

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**NAIALY FERNANDES ARAÚJO REIS**

**MÉTODOS ANALÍTICOS MODERNOS PARA DETERMINAÇÃO DE SILDENAFILA  
E TADALAFILA EM AMOSTRAS DE MEDICAMENTOS E PLASMA HUMANO**

Belo Horizonte - MG  
2020

**NAIALY FERNANDES ARAÚJO REIS**

**MÉTODOS ANALÍTICOS MODERNOS PARA DETERMINAÇÃO DE SILDENAFILA  
E TADALAFILA EM AMOSTRAS DE MEDICAMENTOS E PLASMA HUMANO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Gerson Antônio Pianetti - UFMG

Coorientador: Prof. Dr. Christian Fernandes - UFMG

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Beatriz Abreu Glória -  
UFMG

Belo Horizonte

2020

R375m      Reis, Naialy Fernandes Araújo.  
Métodos analíticos modernos para determinação de sildenafil e  
tadalafila em amostras de medicamentos e plasma humano / Naialy  
Fernandes Araújo Reis. – 2020.  
209 f. : il.

Orientador: Gerson Antônio Pianetti.  
Coorientador: Christian Fernandes.  
Coorientadora: Maria Beatriz de Abreu Glória.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais,  
Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas.

1. Sildenafil – Teses. 2. Tadalafila – Teses. 3. Métodos de análise –  
Teses. 4. Análises forenses – Teses. 5. Método indicativo de  
estabilidade – Teses. 6. Microextração em fase líquida. I. Pianetti,  
Gerson Antônio. II. Fernandes, Christian. III. Glória, Maria Beatriz de  
Abreu. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de  
Farmácia. V. Título.

CDD:615.4



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

### **FOLHA DE APROVAÇÃO**

**MÉTODOS ANALÍTICOS MODERNOS PARA DETERMINAÇÃO DE SILDENAFILA E TADALAFILA EM AMOSTRAS DE  
MEDICAMENTOS E PLASMA HUMANO**

**NAIALY FERNANDES ARAÚJO REIS**

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em  
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Doutora em CIÊNCIA  
FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Dr. Leonardo de Souza Teixeira

Instituto de Ciências Farmacêuticas - ICF

Prof. Dr. Adriano Antunes de Souza Araújo

Universidade Federal de Sergipe - UFS

Prof. Dr. Fernando Henrique Andrade Nogueira

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

Profa. Dra. Magali Benjamim de Araújo

Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL

Prof. Dr. Gerson Antônio Pianetti - Orientador

Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Profa. Dra. Maria Beatriz de Abreu Glória - Coorientadora

Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Christian Fernandes - Coorientador

Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 17 de dezembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Gerson Antonio Pianetti, Professor do Magistério Superior**, em 17/01/2021, às 17:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Beatriz de Abreu Gloria, Professora Magistério Superior - Voluntária**, em 18/01/2021, às 07:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Christian Fernandes, Professor do Magistério Superior**, em 18/01/2021, às 09:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernando Henrique Andrade Nogueira, Usuário Externo**, em 18/01/2021, às 09:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Magali Benjamim de Araújo, Usuário Externo**, em 19/01/2021, às 10:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leonardo de Souza Teixeira, Usuário Externo**, em 22/01/2021, às 07:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adriano Antunes de Souza Araújo, Usuário Externo**, em 22/01/2021, às 08:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 0521066 e o código CRC A43E6DCA.

Referência: Processo nº 23072.247537/2020-45

SEI nº 0521066

Dedico esse trabalho aos meus pais Marcelo e Ronise,  
ao meu grande amor Pedro,  
aos meus irmãos e  
aos meus avós,  
que sempre me apoiaram e incentivaram o meu crescimento.

## **AGRADECIMENTOS**

Por sempre abençoar e proteger a minha vida, me amparar nos momentos difíceis e me dar força, coragem e sabedoria para superar os desafios agradeço imensamente a Deus. Aos meus queridos professores orientadores sou muito grata pelos ensinamentos, pelas valiosas contribuições técnicas que enriqueceram esse trabalho e contribuíram para a minha formação profissional, pela confiança e valorização dos seus alunos, pelos conselhos, apoio, pela grande amizade e pelas oportunidades oferecidas. À toda Faculdade de Farmácia da UFMG, seus professores e funcionários, especialmente àqueles vinculados ao LCQ-FAFAR e CEDAFAR, o meu muito obrigada pelas experiências divididas, pela disponibilidade e conhecimentos compartilhados. Aos eternos amigos do LCQ-FAFAR eu agradeço pela união, prestatividade, pelas discussões e ideias enriquecedoras, pelo aprendizado que sempre compartilhamos e pela grande amizade que construímos. Agradeço ao Setor Técnico e Científico da Superintendência de Polícia Federal de Minas Gerais e ao Instituto de Criminalística da Polícia Civil de Minas Gerais, pela doação das amostras de medicamentos apreendidos. À toda equipe da FUNED, pela parceria, por dividirem os conhecimentos e pela gentil disponibilização de equipamentos necessários à realização desse projeto. Agradeço aos voluntários que doaram sangue, viabilizando a realização da etapa bioanalítica deste trabalho. Às instituições de fomento, CAPES, CNPq e FAPEMIG agradeço os auxílios financeiros e à Farmacopeia Brasileira pelas oportunidades de empregar e ampliar meus conhecimentos farmacêuticos. À minha amada família e amigos, sou profundamente grata pelo amor incondicional, pelas alegrias, por sempre acreditarem em mim, por todo suporte e incentivo à minha qualificação e ao meu crescimento pessoal. Ao meu amigo, namorado, marido e eterno amor Pedro, muito obrigada por ser meu parceiro de vida, por toda compreensão, paciência, por sempre me incentivar, me encorajar diante das dificuldades e compartilhar comigo todos os momentos e conquistas. A todos que, de alguma forma, participaram e contribuíram para a concretização dessa etapa da minha vida, o meu MUITO OBRIGADA!

“A diferença entre o possível e o impossível está na vontade humana.”

*Louis Pasteur*



## RESUMO

Uma das maiores incidências de medicamentos ilegais está relacionada aos inibidores da fosfodiesterase-5, utilizados no tratamento da disfunção erétil, incluindo aqueles contendo citrato de sildenafil (SLD) e tadalafila (TAD). A produção e a comercialização de medicamentos falsificados e/ou contrabandeados, além de ser um problema criminal, representa uma séria ameaça para a saúde pública. SLD e TAD também são utilizados na farmacoterapia da hipertensão arterial pulmonar (HAP), uma doença rara, mas grave e progressiva. Neste contexto, torna-se relevante o desenvolvimento de métodos analíticos modernos, simples, rápidos, ambientalmente corretos, com elevada eficiência e aplicabilidade na determinação de SLD e TAD em medicamentos e amostras biológicas. Portanto, no presente trabalho, um método por UHPLC-UV para quantificação de SLD e TAD na presença de seis produtos de degradação foi desenvolvido e validado. Os fármacos foram submetidos a um detalhado estudo de degradação forçada. A separação dos analitos ocorreu em menos de seis minutos e o método apresentou-se seletivo, linear, preciso, exato e robusto. O SLD foi susceptível à degradação em meio oxidativo, enquanto a TAD degradou em meios ácido, alcalino e oxidativo. As estruturas químicas e os mecanismos para a formação dos principais produtos de degradação foram propostos utilizando UHPLC-Q-TOF-MS. O método UHPLC-UV foi aplicado na análise farmacêutica de medicamentos originais e apreendidos e foi evidenciada falta de qualidade em algumas amostras. Ademais, um método bioanalítico foi desenvolvido para a quantificação simultânea de TAD, SLD, N-desmetil sildenafil e outros seis fármacos presentes no protocolo terapêutico da HAP (anlodipino, bumetanida, digoxina, diltiazem, nifedipino e varfarina) em plasma humano empregando-se microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) e HPLC-MS/MS. Diferentes fatores que influenciam o procedimento da DLLME foram investigados e otimizados, obtendo-se um método eficiente, simples, com reduzido gasto de amostra e de solventes orgânicos. O método foi validado e os resultados foram satisfatórios para seletividade, efeito residual, efeito matriz, linearidade, precisão, exatidão, recuperação e estabilidade dos analitos. Amostras de plasma de voluntários foram analisadas e o método bioanalítico se mostrou adequado para essa aplicação.

**Palavras-chave:** Sildenafil. Tadalafila. Análises forenses. Método indicativo de estabilidade. Método bioanalítico. Microextração líquido-líquido dispersiva.

## ABSTRACT

One of the highest incidences of illegal drug products is related to phosphodiesterase-5 inhibitors, used in the treatment of erectile dysfunction, including those containing sildenafil citrate (SLD) and tadalafil (TAD). In addition to being a criminal justice issue, the manufacturing and commercialization of illegal health products poses a serious threat to public health. SLD and TAD are also used in the treatment of pulmonary arterial hypertension (PAH), a rare but serious and progressive disease. In this context, the development of modern, simple, fast, environmentally friendly analytical methods, with high efficiency and applicability in the quantification of SLD and TAD in drug products and biological matrices, becomes relevant. Therefore, in the present study, a UHPLC-UV method for SLD and TAD in the presence of six degradation products was developed and validated. The drugs were submitted to a detailed forced degradation study. The separation of the analytes was possible in less than six minutes and the method was selective, linear, precise, accurate and robust. SLD was degraded in oxidative media, whereas TAD was degraded in acidic, alkaline and oxidative environment. The chemical structures and the mechanisms for the formation of the main degradation products were proposed by UHPLC-Q-TOF-MS. The UHPLC-UV method was applied in the pharmaceutical analysis of genuine and seized medicines and the lack of quality was evident in some of them. In addition, a bioanalytical method for the simultaneous quantification of TAD, SLD, N-desmethylsildenafil and six other drugs presents in the therapeutic protocol of PAH (amlodipine, bumetanide, digoxin, diltiazem, nifedipine and warfarin) in human plasma was developed by means of dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) and HPLC-MS/MS. Different factors that affected the DLLME procedure were investigated and optimized, obtaining an efficient and simple method, with reduced sample and solvents volumes. The method was validated and the results were satisfactory for selectivity, residual effect, matrix effect, linearity, precision, accuracy, recovery and stability of the analytes. Plasma samples from volunteers were analysed and the bioanalytical method proved to be suitable for the application.

**Keywords:** Sildenafil. Tadalafil. Forensic analysis. Stability-indicating assay method. Bioanalytical method. Dispersive liquid-liquid microextraction.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estruturas químicas do citrato de sildenafil (A) e da tadalafila (B).....	25
Figura 2 – Número de notificações de medicamentos de qualidade inferior e falsificados recebidos pela OMS no período entre 2013 e 2017, de acordo com a classe terapêutica.....	28
Figura 3 – Espectros de absorção na região do infravermelho do SLD SQR (preto) e IFA (azul).....	60
Figura 4 – Espectros de absorção na região do infravermelho da TAD SQR (preto) e IFA (azul).....	60
Figura 5 - Espectros de absorção na região do ultravioleta do SLD (A) e da TAD (B).....	61
Figura 6 – Diagrama de distribuição das formas ao longo da faixa de pH: SLD (A) e TAD (B).....	64
Figura 7 – Cromatogramas obtidos a partir do método otimizado e das amostras submetidas a testes de degradação forçada.....	66
Figura 8 – Diagramas de Pareto referente às recuperações de SLD (A) e de TAD (B) obtidas no planejamento fatorial 2 <sup>4</sup> .....	69
Figura 9 – Cromatogramas provenientes da degradação de mistura dos IFA SLD e TAD (vermelho) e da degradação dos IFA isolados SLD (azul) e TAD (preto) com: HCl 1 M mantido a 50°C durante 24 horas (A), NaOH 0,01 M mantido à temperatura ambiente durante 24 horas (B) e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3% (v/v) mantido à temperatura ambiente durante 24 horas (C).....	70
Figura 10 – Curvas analíticas para avaliação da linearidade do método para o citrato de SLD (A) e para a TAD (B).....	73
Figura 11 – Gráficos de distribuição de resíduos para o conjunto de dados do SLD (A) e da TAD (B).....	73
Figura 12 – Gráficos de Daniel (A) e de Lenth (B) obtidos para o teste de robustez para SLD.....	77
Figura 13 – Gráficos de Daniel (A) e de Lenth (B) obtidos para o teste de robustez para TAD.....	77
Figura 14 – Espectro no UV do SLD (A); espectro de fragmentação (MS2 <i>full-scan</i> ) do SLD (B); espectro no UV do PD <sub>5</sub> (C) e espectro de fragmentação (MS2 <i>full-scan</i> ) do PD <sub>5</sub> .....	80
Figura 15 – Espectros no UV da TAD e do PD <sub>6</sub> sobrepostos (A); espectro de fragmentação (MS2 <i>full-scan</i> ) da TAD (B); espectro de varredura (MS1 <i>full-scan</i> ) da TAD (C) e espectro de varredura (MS1 <i>full-scan</i> ) do PD <sub>6</sub> .....	80
Figura 16 – Proposta de mecanismo de formação e estrutura do PD <sub>5</sub> .....	81
Figura 17 – Proposta de mecanismo de formação e estrutura do PD <sub>6</sub> via tautomerismo ceto-enólico em meios ácido (A) e alcalino (B).....	83
Figura 18 – Imagens das amostras de medicamentos apreendidos disponibilizadas pela PF e PCMG.....	85
Figura 19 – Perfil de dissolução das amostras contendo SLD.....	93
Figura 20 – Perfil de dissolução das amostras contendo TAD.....	95
Figura 21 – Esquema ilustrativo das etapas envolvidas na DLLME.....	105
Figura 22 – Gráficos de log D (coeficiente de distribuição) dos analitos em função do pH..	120
Figura 23 – Estruturas químicas dos PI utilizados para quantificação: SLD d-8 (A) e VERA (B).....	124
Figura 24 - Espectro obtido após fragmentação do íon precursor <i>m/z</i> 409, proveniente da ionização no modo positivo do anlodipino (ANLO).....	140
Figura 25 - Espectro obtido após fragmentação do íon precursor <i>m/z</i> 365, proveniente da ionização no modo positivo da bumetanida (BUM).....	140

/continua

## LISTA DE FIGURAS (continuação)

Figura 26 - Espectro obtido após fragmentação do íon precursor <i>m/z</i> 781, proveniente da ionização no modo positivo da digoxina (DGX).....	141
Figura 27 - Espectro obtido após fragmentação do íon precursor <i>m/z</i> 415, proveniente da ionização no modo positivo do diltiazem (DTZ).....	141
Figura 28 - Espectro obtido após fragmentação do íon precursor <i>m/z</i> 461, proveniente da ionização no modo positivo do N-desmetil sildenafil (N-DMS).....	142
Figura 29 - Espectro obtido após fragmentação do íon precursor <i>m/z</i> 347, proveniente da ionização no modo positivo do nifedipino (NIF).....	142
Figura 30 - Espectro obtido após fragmentação do íon precursor <i>m/z</i> 475, proveniente da ionização no modo positivo do sildenafil (SLD).....	143
Figura 31 - Espectro obtido após fragmentação do íon precursor <i>m/z</i> 390, proveniente da ionização no modo positivo da tadalafila (TAD).....	143
Figura 32 - Espectro obtido após fragmentação do íon precursor <i>m/z</i> 309, proveniente da ionização no modo positivo da varfarina (VAR).....	144
Figura 33 - Espectro obtido após fragmentação do íon precursor <i>m/z</i> 483, proveniente da ionização no modo positivo do sildenafil-d8 (SLD d-8).....	144
Figura 34 - Espectro obtido após fragmentação do íon precursor <i>m/z</i> 455, proveniente da ionização no modo positivo do verapamil (VERA).....	145
Figura 35 - Cromatograma obtido a partir das condições cromatográficas otimizadas para a determinação simultânea de ANLO, BUM, DGX, DTZ, N-DMS, NIF, SLD, TAD, VAR utilizando SLD d-8 e VERA como PI.....	149
Figura 36 - Superfícies de resposta obtidas para recuperação de ANLO (A), BUM (B), TAD (C) e DTZ (D) durante a otimização da etapa de PPT usando planejamento CCD.....	151
Figura 37 - Avaliação do pH do tampão a ser utilizado na DLLME.....	153
Figura 38 - Diagrama de distribuição das formas ao longo da faixa de pH para a BUM.....	154
Figura 39 - Avaliação da concentração do tampão a ser utilizada na DLLME.....	156
Figura 40 - Avaliação da força iônica do tampão a ser utilizado na DLLME.....	158
Figura 41 - Avaliação do tipo do solvente extrator a ser utilizado na DLLME.....	160
Figura 42 - Avaliação do volume do solvente extrator a ser utilizado na DLLME.....	162
Figura 43 - Avaliação do volume do tampão a ser utilizado na DLLME.....	164
Figura 44 - Avaliação do solvente dispersante a ser utilizado na DLLME.....	166
Figura 45 - Avaliação do volume do solvente dispersante a ser utilizado na DLLME.....	168
Figura 46 - Avaliação do tempo de agitação em vórtex a ser utilizado na DLLME.....	170
Figura 47 - Etapas do método DLLME otimizado.....	172
Figura 48 - Cromatogramas obtidos para uma amostra de LIQ (A) e uma amostra plasma branco normal (plasma normal 1) (B) para avaliação da seletividade do método bioanalítico.....	174
Figura 49 - Microtubo após etapa de evaporação do solvente extrator proveniente da DLLME (A) e PPT (B) e <i>vial</i> contendo amostra ressuspensa após procedimento da DLLME (A) e PPT (B).....	177
Figura 50 - Curvas de calibração obtidas durante a avaliação da linearidade no terceiro dia de análise.....	180
Figura 51 - Cromatogramas obtidos na análise da amostra de plasma dos pacientes 2 (A) e 7 (B).....	184

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Métodos farmacopeicos, por HPLC-UV, para determinação do teor de SLD e TAD em IFA e comprimidos.....	31
Tabela 2 – Métodos indicativos de estabilidade para SLD e TAD encontrados na literatura.	35
Tabela 3 – Funções farmacotécnicas e proporções estimada dos excipientes utilizados na fabricação dos comprimidos Viagra® e Cialis® .....	38
Tabela 4 – Concentrações das <i>Soluções padrão</i> para preparo da curva analítica.....	44
Tabela 5 – Condições cromatográficas e variações das mesmas testadas durante o desenvolvimento do método analítico.....	45
Tabela 6 – Resumo das condições cromatográficas definitivas do método analítico seletivo para SLD, TAD e seus produtos de degradação utilizando UHPLC-UV.....	45
Tabela 7 – Gradiente definitivo do método analítico seletivo para SLD, TAD e seus produtos de degradação utilizando UHPLC-UV.....	46
Tabela 8 – Variáveis independentes avaliadas no planejamento fatorial 24 e os níveis avaliados para cada uma delas.....	46
Tabela 9 – Preparo das soluções contendo SLD e TAD SQR para avaliação da linearidade.	50
Tabela 10 – Parâmetros e variações avaliados no teste de robustez.....	52
Tabela 11 – Número de comprimidos utilizados nos testes de controle de qualidade.....	56
Tabela 12 – Números de onda e atribuições das bandas de absorção obtidas nos espectros de infravermelho do SLD IFA e SQR.....	59
Tabela 13 – Números de onda e atribuições das bandas de absorção obtidas nos espectros de infravermelho da TAD IFA e SQR.....	60
Tabela 14 – Parâmetros de adequabilidade do sistema obtidos com a solução padrão e amostras degradadas durante 24 horas e utilizando-se o método desenvolvido e otimizado apresentado nas Tabelas 6 e 7 (páginas 45 e 46).....	66
Tabela 15 – Matriz experimental e respostas obtidas com o planejamento fatorial 2 <sup>4</sup> .....	67
Tabela 16 – Efeitos principais, valores inferiores e superiores do intervalo de confiança de cada efeito e interpretação da significância de cada efeito para na recuperação de SLD e TAD.....	68
Tabela 17 – Resultados obtidos no teste de seletividade com as soluções contendo apenas os fármacos e soluções contendo fármacos + placebo.....	71
Tabela 18 – Avaliação das premissas necessárias à utilização do MMQO para o conjunto de dados do SLD e da TAD.....	72
Tabela 19 - Porcentagens de recuperação de SLD e TAD e DPR obtidos para a avaliação da exatidão e precisão do método analítico.....	75
Tabela 20 – Avaliação do efeito das variáveis na determinação de SLD e TAD por UHPLC..	76
Tabela 21 – Áreas sob os picos do SLD e da TAD e comparação estatística quando são utilizados diferentes diluentes.....	78
Tabela 22 – Descrição e características físicas dos medicamentos apreendidos e originais.....	87
Tabela 23 – Resultados obtidos no teste de identificação e doseamento das amostras apreendidas e autênticas contendo SLD e TAD.....	89
Tabela 24 – Resultados obtidos no teste de uniformidade de conteúdo das amostras apreendidas e autênticas contendo SLD e TAD.....	91
Tabela 25 - Resultados obtidos no teste de dissolução para os comprimidos contendo SLD.....	92
Tabela 26 - Resultados obtidos no teste de dissolução para os comprimidos contendo TAD.....	94

