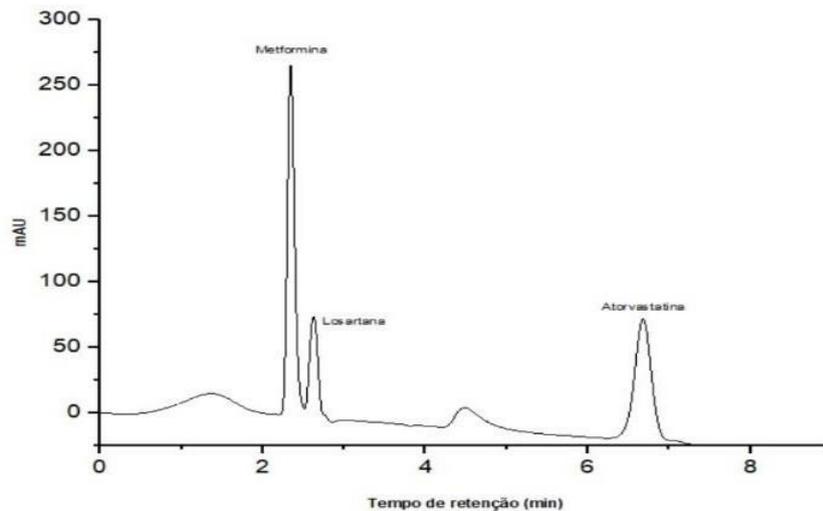
*Média ± referente a variação de 6 determinações

O MTF, por ter estrutura química muito diferente dos outros fármacos foi o que determinou a otimização do sistema cromatográfico, uma vez não foi eluído em até 15 minutos de análise em algumas alterações. Galdos (2012), em seu estudo de estabilidade entre medicamentos que atuam no diabetes tipo II, verificou que o aumento do metanol incrementava no tempo de retenção do cloridrato de metformina e também, utilizou a fase estacionária fenil-polar para uma melhor resolução dos cromatogramas. Esses fármacos são solúveis, por isso, a fase móvel que melhor eluiu MTF, bem como ATO e LOS foi composta por MeOH:H₃O⁺ (78:22) com água ajustada o pH para 3,0 com ácido fosfórico.

Quando foi testado a fase móvel ACN e água ácida (75:25) ajustado o pH com ácido fosfórico para 3,0, não foi possível a separação de dois dos fármacos nas colunas YMC® e Inert Sustain®, pois essa alteração de solvente pode ter alterado a interação dos compostos com a fase estacionária. Em estudo realizado por Stenger (2011) a metodologia desenvolvida apresentou o Meformina em aproximadamente 8 min com fase móvel contendo metanol, tampão e

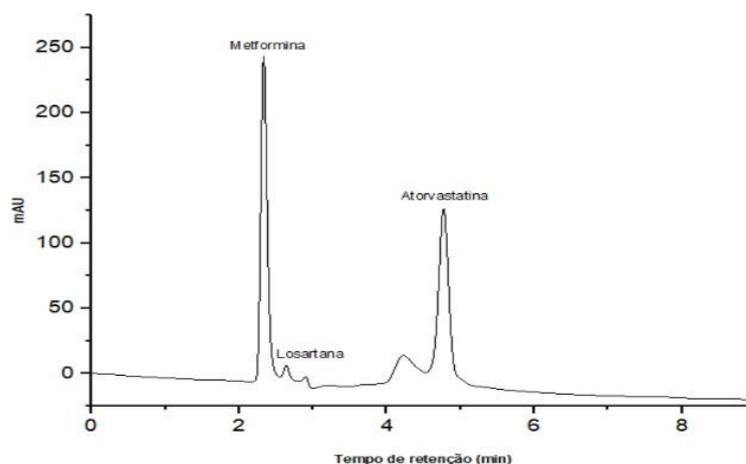
acetonitrila. Desta forma, podendo ter relação direta com as diferenças estruturais do MTF com o ATO e LOS, apenas em fase móvel contendo metanol foi possível, em nosso estudo, separar em quase todas as colunas cromatográficas.

Figura 16 - Cromatograma da amostra comercial magistral obtido na coluna YMC[®] C18 (4,6 x 150 mm, 5 μ m) com vazão de 0,3 mL min⁻¹ e fase móvel composta de ACN:H₃O+ (75:25 v/v), pH para 3,0 ajustado com ácido fosfórico



A coluna YMC[®] mostrou separação e tempo de retenção excelentes para o aproveitamento de análise em menor tempo, mas não foi possível separar todos os fármacos e os cromatogramas apresentaram alguns ruídos podendo ser característico de resíduos retidos na coluna.

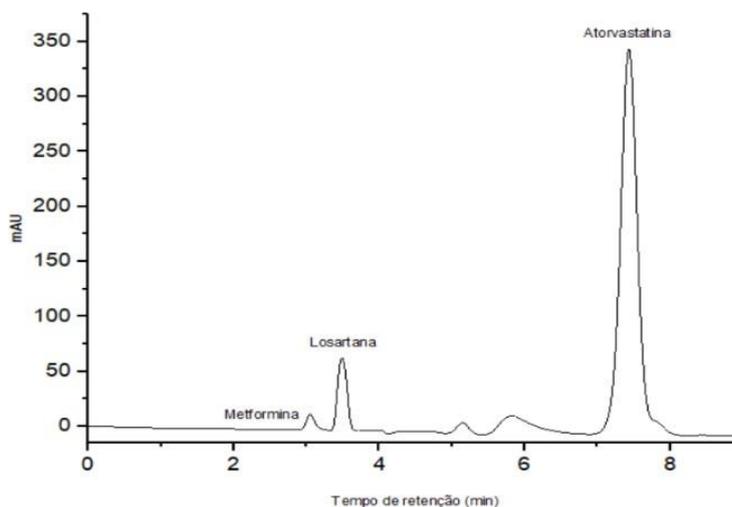
Figura 17 - Cromatograma da amostra comercial magistral obtido na coluna Kromasil[®] C18 (4,6 x 150 mm, 5 μ m) com vazão de 0,3 mL min⁻¹ e fase móvel composta de MeOH:H₃O+ (70:30 v/v), pH para 3,0 ajustado com ácido fosfórico



A coluna Kromasil® demonstrou perfis cromatográficos com resultados satisfatórios de pratos teóricos para Metformina e Atorvastatina, no entanto, para Losartana não teve uma resolução e não foi possível separá-lo em tempo de retenção adequado para uma separação dos três fármacos.

O cromatograma da Kinetex®, ilustrada na Figura 18, propiciou uma boa separação cromatográfica para LOS, porém apenas na fase móvel que continha metanol (MeOH). Nesta mesma coluna, o pico de MTF foi observado em um tempo de retenção de aproximadamente 3 minutos e com má resolução. Isto pode ter ocorrido devido desgaste dessa coluna.

Figura 18 - Cromatograma da amostra comercial magistral obtido na coluna Kinetex® C18 (4,6 x 150 mm, 5µm) com vazão de 0,3 mL min⁻¹ e fase móvel composta de ACN:H₃O⁺ (70:30 v/v), pH para 3,0 ajustado com ácido fosfórico



As colunas testadas nas diferentes proporções foram das marcas Kromasil®, YMC®, Kinetex®, Inert Sustain®, Gl Science®, no entanto a coluna cromatográfica SigmaAldrich® que obteve a melhor separação de todos os compostos.

A coluna Sigma Aldrich® possui alta resolução, excelente seletividade, estabilidade em alta pressão e desempenho estável ao alternar entre as fases móveis compatíveis, além de ter estabilidade química estendida entre pH 1,0 e 12,0 (SIGMAALDRICH, 2020). Sendo assim, essa coluna escolhida para a otimização das condições cromatográficas visando o desenvolvimento e validação do método.

As condições cromatográficas que melhor eluíram os fármacos alvos desse estudo estão representadas na Tabela 9 e Figura 19 refere-se ao cromatograma de separação dos fármacos na coluna Sigma Aldrich® C18 (4,6 x 150 mm, 5µm) com vazão de 0,3 mL min⁻¹ e fase móvel composta de MeOH:H₃O⁺, pH 3,0 ajustado com ácido fosfórico.

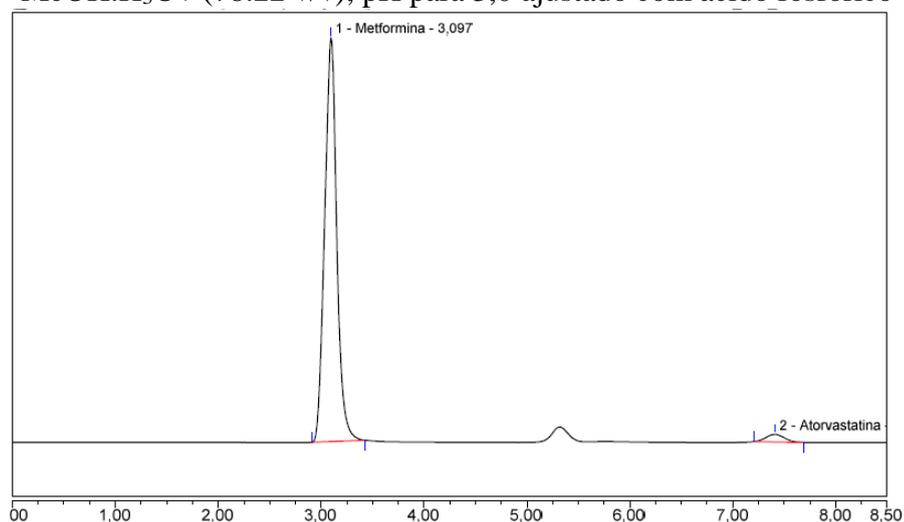
Tabela 9 - Parâmetros avaliados na conformidade do sistema cromatográfico com a coluna Sigma-Aldrich®

Fármaco	Parâmetros			
	Tempo de retenção (min.)	Resolução	Assimetria	Pratos
ATO	6,71 ± 0,09	n.a	1,06 ± 0,21	3884 ± 1,01
LOS	4,88 ± 0,11	1.59 ± 0,72	1,07 ± 0,16	4628 ± 0,70
MTF	3,05 ± 0,12	2.0 ± 1,20	1,24 ± 0,53	3206 ± 1,30

*Condições cromatográficas: fase móvel composta de MeOH e H₃O⁺ (78:22 v/v) pH 3,0 e vazão de 0,3 mLmin⁻¹

*Média ± referente a variação de 6 determinações

Figura 19 - Cromatograma da amostra comercial magistral obtido na coluna Sigma-Aldrich® C18 (4,6 x 150 mm, 5µm) com vazão de 0,3 mL min⁻¹ e fase móvel composta de MeOH:H₃O⁺ (78:22 v/v), pH para 3,0 ajustado com ácido fosfórico



Como pode-se perceber no cromatograma da separação dos fármacos ATO, LOS e MTF (Figura 19), há uma separação adequada dos mesmos, em tempo menor que 10 minutos, segundo o recomendado para a conformidade do sistema cromatográfico, indicando que há possibilidade de validar o método proposto.

5.2.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

5.2.2.1 Linearidade, Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

A linearidade é a capacidade do método de demonstrar que os resultados experimentais obtidos sejam proporcionais à concentração do analito na amostra, sempre respeitando o

intervalo especificado (SACCHI, 2018). O método analítico é considerado linear quando o coeficiente de correlação for $\geq 0,99$ (ANVISA, 2017). As figuras 20, 21 e 22 mostram, respectivamente, as curvas de calibração obtidas de ATO, LOS e MTF.

Figura 20 - Curva de calibração de atorvastatina obtida pela absorção em 246 nm pela fase móvel MeOH:H₂O (78:22) com pH ajustado para 3,0 com ácido fosfórico

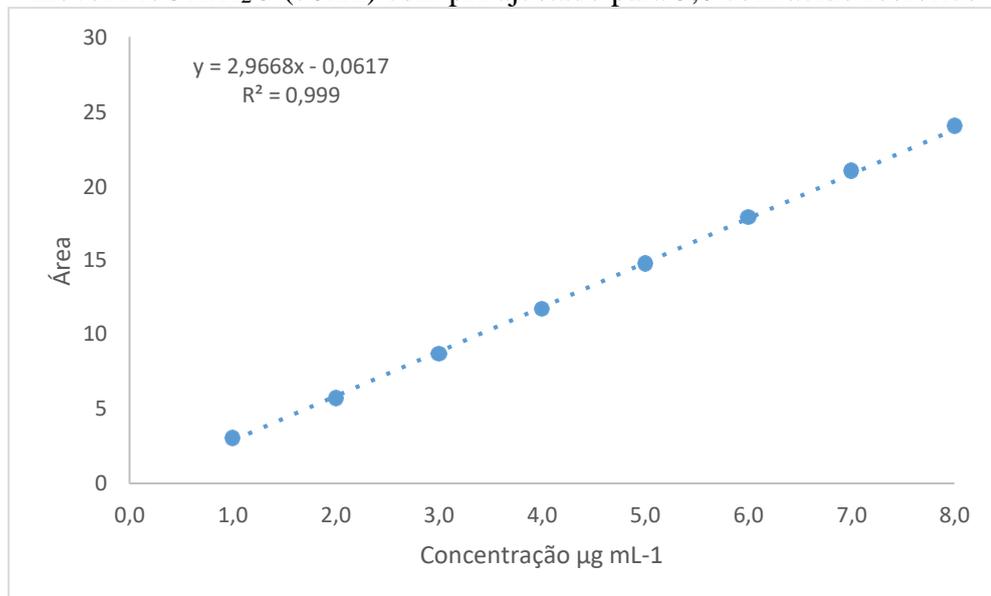


Figura 21 - Curva de calibração de losartana obtida pela absorção em 225 nm pela fase móvel MeOH:H₂O (78:22) com pH ajustado para 3,0 com ácido fosfórico

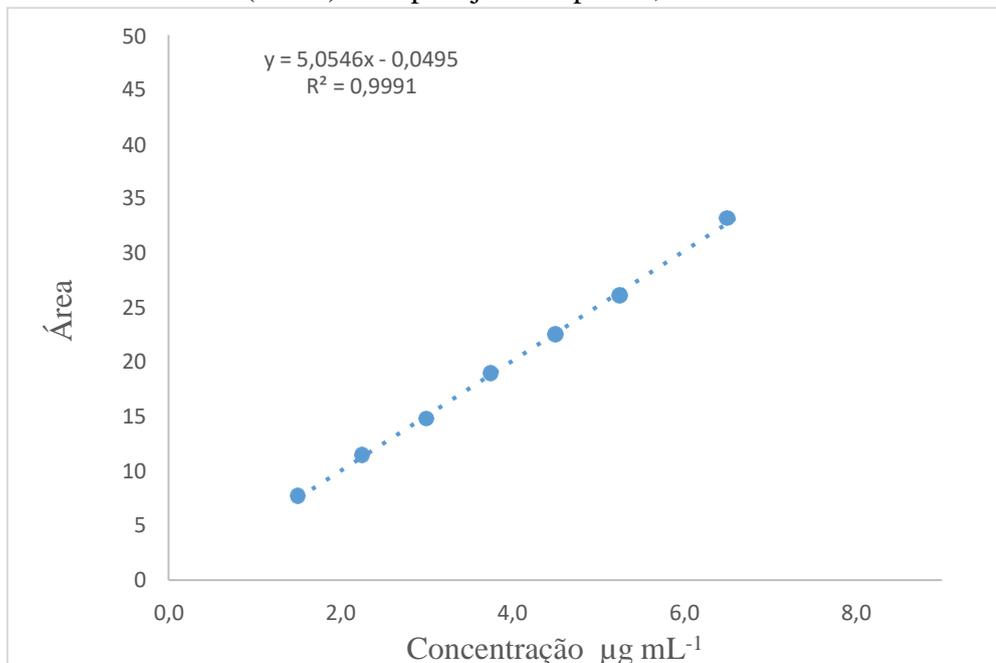
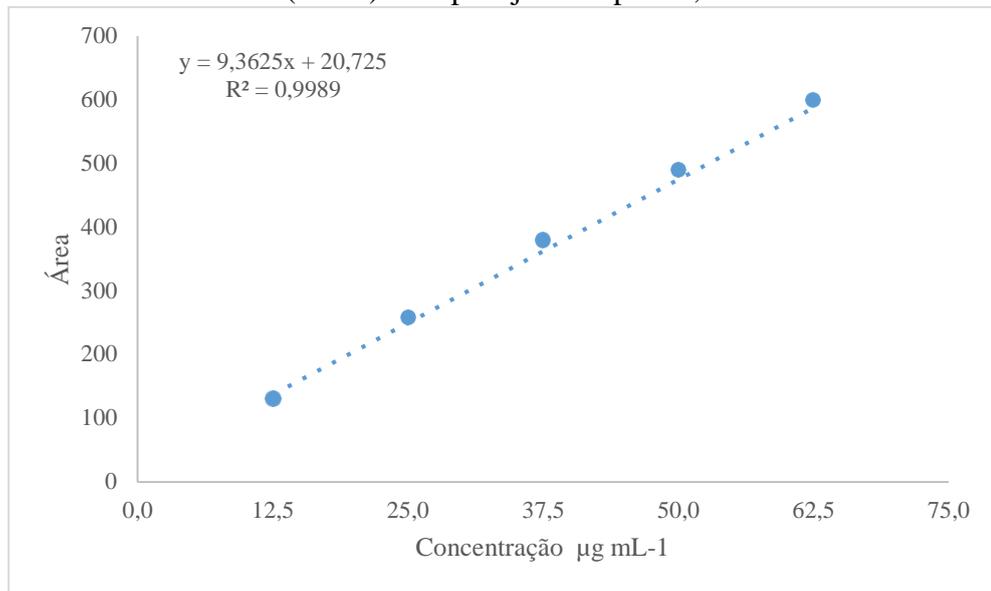


Figura 22 - Curva de calibração de metformina obtida pela absorção em 236 nm pela fase móvel MeOH:H₂O (78:22) com pH ajustado para 3,0 com ácido fosfórico



O limite de detecção é determinado pela análise completa de uma matriz contendo o analito (ABNT, 2001). 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 é o que define o LD do método. É importante saber qual o menor valor de concentração do analito que pode ser detectado pelo método a fim de realizar medidas em amostras com baixos níveis do analito e mesmo assim ser detectada pelo método (ABNT, 2001).

Observa-se que o método foi linear para todos os fármacos, apresentando coeficientes de correlação próximos de 1,0. Os limites de detecção e quantificação foram determinados teoricamente e registrados na Tabela 10.

Tabela 10 - Resultados obtidos da linearidade e limites de detecção e quantificação

Fármaco	Intervalo (µg mL ⁻¹)	Equação da reta	R	LD (µg mL ⁻¹)	LQ (µg mL ⁻¹)
ATO	1,0-9,0	$y = 2,9668x - 0,0617$	0,999	0,02	0,24
LOS	1,5-6,25	$y = 5,0546x - 0,0495$	0,999	0,50	0,68
MTF	12,5-62,5	$y = 9,3625x + 20,725$	0,999	1,9	2,46

R: Coeficiente de correlação; LD: Limite de detecção; LQ: Limite de quantificação

A linearidade do método pode ser comprovada pela análise da variância (ANOVA) demonstrada pela Tabela 11, sendo permitido avaliar a regressão ocorrida explicando a relação entre a concentração e os resultados obtidos (ANVISA, 2017).