## LISTA DE TABELAS (continuação)

Tabela 27 – Métodos bioanalíticos para a determinação de SLD e TAD em plasma humano.....	109
Tabela 28 – Características físico-químicas dos analitos selecionados para desenvolvimento do método bioanalítico.....	117
Tabela 29 – Características farmacocinéticas dos analitos selecionados para desenvolvimento do método bioanalítico.....	119
Tabela 30 – Valores testados para os respectivos parâmetros durante a otimização da fonte de ionização.....	126
Tabela 31 – Gradiente utilizado durante etapa inicial de desenvolvimento do método.....	126
Tabela 32 – Resumo das condições cromatográficas definitivas do método bioanalítico por HPLC-MS/MS.....	127
Tabela 33 – Gradiente definitivo do método bioanalítico por HPLC-MS/MS.....	127
Tabela 34 – Variáveis e seus níveis empregadas para a otimização da etapa de PPT.....	129
Tabela 35 – Concentrações dos analitos nas amostras de plasma enriquecidas para avaliação da linearidade, precisão e exatidão do método.....	134
Tabela 36 – Transições de massas monitoradas e valores de <i>Dwell Time</i> , DP, CE e CXP otimizados.....	139
Tabela 37 – Parâmetros de ionização da fonte otimizados por FIA.....	145
Tabela 38 – Tempos de retenção médios obtidos para os 11 analitos utilizando-se as condições cromatográficas otimizadas.....	148
Tabela 39 – Propriedades físico-químicas dos solventes extratores avaliados durante otimização da DLLME.....	159
Tabela 40 – Resultados de DPR da área sob o pico normalizada com a utilização de diferentes substâncias como PI.....	171
Tabela 41 – Porcentagem da área de picos interferentes em relação à área do analito de interesse no LIQ.....	175
Tabela 42 – Porcentagem da área de picos interferentes na amostra de plasma branco após injeção da amostra de LSQ em relação à área do analito de interesse no LIQ para determinação do efeito residual.....	176
Tabela 43 - Avaliação do efeito matriz utilizando o FMN para as amostras provenientes do preparo de amostra por DLLME e por PPT.....	176
Tabela 44 - Equações da reta e coeficientes de determinação obtidos para os analitos durante avaliação da linearidade da faixa de trabalho.....	179
Tabela 45 – Valores de DPR e EPR obtidos durante a avaliação da precisão e exatidão intracorrida e intercorridas e recuperação do método bioanalítico.....	181
Tabela 46 – Resultados de exatidão (EPR) e precisão (DPR) obtidos para as amostras provenientes dos estudos de estabilidade.....	182
Tabela 47 – Concentrações plasmáticas obtidas em plasma de pacientes voluntários atendidos no Serviço de Anticoagulação, Hematologia e Oncologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.....	184

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANLO	Anlodipino
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPF	Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos
BUM	Bumetanida
C <sub>8</sub>	Sílica quimicamente ligada a grupos octilsilanos
C <sub>18</sub>	Sílica quimicamente ligada a grupos octadecilsilanos
C <sub>máx</sub>	Concentração plasmática máxima
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CQA	Controle de qualidade de alta concentração
CQB	Controle de qualidade de alta concentração
CQD	Controle de qualidade de diluição
CQM	Controle de qualidade de média concentração
CuSO <sub>4</sub>	Sulfato de cobre
CV	Coefficiente de variação
DGX	Digoxina
DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva, em inglês <i>Dispersive liquid-liquid microextraction</i> .
DTZ	Diltiazem
DPF	Departamento de Polícia Federal
DPR	Desvio padrão relativo
ECC	Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento
ECD	Estabilidade de curta duração
ELD	Estabilidade de longa duração
EPP	Estabilidade pós-processamento
EPR	Erro padrão relativo
ESI	Ionização por <i>electrospray</i> , em inglês <i>electrospray ionization</i>
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
<i>g</i>	Força centrífuga
HAP	Hipertensão arterial pulmonar
HCl	Ácido clorídrico
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, em inglês <i>High performance liquid chromatography</i>
HPLC-MS/MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial, em inglês <i>High performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry</i>

/continua

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (continuação)

ICH	<i>International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i>
IFA	Insumo farmacêutico ativo
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
k	Fator de retenção
K <sub>D</sub>	Coeficiente de distribuição
LIQ	Limite inferior de quantificação
LSQ	Limite superior de quantificação
Log P	Coeficiente de partição
Lux	Unidade da intensidade de iluminação
MMQO	Método dos mínimos quadrados ordinários
m/z	Razão massa-carga
N	Número de pratos teóricos
NaOH	Hidróxido de sódio
N-DMS	N-desmetil sildenafil
NIF	Nifedipino
OMS / WHO	Organização Mundial da Saúde, em inglês <i>World Health Organization</i>
PCMG	Polícia Civil de Minas Gerais
PD	Produto de degradação
PDE-5	Fosfodiesterase-5
PF	Polícia Federal
PI	Padrão interno
pKa	Constante de dissociação
PPT	Precipitação de proteínas, em inglês <i>Protein precipitation</i>
PVDF	Fluoreto polivinidileno
R <sup>2</sup>	Coeficiente de determinação
R	Coeficiente de correlação
rpm	Rotações por minuto
SLD	Sildenafil
SLD d-8	Sildenafil d-8 (isótopo deuterado do SLD)
SPE	Extração em fase sólida, em inglês <i>Solid phase extraction</i>
TAD	Tadalafila
TEA	Trietilamina
T <sub>F</sub>	Fator de cauda, em inglês <i>Tailing factor</i>
t <sub>R</sub>	Tempo de retenção
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência, em inglês <i>Ultra high performance liquid chromatography</i>

/continua



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (continuação)

UHPLC-Q-TOF-MS	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial, com analisador do tipo quadrupolo-tempo-de-voo, em inglês <i>Ultra high performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry</i>
UV	Ultravioleta
V	Volt
VERA	Verapamil
Watt	Unidade de potência

## SUMÁRIO

CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	19
CAPÍTULO I: AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE MEDICAMENTOS AUTÊNTICOS E APREENDIDOS CONTENDO CITRATO DE SILDENAFILA E TADALAFILA POR UHPLC-UV.....	21
1 INTRODUÇÃO.....	21
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivo geral.....	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
3.1 Sildenafil e tadalafila: inibidores da fosfodiesterase-5.....	24
3.2 Fabricação e comercialização ilegal de medicamentos.....	26
3.3 Aplicação de técnicas analíticas em atividades forenses.....	29
3.3.1 <u>Métodos cromatográficos com detecção no ultravioleta para determinação de SLD e TAD</u> .....	30
3.4 Controle de qualidade dos medicamentos.....	36
4 MATERIAIS.....	38
4.1 Substâncias químicas de referência (SQR), IFA e placebo.....	38
4.2 Comprimidos originais e apreendidos.....	39
4.3 Reagentes.....	39
4.4 Materiais, vidrarias e instrumentos.....	39
4.5 Equipamentos.....	40
5 MÉTODOS.....	41
5.1 Determinação da solubilidade dos IFA SLD e TAD.....	41
5.2 Identificação por espectrofotometria no infravermelho.....	41
5.3 Determinação dos máximos de absorção na região do ultravioleta do SLD e da TAD.....	41
5.4 Estudos de degradação forçada.....	42
5.4.1 <u>Soluções de degradação</u> .....	43
5.4.2 <u>Soluções padrão de SLD e TAD</u> .....	44
5.5 Desenvolvimento do método para quantificação simultânea de SLD, TAD e potenciais produtos de degradação por UHPLC-UV.....	44
5.6 Otimização da etapa do preparo de amostra para os testes de determinação de teor de SLD e TAD em comprimidos.....	46
5.7 Validação do método analítico.....	47
5.7.1 <u>Adequabilidade do sistema</u> .....	48
5.7.2 <u>Seletividade</u> .....	48
5.7.3 <u>Linearidade</u> .....	49
5.7.4 <u>Precisão e exatidão</u> .....	51
5.7.5 <u>Robustez</u> .....	51
5.7.6 <u>Limites de detecção e quantificação</u> .....	52

/continua

## SUMÁRIO (continuação)

5.7.7 <u>Testes de seletividade e recuperação para diferentes diluentes</u> .....	53
5.8 Elucidação das estruturas químicas dos produtos de degradação.....	53
5.9 Análise dos medicamentos originais e apreendidos.....	54
5.9.1 <u>Recebimento e armazenamento das amostras</u> .....	54
5.9.2 <u>Caracterização física dos comprimidos originais e apreendidos</u> .....	55
5.9.3 <u>Aplicação do método: avaliação da qualidade dos medicamentos originais e apreendidos</u> .....	55
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
6.1 Solubilidade dos IFA SLD e TAD.....	59
6.2 Identificação por espectrofotometria no infravermelho.....	59
6.3 Determinação dos máximos de absorção na região do ultravioleta.....	61
6.4 Estudos de degradação forçada.....	61
6.5 Desenvolvimento do método para quantificação simultânea de SLD, TAD e potenciais produtos de degradação por UHPLC-UV.....	63
6.6 Resultados da otimização do preparo da amostra para os testes de determinação de teor de SLD e TAD em comprimidos.....	67
6.7 Validação do método analítico.....	70
6.7.1 <u>Adequabilidade do sistema</u> .....	70
6.7.2 <u>Seletividade</u> .....	70
6.7.3 <u>Linearidade</u> .....	72
6.7.4 <u>Precisão e exatidão</u> .....	75
6.7.5 <u>Robustez</u> .....	75
6.7.6 <u>Limites de detecção e de quantificação</u> .....	77
6.7.7 <u>Testes de seletividade e recuperação para diferentes diluentes</u> .....	78
6.8 Propostas de elucidação estrutural dos principais produtos de degradação.....	79
6.9 Análise dos medicamentos originais e apreendidos.....	84
6.9.1 <u>Caracterização física dos comprimidos originais e apreendidos</u> .....	84
6.9.2 <u>Aplicação do método: avaliação da qualidade dos medicamentos originais e apreendidos</u> .....	89
7 CONCLUSÕES.....	97
CAPÍTULO II: QUANTIFICAÇÃO DE SILDENAFILA, N-DESMETIL SILDENAFILA, TADALAFILA E OUTROS SEIS FÁRMACOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DA HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR EM PLASMA HUMANO.....	98
1 INTRODUÇÃO.....	98
2 OBJETIVOS.....	100
2.1 Objetivo geral.....	100
2.2 Objetivos específicos.....	100

/continua

## SUMÁRIO (continuação)

<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>101</b>
<b>3.1 Métodos bioanalíticos.....</b>	<b>101</b>
<b>3.1.1 <u>Preparo de amostra</u>.....</b>	<b>102</b>
<b>3.1.2 <u>Métodos bioanalíticos para quantificação de SLD e TAD em plasma humano</u>.....</b>	<b>107</b>
<b>3.2 Hipertensão arterial pulmonar (HAP).....</b>	<b>112</b>
<b>3.2.2 <u>Farmacoterapia da HAP</u>.....</b>	<b>113</b>
<b>3.3 Características físico-químicas e farmacocinéticas dos fármacos utilizado no tratamento da HAP abordados no presente estudo.....</b>	<b>116</b>
<b>4 MATERIAIS.....</b>	<b>121</b>
<b>4.1 SQR e IFA.....</b>	<b>121</b>
<b>4.2 Amostras de plasma humano.....</b>	<b>121</b>
<b>4.3 Reagentes.....</b>	<b>122</b>
<b>4.4 Materiais, vidrarias e instrumentos.....</b>	<b>122</b>
<b>4.5 Equipamentos.....</b>	<b>123</b>
<b>5 MÉTODOS.....</b>	<b>124</b>
<b>5.1 Desenvolvimento do método bioanalítico.....</b>	<b>124</b>
<b>5.1.1 <u>Determinação dos parâmetros espectrométricos</u>.....</b>	<b>124</b>
<b>5.1.2 <u>Otimização das condições cromatográficas</u>.....</b>	<b>126</b>
<b>5.1.3 <u>Otimização da etapa de preparo de amostra</u>.....</b>	<b>128</b>
<b>5.2 Validação do método bioanalítico.....</b>	<b>131</b>
<b>5.2.1 <u>Seletividade</u>.....</b>	<b>131</b>
<b>5.2.2 <u>Efeito residual</u>.....</b>	<b>132</b>
<b>5.2.3 <u>Efeito matriz</u>.....</b>	<b>132</b>
<b>5.2.4 <u>Linearidade</u>.....</b>	<b>134</b>
<b>5.2.5 <u>Precisão e exatidão</u>.....</b>	<b>135</b>
<b>5.2.6 <u>Recuperação</u>.....</b>	<b>136</b>
<b>5.2.7 <u>Estabilidade dos analitos em plasma humano</u>.....</b>	<b>136</b>
<b>5.3 Análise de amostras reais.....</b>	<b>137</b>
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>138</b>
<b>6.1 Desenvolvimento do método bioanalítico.....</b>	<b>138</b>
<b>6.1.1 <u>Determinação dos parâmetros espectrométricos</u>.....</b>	<b>138</b>
<b>6.1.2 <u>Otimização das condições cromatográficas</u>.....</b>	<b>145</b>
<b>6.1.3 <u>Otimização da etapa de preparo de amostra</u>.....</b>	<b>150</b>
<b>6.1.4 <u>Definição dos padrões internos (PI) e método DLLME otimizado</u>.....</b>	<b>171</b>
<b>6.2 Validação do método bioanalítico.....</b>	<b>173</b>
<b>6.2.1 <u>Seletividade</u>.....</b>	<b>173</b>
<b>6.2.2 <u>Efeito residual</u>.....</b>	<b>175</b>
<b>6.2.3 <u>Efeito matriz</u>.....</b>	<b>176</b>
<b>6.2.4 <u>Linearidade</u>.....</b>	<b>178</b>

/continua

## SUMÁRIO (continuação)

<b>6.2.5 <u>Precisão, exatidão e recuperação</u></b> .....	181
<b>6.2.6 <u>Estabilidade dos analitos em plasma</u></b> .....	182
<b>6.3 Análise de amostras reais</b> .....	183
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	185
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	186
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	187
<b>APÊNDICE A – Artigo publicado no <i>Journal of Chromatographic Science</i> - <a href="https://doi.org/10.1093/chromsci/bmaa073">https://doi.org/10.1093/chromsci/bmaa073</a>.....</b>	203
<b>APÊNDICE B – Artigo publicado na revista <i>Química Nova</i> - <a href="https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170565">https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170565</a> (trabalho em colaboração).....</b>	204
<b>APÊNDICE C – Artigo publicado no <i>Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis</i> - <a href="https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113403">https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113403</a> (trabalho em colaboração).....</b>	205
<b>APÊNDICE D – Artigo publicado no <i>Current Pharmaceutical Analysis</i> - DOI: 10.2174/1573412914666180730123426 (trabalho em colaboração).....</b>	206
<b>ANEXO A – Certificados de apresentação e de Relevância Acadêmica na XXVII Semana de Iniciação Científica / PRPQ (Semana do Conhecimento UFMG 2018).....</b>	207
<b>ANEXO B – Certificado 1 de apresentação na sessão de pôsteres do III Simpósio Nacional em Ciências Farmacêuticas (SINCIFAR – 2018).....</b>	208
<b>ANEXO C – Certificado 2 de apresentação na sessão de pôsteres do III Simpósio Nacional em Ciências Farmacêuticas (SINCIFAR – 2018).....</b>	208
<b>ANEXO D – Certificado de apresentação na sessão de pôsteres do IV <i>Congresso of the Brazilian Association of Pharmaceutical Sciences (ABCF Congress - 2018)</i>.....</b>	209
<b>ANEXO E – Certificado de apresentação na XXIX Semana de Iniciação Científica / PRPQ (Semana do Conhecimento UFMG 2020).....</b>	209

## CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Sildenafil (SLD) e tadalafila (TAD) são fármacos inibidores da fosfodiesterase-5 (PDE-5), largamente empregados na farmacoterapia da disfunção erétil e também fazem parte do protocolo de tratamento da hipertensão arterial pulmonar (HAP).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) e levantamentos realizados por autoridades sanitárias e policiais brasileiras, medicamentos contendo SLD e TAD encontram-se entre os mais falsificados e contrabandeados. Tendo em vista as graves consequências e perigos relacionados com a falsificação de medicamentos, além do crescimento constante das solicitações de análises forenses, é relevante o desenvolvimento de métodos analíticos atuais, com utilização de tecnologias modernas, as quais visam reduzir o tempo, consumo de solventes e melhorar a eficiência de análise. Nesse contexto, a cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC, em inglês *Ultra high performance liquid chromatography*) mostra-se vantajosa, uma vez que proporciona análises rápidas, elevada eficiência cromatográfica, além da possibilidade de minimizar o impacto ambiental e ocupacional decorrente do gasto de menores volumes de reagentes.

No desenvolvimento de métodos bioanalíticos, esses parâmetros também estão sendo cada vez mais valorizados. Técnicas de preparo de amostra baseadas em microextração, com a utilização de pequenos volumes de amostra e solventes, vêm sendo desenvolvidas como alternativas aos métodos clássicos de extração. Como técnica de separação e detecção, a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (HPLC-MS/MS, em inglês *High performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry*) é a técnica de escolha para a determinação de fármacos e metabólitos em matrizes biológicas, uma vez que garante detectabilidade e seletividade adequadas.

Portanto, o presente estudo tem como objetivo principal desenvolver e validar métodos analíticos modernos, simples, rápidos, ambientalmente corretos, com elevada eficiência e aplicabilidade na determinação de SLD e TAD em medicamentos e em plasma humano.

O trabalho foi dividido em dois capítulos. O Capítulo I trata da avaliação da qualidade de medicamentos autênticos e apreendidos pelas autoridades policiais brasileiras, contendo SLD e TAD, empregando a técnica UHPLC-UV e coluna com partículas superficialmente porosas. Os resultados deste capítulo foram publicados em artigo científico no *Journal of Chromatographic Science* (**APÊNDICE A**). No Capítulo II é abordada a quantificação simultânea de SLD, N-desmetil sildenafil (N-DMS), TAD e outros seis fármacos utilizados no tratamento da hipertensão arterial pulmonar (HAP) em plasma humano por meio da microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME, em inglês *Dispersive liquid-liquid microextraction*) e HPLC-MS/MS.

# CAPÍTULO I: AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE MEDICAMENTOS AUTÊNTICOS E APREENDIDOS CONTENDO CITRATO DE SILDENAFILA E TADALAFILA POR UHPLC-UV

## 1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), medicamentos de estilo de vida, incluindo aqueles para disfunção erétil, constituem a quarta maior classe de produtos de baixa qualidade ou falsificados no mundo. Levantamentos realizados por autoridades sanitárias e policiais brasileiras revelam que medicamentos contendo os inibidores da PDE-5, incluindo SLD e TAD, são os mais falsificados no país, seguidos por esteroides anabolizantes (AMES; SOUZA, 2012; HURTADO; LASMAR, 2014; WHO, 2017).

Estudos têm sido realizados para a determinação de compostos orgânicos e inorgânicos em medicamentos ilegais contendo SLD e TAD. Esses estudos indicaram que alguns desses produtos não têm a substância ativa, possuem quantidade incorreta do fármaco, alegam conter SLD, mas, em vez disso, eles têm TAD ou uma mistura desses insumos farmacêuticos ativos (IFA) na sua composição e/ou apresentaram grandes quantidades de contaminantes (COELHO; LISBOA, 2017; ORTIZ *et al.*, 2011; ORTIZ *et al.*, 2012a; ORTIZ *et al.*, 2012b; ORTIZ *et al.*, 2013; VEJI *et al.*, 2008).

Nesse contexto, um aspecto importante que deve ser considerado durante o desenvolvimento de um método analítico, principalmente aqueles que serão utilizados na análise de medicamentos falsificados/contrabandeados, é a sua seletividade em relação aos analitos e aos seus produtos de degradação, uma vez que, como não são conhecidos os procedimentos de fabricação, embalagem e armazenamento desses produtos, os mesmos podem conter impurezas desconhecidas.

Uma das técnicas mais utilizadas para a identificação e a quantificação de analitos em formulações farmacêuticas é a cromatografia líquida com detecção na região do ultravioleta, sendo que, a cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC)



apresenta-se como uma vantajosa alternativa, uma vez que permite análises mais rápidas, mais eficientes e com menor consumo de solventes (NOGUEIRA *et al.*, 2011; WREN; TCHELITCHEFF, 2006).

Os medicamentos falsificados e/ou contrabandeados representam alto risco sanitário, uma vez que os mesmos são produzidos sem seguir os rigorosos padrões de qualidade e segurança necessários. Além disso, não são submetidos aos testes de qualidade e eficácia exigidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), não havendo certeza sobre a dose ou o princípio ativo administrado (DÉGARDIN; ROGGO; MARGOT, 2014).

Alguns estudos disponíveis na literatura investigaram, individualmente, a estabilidade do SLD (ABD-ELBARY *et al.*, 2004; DARAGHMEH *et al.*, 2001; LIEW; PEH, 2018; SEGALL *et al.*, 2000; TAMBE; DEODHAR; PRAKYA, 2016) e da TAD (PATEL; PATEL, 2014; RAO *et al.*, 2008; SATHEESH *et al.*, 2013, SEN; PANTEL, 2015). Existem também alguns métodos por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção na região do ultravioleta (HPLC-UV) (FIDAN, BAKIRDERE, 2016; ORSI *et al.*, 2009; YANG *et al.* 2010) e cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC-UV) (ORTIZ; ANTUNES; LINDEN, 2010) que permitem a quantificação simultânea de SLD e TAD em preparações farmacêuticas, mas que não contemplam seus produtos de degradação.

Entretanto, um método rápido e efetivo para a quantificação simultânea de SLD e TAD na presença de seus prováveis produtos de degradação usando UHPLC-UV ainda não foi descrito. Também não foi encontrado um estudo no qual foi realizada uma verificação detalhada das características farmacêuticas de medicamentos ilegais contendo SLD e TAD.

Diante disso, neste Capítulo será contemplado o desenvolvimento e validação de um método para a quantificação simultânea de SLD e TAD por UHPLC-UV, que também é seletivo aos potenciais produtos de degradação desses fármacos. A aplicação do método será apresentada na avaliação completa e detalhada da qualidade de comprimidos originais e apreendidos pelas autoridades policiais brasileiras.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar método analítico seletivo para SLD, TAD e seus produtos de degradação por UHPLC-UV, a ser utilizado com o propósito de identificar, caracterizar e verificar a qualidade de medicamentos originais, falsificados e/ou contrabandeados.

### 2.2 Objetivos específicos

- Submeter os IFA SLD e TAD a estudo de degradação forçada.
- Desenvolver e validar método para quantificação simultânea de SLD e TAD que seja também seletivo aos potenciais produtos de degradação desses fármacos utilizando UHPLC-UV.
- Propor estruturas químicas e mecanismos de formação para os principais produtos de degradação empregando cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial, com analisador do tipo quadrupolo-tempo-de-voo (UHPLC-Q-TOF-MS, em inglês *Ultra high performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry*).
- Aplicar o método UHPLC-UV no controle de qualidade de medicamentos, submetendo amostras de comprimidos originais e apreendidas aos testes de identificação, doseamento, uniformidade de doses unitárias, dissolução e perfil de dissolução.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Sildenafil e tadalafila: inibidores da fosfodiesterase-5

Os inibidores da fosfodiesterase são amplamente utilizados para o tratamento da disfunção erétil, a qual é definida como a incapacidade persistente de obter e/ou manter uma ereção suficiente para uma função sexual satisfatória. Por serem inibidores seletivos da PDE-5, exercem seu efeito farmacológico por meio de um aumento na concentração intracelular de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), um potente vasodilatador e inibidor de proliferação celular. O óxido nítrico produzido pelas células endoteliais ativa a enzima guanilato ciclase, aumentando a produção de GMPc. Entretanto, sua ação é breve, pois é rapidamente degradado pela enzima PDE-5. Os inibidores da fosfodiesterase prolongam o efeito vasodilatador do óxido nítrico por inibir a ação desta enzima (GRESSER; GLEITER, 2002).