Tabela 11 - Análise da Variância (ANOVA) da regressão linear dos fármacos do estudo

Fármaco	Fonte de variação	GL	SQ	MQ	F calculado	F crítico
ATO	Regressão	1	506,03	506,03187	3312,77	1,25387. 10 ⁻¹⁰
	Resíduo	7	1,06926	0,15275		
	Total	8	507,101			
LOS	Regressão	1	407,91	407,91	1013,12	5,7486.10 ⁻⁷
	Resíduo	5	2,013	0,40263		
	Total	6	409,926			
MTF	Regressão	1	123854,64	123854,64	406,46	2,66748.10 ⁻⁴
	Resíduo	3	914,13	304,71		
	Total	4	124768,772			

*GL: graus de liberdade; *SQ: soma de quadrados; *MQ: média quadrática

Os resultados dos padrões ATO, LOS e MTF estão representados dentre os intervalos de concentração de cada uma das curvas de concentração, mostrou que o método desenvolvido foi linear quando comparado à outros estudos encontrados na literatura para determinação de atorvastatina, losartana e metformina isolados ou associados à outros componentes.

5.2.2.2 Precisão

Para o guia do Food Drug and Administration (FDA) , a precisão é a proximidade do acordo entre os resultados de testes independentes obtidos sob condições especificadas no método analítico a ser validado e pode ser posteriormente classificada como repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade assim como na RDC 166/2017. Os resultados obtidos na precisão intermediária e na repetibilidade foram apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Resultados obtidos da precisão do método

Teor ± DPR (%)				MTF	LOS	ATO
Precisão intermediária	Dia 1	An1		94,25 ± 0,88	100,3 ± 0,39	98,0 ± 0,28
		An2		103,3 ± 0,41	97,5 ± 0,35	100,2 ± 0,02
	Dia 2	An1		104,0 ± 0,07	99,0 ± 0,30	98,9 ± 0,05
		An2		102,5 ± 1,09	100,9 ± 0,08	100,05 ± 0,39
	Dia 3	An1		104,15 ± 1,20	99,09 ± 0,29	101,8 ± 0,01
Média				101,51 ± 0,67	99,24 ± 0,28	100,07 ± 0,14
Repetibilidade				101,54 ± 0,35	101,6 ± 0,43	104,5 ± 0,12

An1: Analista 1; An2: analista 2

Segundo a Farmacopeia Brasileira (2010), a especificação de teor para comprimidos de metformina (MTF), de 95,0% a 105,0% da quantidade declarada também pode ser adotada para as cápsulas magistrais. Para Losartana (LOS), o teor determinado é de no mínimo 98,5% e máximo de 101,0% (Farmacopeia Brasileira, 2010).

A Atorvastatina (ATO) deveria conter no mínimo 94,5% e no máximo 105,0% da quantidade declarada (RIBEIRO, 2020). Para os fármacos analisados obteve-se o teor dentre os limites indicados por suas respectivas monografias.

Os valores obtidos de DPR nos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária para os fármacos Metformina, Losartana e Atorvastatina estão abaixo do limite preconizado de 2,0% (ICH, 2005). Estes resultados revelaram que o método foi preciso para a determinação simultânea destes fármacos em formulações farmacêuticas manipuladas.

5.2.2.3 Exatidão

A exatidão de um método analítico obtida pela análise de nove determinações das quais dividem-se em 3 níveis de concentrações (baixa, média e alta) deve obter concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro (ANVISA, 2017). Os valores obtidos para a recuperação dos fármacos estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Resultados obtidos da análise de exatidão do método analítico desenvolvido

Fármacos	Concentração final teórica do padrão ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração experimental ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação (%)	
			Resultado (%)	Média \pm DPR (%)
ATO	2,0	1,91	101,39%	99,84 \pm 0,037
	3,0	2,81	98,58%	
	4,0	3,97	102,55%	
LOS	3,75	3,79	107,60%	99,11 \pm 0,084
	5,0	4,92	98,98%	
	6,25	5,85	90,76%	
MET	25,00	25,61	100,55%	99,07 \pm 0,018
	37,50	37,94	99,62%	
	50,00	49,42	97,03%	

Os valores obtidos de ATO, LOS e MTF estão de acordo com os limites aceitáveis entre 98-102% para os três níveis de concentração analisados (AOAC, 2005). O DPR da média dessas análises foi menor que 2%. Sendo assim, o método proposto para a determinação simultânea dos três fármacos possui exatidão.

5.2.2.4 Robustez

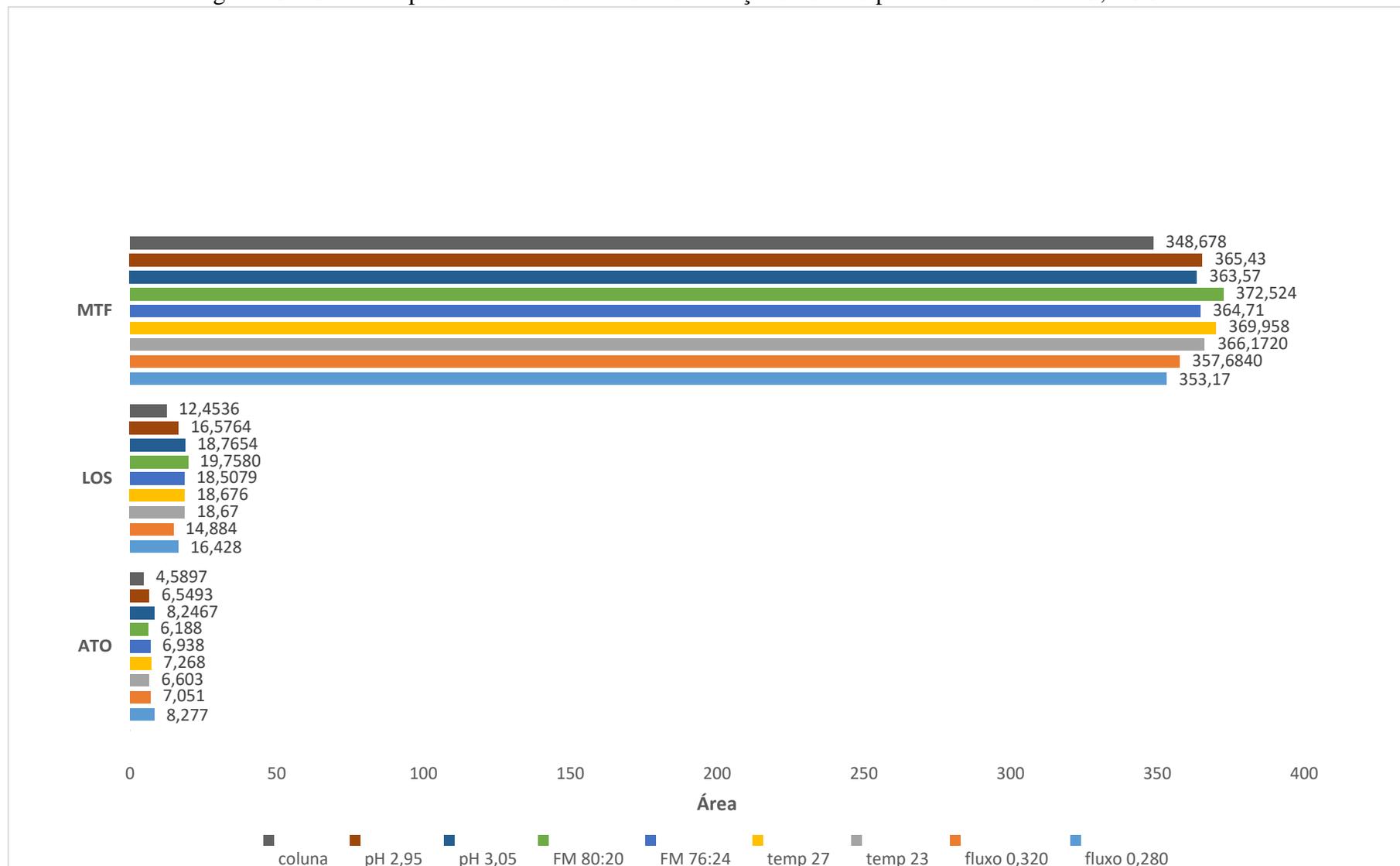
O parâmetro da robustez é utilizado para verificar a capacidade de um procedimento analítico não ser afetado mesmo com pequenas e deliberadas variações das condições analíticas garantindo a confiabilidade do método proposto (FDA). No entanto a RDC 166/2017 não atribui nenhum procedimento de como realizar a robustez, apenas cita itens que poderiam ser modificados para avaliar este parâmetro. Neste método desenvolvido, sendo um método quantitativo, as variações propostas foram variação do pH da fase móvel, variação na composição da fase móvel, diferentes colunas cromatográficas, temperatura e fluxo da fase móvel (RDC 166/2017). Os resultados obtidos foram representados pelo gráfico na Figura 23. Stenger (2011) em seu estudo com cloridrato de metformina e derivados, não apresentou boa resolução no pico cromatográfico quando ocorreu a alteração de fluxo etambém houve um prolongamento no tempo de corrido o que não é favorável para uma análise prolongando o período de análises e quando se associam fármacos, como em nosso estudo.

Das cinco condições modificadas, apenas uma modificou de modo a ser observado diferença nos picos cromatográficos. Quando foi alterado as colunas cromatográficas, os pratos teóricos caíram significativamente considerando as diferenças de estrutura das colunas.

Desta forma, a coluna cromatográfica passa a ser um fator que deve ser modificado com cautela quando o método for reproduzido em outros laboratórios, por outros analistas ou equipamentos diferentes.

As outras alterações realizadas não modificaram os valores das áreas dos picos cromatográficos e também as outras características necessárias como os tempos de retenção, assimetria, resolução e número de pratos teóricos para uma otimização do método. Sendo assim, não houve diferenças significativas quanto a quantificação dos fármacos nessas condições variadas.

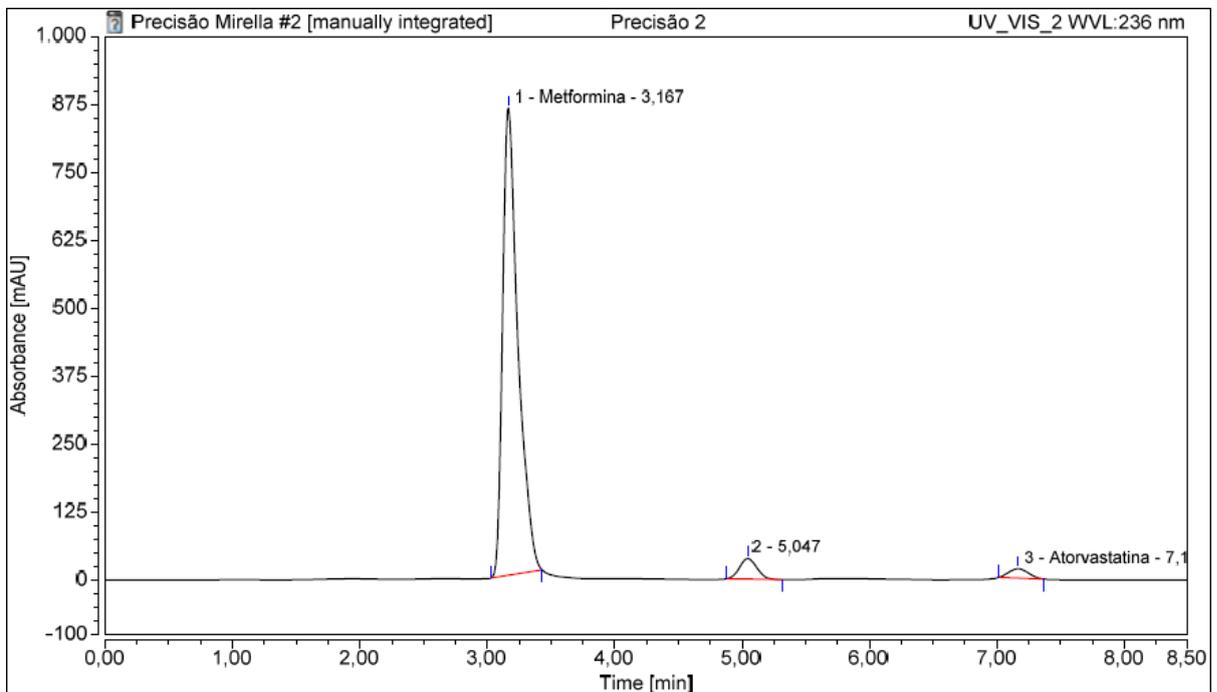
Figura 23 - Gráfico representativo dos efeitos das alterações testadas para os fármacos ATO, LOS e MTF



5.2.2.5 Seletividade

A seletividade foi avaliada em relação aos excipientes, se estes interferiam ou não na identificação da amostra contendo os analitos do estudo. No cromatograma da amostra representado pela Figura 24 não foram observados picos referentes aos excipientes. A identificação destes picos como excipientes foi confirmada pelos cromatogramas das soluções padrões dessas substâncias, sendo os mesmos tempos de retenção e perfis dos picos detectados pelo CLAE-DAD.

Figura 24 - Cromatograma da amostra 1 comercial obtido na coluna Sigma-Aldrich® C18 (4,6 x 150 mm, 5µm) vazão de 0,3 mL min⁻¹ e fase móvel MeOH:H₂O (78:22 v/v) com pH 3,0



Os picos não foram observados por terem suas áreas extremamente pequenas e não interferiram na análise dos compostos, pois apresentaram tempo de retenção distintos dos fármacos do estudo. Além disso, a pureza dos picos confirmou a não coeluição dos componentes.

5.2.3 CONTROLE DE QUALIDADE DAS AMOSTRAS COMERCIAIS

5.2.3.1 Determinação do peso

Nos últimos anos o crescente número de casos relacionados com a falsificação e/ou adulteração de medicamentos, tem sido tratado em muitos países como um problema de saúde pública (MARTINO et al., 2010). Entretanto, este não afeta apenas países emergentes, mas também países desenvolvidos. O uso de medicamentos falsificados ou de má qualidade pode resultar na ineficiência do tratamento médico, onde os pacientes podem não receber a quantidade necessária do princípio ativo, provocando sérios danos à saúde, quando os produtos são adulterados ou produzidos deliberadamente com substâncias inadequadas (KOCZWARA; DRESSMAN, 2017).

Em novembro de 2018, também ocorreu o recolhimento de lotes de Losartana Potássica e Hidroclorotiazida, usados no tratamento de hipertensão, contendo a mesma impureza (FDA, 2018). Em janeiro de 2017, testes foram feitos para avaliação da qualidade dos remédios genéricos no Brasil, sendo que Losartana Potássica, não atingiu a quantidade mínima exigida de princípio ativo (ANVISA, 2017).

Contudo, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 1 a cada 10 produtos farmacêuticos em circulação em países emergentes são falsificados (OMS, 2017).

Os limites de variação permitidos para cápsulas cujo o peso médio for menor que 300 mg é $\pm 10,0\%$, porém quando o valor do peso médio for maior ou igual a 300mg a variação aceitável é $\pm 7,5\%$. Sabendo disto, quando o peso médio for 683mg, o limite de variação aceitável é nas medidas na faixa de 631-734mg. Neste exemplo e em outras análises de determinação de peso médio, dentro desta faixa, não é tolerado mais que duas cápsulas fora do limite preconizado e nenhuma unidade pode ter o dobro dos valores do limite de variação (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010) (RDC, 2011). Assim como, o desvio padrão relativo que não pode ser maior que 4% (ANVISA, 2012).

A análise de determinação de peso das cápsulas das três amostras das farmácias de manipulação, sendo o peso médio igual a 683mg, apresentaram resultados dentro dos limites, confirmando que todas as cápsulas pesadas estiveram com seus pesos médio dentro da variação aceitável, sendo assim nenhuma unidade fora dos limites e também não obtendo o dobro dos valores dos limites, fora da faixa de exclusão. Este parâmetro quando não conforme impede que outros testes sejam feitos pois constitui um critério para reprovação do produto (BARQUETTE et al., 2017).