Com comercialização liberada em 1998 para o tratamento da disfunção erétil, o citrato de sildenafil (citrato de SLD) foi o primeiro fármaco da classe dos inibidores da PDE-5. Além de ser utilizado para o tratamento da disfunção erétil, o SLD foi aprovado em 2005 pela agência regulatória americana, *Food and Drug Administration* (FDA), para utilização no tratamento da hipertensão arterial pulmonar (HAP) (GALIE *et al.*, 2005; SIMIELE *et al.*, 2015), uma vez que a PDE-5 é também abundantemente expressa no tecido pulmonar (AHN *et al.*, 1991). O medicamento referência contendo SLD aprovado para tratamento da HAP no Brasil é o Revatio<sup>®</sup>, o qual consiste em comprimidos revestidos contendo 20 mg de SLD (ANVISA, 2020a).

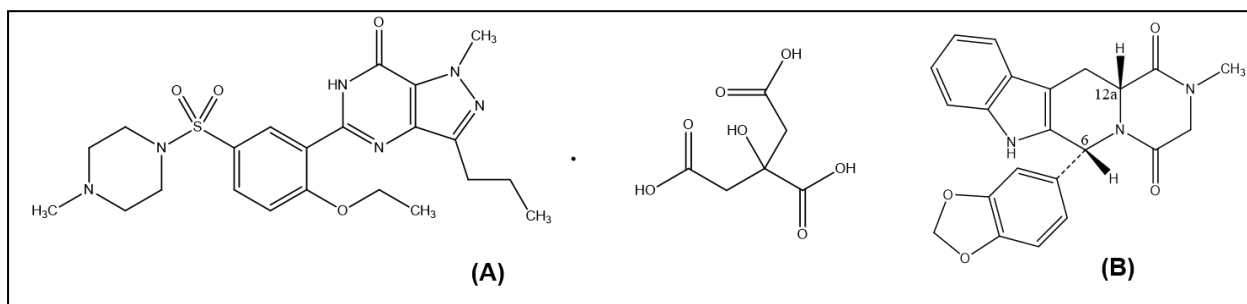
Desde a introdução do SLD, foram desenvolvidos outros inibidores da PDE-5 para uso no tratamento da disfunção erétil e da HAP, como a tadalafila (TAD) e a vardenafila (MICHEL; HOFFMAN, 2012).

Os medicamentos referência utilizados no tratamento da disfunção erétil Viagra<sup>®</sup> (contendo SLD, na forma de citrato) e Cialis<sup>®</sup> (contendo TAD, na forma de base), além dos medicamentos genéricos e similares contendo também estes IFA são comercializados na forma de comprimidos revestidos para administração oral. Tais medicamentos apresentam mecanismos de ação semelhantes, diferindo-se

principalmente quanto à potência de inibição da enzima e às propriedades farmacocinéticas, como velocidade de absorção, meia-vida plasmática e duração do efeito (CARSON; NOH, 2002).

O citrato de SLD (**Figura 1A**) possui fórmula molecular  $C_{22}H_{30}N_6O_4S \cdot C_6H_8O_7$  e massa molar igual a 666,70 g/mol. A base livre ( $C_{22}H_{30}N_6O_4S$ ) apresenta massa molar de 474,58 g/mol. É pouco solúvel em água e em metanol e praticamente insolúvel em hexano (THE UNITED, 2019). Apresenta pKa igual a 5,99 (PUBCHEM, 2020) e coeficiente de partição octanol-água (log P) fortemente influenciado pelo pH do meio, de modo que o log P pode apresentar valores diferentes como 1,59, -0,52 e 1,13 para as espécies neutra, catiônica e aniônica, respectivamente. Estes valores foram obtidos experimentalmente, por Wang, Chow e Zuo (2008).

**Figura 1 – Estruturas químicas do citrato de sildenafil (A) e da tadalafila (B).**



Fonte: adaptado de THE UNITED, 2019.

A TAD (**Figura 1B**), por sua vez, possui fórmula molecular  $C_{22}H_{19}N_3O_4$  e massa molar 389,40 g/mol. É praticamente insolúvel em água, facilmente solúvel em dimetilsulfóxido e pouco solúvel em cloreto de metileno (THE UNITED, 2019). Trata-se de uma molécula neutra na faixa de pH entre 0 e 14 e possui log P de 1,64 (CHEMAXON, 2018; PUBCHEM, 2020).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) e as autoridades sanitárias e policiais do Brasil, um dos principais alvos de contrafação são os medicamentos que contêm inibidores da PDE-5, dentre eles, aqueles contendo SLD e TAD. Os medicamentos ilegais são agrupados em duas categorias, sendo elas: falsificados e contrabandeados (origem estrangeira, internalizados de modo irregular no Brasil) (AMES; SOUZA, 2012; HURTADO; LASMAR, 2014; WHO, 2017).

### **3.2 Fabricação e comercialização ilegal de medicamentos**

Um medicamento falsificado é um produto embalado e etiquetado indevidamente, de maneira deliberada e fraudulenta, no que diz respeito à identidade e/ou à origem. A falsificação aplica-se tanto a medicamentos referência quanto a genéricos e similares, e pode incluir medicamentos sem IFA, com uma quantidade insuficiente ou excessiva do IFA, com o IFA inadequado ou com embalagem falsa (WHO, 1999).

Já os medicamentos não registrados/não licenciados são definidos como aqueles que não foram submetidos a avaliação e/ou aprovação das autoridades nacionais ou regionais reguladoras dos medicamentos para o mercado em que são vendidos/distribuídos ou utilizados (WHO, 2017). De acordo com a lei nº 6360/1976, apenas é permitida a venda de medicamentos em território nacional, inclusive importado, após registro em órgão público competente (BRASIL, 1976). Dessa forma, ao adentrar ilegalmente no país, os medicamentos sejam eles falsificados ou não registrados, assumem a natureza de contrabando (ANVISA, 2006).

A falsificação de medicamentos e sua comercialização é uma atividade ilegal altamente lucrativa, considerando o baixo custo de produção destes produtos, uma vez que não seguem os padrões de qualidade e segurança necessários. Além disso, apresenta risco menor de repressão pelas autoridades policiais em comparação ao tráfico de drogas, estando ligadas diretamente a organizações criminosas internacionais (DUBOSE, 2006; HURTADO; LASMAR; 2014).

Conforme descrito na Lei nº 9677/1998, falsificar, corromper, adulterar, alterar, distribuir ou vender produtos destinados a fins terapêuticos ou medicinais é considerado crime hediondo contra a saúde pública, inafiançável, com pena de reclusão de 10 a 15 anos e multa (BRASIL, 1998). Além de ser uma questão criminal, a produção e comercialização de medicamentos falsificados e/ou contrabandeados representa uma séria ameaça para a saúde pública (DÉGARDIN; ROGGO; MARGOT, 2014), uma vez que o uso de um medicamento falsificado pode simplesmente não causar nenhuma reação no paciente, pode provocar um agravamento do estado de saúde pela ausência do IFA ou pelo seu teor inadequado e/ou pode causar problemas pela presença de impurezas (provenientes da

degradação do IFA e excipientes) e substâncias desconhecidas adicionadas pelo fabricante clandestino.

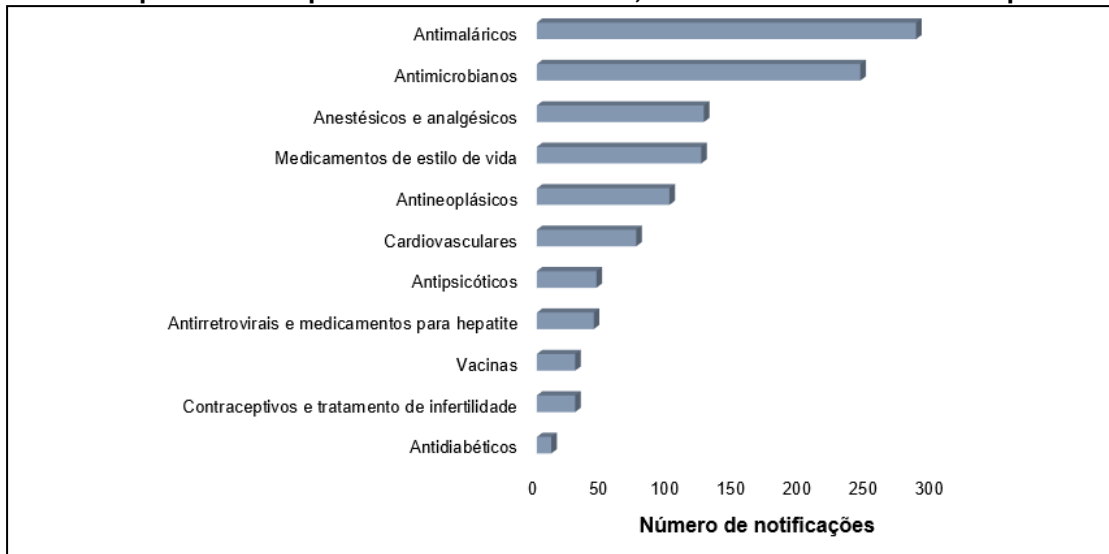
Como o comércio de medicamentos falsificados é ilegal, não é possível saber ao certo a proporção da sua ocorrência. Entretanto, o número de relatos de apreensão de medicamentos falsificados está aumentando e as estimativas da sua dimensão são alarmantes, tratando-se de um problema mundial (DÉGARDIN; ROGGO; MARGOT, 2014). A OMS estima que cerca de 10% dos medicamentos no mundo são falsificados e que esse mercado de vendas pode ter faturado cerca de 75 bilhões de dólares em 2010 (WHO, 2016).

O aumento significativo da falsificação e comercialização de medicamentos ilegais pode ser associado a um acesso mais fácil pelos falsificadores às tecnologias necessárias para replicar produtos farmacêuticos originais e pela falta de controle efetivo sobre os medicamentos que são vendidos por fornecedores ilícitos nas plataformas virtuais (KRAKOWSKA *et al.*, 2016). Têm sido descobertos, em todos os continentes, locais de fabricação ligados à produção clandestina de medicamentos, havendo centros que realizam produção em escala industrial e outros que fabricam em uma escala menor e menos sofisticada (WHO, 2017).

A falsificação de medicamentos não se resume a uma classe terapêutica específica (HURTADO; LASMAR, 2014). Dentre os produtos de baixa qualidade ou falsificados (**Figura 2**), os medicamentos conhecidos como “medicamentos de estilo de vida”, (medicamentos para tratamento da disfunção erétil, anabolizantes e anorexígenos), constituem a quarta maior classe de medicamentos reportados à OMS no período de 2013 a 2017 e foram identificados em 37 países diferentes (WHO, 2017).

No Brasil, os medicamentos mais falsificados coincidem com aqueles mais procurados pela população e de maior preço no mercado oficial. De acordo com dados da perícia brasileira, os medicamentos que contêm inibidores da PDE-5, utilizados para tratar a disfunção erétil, dentre eles, Viagra® (SLD, Pfizer) e Cialis® (TAD, Eli Lilly) são os mais comumente falsificados no país, seguidos por esteroides anabolizantes (AMES; SOUZA, 2012).

**Figura 2 – Número de notificações de medicamentos de qualidade inferior e falsificados recebidos pela OMS no período entre 2013 e 2017, de acordo com a classe terapêutica.**



Fonte: adaptado de WHO, 2017.

No estudo realizado por Hurtado e Lasmar (2014), foi determinado o panorama de comercialização de medicamentos ilegais no Brasil por meio de um levantamento de apreensões realizadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), no período de 2007 a 2011. Dentre os medicamentos falsificados, destacou-se a apreensão de medicamentos para o tratamento da disfunção erétil, responsáveis por 78% das apreensões. Outro fato importante é a apreensão conjunta de medicamentos contrabandeados e falsificados, de modo que, em 49% das apreensões, esses produtos foram fabricados pela indústria paraguaia, levando a concluir que os produtos falsos muitas vezes são produzidos no exterior e adentram no país por meio da fronteira (HURTADO; LASMAR, 2014).

Ames e Souza (2012) realizaram estudo retrospectivo a partir de informações de laudos de medicamentos inautênticos do Sistema de Criminalística da Polícia Federal (PF), datados de janeiro de 2007 a setembro de 2010, produzidos pelas unidades periciais das Unidades Federativas brasileiras. Dentre os medicamentos falsificados, 69% pertenciam à categoria dos inibidores da PDE-5, seguidos pelos esteroides anabolizantes, inibidores de prostaglandinas e por outros medicamentos. Além disso, 67% das apreensões incluíram medicamentos contrabandeados e, cerca de 49% dos medicamentos contrabandeados eram de indústria paraguaia.

### 3.3 Aplicação de técnicas analíticas em atividades forenses

A identificação de um medicamento falsificado ou contrabandeado é realizada por meio de uma comparação entre o produto autêntico ou dados da literatura e o produto questionado. A constatação da falsificação envolve uma sequência de análises que iniciam com a avaliação detalhada de diferentes elementos existentes nas embalagens e na forma farmacêutica, dentre as quais se destacam a avaliação macroscópica das embalagens e bulas e dos padrões de impressão (fontes, figuras, hologramas). Em seguida deve ser realizada a avaliação das características físicas da forma farmacêutica (cor, marcações, medidas de dimensões e massa). Faz-se necessário também, a utilização de técnicas analíticas que possibilitem a caracterização da formulação, objetivando-se identificar e/ou quantificar o(s) IFA e excipientes (ORTIZ, 2013).

Na avaliação química das amostras, é fundamental a identificação e a quantificação do princípio ativo mencionado no rótulo do produto. Para isso, deve-se escolher técnica(s) analítica(s) adequada(s) considerando-se as propriedades e estabilidades física, química e físico-química das substâncias envolvidas (ORTIZ; ANTUNES; LINDEN, 2010).

Existem diversas técnicas de análise utilizadas para caracterizar medicamentos e verificar sua autenticidade, desde técnicas mais simples, como as colorimétricas e análise termodinâmica, até técnicas mais avançadas, como cromatografia líquida de alta/ultra eficiência, cromatografia a gás (CG), eletroforese capilar, espectrofotometria no infravermelho, espectroscopia Raman, espectrometria de massas, espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e técnicas combinadas (KRAKOWSKA *et al.*, 2016).

Encontram-se descritos na literatura estudos que contemplam a análise de compostos orgânicos e inorgânicos em medicamentos ilegais contendo SLD e TAD, utilizando diferentes técnicas de análise. Esses estudos indicam que alguns dos medicamentos avaliados não apresentam o IFA, possuem quantidade inadequada da substância ativa, alegam conter SLD, mas, na verdade, têm TAD ou uma mistura desses IFA e/ou apresentam grandes quantidades de contaminantes (COELHO;



LISBOA, 2017; ORTIZ *et al.*, 2011; ORTIZ *et al.*, 2012a; ORTIZ *et al.*, 2012b; ORTIZ *et al.*, 2013; VEJI *et al.*, 2008).

Dentre as técnicas mais utilizadas em análises farmacêuticas e forenses, encontra-se a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, em inglês *High performance liquid chromatography* (HPLC)), uma vez que é considerada uma técnica de referência para análises qualitativas e quantitativas. Sistemas de HPLC podem estar equipados com diferentes tipos de detectores que oferecem variáveis tipos de respostas, tais como detector ultravioleta (UV) e espectrômetro de massas (MS) (KRAKOWSKA *et al.*, 2016).

### **3.3.1 Métodos cromatográficos com detecção no ultravioleta para determinação de SLD e TAD**

Nas Farmacopeias Americana (THE UNITED, 2019), Europeia (THE EUROPEAN, 2017) e Britânica (BRITISH, 2014) encontram-se descritas monografias para os IFA citrato de SLD e TAD. Entretanto, apenas na Farmacopeia Americana há monografias para a forma farmacêutica comprimidos. Na **Tabela 1**, encontra-se um resumo dos parâmetros e métodos de análise farmacopeicos existentes para a determinação do teor do SLD e da TAD.

O método para quantificação da cedência (teste de dissolução) de comprimidos contendo SLD utiliza espectrofotometria na região ultravioleta, com detecção em 290 nm. O método de uniformidade de conteúdo para comprimidos contendo TAD também emprega a quantificação por espectrofotometria na região ultravioleta, mas com detecção em 285 nm (THE UNITED, 2019).

Ao analisar a **Tabela 1** é possível perceber que, em todos os métodos analíticos compendiais para determinação de SLD, utiliza-se coluna com sílica ligada a grupos octadecilsilano e fase aquosa constituída por solução de trietilamina (TEA) com pH ajustado para 3,0, enquanto que para a TAD, utilizam-se colunas com sílica ligada a grupos octilsilano e fase aquosa acidificada com ácido trifluoroacético. Em relação à detecção, opera-se em 290 nm para quantificação do SLD e em 285 nm para a TAD.

Tabela 1 – Métodos farmacopeicos, por HPLC-UV, para determinação do teor de SLD e TAD em IFA e comprimidos.

Farmacopeia	Teste / Matriz	Fase móvel	Fase estacionária	Vazão (mL/min)	Volume de injeção (µL)	Temperatura do forno (°C)	Deteccão (nm)
Americana 42ª edição (THE UNITED, 2019)	Doseamento / SLD IFA	Solução aquosa de TEA 0,7% (v/v) pH 3,0, metanol e acetonitrila 58:25:17 (v/v)	C <sub>18</sub> , 150 x 3,9 mm, 5 µm	1,0	20	30	290
		Solução aquosa de TFA 0,1% (v/v) e acetonitrila 55:45 (v/v)	C <sub>8</sub> , 250 x 4,6 mm, 3,5 µm	1,5	20	40	285
Europeia 9 ed. (THE EUROPEAN, 2017)							
Britânica 2014 (BRITISH, 2014)	Doseamento / TAD IFA	Solução aquosa de TEA 0,7% (v/v) pH 3,0, metanol e acetonitrila 58:25:17 (v/v)	C <sub>18</sub> , 150 x 3,9 mm, 5 µm	1,0	20	30	290
Americana 42ª edição (THE UNITED, 2019)	Doseamento / SLD comprimidos	Água, acetonitrila, e TFA 65:35::0,1 (v/v)	C <sub>8</sub> , 150 x 4,6 mm, 3,5 µm	1,0	10	35	285
	Dissolução / TAD comprimidos	Água e metanol e 50:50 (v/v)	C <sub>8</sub> , 50 x 4,6 mm, 3,5 µm	2,0	50	40	225

**Legenda:** TEA = trietilamina; TFA = ácido trifluoroacético.

Além dos compêndios oficiais, há na literatura métodos cromatográficos para determinação simultânea de SLD e TAD em medicamentos, com a utilização de HPLC-UV (FIDAN, BAKIRDERE, 2016; ORSI *et al.*, 2009; YANG *et al.* 2010).

Devido à possibilidade de separar vários componentes durante a análise de amostras, métodos cromatográficos têm precedência sobre os métodos convencionais de análise. A HPLC é considerada a técnica mais desenvolvida, difundida e empregada em laboratórios analíticos de indústrias farmacêuticas e químicas (AL-SAYAH *et al.*, 2008). Porém, a demanda por métodos de análise mais rápidos e com elevada eficiência vem crescendo significativamente.

Diante dessas necessidades, alternativas estão sendo desenvolvidas e aplicadas em busca da redução do tempo e melhoria da eficiência de análises realizadas por HPLC. Uma delas é a UHPLC, na qual as partículas porosas constituintes da fase estacionária possuem diâmetro médio inferior a 2  $\mu\text{m}$ , proporcionando assim, elevada eficiência cromatográfica e consequente ganho em resolução, detectabilidade e rapidez (GUILLARME *et al.*, 2010; PRADO, 2013).

O sistema cromatográfico utilizado na UHPLC é mais sofisticado, sendo capaz de suportar pressões de até 15000 psi (cerca de 1000 bar). É equipado com detectores com menor tempo de resposta, maior taxa de aquisição de dados e menor volume interno da célula de detecção. Ademais, possui tubulações de menor comprimento e diâmetro interno (MARTINS, 2012; AMPARO, 2011; NGUYEN *et al.*, 2006). A UHPLC pode apresentar melhor relação custo-benefício a médio ou longo prazos, além da possibilidade de minimizar o impacto ambiental e ocupacional decorrente do uso de menores volumes de reagentes e amostra (NOGUEIRA *et al.*, 2011; WREN; TCHELITCHEFF, 2006).

Uma outra possibilidade que traz como benefício a redução do tempo de análise e melhora na eficiência cromatográfica, é a utilização de colunas com partículas superficialmente porosas, também conhecidas como núcleo fundido. Essas são constituídas por um núcleo sólido não poroso e impermeável, normalmente de 1,7  $\mu\text{m}$  de diâmetro, revestido por uma parte externa porosa com espessura geralmente de 0,5  $\mu\text{m}$  (DESTEFANO; LANGLOIS; KIRKLAND, 2008).

Em comparação com partículas porosas de diâmetros totalmente semelhantes, o caminho de difusão é muito mais curto, uma vez que o interior do núcleo é sólido, ou seja, é impenetrável pelos analitos. O menor caminho de difusão facilita a transferência de massa e reduz o caminho intra-partículas, o que contribui para que o efeito de alargamento de bandas seja minimizado. Outra característica a ser destacada é a distribuição homogênea de partículas de mesmo tamanho no leito cromatográfico, reduzindo o efeito de caminhos múltiplos (ALI *et al.*, 2012; GUILLARME *et al.*, 2010).