Figura 25 - Gráfico representativo do peso médio de 10 cápsulas da Amostra 1

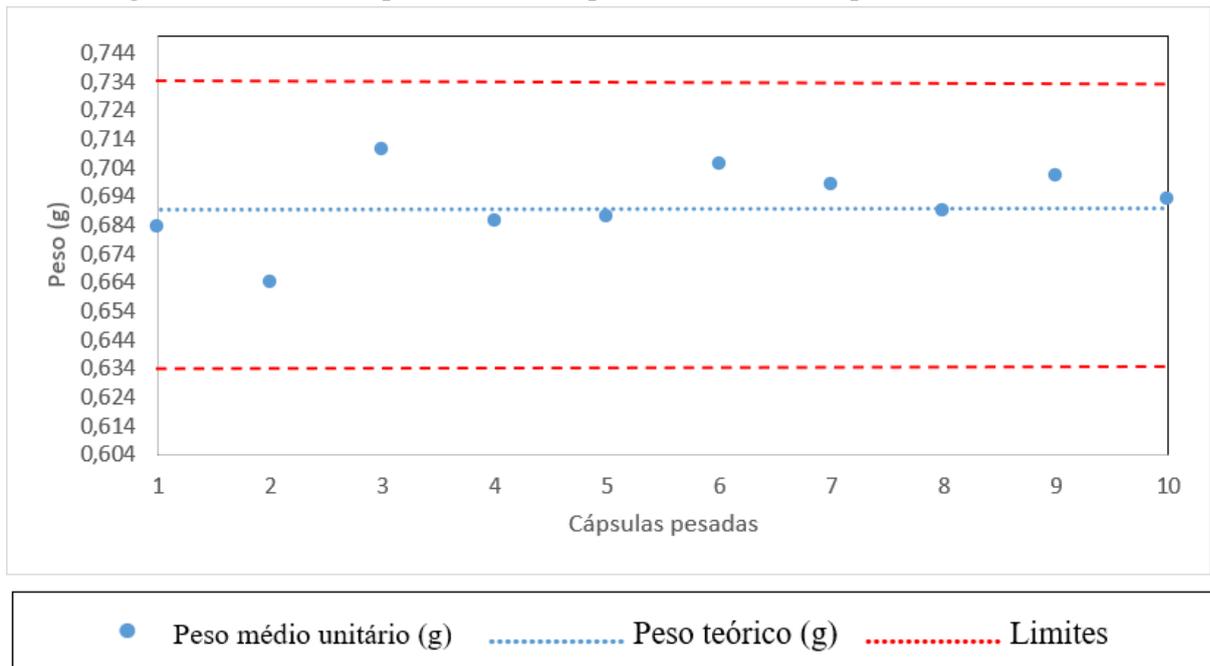


Figura 26 - Gráfico representativo do peso médio de 10 cápsulas da Amostra 2

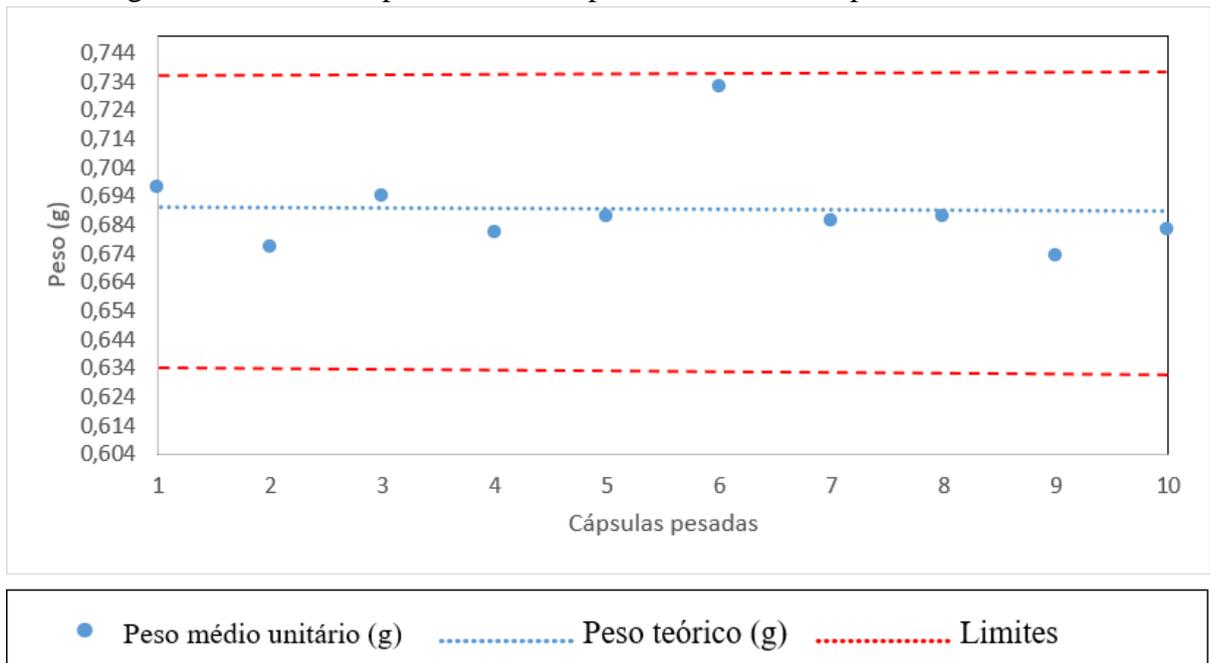
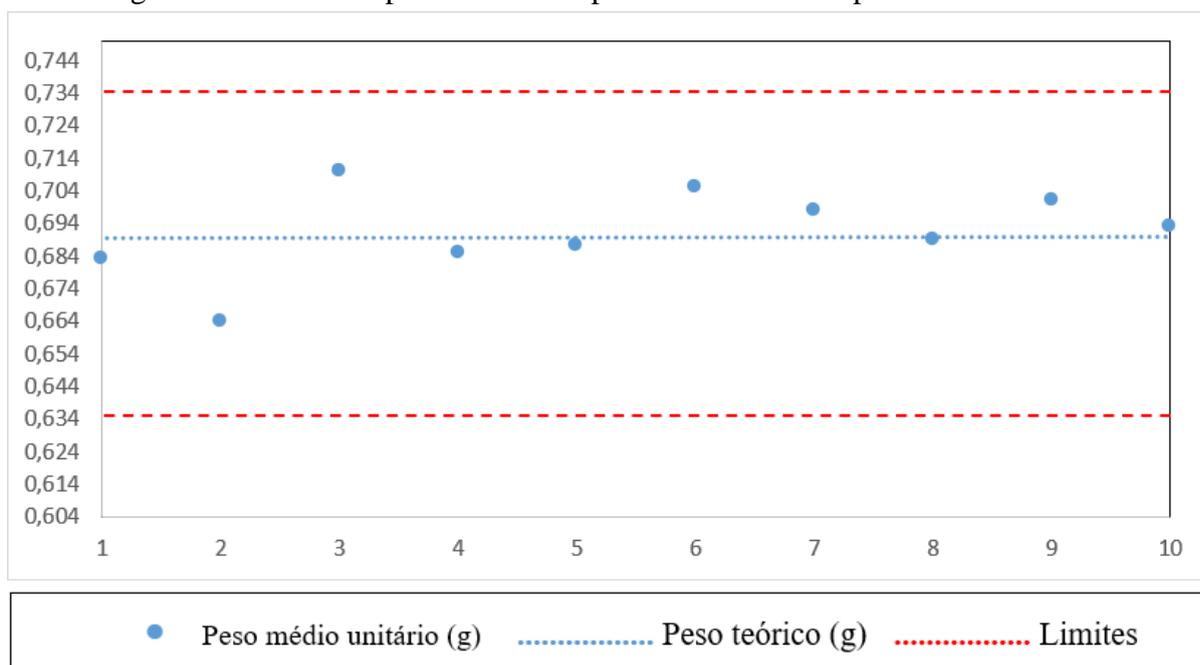


Figura 27 - Gráfico representativo do peso médio de 10 cápsulas da Amostra 3

**Tabela 14** - Resultados obtidos no ensaio de determinação de peso de 10 unidades de cápsulas das amostra comerciais

Parâmetros	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Peso médio	0,683	0,690	0,684
Desvio padrão	0,17	0,24	0,22
DPR (%)	2,48	3,47	3,21

5.2.4 COMPATIBILIDADE ENTRE COMPONENTES DA FORMULAÇÃO

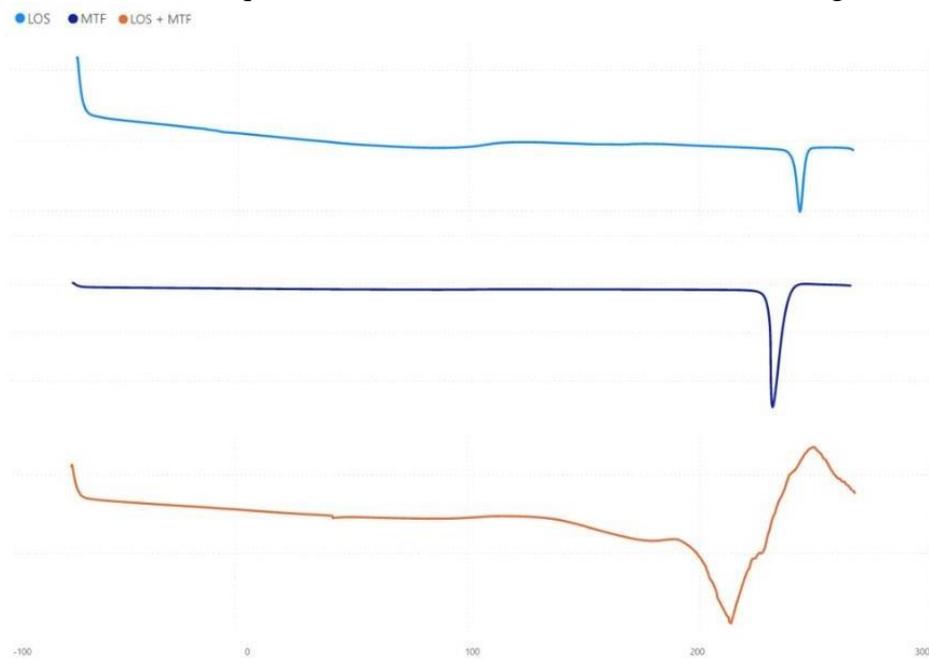
5.2.4.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria (TG)

Nas figuras 28, 29 e 30 observam-se as curvas de DSC de ATO, LOS e MTF isoladas e também a curva DSC referente a mistura de dois destes fármacos. Em uma revisão feita por Matos (2013), comparando os métodos de análise de compatibilidade entre componentes da formulação, observaram compatibilidade entre fármacos mas algumas incompatibilidades de alguns com os excipientes em análises feitas por DSC podendo ser uma significativa interpretação de alguma interação química ou física entre os fármacos. Neste estudo, observamos que ao analisara curva DSC das misturas o perfil se mostrou bem diferente quanto a ela isoladas.

A Figura 28 apresenta as curvas DSC do Losartana, do Metformina e respectiva mistura binária entre os dois no intervalo de temperatura de -70 à 270°C englobando a faixa de

decomposição deles. A antecipação da fusão de ambos quando em mistura também foi observada por Silva (2017) em estudo com excipientes e é um indicativo de interação. A formação de um pico largo e tortuoso representou uma perda de massa por decomposição antes dos eventos endotérmicos, confirmando que a presença de interações pode ser detectada por uma endoterma de ebulição não-isotérmica, onde a temperatura da amostra aumenta durante a ebulição gerando picos largos.

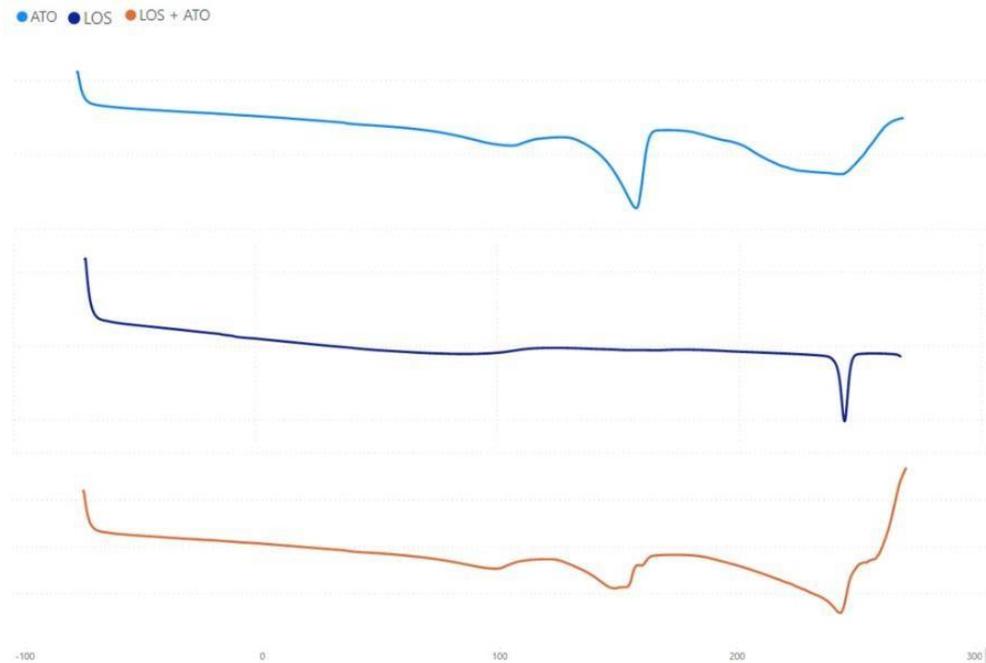
Figura 28 - Gráfico de compatibilidade das curvas DSC dos fármacos LOS + MTF associados com razão de aquecimento $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ em atmosfera de nitrogênio



A figura 29 demonstra as curvas referentes à Losartana, do Atorvastatina e respectiva mistura binária entre os dois no intervalo de temperatura de -70 à 270°C . A comparação das curvas mostrou deslocamento dos eventos térmicos para temperaturas mais baixas, sugerindo uma interação entre os fármacos nem tão significativa quanto a interação com a Metformina ilustrada na figura 28, porém foi encontrado alteração semelhante ao estudo de compatibilidade feito por Pires (2012) com excipientes.

A mistura de LOS e ATO teve uma pequena alteração de temperatura sem que tenha levado a uma decomposição anterior de ambos. Ao comparar com a mistura anterior, esperava-se que haveria interferência e o surgimento de aproximação dos picos, mas como os processos de decomposição de ambos possuem temperaturas distantes não ocorreu essa interferência significativa.

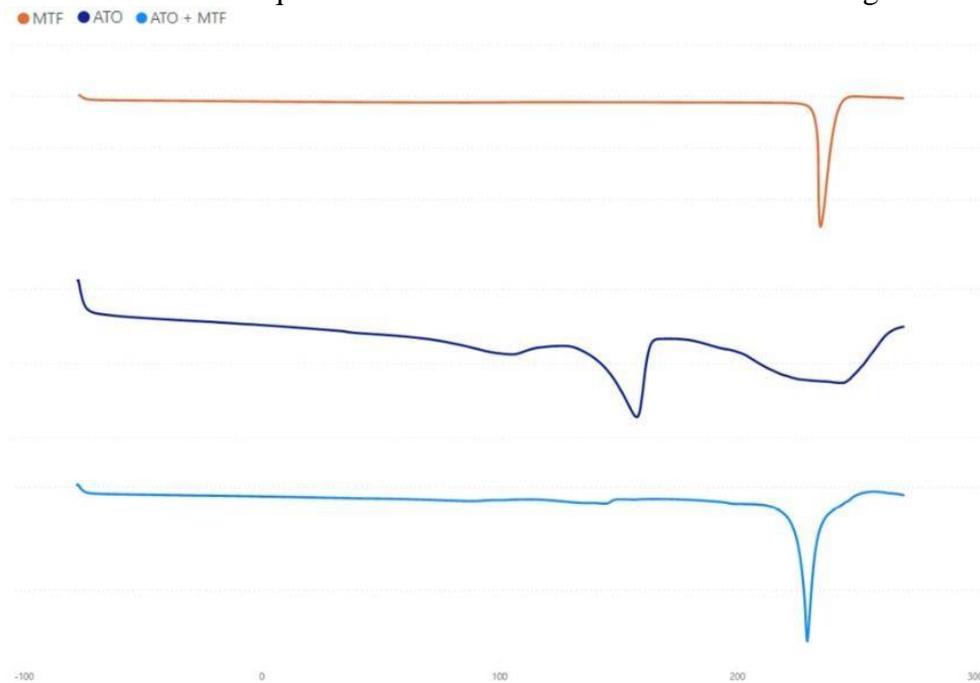
Figura 29 - Gráfico de compatibilidade das curvas DSC dos fármacos LOS + ATO associados com razão de aquecimento $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ em atmosfera de nitrogênio



Em ATO e MTF, ilustrado na Figura 30, ocorre apenas um pico de evento endotérmico podendo ser interpretada a análise como uma alteração de extrema decomposição da Atorvastatina quando em mistura com a Metformina, podendo ter ocorrido uma reação onde a temperatura da amostra aumentou drasticamente ao ponto de não identificar o começo da ebulição de ATO.

Assim como no estudo feito por Silva (2016) em compatibilidades de Atorvastatina com excipientes, o desaparecimento do pico de fusão do fármaco ATO pode ser devido a sua completa solubilidade quando associado com MTF, podendo isto não ser característico a uma interação, não caracterizando incompatibilidade.

Figura 30 - Gráfico de compatibilidade das curvas DSC dos fármacos ATO + MTF associados com razão de aquecimento $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ em atmosfera de nitrogênio

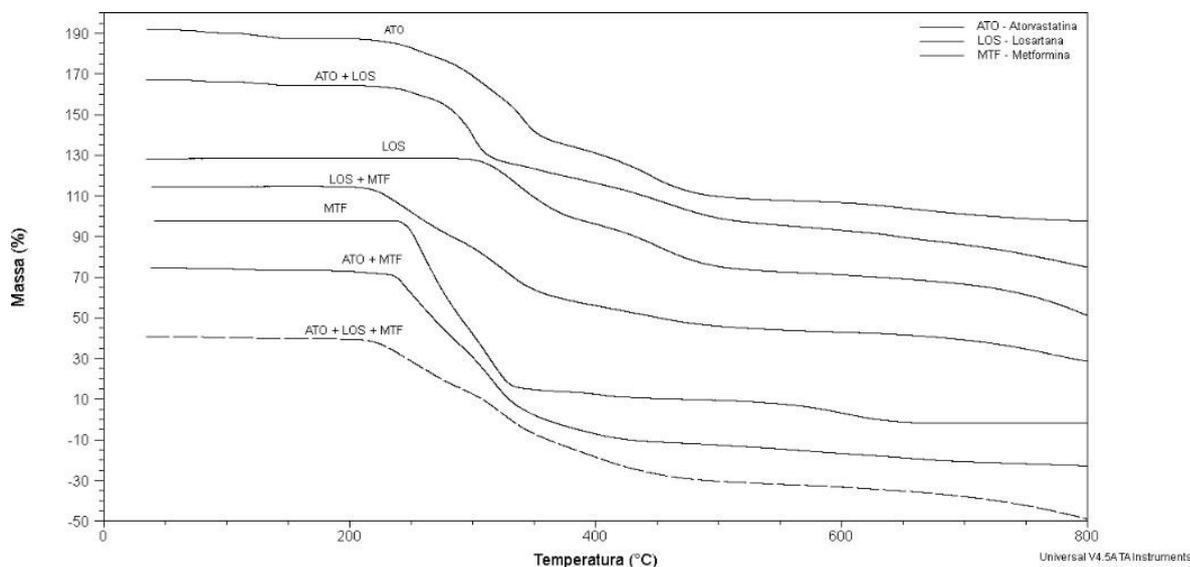


Uma interação, quando ocorre, altera a faixa o ponto de fusão dos fármacos, assim como a forma e a área do pico. Para Oliveira (2011) o aparecimento de transição ou aparecimento/desaparecimento de picos quando se misturam os componentes, pode indicar interações ou reações indesejáveis. Matos (2013) identificou em sua revisão interações que ocorreram entre fármacos e excipientes quando estes analisados por análise térmica em mistura confirmando que podem ocorrer esta interferência nos picos.

Da mesma forma, se não houver interações entre os componentes da mistura, os valores referentes aos eventos endotérmicos não apresentam variação. No entanto, as suspeitas de interações devem ser confirmadas com outras técnicas analíticas como a espectroscopia IV, por exemplo. Percebe-se que em mais de uma mistura, provavelmente ocorreu um somatório de eventos endotérmicos que pode levar ao indicativo que há interações significativas entre estes princípios ativos de acordo com a DSC (OLIVEIRA, 2011).

Os efeitos de calor associados com alterações físicas ou químicas da amostra podem demonstrar mudanças de estado físico, estabilidade térmica, degradação endotérmica ou exotérmica e oxidação (SILVA, 2017).

Figura 31 - Gráficos representativos do estudo de compatibilidade das curvas TG dos fármacos associados e isolados



A mistura experimental ATO + LOS apresentou um perfil semelhante aos fármacos isolados com dois eventos de perda de massa característicos e um insignificante. LOS + MTF apresentaram uma perda de massa antes das temperaturas limites, que pode ser justificado por uma possível interação em consequência da formação de produtos mais voláteis o que também pode ser observado no gráfico comparativo de DSC. ATO + MTF não obteve perda de massa característica de interações, o perfil continuou semelhante aos fármacos isolados com os eventos característicos de perda de massa na temperatura característica. A mistura dos três fármacos apresentou uma perda de massa antes de seus respectivos pontos de fusão, sendo característicos dessas pequenas interações entre eles.