São encontrados alguns métodos para quantificação de SLD e/ou TAD em medicamentos ilegais utilizando UHPLC-UV. Dentre eles, pode-se citar o estudo realizado por Sacré e colaboradores (2011), que desenvolveram um método rápido para identificar e quantificar três inibidores da PDE-5 (SLD, TAD e vardenafila) e cinco análogos (acetildenafil, hidroxiacetilsildenafil, dimetilsildenafil, pseudovardenafila, aminotadalafila e trans-tadalafila), que podem ser encontrados em medicamentos falsificados. Para isso, foi utilizada coluna C<sub>18</sub> (100 x 2,1 mm, 1,7 µm), fase móvel constituída por acetonitrila e tampão formiato de amônio 10 mM pH 3,5 em modo de eluição gradiente, com tempo de corrida de 4,5 minutos. Ortiz, Antunes e Linden (2010) desenvolveram e validaram um método para determinação simultânea de SLD e TAD e o aplicaram em comprimidos originais e encaminhados para exame pericial pela PF. Neste método foi utilizada coluna C<sub>18</sub> (50 x 2,1 mm, 1,7 µm), mantida a 60 °C, fase móvel constituída por tampão fosfato 10 mM (pH 2,3) e acetonitrila em eluição isocrática e vazão da fase móvel de 0,7 mL/min. Os analitos foram detectados em 290 nm e a corrida cromatográfica teve duração de 1,5 minutos.

Esses métodos trazem a vantagem de serem muito rápidos e eficientes na separação de SLD e TAD. Entretanto, nenhum deles caracteriza-se por ser indicativo de estabilidade, o qual é definido como sendo capaz de mensurar com precisão e exatidão o(s) princípio(s) ativo(s), sem a interferência dos produtos de degradação, impurezas de processo, excipientes ou outras potenciais impurezas (FDA, 2000). Os métodos indicativos de estabilidade são desenvolvidos a partir de estudos de degradação forçada, que permitem a geração de produtos de degradação por meio da exposição do IFA e produto acabado a condições de

estresse, como por exemplo, luz, temperatura, calor, umidade, hidrólise ácida/básica e oxidação, entre outras (BRASIL, 2015).

Na literatura foram encontrados alguns métodos que investigam a estabilidade individualmente do SLD (ABD-ELBARY *et al.*, 2004; DARAGHMEH *et al.*, 2001; LIEW; PEH, 2018; SEGALL *et al.*, 2000; TAMBE; DEODHAR; PRAKYA, 2016) e da TAD (PATEL; PATEL, 2014; RAO *et al.*, 2008; SATHEESH *et al.*, 2013, SEN; PANTEL, 2015), os quais são apresentados na **Tabela 2**.

Em todos esses métodos foi empregada a HPLC-UV como técnica de análise, com exceção dos métodos descritos por Tambe, Deodhar e Prakya (2016) e Satheesh *et al.* (2013), nos quais foi utilizada UHPLC-UV.

Ao avaliar a **Tabela 2**, verifica-se que os resultados referentes à formação de produtos de degradação nas condições de estresse são divergentes nos artigos encontrados. Isto pode ser justificado, pelo fato de os IFA serem provenientes de diferentes fornecedores e rotas de síntese e/ou as formulações serem constituídas por variados excipientes. Além disso, não há uma padronização das condições (como, por exemplo, concentração, temperatura e tempo) de exposição aos agentes degradantes.

Apesar de existirem métodos indicativos de estabilidade individuais para SLD e TAD utilizando-se HPLC e UHPLC, não foi encontrado na literatura um estudo completo de estabilidade, incluindo degradação forçada, identificação de produtos de degradação e desenvolvimento de método indicativo de estabilidade rápido e eficaz para quantificação simultânea desses fármacos na presença de seus produtos de degradação por UHPLC-UV, que possa também ser aplicado nos testes de qualidade de medicamentos originais e ilegais.

Tabela 2 – Métodos indicativos de estabilidade para SLD e TAD encontrados na literatura.

Referência	Analito(s) e matriz	Técnica analítica	Agentes degradantes	Condições com formação de PD	Identificação dos PD
LIEW; PEH, 2018	SLD e hidróxido de dapoxetina IFA e comprimidos	HPLC-UV	Meios ácido (HCl 3 M TA 3 h), alcalino (NaOH 3 M TA 3 h), oxidativo (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 35% v/v 3 h), luz (cabine de luz UV 24 h) e temperatura (80 °C 2 h)	Ambos os fármacos foram suscetíveis à oxidação e o conteúdo dos IFA reduziu ligeiramente nas condições ácida e alcalina, mas manteve-se estável sob luz UV e calor	NA
TAMBE; DEODHAR; PRAKYA, 2016	SLD e hidróxido de dapoxetina IFA e comprimidos	UHPLC-UV-MS	Meios ácido (HCl 1 M 90 °C 6 h), alcalino (NaOH 1 M 90 °C 6 h) e neutro (H <sub>2</sub> O TA 24 h), estresse fotolítico (UV 1,2 milhões lux.h) e térmico (calor seco 90 °C 6 h)	Formaram-se PD provenientes do SLD em meios ácido, alcalino, oxidativo e sob aquecimento	Foram apresentadas algumas possíveis estruturas dos PD
ABD-ELBARY <i>et al.</i> , 2004	SLD IFA e comprimidos	HPLC-UV	pH (2,5; 4 e 8) e temperatura (60 °C e 80 °C) durante 3 dias	SLD degradou em todas as condições e houve a formação de um PD	NA
DARAGHMEH <i>et al.</i> , 2001	SLD e substâncias relacionadas em IFA e comprimidos	HPLC-UV	Fotodegradação (luz direta por 6 dias)	Pequena fotodegradação (formação de dois PD)	NA
SEGALL <i>et al.</i> , 2000	SLD comprimidos	HPLC-UV	Meios ácido (HCl 1 M sob refluxo por 15 min), alcalino (NaOH 1 M sob refluxo 15 min), neutro (H <sub>2</sub> O sob refluxo 15 min), oxidativo (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% v/v sob refluxo por 15 min), estresse fotolítico (luz do dia 24 h) e térmico (calor seco 110 °C 24 h)	Formaram-se dois PD em meio ácido, um PD em meio alcalino, três PD em meio oxidativo, sendo um majoritário, um PD em meio neutro e a partir do estresse fotolítico com o mesmo t <sub>R</sub>	NA
SEN; PATEL, 2015	TAD IFA	HPLC-UV	Meios ácido (HCl 1 M HCl a 40 °C, 60 °C e 80 °C), alcalino (NaOH 1 M a 40 °C, 60 °C e 80 °C) e oxidativo (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% v/v)	Degradação nos meios ácido, alcalino e oxidativo	NA
PATEL; PATEL, 2014	TAD e ambrisentana em comprimidos	HPLC-UV	Luz solar, calor (refluxo), ácido (HCl 1 M), base (NaOH 1 M) e oxidação (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% v/v)	A TAD apresentou degradação extensa sob condições alcalinas e degradou em meio ácido	NA
SATHEESH <i>et al.</i> , 2013	TAD em comprimidos	UHPLC-UV	Meios ácido (HCl 1 M HCl a 80 °C por 12 h), alcalino NaOH 1 M a 80 °C por 12 h), neutro (solução aquosa aquecida a 80 °C por 12 h), oxidativo (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3% v/v a 35 °C, por 12 h), estudo de fotodegradação (UV a 254 nm por 2 dias), aquecimento a 105 °C por 2 dias	Degradação nos meios ácido e oxidativo	NA
RAO <i>et al.</i> , 2008	TAD IFA e comprimidos	HPLC-UV	Meios ácido (HCl 0,1 M HCl a 27 °C por 48 h e HCl 1 M a 70 °C por 3 h), alcalino NaOH 0,1 M a 27 °C por 48 h), neutro (solução aquosa aquecida a 70 °C por 3 h), oxidativo (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 6% e 20% v/v por 48 h à TA). Estudo de fotodegradação (1,2 milhões lux.h e energia UV de 200 watt hm <sup>2</sup> ). O IFA foi exposto ao aquecimento a 40 °C durante 10 dias e a 60 °C durante 7 dias	Apresentou PD em meio ácido, alcalino e oxidativo	Identificação do PD proveniente da hidrólise em meios ácido e alcalino utilizando tempo de retenção (isômero TAD)

**Legenda:** NA = não avaliado; PD = produto de degradação; TA = temperatura ambiente.

### 3.4 Controle de qualidade dos medicamentos

A qualidade, segurança e efetividade dos medicamentos são os pilares para o sucesso de um tratamento. Para garantir a qualidade dos medicamentos, devem ser seguidos procedimentos padrão e requisitos mínimos durante a sua fabricação, visando sempre o cumprimento das Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos (BPF). As BPF, por sua vez, podem ser definidas como um conjunto de ações que determinam que os produtos são consistentemente produzidos e controlados, com padrões de qualidade apropriados para o uso pretendido e requerido pelo registro sanitário (BRASIL, 2019).

A falsificação e contrabando de medicamentos representam alto risco sanitário, uma vez que os mesmos são produzidos sem seguir os padrões de qualidade e segurança necessários. Além disso, não são submetidos aos testes de qualidade e efetividade exigidos pela autoridade regulatória, não havendo certeza sobre a dose, princípio ativo e impurezas. Tais produtos podem não produzir os efeitos terapêuticos desejados e/ou provocar o aparecimento de reações clínicas inesperadas (AMES; SOUZA, 2012).

Tendo em vista a necessidade de conhecer o grau de qualidade dos comprimidos falsificados, adulterados ou contrabandeados contendo SLD e TAD aos quais os pacientes estão tendo acesso, faz-se necessária uma avaliação completa e detalhada das características físico-químicas desses medicamentos. O controle de qualidade faz parte das BPF e, dentre os principais testes de qualidade físico-químico aos quais os comprimidos devem ser submetidos, citam-se os testes de identificação, doseamento, uniformidade de doses unitárias, dissolução e perfil de dissolução.

Os testes de identificação são ensaios que permitem a confirmação da presença do IFA na formulação. O doseamento é realizado para quantificar o IFA no medicamento. Já por meio do teste de uniformidade de doses unitárias é possível avaliar a quantidade de IFA em unidades individuais do lote e verificar se esta é uniforme entre as unidades testadas. O teste de dissolução possibilita determinar a quantidade de substância ativa dissolvida no meio de dissolução quando o produto é

exposto à ação de aparelhagem específica, sob condições experimentais descritas na monografia. E o perfil de dissolução, por sua vez, é definido como ensaio analítico (*in vitro*) com coletas em múltiplos pontos, que permite a construção da curva de porcentagem do IFA dissolvido em função do tempo (FARMACOPEIA, 2019; GIL, 2010).

Conforme descrito no item **3.3.1** (página 30), nas monografias farmacopeicas para SLD e TAD são utilizadas diferentes técnicas e métodos para as análises físico-químicas dos comprimidos. Dessa forma, considera-se relevante o desenvolvimento de um método analítico único, validado em uma faixa que permita sua utilização tanto no teste de doseamento e uniformidade de conteúdo, quanto no teste de dissolução e que ainda seja capaz de quantificar os analitos na presença de potenciais produtos de degradação/impurezas de maneira rápida, para agilizar e reduzir os custos envolvidos na realização dessas análises.



## 4 MATERIAIS

### 4.1 Substâncias químicas de referência (SQR), IFA e placebo

- As seguintes SQR foram utilizadas no presente estudo: citrato de sildenafil SQR (Farmacopeia Europeia, lote 1.1, pureza de 98,80%) e tadalafila SQR (Farmacopeia Europeia, lote 2.0, pureza de 99,90%).
- Os seguintes IFA também foram usados: citrato de sildenafil IFA (disponibilizado pela Farmácia Amphora, de origem indiana, comercializado pela Fagron, lote 15116589B e pureza de 98,83%) e tadalafila IFA (disponibilizado pela Farmácia Vivence, de origem indiana, lote 2982 e pureza de 99,02%).
- Mistura de excipientes (placebo) utilizada na validação do método analítico. Para o seu preparo, estimou-se a composição quantitativa dos excipientes a partir da constituição qualitativa descrita nas bulas dos medicamentos referência Viagra® e Cialis®, e de informações obtidas na literatura. Os componentes, respectivas funções farmacotécnicas e proporções estimadas de cada excipiente são apresentados na **Tabela 3**.

**Tabela 3 – Funções farmacotécnicas e proporções estimada dos excipientes utilizados na fabricação dos comprimidos Viagra® e Cialis®.**

Excipiente	Função farmacotécnica	Proporção estimada (%) <sup>1</sup>	
		Viagra®	Cialis®
Celulose microcristalina	Diluyente	50,0	40,0
Croscarmelose sódica	Desintegrante	2,0	2,0
Dióxido de titânio	Agente de revestimento, opacificador e pigmentador	-	2,0
Estearato de magnésio	Lubrificante	2,0	2,0
Fosfato de cálcio dibásico anidro	Diluyente	19,8	-
Opadry® azul <sup>2</sup>	Agente de revestimento e corante	3,0	-
Hidroxipropilcelulose	Agente de revestimento	-	2,0
Hipromelose	Agente de revestimento	-	0,5
Lactose monoidratada	Diluyente	-	44,0
Laurilsulfato de sódio	Lubrificante	-	1,0
Opadry® transparente	Agente de revestimento, umectante e plastificante	1,0	-
Óxido de ferro amarelo	Corante	-	0,5
Triacetina	Umectante e plastificante	-	0,5

<sup>1</sup>A proporção estimada de cada excipiente foi baseada no *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (ROWE *et al.*, 2009) e na proporção média de citrato de SLD e TAD nos comprimidos, sendo 22,2% e 5,5% respectivamente.

<sup>2</sup>Opadry® azul: hipromelose, lactose, triacetina, índigo carmin alumínio laca e dióxido de titânio.

<sup>3</sup>Opadry® transparente: hipromelose e triacetina.

## 4.2 Comprimidos originais e apreendidos

- Comprimidos originais, registrados na ANVISA, contendo 50 mg de sildenafil (equivalente a 70,24 mg de citrato de sildenafil). Foram utilizados dois lotes do medicamento referência (codificados como Viagra 1 e 2) e dois lotes de medicamentos genéricos fabricados por diferentes indústrias farmacêuticas (codificados como genérico SLD 1 e 2).
- Comprimidos originais, registrados na ANVISA, contendo 20 mg de tadalafila. Foram utilizados um lote do medicamento referência (Cialis) e três lotes de medicamentos genéricos fabricados por diferentes indústrias farmacêuticas (codificados como genérico TAD 1, 2 e 3).
- Dez diferentes lotes de comprimidos apreendidos e disponibilizados pela Polícia Federal (PF) e pela Polícia Civil de Minas Gerais (PCMG) suspeitos de conter SLD e/ou TAD com provável proveniência de falsificação ou contrabando.

## 4.3 Reagentes

- Água ultrapura.
- Reagentes grau analítico: ácido clorídrico, ácido fórmico, álcool etílico absoluto, dodecil sulfato de sódio/laurilsulfato de sódio, sulfato de cobre pentahidratado, trietilamina e uracila Sigma Aldrich (Saint Louis, EUA), ácido acético glacial Neon (Suzano, Brasil), ácido trifluoroacético Tedia Company (Fairfield, EUA), formiato de amônio Merck (Darmstadt, Alemanha), hidróxido de sódio Synth e peróxido de hidrogênio Synth (Diadema, Brasil).
- Solventes grau HPLC: acetonitrila J.T. Baker (Xalostoc, México), acetonitrila Merck (Darmstadt, Alemanha), acetonitrila Honeywell (Muskegon, EUA) e metanol Sigma Aldrich (Saint Louis, EUA).

## 4.4 Materiais, vidrarias e instrumentos

- Coluna cromatográfica Phenomenex, Kinetex C<sub>18</sub> (50 x 2,1 mm, 1,7 µm).
- Frasco tipo *vial* com tampa de rosca e septos de silicone.
- Filtros de seringa de PVDF com 0,45 µm e 0,22 µm de tamanho de poro.
- Kit para filtração a vácuo.

- Membrana de celulose regenerada para filtração com 22 mm de diâmetro e poros de 0,22  $\mu\text{m}$  Sartorius Stedim Biotech.
- Paquímetro Mitutoyo 500-143B.
- Pipetas automáticas.
- Ponteiras para uso em pipetas automáticas.
- Seringas de plástico de 5 mL e 10 mL.

#### 4.5 Equipamentos

- Aparelho de ultrassom BRANSON 3210R-MT.
- Balança analítica SARTORIUS modelo BP211D.
- Balança semi-analítica Ohaus TP2KS
- Banho-maria FULL GAUGE TIC-17C.
- Bomba de vácuo Weg B480794.
- Câmara de fotoestabilidade equipada com lâmpadas distintas para emissão de radiação visível e ultravioleta.
- Centrífuga Jouan B 4i.
- Dissolutor Hanson SR 8 Plus.
- Espectrofotômetro FTIR PerkinElmer modelo Spectrum One com *software* Spectrum.
- Espectrofotômetro UV/VIS Vankel modelo Cary 50.
- Estufa NABERTHERM TR 60.
- Potenciômetro METROHM 827 pH Lab.
- Sistema de purificação de água MILLIPORE DIRECT Q3 UV.
- Sistema UHPLC-Q-TOF-MS composto por cromatógrafo a líquido de ultra eficiência Agilent 1290 (amostrador, injetor automático, desgaseificador, bomba quaternária, forno de colunas e detector de arranjo de diodos - DAD) e espectrômetro de massas Agilent 6540 UHD, equipado com fonte de ionização *electrospray* e analisador do tipo híbrido - quadrupolo e tempo-de-voe - e *software* MassHunter.
- Sistema UHPLC-UV composto por cromatógrafo a líquido de ultra eficiência WATERS ACQUITY UPLC (amostrador, injetor automático, desgaseificador, bomba quaternária, forno de colunas e detector UV) e *software* Empower.
- *Softwares* Action Stat<sup>®</sup>, Microsoft Excel<sup>®</sup> e STATISTICA<sup>®</sup>

## 5 MÉTODOS

### 5.1 Determinação da solubilidade dos IFA SLD e TAD

A solubilidade de cada um dos IFA (SLD e TAD) foi avaliada, separadamente, em água, álcool etílico absoluto, acetonitrila, metanol, ácido fórmico 0,1% (v/v) e em mistura de acetonitrila e água 70:30 (v/v).

Para este procedimento, pesaram-se, separadamente, cerca de 10 mg de cada um dos IFA e transferiram-se para erlenmeyers de 125 mL. Alíquotas crescentes do solvente foram adicionadas até a completa solubilização do IFA. Após cada adição do solvente, agitou-se o erlenmeyer manualmente e, em seguida, este foi deixado em banho de ultrassom durante 1 minuto. Nos casos em que um volume de 100 mL de solvente não provocou solubilização, classificou-se o IFA como não solúvel nesse determinado solvente. O teste foi realizado em temperatura ambiente.

### 5.2 Identificação por espectrofotometria no infravermelho

Para a identificação dos IFA utilizados neste trabalho, obtiveram-se os espectros de absorção na região do infravermelho do SLD e da TAD IFA e das respectivas SQR na faixa de 4000 a 650  $\text{cm}^{-1}$  utilizando-se equipamento com acessório de refletância total atenuada, em inglês *Attenuated total reflection* (ATR). Os espectros foram comparados para confirmar a identidade das amostras.

### 5.3 Determinação dos máximos de absorção na região do ultravioleta do SLD e da TAD

Com o objetivo de determinar os comprimentos de onda nos quais ocorrem os máximos de absorção do SLD e da TAD na região do ultravioleta, os espectros de absorção foram obtidos na faixa de 200 a 400 nm para soluções individuais, contendo 8  $\mu\text{g/mL}$  de citrato de SLD SQR e 5  $\mu\text{g/mL}$  de TAD SQR preparadas em acetonitrila e água 50:50 (v/v). A solução branco foi constituída por uma mistura de acetonitrila e água nas mesmas proporções. A partir dos espectros de varredura

obtidos para o SLD e a TAD determinou-se o comprimento de onda de detecção a ser utilizado no método analítico.

#### **5.4 Estudos de degradação forçada**

Com o objetivo de desenvolver método seletivo para os IFA SLD e TAD e para seus possíveis produtos de degradação/impurezas, realizaram-se inicialmente testes preliminares de degradação forçada, submetendo os IFA às condições ácida, alcalina, neutra, presença de íons metálicos, degradação térmica, fotolítica e oxidação com peróxido de hidrogênio. As condições de degradação, tais como a concentração do agente estressante, bem como o tempo e temperatura de exposição foram reduzidas ou aumentadas gradativamente até se conseguir a porcentagem de degradação desejada (mínimo de 10%) ou até que se alcançasse uma condição considerada extrema de estresse e, portanto, não mais condizente com situações reais às quais os fármacos e medicamentos poderiam ser expostos (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2011; BRASIL, 2015).

Os agentes estressantes, diluentes e fase móvel empregados no teste de degradação forçada também foram avaliados isoladamente, visando identificar os respectivos sinais cromatográficos, para que esses não fossem confundidos com produtos de degradação/impurezas. O estudo de degradação foi conduzido tanto com os IFA isolados, quanto juntos na mesma solução.

As amostras degradadas foram utilizadas na otimização do método analítico e então ajustaram-se as condições cromatográficas, de forma a se obter separação adequada entre os picos dos analitos e produtos de degradação formados.

O preparo das soluções amostra de IFA submetidas à degradação forçada e das soluções padrão utilizadas para a quantificação de SLD e TAD remanescentes após a degradação são descritas a seguir.

#### 5.4.1 Soluções de degradação

As exposições aos agentes degradantes foram realizadas conforme recomendado por Baertschi, Alsante e Reed (2011). Para o preparo das soluções de degradação em meio neutro, ácido, alcalino, oxidativo e com íons metálicos, preparou-se inicialmente soluções estoque dos IFA isolados e misturados contendo 1400 µg/mL de citrato de SLD e 400 µg/mL de TAD utilizando-se mistura de acetonitrila e água 70:30 (v/v) (*Diluyente 1*) como diluente.

Em seguida, foram preparadas as soluções de degradação, adicionando-se 5 mL dos agentes estressantes (água ultrapura, ácido clorídrico 2 M, hidróxido de sódio 0,02 M, peróxido de hidrogênio 6% (v/v) e sulfato de cobre 0,1 M) a 5 mL das soluções estoque dos IFA. Para cada condição de estresse, foram preparadas duplicatas, de modo que uma réplica foi mantida à temperatura ambiente e a outra mantida em banho-maria a 50 °C.

Alíquotas de 1 mL das soluções de degradação foram retiradas em diferentes tempos de coleta e transferidas para balão volumétrico de 10 mL. O volume foi completado com mistura de acetonitrila e água 15:85 (v/v) (*Diluyente 2*), homogeneizou-se, filtrou-se utilizando-se filtro de seringa de 0,22 µm de tamanho de poro e transferiu-se para *vial*.

Para o preparo das amostras provenientes da degradação térmica, os IFA foram pesados, colocados em pesa-filtros e expostos a 60 °C durante 30 dias em uma estufa. Para a exposição à fotodegradação, os IFA foram transferidos para placas de petri e submetidos à degradação em câmara de fotoestabilidade equipada com lâmpadas distintas para emissão de radiação visível e ultravioleta. A exposição foi de três ciclos a mais do que é exigido nas legislações de fotoestabilidade (ICH Q1B, 1996), ou seja, as amostras foram expostas a 3,6 milhões lux.h (visível) e 600 watt.h/m<sup>2</sup> (ultravioleta). A partir das amostras expostas à temperatura e luz, prepararam-se soluções com concentração teórica de 70 µg/mL de citrato de SLD e 20 µg/mL de TAD utilizando-se os *Diluentes 1 e 2*.

#### 5.4.2 Soluções padrão de SLD e TAD

Para a quantificação dos IFA remanescentes nas amostras degradadas, utilizou-se curva analítica construída por *Soluções padrão* a 20%, 100% e 180% das concentrações de trabalho (70 µg/mL para citrato de SLD e 20 µg/mL para TAD) preparadas a partir de uma *Solução padrão estoque*, que foi obtida *pesando-se*, exatamente, cerca de 17,5 mg de citrato de SLD SQR e 5 mg de TAD SQR e transferindo-se para balão volumétrico de 25 mL. Adicionaram-se cerca de 20 mL do *Diluyente 1* e deixou-se em banho de ultrassom durante 10 minutos. Após esfriar, completou-se o volume com o *Diluyente 1* e homogeneizou-se, obtendo-se solução a 700 µg/mL de citrato de SLD e 200 µg/mL de TAD.

A partir da *Solução padrão estoque*, prepararam-se as *Soluções padrão* nas concentrações apresentadas na **Tabela 4**, utilizando-se *Diluyente 2* para completar o volume.

**Tabela 4 – Concentrações das *Soluções padrão* para preparo da curva analítica.**

Nível de concentração	Concentração citrato de SLD (µg/mL)	Concentração TAD (µg/mL)
20%	14	4
100%	70	20
180%	126	36

#### 5.5 Desenvolvimento do método para quantificação simultânea de SLD, TAD e potenciais produtos de degradação por UHPLC-UV

O desenvolvimento do método para quantificação simultânea de SLD e TAD por UHPLC-UV foi realizado utilizando-se as amostras provenientes do estudo de degradação forçada.

Iniciou-se o desenvolvimento com a realização de gradientes exploratórios com fase móvel constituída por acetonitrila e ácido fórmico 0,1% (v/v), com a finalidade de conhecer a retenção dos analitos. Em seguida, vários métodos isocráticos foram propostos, testando-se diferentes condições, conforme apresentado na **Tabela 5**, na tentativa de obter resolução satisfatória entre SLD, TAD e os produtos de degradação formados.

Como não foi obtida separação satisfatória entre os analitos de interesse com a eluição isocrática, partiu-se para a realização de testes utilizando-se eluição em gradiente. Então, a partir dos resultados obtidos com o primeiro gradiente testado, propôs-se diversas alterações no tempo e proporção do solvente orgânico, com a finalidade de melhorar a resolução entre os picos.

**Tabela 5 – Condições cromatográficas e variações das mesmas testadas durante o desenvolvimento do método analítico.**

<b>Condição cromatográfica</b>	<b>Variações testadas</b>
Eluentes orgânico	Acetonitrila e metanol
Eluentes aquosos	Ácido fórmico 0,1% (v/v); solução aquosa de trietilamina (TEA) 0,1% e 0,2% (v/v), pH 3,0; ácido trifluoroacético (TFA) 0,05% (v/v) e ácido acético 0,1% (v/v).
Composição da fase móvel	20 a 40% de eluente orgânico
Vazão da fase móvel	0,1 a 0,8 mL/min
Temperatura do forno	25 a 50 °C
Volume de injeção	1 a 5 µL
Frequência de aquisição do detector	5 e 10 pontos/segundo

Optou-se pelo gradiente que produziu melhor separação entre os analitos e os picos dos produtos (resolução de, no mínimo, 1,5 para o par crítico) e que levou a valores adequados dos seguintes parâmetros cromatográficos: fator de retenção ( $k$ ), fator de cauda ( $T_f$ ) e número de pratos teóricos ( $N$ ).

As condições cromatográficas e o gradiente do método otimizado utilizando-se UHPLC-UV e coluna com partículas superficialmente porosas para quantificação simultânea de SLD, TAD e potenciais produtos de degradação estão descritas nas **Tabelas 6 e 7** respectivamente.

**Tabela 6 – Resumo das condições cromatográficas definitivas do método analítico seletivo para SLD, TAD e seus produtos de degradação utilizando UHPLC-UV.**

<b>Parâmetros</b>	<b>Condições</b>
Coluna	Phenomenex®, Kinetex C <sub>18</sub> (50 x 2,1 mm, 1,7 µm)
Composição da fase móvel	Acetonitrila:solução aquosa de trietilamina (TEA) 0,2% (v/v), pH 3,0 ajustado com ácido fórmico - eluição em gradiente
Comprimento de onda	285 nm
Fluxo da fase móvel	0,3 mL/min
Gradiente	Descrito na <b>Tabela 7</b>
Temperatura do forno	35 °C
Volume de injeção	5 µL
Frequência de aquisição do detector	5 pontos/segundo
Tempo da corrida	7 min seguidos de 2 min para re-equilíbrio da coluna



**Tabela 7 – Gradiente definitivo do método analítico seletivo para SLD, TAD e seus produtos de degradação utilizando UHPLC-UV.**

Tempo (min)	A % (v/v) (TEA 0,2% (v/v), pH 3,0)	B % (v/v) (acetonitrila)	Eluição
0 – 0,5	85% → 75%	15% → 25%	Gradiente linear
0,5 – 2,0	75%	25%	Isocrática
2,0 – 2,5	75% → 70%	25% → 30%	Gradiente linear
2,5 – 6,5	70%	30%	Isocrática
6,5 – 7,0	70% → 85%	30% → 15%	Gradiente linear
7,0 – 9,0	85%	15%	Re-equilíbrio

## 5.6 Otimização da etapa do preparo de amostra para os testes de determinação de teor de SLD e TAD em comprimidos

Como o método analítico desenvolvido será aplicado para a realização dos testes de doseamento e uniformidade de conteúdo de amostras originais e suspeitas de falsificação ou contrabando, a etapa de preparo de amostra para realização desses testes em comprimidos foi realizada por meio de um planejamento fatorial 2<sup>4</sup>.

As variáveis independentes escolhidas para compor o planejamento foram: composição do diluente (X<sub>1</sub>), tempo de extração no ultrassom (min) (X<sub>2</sub>), procedimento para remoção de partículas (filtração/centrifugação) (X<sub>3</sub>) e estabilidade das soluções (X<sub>4</sub>). Os níveis avaliados são apresentados na **Tabela 8**. As demais variáveis independentes que não foram escolhidas para compor o planejamento fatorial tiveram seus valores fixados. As variáveis dependentes (respostas) avaliadas foram as recuperações de SLD e TAD obtidas em cada experimento, calculadas utilizando-se a seguinte equação:

$$\text{Recuperação (\%)} = (\text{concentração experimental} / \text{concentração teórica}) \times 100$$

**Tabela 8 – Variáveis independentes avaliadas no planejamento fatorial 2<sup>4</sup> e os níveis avaliados para cada uma delas.**

Fator	Nível	
	Inferior (-)	Superior (+)
X <sub>1</sub> - Composição do diluente*	Acetonitrila/água <i>Diluentes 1 e 2</i>	Acetonitrila/TEA 0,2% (v/v), pH 3,0 <i>Diluentes 3 e 4</i>
X <sub>2</sub> - Tempo de extração no ultrassom	10 min	20 min
X <sub>3</sub> - Remoção de partículas	Filtração (PVDF, 0,45 µm de poro)	Centrifugação (2209 x g por 10 min)
X <sub>4</sub> - Estabilidade das soluções	Tempo zero (início)	24 h

\*Os diluentes foram constituídos por mistura de acetonitrila e água 70:30 (v/v) (*Diluyente 1*); acetonitrila e água 15:85 (v/v) (*Diluyente 2*); acetonitrila e TEA 0,2% (v/v), pH 3,0 70:30 (v/v) (*Diluyente 3*); acetonitrila e TEA 0,2% (v/v), pH 3,0 15:85 (v/v) (*Diluyente 4*).

As soluções amostra contendo placebo, SLD IFA e TAD IFA foram preparadas de maneira a reproduzir a matriz experimental do planejamento fatorial 2<sup>4</sup> sendo realizados 16 experimentos, conforme descrito a seguir: transferiu-se quantidade dos placebos de Viagra® e Cialis® presentes em 1/4 do peso médio dos comprimidos (61,54 mg de placebo de Viagra® e 86,05 mg de placebo de Cialis®) para balões volumétricos de 50 mL. Em seguida adicionaram-se a cada balão, cerca de 35,12 mg de citrato de SLD e 10 mg de TAD, 40 mL do *Diluyente 1 ou 3* e deixou-se em banho de ultrassom durante 10 ou 20 minutos. Em seguida, completou-se o volume com o *Diluyente 1 ou 3* e procedeu-se à filtração utilizando-se filtro de seringa de 0,45 µm de tamanho de poro ou centrifugou-se a 2209 x g durante 10 minutos. Pipetaram-se 2,5 mL do filtrado ou do sobrenadante e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL. Completou-se o volume com *Diluyente 2 ou 4* e homogeneizou-se. Filtrou-se com filtro de seringa de 0,22 µm de tamanho de poro e transferiu-se para *vial*. As soluções amostra preparadas foram analisadas imediatamente após o preparo (tempo zero) e após 24 horas.

Para a determinação da recuperação, prepararam-se duas *Soluções padrão*, contendo 70 µg/mL e 20 µg/mL de citrato de SLD e TAD respectivamente, uma delas utilizando-se mistura de acetonitrila e água (*Diluentes 1 e 2*) e outra utilizando-se mistura de acetonitrila e TEA 0,2% (v/v), pH 3,0 (*Diluentes 3 e 4*).

A recuperação de cada solução amostra foi obtida, os efeitos principais e de segunda ordem foram calculados como as diferenças entre médias no nível superior (+) e médias no nível inferior (-) para cada variável analisada, o erro foi estimado e a significância dos efeitos foram obtidas, com 95% de confiança (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

## 5.7 Validação do método analítico

O método desenvolvido (**Tabelas 6 e 7**, páginas 45 e 46) foi validado de acordo com as recomendações presentes na Resolução RDC nº 166/2017 da ANVISA (BRASIL, 2017), no Guia da *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use Q2(R1)* (ICH) (ICH, 2005), nas *Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos*

(DOQ-CGCRE-008) (INMETRO, 2018) e nos procedimentos de validação intralaboratorial definidos por Souza (2007) e Souza e Junqueira (2005). Todos os cálculos foram realizados com auxílio do programa Microsoft Excel® e do *software* estatístico Action Stat®.

### **5.7.1 Adequabilidade do sistema**

Para verificar a adequabilidade do sistema cromatográfico e comprovar que o tempo proposto de 2 minutos é suficiente para o re-equilíbrio da coluna, preparou-se uma solução padrão a 100% das concentrações dos fármacos, conforme descrito no item 5.4.2 (página 44), e a mesma foi injetada seis vezes consecutivas no cromatógrafo. Em seguida avaliou-se os seguintes parâmetros para os picos dos analitos: desvio padrão relativo (DPR) da área sob o pico (DPR área), do tempo de retenção (DPR  $t_R$ ), fator de cauda ( $T_f$ ) e fator de retenção ( $k$ ).

### **5.7.2 Seletividade**

A seletividade do método foi avaliada em relação aos excipientes das formulações e em relação aos produtos provenientes da degradação do SLD e da TAD.

Para a verificação da seletividade em relação aos produtos de degradação, os IFA SLD e TAD foram expostos a estudo de degradação forçada e as amostras foram injetadas utilizando-se o método analítico desenvolvido e otimizado. Todos os picos deveriam estar separados com uma resolução mínima de 1,5 (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

As amostras provenientes da degradação com HCl 1 M a 50 °C durante 24 horas, NaOH 0,01 M à temperatura ambiente durante 6 horas e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% (v/v) à temperatura ambiente durante 10 horas, foram injetadas também, utilizando diferentes comprimentos de onda de detecção, sendo eles: 220, 254, 270 e 350 nm, com o objetivo de verificar a existência de possíveis picos que não absorvam em 285 nm (comprimento de onda de detecção padronizado no método desenvolvido). Caso outros picos fossem detectados, seria verificado se os mesmos se encontravam bem resolvidos dos analitos de interesse.

Para a comprovação da seletividade do método analítico frente aos excipientes da formulação, preparou-se uma solução a partir dos placebos utilizados na fabricação dos comprimidos de Viagra® e Cialis® (**Tabela 3**, página 38), com a finalidade de se comprovar, visualmente, a ausência de picos interferentes nos tempos de retenção do SLD e da TAD.

Realizou-se também, uma avaliação estatística para verificar se há diferença na recuperação dos IFA em soluções contendo apenas os fármacos e soluções contendo os fármacos e os placebos. Para isso, prepararam-se três soluções com apenas os fármacos e três soluções contendo fármacos+placebos e comparou-se estatisticamente a recuperação de SLD e TAD obtidas a partir dessas soluções utilizando-se o teste F da análise de variância (ANOVA), com a finalidade de se verificar possível interferência dos excipientes na resposta.

### **5.7.3 Linearidade**

A linearidade foi avaliada construindo-se curva analítica para SLD e TAD em nove níveis de concentração, na faixa de 20% a 180% das concentrações de trabalho (70 µg/mL para citrato de SLD e 20 µg/mL para TAD).

Para a construção da curva analítica, primeiramente, preparou-se solução padrão estoque contendo 700 µg/mL de citrato de SLD e 200 µg/mL de TAD em *Diluyente 1*. Em seguida, a partir da solução padrão estoque, prepararam-se as replicatas das soluções descritas na **Tabela 9**, utilizando o *Diluyente 2* para completar o volume.

As diluições foram realizadas em triplicata, totalizando 27 soluções. O preparo e a injeção das soluções no sistema UHPLC-UV foram realizados em ordem aleatória para evitar que variações temporais das condições cromatográficas interferissem no resultado e para garantir a independência dos resultados.

**Tabela 9 – Preparo das soluções contendo SLD e TAD SQR para avaliação da linearidade.**

Nível de concentração*	Concentração citrato de SLD (µg/mL)	Concentração TAD (µg/mL)
20%	14	4
40%	28	8
60%	42	12
80%	56	16
100%	70	20
120%	84	24
140%	98	28
160%	112	32
180%	126	36

\*em relação à concentração de trabalho.

Os valores dispersos (*outliers*) foram identificados pelo teste de resíduo padronizado de *Jackknife* ( $\alpha = 0,05$ ). O critério de aceitação utilizado foi que no máximo 22% dos dados originais da curva analítica poderiam ser excluídos (SOUZA, 2007; SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

Em seguida, testes estatísticos foram aplicados para verificar se os dados de regressão linear atenderiam às premissas para o Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO), conforme descrito por Souza e Junqueira (2005). As premissas relacionadas à análise de regressão foram avaliadas quanto à normalidade, pelo teste de *Ryan-Joiner*, homocedasticidade, pelo teste de *Levene* modificado por *Brown e Forsythe* e independência dos resíduos da regressão, pelo teste de *Durbin-Watson*. Em seguida, averiguou-se a adequação dos dados ao modelo linear, ou seja, verificou-se se a regressão é significativa e se o desvio da linearidade não é significativo utilizando ANOVA (INMETRO, 2018; SOUZA, 2007; SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

Por fim, construiu-se curva analítica com os valores de área sob os picos do SLD e da TAD obtidas para cada nível de concentração, estabeleceram-se os coeficientes de determinação ( $R^2$ ), de correlação ( $R$ ), angular ( $b$ ), linear ( $a$ ) e o gráfico de distribuição dos resíduos. Avaliou-se a significância do coeficiente angular utilizando o teste F da ANOVA, para comprovar que é estatisticamente diferente de zero. E também realizou-se o teste do intercepto (coeficiente linear) utilizando a estatística  $t$  de Student para verificar se o mesmo é estatisticamente igual a zero, ou seja, se a curva analítica passa pela origem. A regressão linear foi então calculada pelo

MMQO e a linearidade foi avaliada por meio da estimativa de todos esses parâmetros.

#### **5.7.4 Precisão e exatidão**

A precisão e a exatidão foram avaliadas pelo método do placebo fortificado, adicionando-se quantidades conhecidas de SLD e TAD à mistura dos componentes das formulações (**Tabela 3**, página 38) com o intuito de determinar a porcentagem de recuperação e os DPR entre as recuperações das soluções amostra preparadas. O experimento foi realizado em três níveis de concentração: 20% (baixo), 100% (médio) e 180% (alto) das concentrações de trabalho (70 µg/mL e 20 µg/mL de citrato de SLD e TAD respectivamente). Para cada nível de concentração foram preparadas três réplicas independentes e o experimento foi realizado em dois dias distintos, por analistas diferentes.

Para que o método seja considerado exato, os valores para a recuperação média em cada nível de concentração devem estar entre 98,0% e 102,0% (INMETRO, 2018). Para determinar a repetibilidade (precisão intradia), foi calculada a média de recuperação e os DPR em cada nível. A precisão intermediária (interdias) foi avaliada pela repetição do mesmo procedimento em outro dia, por outro analista, e foi avaliada determinando-se o DPR em cada nível, considerando os dois dias de análise. Recomenda-se que os valores de DPR sejam inferiores a 2% (GREEN, 1996).

#### **5.7.5 Robustez**

A robustez foi avaliada pelo método estatístico de Youden e Steiner (YOU DEN; STEINER, 1975), no qual algumas condições cromatográficas foram variadas e a influência das modificações nos resultados de recuperação do SLD e da TAD foi avaliada. Em cada condição modificada foram realizadas injeções da solução padrão a 100% das concentrações de trabalho dos fármacos e da solução amostra contendo placebo, 70 µg/mL de citrato de SLD IFA e 20 µg/mL de TAD IFA. Os parâmetros, bem como as variações avaliadas, encontram-se descritas na **Tabela 10**.

**Tabela 10 – Parâmetros e variações avaliados no teste de robustez.**

Parâmetro		Varição (-)	Condição nominal		Varição (+)
Temperatura da coluna	a	32 °C	35°C	A	38 °C
Vazão da fase móvel	b	0,25 mL/min	0,30 mL/min	B	0,35 mL/min
Volume de injeção	c	4,5 µL	5 µL	C	5,5 µL
Fornecedor da acetonitrila	d	Honeywell	Merck	D	J.T. Baker
pH do eluente aquoso	e	2,8	3,0	E	3,2
Comprimento de onda de detecção	f	280 nm	285 nm	F	290 nm
Composição da fase móvel	g	Gradiente a <sup>1</sup>	Gradiente definitivo	G	Gradiente b <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Gradiente a = constituído pela redução de 2% na proporção do solvente aquoso em cada linha do gradiente definitivo (**Tabela 7**, página 46).

<sup>2</sup>Gradiente b = constituído pelo aumento de 2% na proporção do solvente aquoso em cada linha do gradiente definitivo (**Tabela 7**, página 46).

Após a realização dos experimentos, foram obtidos os valores de teor para SLD e TAD e calculou-se o efeito de cada variável subtraindo-se a média dos resultados obtidos nos quatro experimentos em que determinada variável foi utilizada em nível alto, pela média dos resultados obtidos nos quatro experimentos em que a mesma variável foi utilizada em nível baixo (YOUNDEN; STEINER, 1975).

Em seguida, o efeito de cada variável foi analisado no *software* estatístico Action Stat<sup>®</sup>, sendo utilizado o método de Lenth e o gráfico de Daniel para a identificação dos parâmetros significativos. O método analítico é considerado robusto se não houver diferenças estatisticamente significativas nas respostas (teores de SLD e TAD na solução amostra) frente às alterações propostas (BRASIL, 2017).

### **5.7.6 Limites de detecção e quantificação**

Os limites de detecção e quantificação teóricos para o SLD e a TAD foram estimados com base nos desvios padrão das respostas e na inclinação das respectivas curvas analíticas (BRASIL, 2017; ICH-Q2(R1), 2005).

Para confirmar os limites teóricos, injetaram-se soluções de SLD e TAD na mesma concentração obtida a partir da equação e, em seguida, foram realizadas diluições e as razões sinal/ruído foram calculadas pelo *software* Empower. O limite de detecção é aquele no qual a razão sinal/ruído é maior ou igual a 2:1, e o limite de quantificação é aquele no qual a razão sinal/ruído é de, no mínimo, 10:1 (BRASIL, 2017; ICH-Q2(R1), 2005).

### **5.7.7 Testes de seletividade e recuperação para diferentes diluentes**

Para comprovar que o método desenvolvido e validado para determinação do teor de SLD e TAD em comprimidos pode também ser utilizado na quantificação da cedência (teste de dissolução e perfil de dissolução), foi necessário avaliar se o método analítico é seletivo e garante recuperação adequada mesmo quando são utilizados diferentes diluentes, tais como ácido clorídrico 0,01 *M* e dodecil sulfato de sódio/laurilsulfato de sódio 0,5% (p/v), que são os meios descritos no teste de dissolução das monografias de citrato de SLD comprimidos e TAD comprimidos, respectivamente (THE UNITED, 2019).

Dessa forma, para comprovar a seletividade, injetaram-se os diluentes ácido clorídrico 0,01 *M* e dodecil sulfato de sódio/laurilsulfato de sódio 0,5% (p/v) para verificar se há picos nos tempos de retenção do SLD e TAD, que poderiam coeluir com os mesmos e prejudicar a seletividade do método analítico.