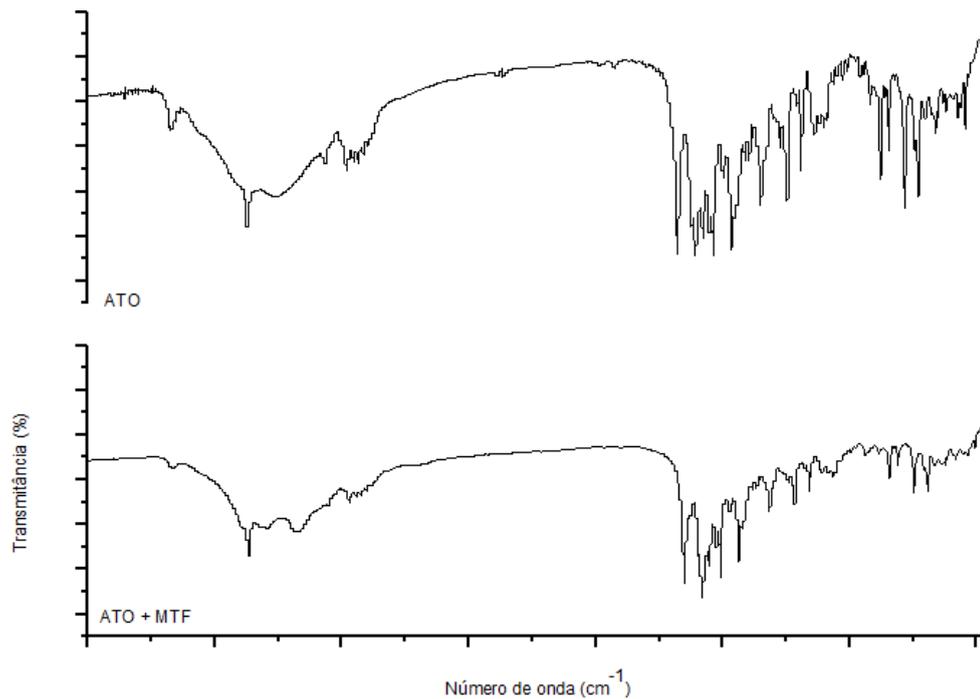
5.2.4.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

Para o desenvolvimento de uma formulação apropriada para utilização, deve-se considerar as características físicas, químicas e biológicas de todos os componentes utilizados para a produção do produto. As fórmulas farmacêuticas sólidas orais representam mais de 50% do mercado mundial, e desta forma, estudos das avaliações das propriedades destas envolvem testes como solubilidade e ponto de fusão, mas principalmente ensaios de estabilidade e compatibilidade (MATOS, 2013).

Nas análises de compatibilidade utilizando espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV), quando ocorre o surgimento de novas bandas de absorção, alargamento das bandas e alteração de intensidades, essas características permitem evidenciar interações entre

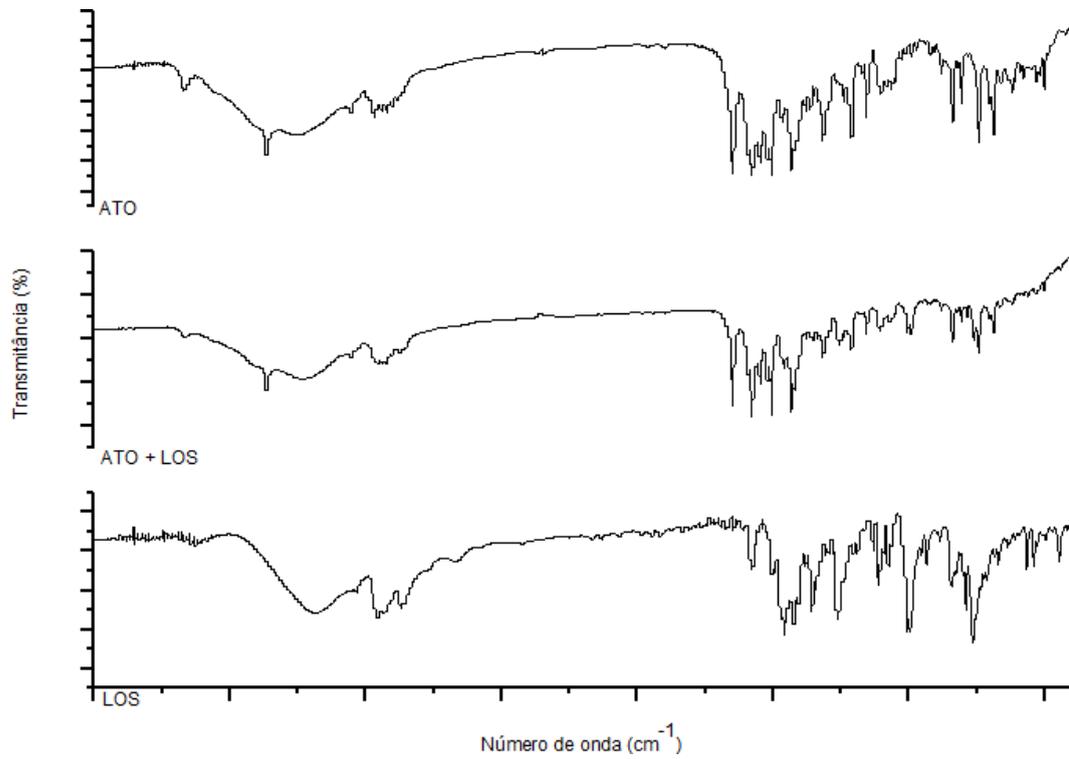
fármacos e excipientes, quando há (TITA, 2011). Os resultados obtidos na primeira mistura, ATO + MTF, (Figura 32) mostraram uma possível interação com alargamento e redução da intensidade de algumas bandas, o que também pode ser observado no gráfico comparativo de DSC e TG.

Figura 32 - Gráficos representativos do estudo de compatibilidade dos espectros de infravermelho de ATO e MTF associados



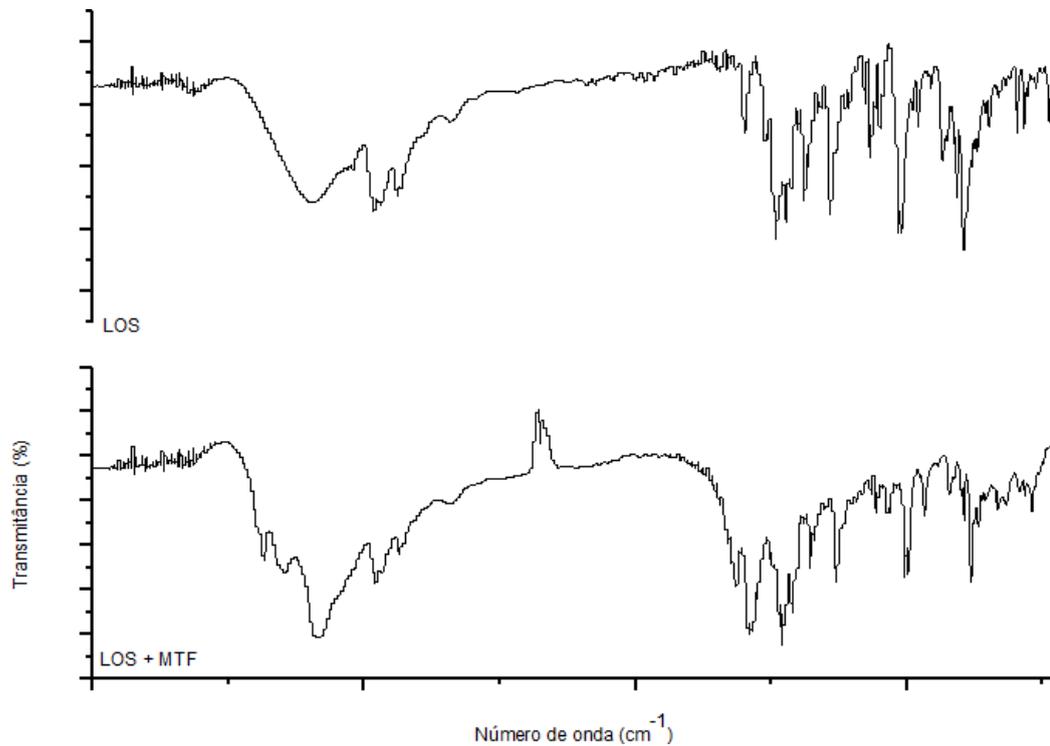
Na segunda mistura, ATO + LOS, (Figura 33) houve um encurtamento das bandas características de ligações C-O e C-Cl em LOS, confirmado pela possível interação observada na alteração das curvas DSC/TG da mistura.

Figura 33 - Gráficos representativos do estudo de compatibilidade dos espectros de infravermelho de ATO e LOS associados e isolado



No entanto, na terceira mistura, LOS + MTF, (Figura 34) foi observado um aumento de intensidade e desconfiguração em algumas bandas que pode indicar que houve interação significativa, assim como observado nas curvas de TG e DSC desta mistura.

Figura 34 - Gráficos representativos do estudo de compatibilidade dos espectros de infravermelho de LOS e MTF associados



As interações normalmente encontradas entre fármacos são hidrólise, isomerização, desidratação, oxidação, fotodegradação e ciclização. Quando o fármaco possui grupamento de amina primária como no caso da Metformina pode acontecer uma reação de Maillard que ocorre o escurecimento entre um açúcar e o grupamento amino, podendo levar a uma possível inativação do fármaco (MATOS, 2013).

A hidrólise também pode ocorrer em estudos de estabilidade dos fármacos, quando ocorre, os ataques nucleofílicos promovem a degradação do fármaco ou da formulação.

Essas interações podem ter ocorrido por quebra de ligações e formação de outras, como visto nos estudos de Silva e colaboradores (2016) ao analisar excipientes e interferências.

Estudos com ensaios de espectro na absorção do infravermelho funcionam como análise complementar ao DSC e TG. (MATOS, 2013) Analisado a compatibilidade entre os fármacos ATO, LOS e MTF, em mistura, foi comparado com as técnicas de DSC e FTIR.

6 CONCLUSÕES

O método desenvolvido e validado para a determinação simultânea de MTF, LOS e ATO associados em formulação farmacêutica manipulada é linear, preciso, robusto, exato e seletivo.

Além disso, é um método sensível, rápido e isocrático, podendo ser analisado os três fármacos associados em apenas oito minutos de corrida cromatográfica. Podendo então, este método ser aplicado em outros produtos farmacêuticos que contenham os fármacos do estudo associados ou isolados e ser aplicado na rotina de controle de qualidade para análise destes medicamentos em outros laboratórios e empresas terceirizada.

REFERÊNCIAS

ANFARMAG. DADOS SOCIOECONOMICOS DAS FARMÁCIAS DE MANIOPULAÇÃO – Panorama Setorial 2020. São Paulo, 2020. Acesso em: https://issuu.com/luana_font/docs/anfarmag_panorama_setorial_2020_270x205_final 15 de novembro de 2020.

ALMEIDA, M.L.C.de; FILHO, A.P.doN. Análise das cápsulas manipuladas segundo a RDC 67/2007 da ANVISA/MS para a garantia da qualidade. *Revista Brasileira de Farmácia, Farmácia Hospitalar – Artigo Original*, Rio de Janeiro, v.91, p. 119-125, 2011.

ALWAN, A. et al. No Title. *The Lancet*, v. 376, n. 9755, p. 1861–1868, 2010.

ANDERSON, J. F. F. Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE para determinação quantitativa de anti-hipertensivos e estudo de interação entre componentes da formulação. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 53, n. 9, p. 1689– 1699, 2016.

ANVISA. Formulário Nacional Da Farmacopeia Brasileira 2a edição - Revisão 02. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, p. 225, 2012.

ANVISA. RDC N. 166, de 25 de Julho de 2017. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, v. 2017, p. 1–21, 2017.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR ISO/IEC 17025: requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. p. 20, 2001.

ANVISA. RDC N. 166, de 25 de Julho de 2017. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, v. 2017, p. 1–21, 2017.

ATIA, N. N. et al. Novel sublingual tablets of Atorvastatin calcium/Trimetazidine hydrochloride combination; HPTLC quantification, in vitro formulation and characterization. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 27, n. 4, p. 540–549, 2019.

AZEVEDO, R. D. C. P.; RIBEIRO, G. P.; DE ARAÚJO, M. B. Desenvolvimento e validação do ensaio de dissolução para captopril em cápsulas magistrais por CLAE. **Revista Brasileira de Ciências Farmacéuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 2, p. 261–269, 2008.

BAIENSE, A. S. R. et al. Guia Prático do Farmacêutico Magistral. **Conselho Federal de Farmácia**, p. 1–16, 2017.

BENMESSAOUD, I. et al. Solvent screening and crystal habit of metformin hydrochloride. **Journal of Crystal Growth**, v. 451, p. 42–51, 2016.

BONFILIO, R. DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE LOSARTANO POTÁSSICO EM CÁPSULAS. 2009.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. PLANO DE AÇÕES ESTRATÉGICAS PARA O ENFRENTAMENTO DAS DOENÇAS CRÔNICAS NÃO TRANSMISSÍVEIS (DCNT) no Brasil. **Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise da Situação de Saúde**, p. 148p, 2011.

DIRETRIZES SBD. Tratamento de dislipidemia associada ao diabetes mellitus

PREVALÊNCIA DE DISLIPIDEMIA EM DIABETES MELLITUS TIPO 2. p. 127–135, 2015.

EL-ZAHER, A. A. et al. A validated LC-MS/MS bioanalytical method for the simultaneous determination of dapagliflozin or saxagliptin with metformin in human plasma. **Microchemical Journal**, v. 149, n. April, p. 104017, 2019.

FDA. Sandoz Inc. Issues Voluntary Nationwide Recall of One Lot of Losartan Potassium and Hydrochlorothiazide Due to the Detection of Trace Amounts of NDEA (N-Nitrosodiethylamine) Impurity Found in the Active Pharmaceutical Ingredient (API). **Fda**, p. 2018, 2018.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Atorvastatina cálcica. 2017.

GIOLITO. Princípios Básicos da Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial/ Calorimetria Exploratória Diferencial. 2004.

GORAIEB, K. O DESAFIO DE ANALISAR SOLUTOS BÁSICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA EM MODO REVERSO: ALGUMAS ALTERNATIVAS PARA MELHORAR AS SEPARAÇÕES. v. 35, n. 5, p. 993–1003, 2012.

GRAZIELA RAMOS, D. C. M. DE M. Revisão de literatura sobre excipientes em farmácia de manipulação. p. 11–26, 2013.

KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R. HPLC for Pharmaceutical Scientists. **John Wiley & Sons**, 2007.

KOCZWARA, A.; DRESSMAN, J. Poor-Quality and Counterfeit Drugs: A Systematic Assessment of Prevalence and Risks Based on Data Published From 2007 to 2016. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 106, n. 10, p. 2921–2929, out. 2017.

LAPORTA, L. V. et al. Validation of analytical method for quality control of compounded metformin hydrochloride capsules | Validação de método analítico para avaliação da qualidade de cápsulas de cloridrato de metformina manipuladas. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 34, n. 2, p. 235–244, 2013.

LOBO, L. A. C. et al. Tendência temporal da prevalência de hipertensão arterial sistêmica no Brasil. **Cadernos de Saude Publica**, v. 33, n. 6, 2017.

LYRA, R. et al. **Sociedade Brasileira de Diabetes**. [s.l: s.n.]. v. 5

MALTA, D. C.; SILVA JR, J. B. DA. O Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas Não Transmissíveis no Brasil e a definição das metas globais para o enfrentamento dessas doenças até 2025: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 22, n. 1, p. 151–164, 2013.

MARTINO, R. et al. Counterfeit drugs: Analytical techniques for their identification. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 1, p. 77–92, 2010.

MIGUEL, M. D. et al. O Cotidiano Das Farmácias De Manipulação. **Visão Acadêmica**, v. 3, n. 2, p. 103–108, 2002.

NART, V. DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE SISTEMAS MULTIPARTICULADOS NA FORMA DE MINI Florianópolis. p. 127, 2015.

NOVARTIS, S. Número do diabetes no Brasil e no mundo. [s.d.].

NUNES, N. M. Desenvolvimento e Validação da Metodologia Analítica do Teor de Atorvastatina Cálcica em insumo farmacêutico ativo e em comprimidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. **Biological Conservation**, 2010.

OLIVEIRA, M. A. et al. Access to medicines for chronic diseases in Brazil: A multidimensional approach. **Revista de Saude Publica**, v. 50, n. suppl 2, p. 1–13, 2016.

OMS, O. M. DA S. **Sistema Mundial de Vigilância e Monitorização da OMS para os Produtos Médicos de qualidade inferior ou falsificados**. [s.l: s.n.].

PERES, F. G. VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA CÁPSULAS MAGISTRAIS E ESTUDO DE EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA DO CLORIDRATO DE METFORMINA 850MG REFERÊNCIA, GENÉRICO E SIMILAR. p. 1–28, 2013.

POMBAL, R.; BARATA, P.; OLIVEIRA, R. ESTABILIDADE DOS MEDICAMENTOS MANIPULADOS. **Revista da Faculdade de Ciências da Saúde**, v. n. 7, p. 330–341, 2010.

ROCHA, T. G.; GALENDE, S. B. A importância do controle de qualidade na indústria farmacêutica. **Uningá Review**, v. 20, n. 2, p. 97–103, 2014.

SANTOS, V. L. P. Estabilidade e tempo de vida útil de fármacos e medicamentos Universidade Fernando Pessoa Faculdade de Ciências da Saúde. p. 83, 2012.

SAÚDE, M. DA. BRASIL. 2018.

TAVARES, N. U. L. et al. Uso de medicamentos para tratamento de doenças crônicas não transmissíveis no Brasil: resultados da Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 24, n. 2, p. 315–323, 2015.

TEIXEIRA, A.; BUZUTTI, A. UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO CUIABÁ MATO GROSSO – BRASIL MATO GROSSO - BRASIL. 2015.

TENGLI, A. R.; GURUPADAYYA, B. M.; SONI, N. Simultaneous estimation of hydrochlorothiazide, amlodipine, and losartan in tablet dosage form by RP-HPLC. **International Journal of Chemical and Analytical Science**, v. 4, n. 1, p. 33–38, 2013.

THOMAS, A. B. et al. Stability-indicating HPTLC method for simultaneous determination of nateglinide and metformin hydrochloride in pharmaceutical dosage form. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 19, n. 4, p. 221–231, 2011.

VILLANOVA, J.C.O.; SÁ, V. . **Excipientes, guia prático para padronização**. [s.l: s.n.].

VITOI, N. C. et al. Prevalência e fatores associados ao diabetes em idosos no município de Viçosa, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, n. 4, p. 953–965, 2015.