Para a verificação da adequada recuperação, independente do diluente utilizado, prepararam-se, para cada um dos três níveis de concentração estudados (20%, 100% e 180% das concentrações de trabalho) as seguintes soluções: três soluções contendo placebo, SLD e TAD utilizando-se como diluente mistura de acetonitrila e água; três soluções com placebo e SLD IFA utilizando-se como diluente ácido clorídrico 0,01 *M* e três soluções com placebo e TAD IFA preparadas com dodecil sulfato de sódio/laurilsulfato de sódio 0,5% (p/v) como diluente.

As soluções amostra foram injetadas em sistema UHPLC-UV aplicando o método analítico desenvolvido e validado (**Tabelas 6 e 7**, páginas 45 e 46) e verificou-se pelo teste F da ANOVA se havia diferença estatística entre a média das áreas sob os picos obtidos em cada um dos grupos, para os três níveis avaliados.

### **5.8 Elucidação das estruturas químicas dos produtos de degradação**

Com o objetivo de se propor estruturas químicas e mecanismos químicos de formação dos produtos de degradação majoritários, utilizou-se a cromatografia líquida de ultra eficiência com detector de arranjo de diodos (DAD) acoplada à



espectrometria de massas sequencial, com ionização por *electrospray* (IES) e analisador do tipo quadrupolo-tempo-de-voo (UHPLC-Q-TOF-MS).

As amostras provenientes do estudo de degradação forçada foram injetadas no sistema UHPLC-Q-TOF-MS utilizando-se fase móvel constituída por acetonitrila com ácido fórmico 0,5% (v/v) e tampão formiato de amônio 10 mM pH 3,0 (ajustado com ácido fórmico) a uma vazão de 0,3 mL/min. O gradiente, a coluna cromatográfica, a temperatura e o volume de injeção foram os mesmos utilizados no método desenvolvido por UHPLC-UV (**Tabelas 6 e 7**, páginas 45 e 46). A detecção UV foi realizada na faixa de 190 a 400 nm e a ionização dos analitos foi obtida no modo positivo (IES (+)). Os parâmetros espectrométricos e os respectivos valores utilizados durante a análise foram: voltagens do *spray*, fragmentador, *skimmer* e octapol de 3000, 175, 75 e 750 V, respectivamente. A temperatura do gás de secagem foi de 300 °C, vazão de 8 L/min e pressão de 35 psi.

Primeiramente, as amostras degradadas foram injetadas no modo de varredura (MS1 *full-scan*) e assim foi possível determinar as razões massa/carga ( $m/z$ ) dos íons precursores dos produtos de degradação majoritariamente formados. Em seguida, os íons precursores foram fragmentados na célula de colisão, por meio da aplicação de uma energia de colisão de 15 eV para TAD e respectivos produtos de degradação e de 35 eV para SLD e seus produtos de degradação. Sendo assim, foram obtidos os espectros de fragmentação (MS2 *full-scan*), com a detecção dos íons produto formados de razão  $m/z$  na faixa de 90-1000 Da. Dessa forma, conhecendo-se as razões  $m/z$  mais abundantes de cada íon precursor e dos respectivos íons produto, foi possível propor estruturas e rotas de formação para os produtos de degradação mais relevantes.

## **5.9 Análise dos medicamentos originais e apreendidos**

### **5.9.1 Recebimento e armazenamento das amostras**

Os comprimidos provenientes de apreensões e disponibilizados pela PF e pela PCMG totalizaram 10 tipos diferentes de amostras suspeitas de conter SLD ou TAD, que foram codificadas como amostras apreendidas 1 a 10, de acordo com a ordem

cronológica de recebimento. Além dos medicamentos apreendidos, foram adquiridos em farmácias, quatro diferentes lotes de medicamentos contendo SLD e quatro lotes contendo TAD.

Após o recebimento das amostras, as mesmas foram armazenadas em dessecador sob proteção da luz e temperatura controlada de 25 °C.

### **5.9.2 Caracterização física dos comprimidos originais e apreendidos**

Ao receber as amostras apreendidas e originais, registraram-se, por meio de fotografias, as embalagens secundária e primária (quando presentes) e os comprimidos. Em seguida, procedeu-se à determinação dos aspectos físicos, sendo registradas as características visuais de cada comprimido (cor, forma e presença ou ausência de marcações). Utilizando-se paquímetro digital, também foram determinadas as medidas dos comprimidos, tais como comprimentos (maior e menor) e espessura. Por fim, os comprimidos foram pesados utilizando-se balança analítica. Os valores médios das medições obtidas para os comprimidos de uma mesma amostra foram comparados com as demais amostras.

### **5.9.3 Aplicação do método: avaliação da qualidade dos medicamentos originais e apreendidos**

Com o objetivo de aplicar o método desenvolvido e validado (**Tabelas 6 e 7**, páginas 45 e 46), além de se determinar a qualidade dos comprimidos apreendidos e originais, os mesmos foram submetidos aos principais testes de controle de qualidade físico-químico, sendo eles: identificação, doseamento, uniformidade de conteúdo, teste de dissolução e perfil de dissolução.

Durante a realização desses testes, não foi possível utilizar a quantidade de unidades recomendadas nos métodos farmacopeicos, devido à limitação do número de comprimidos disponíveis. Dessa forma, o número de comprimidos utilizados em cada um dos testes de controle de qualidade foi estabelecido de acordo com o número total de unidades obtido de cada amostra.

No caso em que a quantidade total de comprimidos disponíveis era insuficiente para a realização de todos os testes, priorizou-se a realização do doseamento, seguido do teste de dissolução e perfil de dissolução. Na **Tabela 11** encontram-se descritos o número de unidades submetidas a cada teste de qualidade.

**Tabela 11 – Número de comprimidos utilizados nos testes de controle de qualidade.**

Amostra	Quantidade total de comprimidos disponíveis	Número de comprimidos utilizados no teste		
		Identificação e doseamento	Uniformidade de conteúdo	Teste de dissolução e perfil de dissolução
Apreendida 1	20	4	4	3
Apreendida 2	10	2	2	3
Apreendida 3	20	4	4	3
Apreendida 4	2	1	NR	NR
Apreendida 5	5	1	NR	2
Apreendida 6	7	1	2	2
Apreendida 7	5	1	NR	2
Apreendida 8	6	1	NR	3
Apreendida 9	2	1	NR	NR
Apreendida 10	20	4	4	3
Viagra 1	20	4	4	6
Viagra 2	15	4	3	6
Genérico SLD 1	20	4	4	6
Genérico SLD 2	20	4	4	6
Cialis	2	NR	NR	NR
Genérico TAD 1	10	2	3	3
Genérico TAD 2	10	2	3	3
Genérico TAD 3	10	2	3	3

**Legenda:** NR = Não realizado devido à indisponibilidade de amostra.

Para a quantificação dos analitos nas soluções amostra durante os testes de qualidade, preparou-se curva analítica construída a partir de soluções padrão contendo 20%, 100% e 180% das concentrações de trabalho (70 µg/mL para citrato de SLD e 20 µg/mL para TAD).

Juntamente com o teste de doseamento, foi realizada a identificação do(s) IFA(s) em cada uma das amostras.

Para o preparo das soluções amostra utilizadas no teste de doseamento, primeiramente, pesaram-se os comprimidos e determinaram-se os pesos médios. Em seguida estes foram pulverizados utilizando-se gral e pistilo. A partir de cada *pool* de comprimidos, prepararam-se, no mínimo, duas soluções amostra. A especificação para o doseamento de comprimidos contendo tanto SLD quanto TAD,

de acordo com a Farmacopeia Americana (THE UNITED, 2019), é de, no mínimo 90,0% e, no máximo 110,0% do valor rotulado.

Durante a realização do teste de uniformidade de conteúdo, pesou-se um comprimido e o transferiu para balão volumétrico de 100 mL. Prosseguiu-se o preparo de acordo com o procedimento otimizado. O Valor de Aceitação (VA) foi estimado conforme descrito na Farmacopeia Brasileira 6ª edição (FB 6), utilizando-se valor de aceitabilidade (k) igual a 2,4 (correspondente à análise de 10 unidades), uma vez que não se encontra descrito o k para número menor de unidades. O produto cumpre o teste de uniformidade de doses unitárias se o VA não é maior que 15,0 (FARMACOPEIA, 2019).

Os parâmetros (meio de dissolução, aparato e tempo(s) de coleta) utilizados para o teste de dissolução, foram os descritos nas respectivas monografias de citrato de SLD e TAD comprimidos presentes na Farmacopeia Americana (THE UNITED, 2019). Ademais, o teste de perfil de dissolução foi realizado conforme preconizado na Resolução RDC nº 31/2010 (ANVISA) (BRASIL, 2010).

Os comprimidos contendo SLD foram analisados utilizando-se 900 mL de ácido clorídrico 0,01 M mantido a  $37,0 \pm 0,5$  °C como meio de dissolução e cestas a 100 rpm como aparato. Durante o teste de perfil de dissolução, coletaram-se 10 mL de cada uma das cubas em sete diferentes tempos, sendo eles: 2, 5, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos. As amostras coletadas foram imediatamente filtradas utilizando-se filtros de seringa de 0,22 µm de tamanho de poro, transferidas para *vial* e injetadas no sistema UHPLC-UV. Construiu-se a curva de cedência para os lotes analisados. Os resultados obtidos no tempo de coleta de 15 minutos foram utilizados no teste de dissolução. A porcentagem de cedência de cada unidade deveria ser maior ou igual a 85% (Q = 80%) no primeiro estágio (E<sub>1</sub>) do teste de dissolução (THE UNITED, 2019).

Já para os comprimidos contendo TAD, foram utilizados 1000 mL de laurilsulfato de sódio 0,5% (p/v) mantido a  $37,0 \pm 0,5$  °C como meio de dissolução e pás a 50 rpm como aparato. Durante o teste de perfil de dissolução comparativo, coletaram-se 10 mL de cada uma das cubas após 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 e 75 minutos do início do

teste. As amostras coletadas foram imediatamente filtradas utilizando-se filtros de seringa de 0,22  $\mu\text{m}$  de tamanho de poro, transferidas para *vial* e injetadas em cromatógrafo a líquido de ultra eficiência. Construiu-se a curva de cedência para os lotes analisados. Os resultados obtidos nos tempos de coleta de 10 e 30 minutos foram utilizados para o teste de dissolução. O critério de aceitação estabelecido para o E<sub>1</sub> é que a porcentagem de cedência de cada unidade deveria ser maior ou igual a 45% (Q = 40%) após 10 minutos e maior ou igual a 85% (Q = 80%) após 30 minutos do início do teste (THE UNITED, 2019).

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Solubilidade dos IFA SLD e TAD

Os termos descritivos da FB 6 (FARMACOPEIA, 2019) foram utilizados para expressar a solubilidade dos IFA.

Após a realização do teste, o SLD foi classificado como pouco solúvel em água, álcool etílico absoluto, metanol e ácido fórmico 0,1% (v/v); muito pouco solúvel em acetonitrila e solúvel em mistura de acetonitrila e água 70:30 (v/v), que corresponde ao diluente utilizado no método analítico desenvolvido (*Diluente 1*). A TAD, por sua vez, foi classificada como praticamente insolúvel em água e em ácido fórmico 0,1% (v/v); e pouco solúvel em álcool etílico absoluto, acetonitrila, metanol e no *Diluente 1*. Portanto, considerou-se adequada a utilização de mistura de acetonitrila e água 70:30 (v/v) como diluente para o preparo das soluções amostra.

### 6.2 Identificação por espectrofotometria no infravermelho

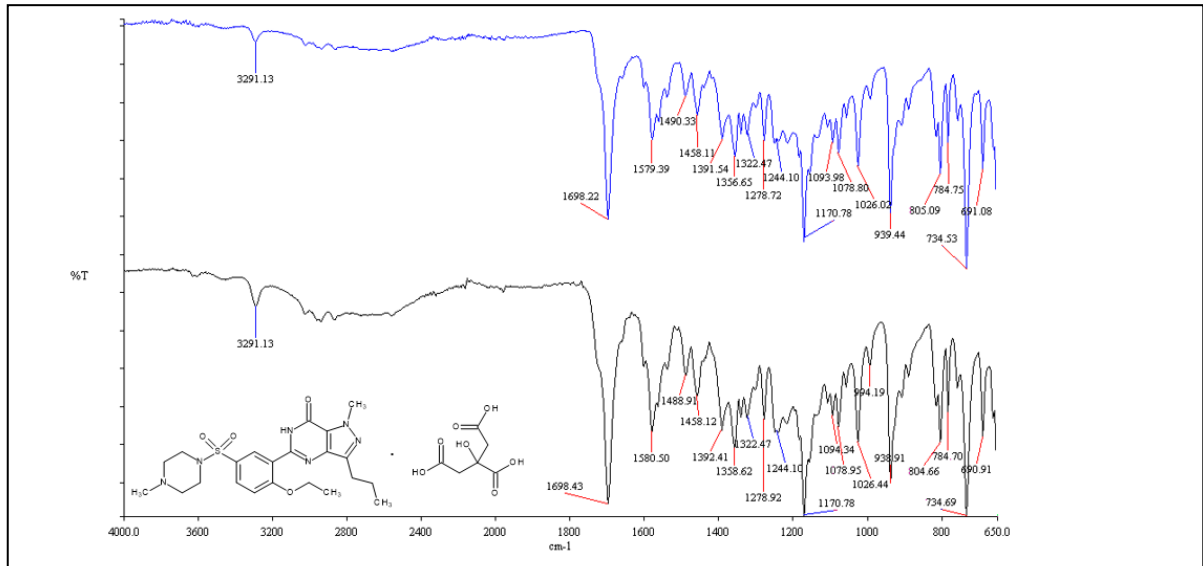
Os espectros obtidos para o SLD SQR e IFA foram comparados para confirmar a identidade da amostra (**Figura 3**). O fator de comparação obtido foi de 98,26%, valor superior ao mínimo estabelecido no *software* Spectrum (>95,00%) para confirmação de identidade. A sobreposição dos dois espectros demonstra que se trata da mesma substância, uma vez que possuem bandas de absorção nos mesmos comprimentos de onda e com as mesmas intensidades relativas.

As principais bandas de absorção obtidas nos espectros de infravermelho para o SLD SQR e IFA, bem como as atribuições relativas aos grupos funcionais da molécula, são apresentadas na **Tabela 12**.

**Tabela 12 – Números de onda e atribuições das bandas de absorção obtidas nos espectros de infravermelho do SLD IFA e SQR.**

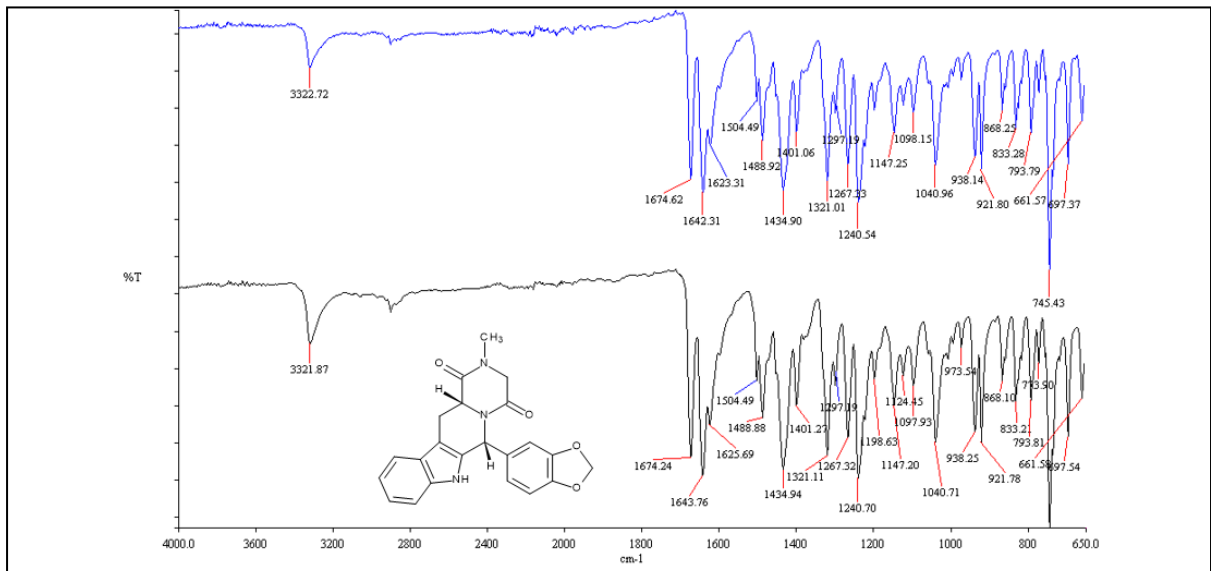
Número de onda	Atribuição e grupo funcional
1171 cm <sup>-1</sup>	Deformação axial (simétrica) da ligação oxigênio=enxofre=oxigênio da sulfona
1357 cm <sup>-1</sup>	Deformação axial (assimétrica) da ligação oxigênio=enxofre=oxigênio da sulfona
1579 cm <sup>-1</sup>	Deformação axial da ligação dupla carbono-carbono de compostos aromáticos
1698 cm <sup>-1</sup>	Deformação axial da ligação dupla carbono-oxigênio de amida e/ou de ácido carboxílico do citrato
3291 cm <sup>-1</sup>	Deformação axial da ligação nitrogênio-hidrogênio de amida secundária

**Figura 3 – Espectros de absorção na região do infravermelho do SLD SQR (preto) e IFA (azul).**



Os espectros obtidos para a TAD SQR e IFA também foram comparados para confirmar a identidade da amostra (**Figura 4**). O fator de comparação obtido foi de 97,46%, demonstrando que o IFA e a SQR são a mesma substância, uma vez que possuem bandas de absorção nos mesmos comprimentos de onda e com intensidades semelhantes. As atribuições das bandas de absorção relativas aos grupos funcionais da molécula são apresentadas na **Tabela 13**.

**Figura 4 – Espectros de absorção na região do infravermelho da TAD SQR (preto) e IFA (azul).**



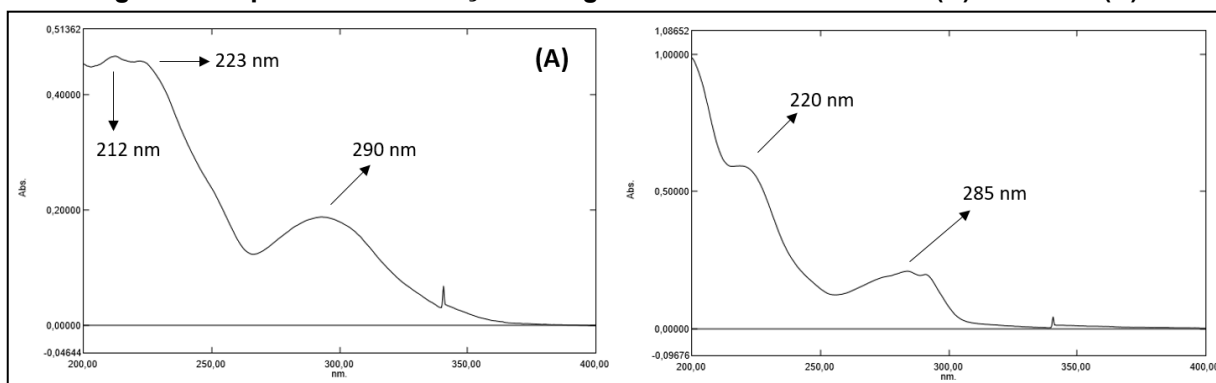
**Tabela 13 – Números de onda e atribuições das bandas de absorção obtidas nos espectros de infravermelho da TAD IFA e SQR.**

Número de onda	Atribuição e grupo funcional
1489 $\text{cm}^{-1}$	Deformação axial da ligação dupla carbono-carbono de compostos aromáticos
1674 $\text{cm}^{-1}$	Deformação axial da ligação carbono-oxigênio de amida
3322 $\text{cm}^{-1}$	Deformação axial da ligação nitrogênio-hidrogênio de amida secundária

### 6.3 Determinação dos máximos de absorção na região do ultravioleta

Os espectros de absorção na região do ultravioleta obtidos na faixa de comprimento de onda de 200 a 400 nm a partir de soluções contendo 8 µg/mL de citrato de SLD SQR e 5 µg/mL de TAD SQR, preparadas em acetonitrila e água 50:50 (v/v), são apresentados na **Figura 5**.

**Figura 5 - Espectros de absorção na região do ultravioleta do SLD (A) e da TAD (B).**



Como pode ser observado, os máximos de absorção ocorrem em 212 nm, 223 nm e 290 nm para o SLD e 220 nm e 285 nm para a TAD. Com o objetivo de garantir um método mais seletivo e com maior detectabilidade, optou-se por definir o comprimento de onda de detecção do método analítico a ser desenvolvido e validado em 285 nm, uma vez que neste comprimento de onda uma menor quantidade de possíveis interferentes absorvem e também, tanto a TAD quanto o SLD apresentam uma boa capacidade de absorção.

### 6.4 Estudos de degradação forçada

Ao realizar os estudos de degradação forçada, verificou-se que tanto o SLD quanto a TAD não sofrem degradação quando expostos a água ultrapura e a solução de sulfato de cobre 0,05 M com aquecimento a 50 °C durante 144 horas (6 dias). As amostras provenientes da degradação térmica e da exposição fotolítica também não apresentaram formação de produtos de degradação e/ou redução da área sob os picos do SLD e da TAD.



Em relação às amostras submetidas a meio oxidativo ( $\text{H}_2\text{O}_2$  3% (v/v), mantido à temperatura ambiente), ocorreu a formação de um produto proveniente da degradação da TAD (PD<sub>4</sub>) e de um produto de degradação (PD<sub>5</sub>) oriundo da degradação do SLD.

Em meio alcalino (NaOH 0,01 M à temperatura ambiente), a TAD degradou formando um produto de degradação (PD<sub>6</sub>). Em meio ácido (HCl 1 M a 50 °C) ocorreu a formação de um produto de degradação com o mesmo tempo de retenção do produto formado em meio alcalino (PD<sub>6</sub>), além da formação de três outros produtos de degradação de menor intensidade (PD<sub>1</sub>, PD<sub>2</sub> e PD<sub>3</sub>) provenientes da degradação da TAD. O SLD não apresentou degradação nas condições ácida e alcalina, mesmo após 144 horas (6 dias) de exposição.

TAD e SLD são suscetíveis à degradação em algumas condições, as quais devem ser consideradas no desenvolvimento da formulação e na determinação das condições de embalagem e armazenamento do medicamento. A investigação do perfil de degradação do fármaco pode indicar tipos de adjuvantes, aditivos de proteção específicos e de acondicionamento, que melhoram a integridade do IFA e do produto acabado. Demonstra-se assim, que o conhecimento do comportamento químico pode ser utilizado para garantir a estabilidade da forma farmacêutica desejada (SILVA *et al.*, 2009).

A TAD apresentou-se susceptível à degradação em meios ácido e alcalino. Diante deste resultado, deve-se privar ao máximo o contato deste IFA com a umidade durante a fabricação e armazenamento do medicamento. Recomenda-se evitar o método de granulação por via úmida durante a sua fabricação e deve ser priorizada a utilização de embalagens impermeáveis, com o objetivo de evitar, ou ao menos, reduzir a sua degradação.

O SLD e a TAD apresentaram-se susceptíveis à degradação em meio oxidativo com peróxido de hidrogênio. A estabilização de fármacos frente a condições oxidativas envolve precauções durante a fabricação e estocagem. Uma vez que o oxigênio é o principal responsável pela reação de oxidação, uma maneira de evitar a degradação é o preenchimento total dos recipientes, ou a substituição de oxigênio por outro gás

como o nitrogênio ou dióxido de carbono. Como alternativa mais simples, tem-se a utilização de adjuvantes farmacotécnicos como antioxidantes, que podem sofrer degradação preferencial em relação ao IFA ou agir como inibidores de cadeias de radicais livres, e assim haverá redução da degradação do IFA (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2011; FLORENCE; ATTWOOD, 2011).

### **6.5 Desenvolvimento do método para quantificação simultânea de SLD, TAD e potenciais produtos de degradação por UHPLC-UV**

A utilização de métodos indicativos de estabilidade é recomendada pelas agências regulatórias para a quantificação de fármacos. No caso de análises de medicamentos ilegais, seu uso é ainda mais importante, uma vez que, como não são conhecidos os procedimentos de fabricação, embalagem e armazenamento desses produtos, os mesmos podem conter impurezas diversas.

O desenvolvimento do método para quantificação de SLD e TAD utilizando UHPLC-UV e coluna com partículas superficialmente porosas foi realizado para ser utilizado nos testes de identificação, doseamento, uniformidade de conteúdo, dissolução e perfil de dissolução de comprimidos autênticos e apreendidos pelas autoridades policiais.

Ademais, com o objetivo de se obter um método seletivo aos IFA e aos possíveis produtos de degradação/impurezas que podem estar presentes tanto nos comprimidos originais, quanto nos falsificados ou contrabandeados, os IFA foram expostos a condições de degradação forçada e as amostras degradadas foram utilizadas na otimização do método.

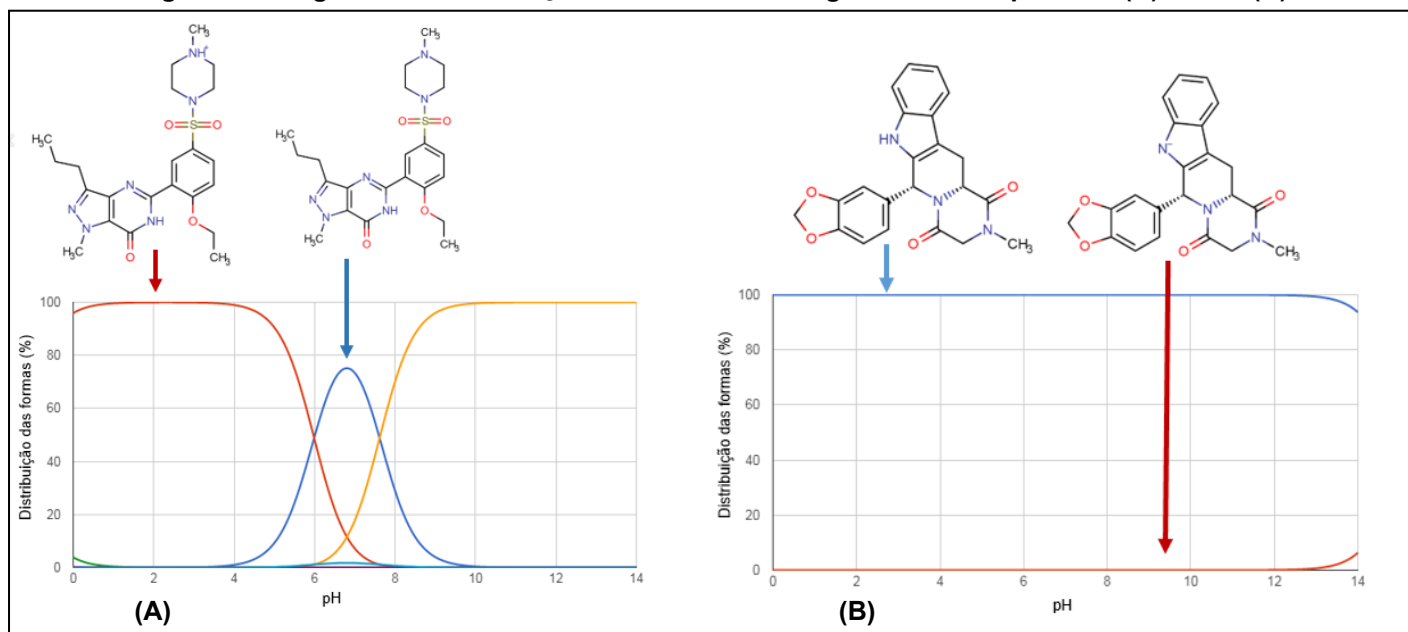
Optou-se por desenvolver um único método para quantificação simultânea desses IFA, uma vez que os medicamentos contendo esses fármacos são os mais falsificados no Brasil e, assim, o método pode ser aplicado para medicamentos contendo tanto SLD quanto TAD e, também pelo fato de encontrarem-se descritos na literatura, casos em que os produtos ilegais alegavam conter SLD na embalagem, mas tinham TAD ou uma mistura desses ingredientes ativos e produtos que continham grandes quantidades de contaminantes (COELHO, LISBOA, 2017; ORTIZ

*et al.*, 2011; ORTIZ *et al.*, 2012a; ORTIZ *et al.*, 2012b; ORTIZ *et al.*, 2013; VEJI *et al.*, 2008; VENHUIS *et al.*, 2010).

Iniciou-se o desenvolvimento do método por UHPLC-UV por meio da realização dos gradientes exploratórios. Com esses resultados foi possível verificar o número de analitos que seria necessário separar e conhecer as características da amostra.

Ao analisar o diagrama de ionização do SLD ao longo da faixa de pH (**Figura 6A**), verifica-se que, em baixos valores de pH, o SLD encontra-se majoritariamente na sua forma ionizada (protonada). Como para a TAD, independente do pH do meio, o mesmo apresenta-se na forma neutra (**Figura 6B**), optou-se por utilizar um eluente aquoso ácido, uma vez que em meio ácido o SLD se encontrará predominantemente em uma única forma (forma ionizada) e assim apresentará uma interação mais uniforme com a fase estacionária, o que favorecerá a obtenção de um pico cromatográfico mais simétrico, fino e com altura maior.

**Figura 6 – Diagrama de distribuição das formas ao longo da faixa de pH: SLD (A) e TAD (B).**



Fonte: adaptado de CHEMAXON, 2018.

Em relação aos testes utilizando eluição isocrática, nenhuma condição avaliada proporcionou resolução adequada entre todos os picos, sendo que algumas provocaram baixa intensidade dos picos, fator de cauda elevado para o SLD e longo tempo de corrida. Apesar de não ter sido possível obter um método isocrático capaz

de separar adequadamente os analitos de interesse, nessa etapa do desenvolvimento foi possível definir os eluentes orgânico e aquoso, uma vez que a mistura de acetonitrila e TEA 0,2% (v/v) pH 3,0 foi a que proporcionou maior intensidade dos picos e menor fator de cauda para o pico do SLD.

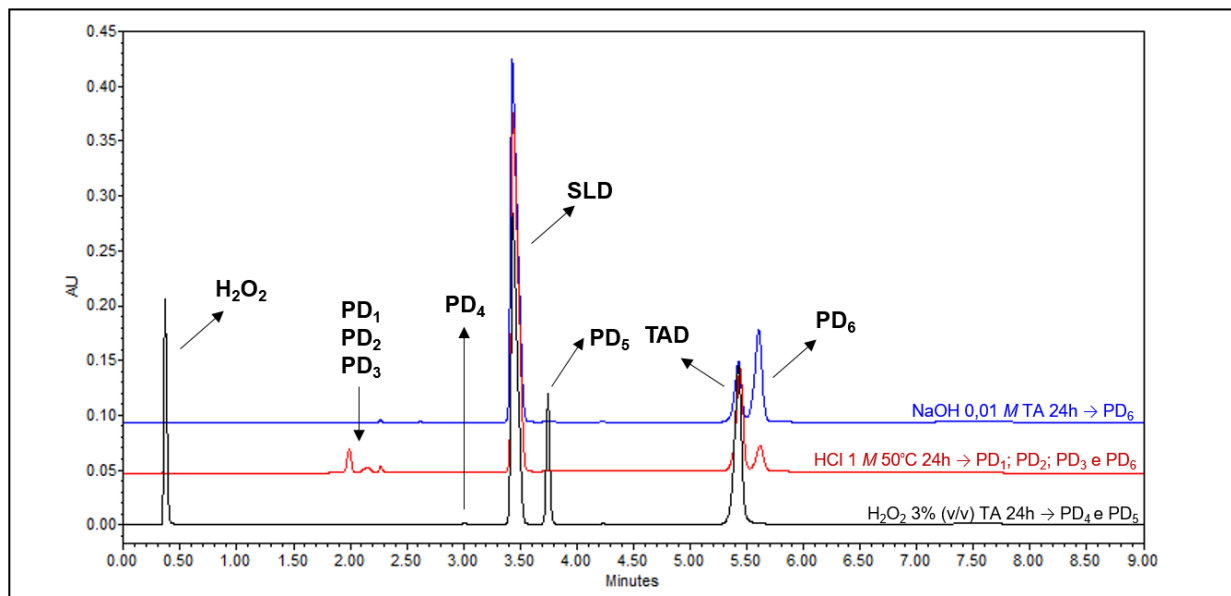
O uso de TEA como aditivo no eluente aquoso, foi capaz de minimizar a formação de cauda pronunciada no pico do SLD. O SLD é um analito que apresenta caráter básico e, por isso, pode interagir com os grupos silanóis residuais presentes na coluna cromatográfica que apresentam caráter predominantemente ácido (interações secundárias), resultando em interações diferenciadas ao longo da coluna e consequente formação de cauda no pico cromatográfico. A utilização de TEA faz com que esta molécula interaja preferencialmente com os grupos silanóis residuais e então, o SLD irá interagir majoritariamente com as cadeias carbônicas da fase ligada, apresentando um tipo de interação predominante e resultando em um pico cromatográfico com menor fator de cauda, mais agudo e intenso (BORGES; GORAIEB; COLLINS, 2012; SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

Dando prosseguimento ao desenvolvimento do método analítico, para a adequada separação entre os picos dos produtos de degradação gerados nos testes de estresse e os picos do SLD e da TAD, iniciaram-se os testes com diferentes eluições em gradiente, alterando-se o tempo e a proporção dos eluentes.

Após todos esses testes, as condições cromatográficas e o gradiente do método que promoveram os melhores resultados para os parâmetros de adequabilidade do sistema foram os apresentados nas **Tabelas 6 e 7** (páginas 45 e 46). Os cromatogramas obtidos a partir das amostras degradadas são apresentados na **Figura 7**.

Os parâmetros cromatográficos tempo morto ( $t_0$ ), fator de retenção ( $k$ ), número de pratos teóricos ( $N$ ), resolução ( $R$ ) e fator de cauda ( $T_f$ ) obtidos com o método otimizado foram calculados para as soluções padrão contendo 70 µg/mL de citrato de SLD e 20 µg/mL de TAD e para as soluções amostra provenientes da degradação em meio ácido, alcalino e oxidativo (**Tabela 14**). O tempo morto obtido com injeção de solução de uracila a 50 µg/mL foi de 0,38 minuto.

**Figura 7 – Cromatogramas obtidos a partir do método otimizado e das amostras submetidas a testes de degradação forçada: em azul cromatograma proveniente da degradação em meio alcalino (NaOH 0,01 M mantido à temperatura ambiente durante 24h); em vermelho cromatograma proveniente da degradação em meio ácido (HCl 1 M mantido a 50 °C durante 24h); em preto cromatograma proveniente da degradação em meio oxidativo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% (v/v) mantido à temperatura ambiente durante 24h).**



**Legenda:** SLD = sildenafil; TAD = tadalafila; TA = temperatura ambiente; PD<sub>1</sub>, PD<sub>2</sub> e PD<sub>3</sub>= produtos de degradação formados em meio ácido, provenientes da degradação da TAD; PD<sub>4</sub>= produto de degradação proveniente da degradação da TAD em meio oxidativo; PD<sub>5</sub>= produto de degradação formado em meio oxidativo, proveniente da degradação do SLD; PD<sub>6</sub>= produto de degradação formado em meio ácido e alcalino, proveniente da degradação da TAD.

**Tabela 14 – Parâmetros de adequabilidade do sistema obtidos com a solução padrão e amostras degradadas durante 24 horas e utilizando-se o método desenvolvido e otimizado apresentado nas Tabelas 6 e 7 (páginas 45 e 46).**

Condição	Analito	Tempo de retenção (t <sub>R</sub> ) (min)	Fator de retenção (k)	Resolução (R)	Fator de cauda (T <sub>f</sub> )	Número de pratos teóricos (N)
Solução padrão	SLD	3,47	8,13	-	1,85	13229
	TAD	5,53	13,55	18,69	0,85	35987
NaOH 0,01 M, 24h, TA	SLD	3,43	8,02	-	1,90	12048
	TAD	5,43	13,29	16,59	0,86	37363
	PD <sub>6</sub>	5,61	13,76	1,53	-	34331
HCl 1 M, 24h, 50 °C	PD <sub>1</sub>	1,99	4,24	-	-	14550
	PD <sub>2</sub>	2,15	4,66	1,61	-	4242
	PD <sub>3</sub>	2,32	5,10	1,36	-	40343
	SLD	3,43	8,03	14,00	1,95	13030
	TAD	5,44	13,32	16,87	0,86	36759
	PD <sub>6</sub>	5,62	13,79	1,52	-	33895
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3%, 24h, TA	PD <sub>4</sub>	3,04	7,00	-	-	47869
	SLD	3,44	8,05	6,98	1,85	14989
	PD <sub>5</sub>	3,76	8,89	3,66	-	72872
	TAD	5,43	13,29	19,31	0,88	36473

Os parâmetros cromatográficos estão de acordo com as recomendações, ou seja, os fatores de retenção ( $k$ ) encontrados foram superiores a 2,0 e a resolução entre o par crítico (TAD-PD<sub>6</sub>) foi maior que 1,5 (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997). O número de pratos teóricos encontrado foi superior a 12000 para os picos do SLD e da TAD e os fatores de cauda foram inferiores a 2,0 (DOLAN, 2003).

## 6.6 Resultados da otimização do preparo da amostra para os testes de determinação de teor de SLD e TAD em comprimidos

Com o objetivo de se determinar as etapas que proporcionariam maiores valores de recuperação tanto de SLD quanto de TAD nas amostras de comprimidos, durante os testes de doseamento e uniformidade de conteúdo, realizou-se um planejamento fatorial 2<sup>4</sup>, conforme descrito no item 5.6 (página 46).

Após a realização dos 16 experimentos, nos quais foram avaliadas as variáveis independentes composição do diluente ( $X_1$ ), tempo de extração no ultrassom (min) ( $X_2$ ), procedimento para remoção de partículas (filtração/centrifugação) ( $X_3$ ) e estabilidade das soluções ( $X_4$ ), os resultados de recuperação obtidos são apresentados na **Tabela 15**.

**Tabela 15 – Matriz experimental e respostas obtidas com o planejamento fatorial 2<sup>4</sup>.**

Ensaio	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	Recuperação de SLD (%)	Recuperação de TAD (%)
1	- <i>Diluentes 1 e 2</i>	- 10 min	- Filtração	- Tempo zero	102,87	101,89
2	+ <i>Diluentes 3 e 4</i>	- 10 min	- Filtração	- Tempo zero	99,66	101,30
3	- <i>Diluentes 1 e 2</i>	+ 20 min	- Filtração	- Tempo zero	105,16	101,78
4	+ <i>Diluentes 3 e 4</i>	+ 20 min	- Filtração	- Tempo zero	99,69	100,63
5	- <i>Diluentes 1 e 2</i>	- 10 min	+ Centrifugação	- Tempo zero	104,72	101,77
6	+ <i>Diluentes 3 e 4</i>	- 10 min	+ Centrifugação	- Tempo zero	98,99	99,46
7	- <i>Diluentes 1 e 2</i>	+ 20 min	+ Centrifugação	- Tempo zero	103,31	101,42
8	+ <i>Diluentes 3 e 4</i>	+ 20 min	+ Centrifugação	- Tempo zero	99,58	100,26
9	- <i>Diluentes 1 e 2</i>	- 10 min	- Filtração	+ 24 h	103,62	101,89
10	+ <i>Diluentes 3 e 4</i>	- 10 min	- Filtração	+ 24 h	100,14	101,30

**Tabela 15 – Matriz experimental e respostas obtidas com o planejamento fatorial 2<sup>4</sup> (continuação).**

Ensaio	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	Recuperação de SLD (%)	Recuperação de TAD (%)
11	- <i>Diluentes 1 e 2</i>	+ 20 min	- Filtração	+ 24 h	105,40	101,78
12	+ <i>Diluentes 3 e 4</i>	+ 20 min	- Filtração	+ 24 h	99,93	100,63
13	- <i>Diluentes 1 e 2</i>	- 10 min	+ Centrifugação	+ 24 h	106,09	101,77
14	+ <i>Diluentes 3 e 4</i>	- 10 min	+ Centrifugação	+ 24 h	99,96	99,46
15	- <i>Diluentes 1 e 2</i>	+ 20 min	+ Centrifugação	+ 24 h	104,04	101,42
16	+ <i>Diluentes 3 e 4</i>	+ 20 min	+ Centrifugação	+ 24 h	100,28	100,26

Os efeitos principais e de segunda ordem foram calculados e o erro foi estimado (0,4830 para SLD e 0,1923 para TAD). A significância dos efeitos principais foi obtida, com 95% de confiança, utilizando-se o *software* Microsoft Excel® e o *software* STATISTICA® e os valores obtidos encontram-se na **Tabela 16**.

**Tabela 16 – Efeitos principais, valores inferiores e superiores do intervalo de confiança de cada efeito e interpretação da significância de cada efeito para na recuperação de SLD e TAD.**

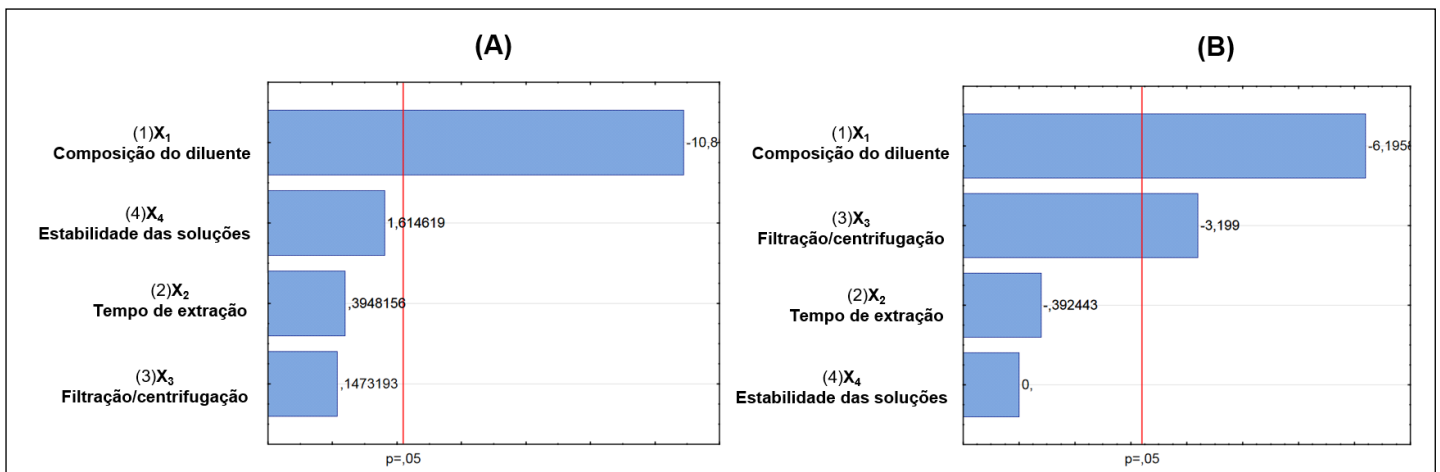
Variável	SLD				TAD			
	Efeito	Intervalo de confiança		Interpretação	Efeito	Intervalo de confiança		Interpretação
		(-)	(+)			(-)	(+)	
1	-4,62	-5,86	-3,38	Significativo	-1,30	-1,80	-0,81	Significativo
2	0,17	-1,08	1,41	Não significativo	-0,08	-0,58	0,41	Não significativo
3	0,06	-1,18	1,31	Não significativo	-0,67	-1,17	-0,18	Significativo
4	0,68	-0,56	1,93	Não significativo	0,00	-0,49	0,49	Não significativo

Na **Figura 8** são apresentados os diagramas de Pareto referentes à recuperação de SLD e TAD. Os efeitos de segunda ordem não se mostraram significativos na recuperação de ambos os analitos e, por isso, os resultados referentes às interações dos fatores não foram apresentados.

Ao analisar a **Tabela 16** e a **Figura 8**, conclui-se que, tanto para a recuperação do SLD quanto para a TAD, a composição do diluente (variável 1) é significativa, de forma que, a recuperação é reduzida em 4,62% para o SLD e em 1,20% para a TAD, quando altera-se os *Diluentes 1 e 2* (nível inferior) para os *Diluentes 3 e 4* (nível superior). Portanto, para maximizar a recuperação, no preparo de amostra devem ser utilizados os *Diluentes 1 e 2*, constituídos por acetonitrila e água. Em

relação à variável 2, tempo de ultrassom, a mesma não se apresentou significativa para a recuperação dos analitos. Com o objetivo de reduzir o tempo do preparo da amostra, optou-se por padronizar a utilização do nível inferior dessa variável, ou seja, as amostras devem permanecer durante 10 minutos em banho de ultrassom. Os resultados obtidos para a variável 3 (procedimento para remoção de partículas), mostraram que a recuperação do SLD independe de utilizar a filtração ou centrifugação, mas para a TAD, a recuperação reduz em 0,67% quando utiliza-se a centrifugação. Sendo assim, optou-se por padronizar a filtração utilizando-se filtros de seringa de 0,45  $\mu\text{m}$  de tamanho de poro, para remoção das partículas da solução amostra. Por fim, a estabilidade das soluções amostra para ambos analitos foi considerada adequada durante 24 horas, uma vez que o efeito (variável 4) não foi estatisticamente significativo.

**Figura 8 – Diagramas de Pareto referente às recuperações de SLD (A) e de TAD (B) obtidas no planejamento fatorial 2<sup>4</sup>.**



Como os resultados da otimização do preparo de amostra mostraram que deve ser utilizada a filtração para remoção das partículas, testou-se a influência da filtração na recuperação do SLD e da TAD, comparando-se estatisticamente, por ANOVA, a média da área sob o pico dos analitos obtidas a partir de três soluções amostra dos IFA que passaram pelo processo de filtração, com três soluções amostra dos IFA que não foram filtradas. Com os resultados obtidos, pôde-se confirmar que a filtração não influencia a recuperação dos analitos ( $F_{\text{calculado}}$  é inferior ao  $F_{\text{tabelado}}$ ) e, portanto, a filtração pode ser utilizada durante o preparo de amostra.



## 6.7 Validação do método analítico

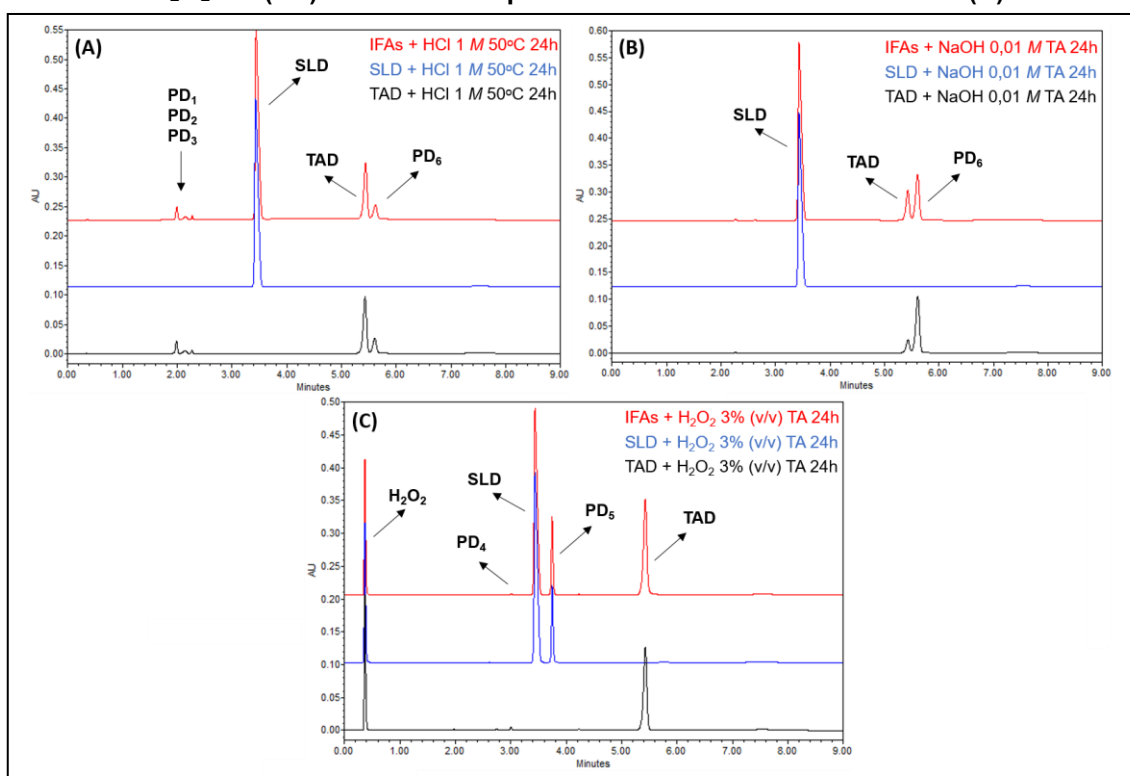
### 6.7.1 Adequabilidade do sistema

Os resultados de adequabilidade do sistema foram satisfatórios. O DPR das áreas sob os picos de SLD e TAD e dos tempos de retenção foram inferiores a 1%, o fator de cauda médio foi de 1,85 para o SLD e 0,85 para a TAD e o fator de retenção (k) foi maior que 2 tanto para o SLD quanto para a TAD (DOLAN, 2003; SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997; UNITED STATES, 1994).

### 6.7.2 Seletividade

Na **Figura 9** observam-se os cromatogramas obtidos a partir do estudo de degradação com os IFA isolados e juntos. Como pode ser verificado, a TAD foi susceptível à degradação em meios ácido, alcalino e oxidativo. O SLD, por sua vez, sofreu degradação apenas na presença de peróxido de hidrogênio.

**Figura 9 – Cromatogramas provenientes da degradação de mistura dos IFA SLD e TAD (vermelho) e da degradação dos IFA isolados SLD (azul) e TAD (preto) com: HCl 1 M mantido a 50°C durante 24 horas (A), NaOH 0,01 M mantido à temperatura ambiente durante 24 horas (B) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% (v/v) mantido à temperatura ambiente durante 24 horas (C).**



Uma vez que o detector ultravioleta utilizado para o desenvolvimento e validação do método por UHPLC é do tipo variável, não foi possível realizar o teste de pureza de pico, o qual é exigido na RDC nº 166 de 2017 (ANVISA) (BRASIL, 2017). Dessa forma, na tentativa de evidenciar a presença de coeluições, soluções padrão e amostras degradadas foram injetadas e analisadas em diferentes comprimentos de onda de detecção ao longo da faixa ultravioleta e os cromatogramas obtidos foram comparados.

Entretanto, independente do comprimento de onda de detecção utilizado, os picos apresentaram sempre o mesmo formato, sendo observado apenas alteração na intensidade. Além disso, durante as análises para a identificação dos produtos de degradação, usando o modo de varredura (MS1 *full-scan*), nenhum pico adicional foi observado. Ademais, não foram visualizados picos provenientes dos excipientes e do diluente eluindo no mesmo tempo de retenção do analitos de interesse.

Para comprovar a ausência de interferência do placebo no comprimento de onda de 285 nm, procedeu-se à análise estatística da seletividade pelo teste F da ANOVA e, os resultados de recuperação obtidos para as soluções contendo apenas os fármacos e soluções contendo fármacos + placebo (**Tabela 17**) mostram que o placebo não interfere na quantificação de SLD e TAD em 285 nm, ou seja, o método é seletivo frente aos excipientes das formulações, uma vez que não há diferença estatística entre as médias dos dois grupos comparados (soluções contendo apenas os fármacos e soluções contendo fármacos + placebo).

**Tabela 17 - Resultados obtidos no teste de seletividade com as soluções contendo apenas os fármacos e soluções contendo fármacos + placebo.**

Amostra	SLD				TAD			
	Recuperação (%)		F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>	Recuperação (%)		F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>
	Soluções fármaco	Soluções fármacos + placebo			Soluções fármaco	Soluções fármacos + placebo		
1	100,42	102,23			100,75	99,32		
2	101,66	101,30			100,69	99,20		
3	100,89	102,26	3,8542	7,7086	99,52	100,79	0,7249	7,7086
Média	100,99	101,93			100,32	99,77		
DPR (%)	0,6193	0,5360			0,6925	0,8912		

### 6.7.3 Linearidade

Avaliou-se a linearidade do método construindo-se curva analítica para o SLD e a TAD em nove níveis de concentração, na faixa de 20% a 180% das concentrações de trabalho. Optou-se por validar o método em uma faixa ampla de concentração, uma vez que será utilizado para a análise de controle de qualidade de medicamentos suspeitos de falsificação e/ou contrabando e, dessa forma, as amostras podem apresentar diferentes níveis de concentração do analito.

Após a aplicação dos testes estatísticos, detectaram-se quatro *outliers* para o conjunto de dados do SLD e cinco para a TAD, os quais foram excluídos. Os resíduos provenientes das curvas analíticas atenderam a todas as premissas necessárias para utilização do MMQO, conforme mostrado na **Tabela 18**.

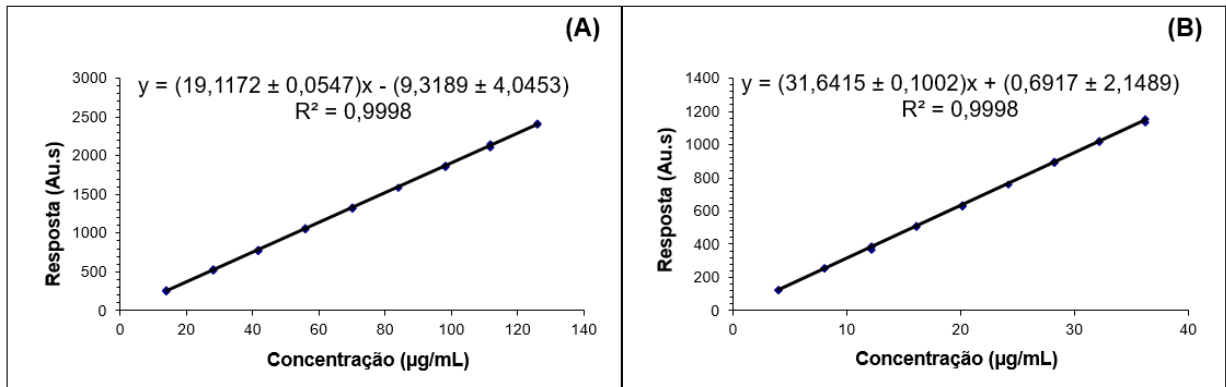
**Tabela 18 – Avaliação das premissas necessárias à utilização do MMQO para o conjunto de dados do SLD e da TAD.**

Premissas (testes)	Especificações	Resultados obtidos		Conclusões
		SLD	TAD	
Teste de <i>outliers</i> ( <i>Jackknife</i> )	$ J_{ei}  > J_{crítico}$ para $\alpha=0,05$	Quatro pontos apresentaram $J_{ei} > J_{crítico}$	Cinco pontos apresentaram $J_{ei} > J_{crítico}$	Exclusão dos pontos considerados <i>outlier</i>
Normalidade ( <i>Ryan-Jones</i> )	$R_{eq} \geq R_{crítico}$ para $\alpha=0,05$	$R_{eq}=0,9829$ $R_{crítico}=0,9554$	$R_{eq}=0,9743$ $R_{crítico}=0,9538$	Os resíduos seguem a distribuição normal
Independência dos resíduos ( <i>Durbin-Watson</i> )	$d_u < d_{calculado} < 4-d_u$ para $\alpha=0,05$	$d_u=1,4375$ $d_{cal}=1,5429$ $4-d_u=2,5625$	$d_u=1,4288$ $d_{cal}=1,5851$ $4-d_u=2,5712$	Não há correlação entre os resíduos (os resíduos são independentes)
Homocedasticidade ( <i>Brown-Forsythe</i> ou <i>Levene modificado</i> )	$t_L \leq t_{crítico}$ para $\alpha=0,05$	$t_L=0,4245$ $t_{crítico}=2,0796$	$t_L=0,9725$ $t_{crítico}=2,0860$	Há homocedasticidade entre os resíduos

Fonte: tabela construída com base nas informações disponíveis em SOUZA, 2007 e SOUZA; JUNQUEIRA, 2005.

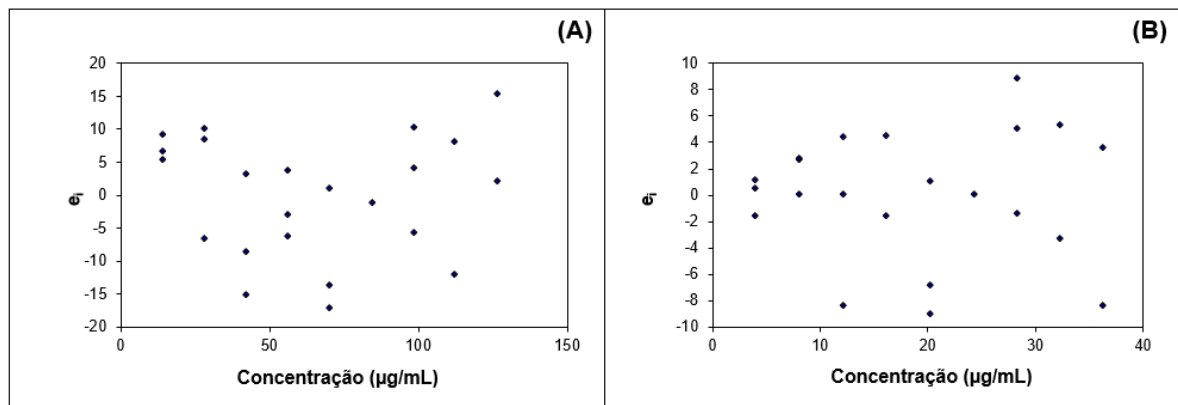
Diante dos resultados satisfatórios em relação às premissas, aplicou-se o MMQO e, assim, foi possível obter as curvas analíticas, as equações das retas e os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) para SLD e TAD, os quais são apresentados na **Figura 10**.

**Figura 10 – Curvas analíticas para avaliação da linearidade do método para o citrato de SLD (A) e para a TAD (B).**



Os gráficos de distribuição de resíduos são apresentados na **Figura 11**. Ao analisá-los, é possível verificar uma distribuição aleatória dos pontos e, portanto, ausência de qualquer tendência.

**Figura 11 – Gráficos de distribuição de resíduos para o conjunto de dados do SLD (A) e da TAD (B).**



A avaliação da significância do coeficiente angular das equações das retas obtidas, para o SLD e para a TAD, demonstrou que o p-valor do teste F da ANOVA é menor que 0,05. Portanto, rejeitou-se a hipótese nula (coeficiente angular igual a zero) ao nível de significância de 5% e concluiu-se que o coeficiente angular é significativamente diferente de zero, conforme preconizado na RDC nº 166/2017 (ANVISA) (BRASIL, 2017).

Em relação à avaliação estatística do coeficiente linear da equação da reta obtida para o SLD, utilizando-se o teste t de Student, foi obtido um p-valor de 0,0317, que é menor que 0,05. Dessa forma, rejeitou-se a hipótese nula (intercepto igual a zero) ao

nível de significância de 5%. Já ao avaliar os dados obtidos para a TAD foi encontrado um p-valor de 0,7509, ou seja, o coeficiente linear não é significativamente diferente de zero e, nesse caso, a curva analítica passa pela origem.

Quando é encontrado intercepto (coeficiente linear) estatisticamente diferente de zero e com magnitude significativa frente às respostas analíticas, como foi o caso do SLD, é recomendado a utilização de uma curva de calibração, ao invés de um ponto único, para a quantificação das amostras na rotina de análise (PORTAL ACTION, 2020b). Dessa forma, uma vez que, a reta obtida para o SLD não passa pela origem, seguiu-se a recomendação, e então a quantificação dos analitos nas amostras foram realizadas utilizando-se sempre uma curva de calibração construída a partir de soluções padrão a 20%, 100% e 180% das concentrações de trabalho (70 µg/mL para citrato de SLD e 20 µg/mL para TAD).

Os coeficientes de correlação (R) obtidos para ambas as curvas foi de 0,9999 e está de acordo com o preconizado na Resolução RDC nº 166/2017 (ANVISA), na qual é descrito que o critério mínimo aceitável para um método ser considerado linear, é que a curva analítica apresente um R maior ou igual a 0,990 (BRASIL, 2017). Entretanto, de acordo com Thompson, Ellison e Wood (2002), o R é inadequado para indicar a falta de ajuste ao modelo linear, não devendo ser utilizado como teste de linearidade (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). R e R<sup>2</sup> indicam o grau de ajuste dos dados à curva, independente do modelo. Contudo, valores de R próximos a 1, não pertencem necessariamente a uma relação linear, podendo resultar de pontos bem ajustados a um modelo não linear (RSC, 2005; SOUZA, 2007).

Diante disso, realizou-se a análise da variância (ANOVA) para determinar a significância da regressão e do desvio de linearidade. Com os resultados obtidos, conclui-se que a regressão é estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) e que não há desvio de linearidade ( $p > 0,05$ ) tanto para o conjunto de dados referentes ao SLD quanto à TAD, ou seja, o método demonstrou ser linear na faixa de 14-126 µg/mL para o citrato de SLD e 4-36 µg/mL para a TAD.

#### 6.7.4 Precisão e exatidão

Os resultados das porcentagens de recuperação de SLD e TAD obtidos para os níveis avaliados (20%, 100% e 180% das concentrações de trabalho) em dois dias de análise, e os respectivos valores de DPR obtidos, estão apresentados na **Tabela 19**.

**Tabela 19 - Porcentagens de recuperação de SLD e TAD e DPR obtidos para a avaliação da exatidão e precisão do método analítico.**

	Nível*	SLD		TAD	
		Recuperação média (%)	DPR (%)	Recuperação média (%)	DPR (%)
Dia 1 (intradia)	20%	101,34	0,0725	99,99	0,4544
	100%	99,59	1,8490	100,05	0,2439
	180%	100,65	0,3716	100,21	0,4014
Dia 2 (intradia)	20%	99,60	1,6344	101,82	0,1088
	100%	101,72	0,5306	101,62	0,4227
	180%	98,89	1,8102	101,17	0,1532
Interdias	20%	100,47	1,3955	100,90	1,1279
	100%	100,66	1,6733	100,83	0,9070
	180%	99,77	1,5098	100,69	0,5894

\*Em relação às concentrações de trabalho.

Os valores de recuperação média, nos dois dias de análise, encontraram-se entre 98% e 102%, indicando que o método apresentou exatidão adequada (INMETRO, 2018). Os DPR encontrados para cada nível, em cada dia de análise (repetibilidade) e, considerando-se os dois dias de análise (precisão intermediária), estão de acordo com Green (1996), visto que tais valores são inferiores a 2,0%. Deste modo, conclui-se que o método apresenta precisão satisfatória.

#### 6.7.5 Robustez

Após a realização dos testes de robustez, obtiveram-se os valores de teor para SLD e TAD em cada um dos experimentos realizados e o efeito de cada variável foi calculado (**Tabela 20**).

Tabela 20 – Avaliação do efeito das variáveis na determinação de SLD e TAD por UHPLC.

	Temperatura (A/a)	Vazão (B/b)	Volume injeção (C/c)	Fornecedor ACN (D/d)	pH eluyente aquoso (E/e)	$\lambda$ deteccão (F/f)	Composição fase móvel (G/g)	Teor SLD (%)	Teor TAD (%)
	A	B	C	D	E	F	G	99,88	100,40
	A	B	c	D	e	f	g	100,51	100,96
	A	b	C	d	E	f	g	100,22	100,49
	A	b	c	d	e	F	G	100,02	100,57
	a	B	C	d	e	F	g	99,86	100,25
	a	B	c	d	E	f	G	100,21	100,50
	a	b	C	D	e	f	G	100,16	100,64
	a	b	c	D	E	F	g	100,23	100,55
<b>Efeito SLD</b>	0,04	-0,04	-0,21	0,12	0,00	-0,28	-0,14	-	-
<b>Efeito TAD</b>	0,12	-0,03	-0,20	0,19	-0,12	-0,20	-0,03	-	-

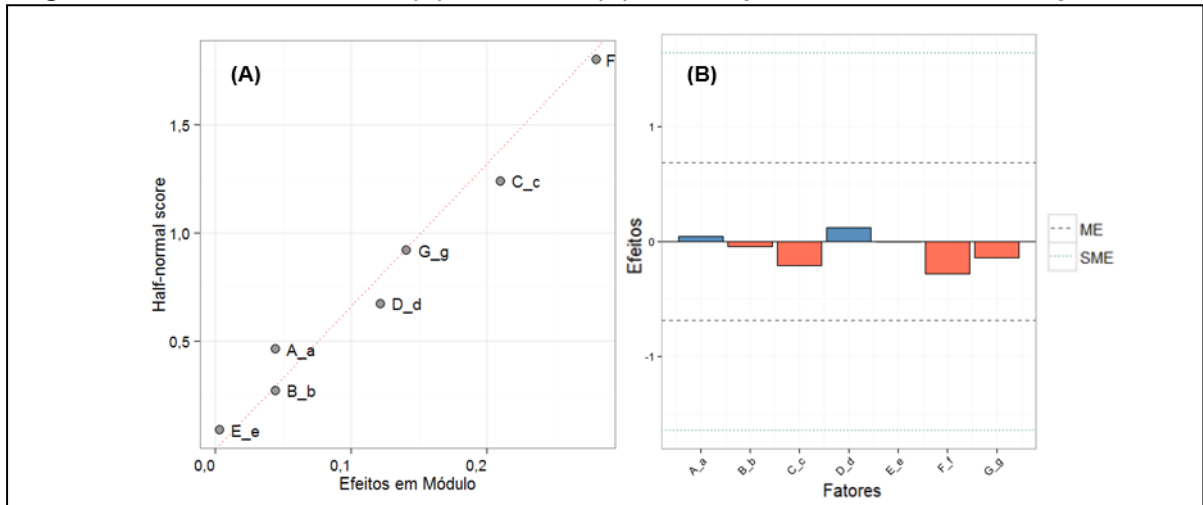
Os gráficos de Daniel e Lenth são apresentados nas **Figuras 12 e 13** para o SLD e a TAD, respectivamente. A análise desses gráficos é uma maneira objetiva para definir quais efeitos são significativos na análise de experimentos sem réplicas.

O gráfico de Daniel trata-se de um gráfico de probabilidade half-normal dos efeitos, no qual, os efeitos cujos pontos estiverem claramente afastados de uma linha de ajuste de distribuição, formada pela nuvem de pontos, serão julgados ativos, ou seja, efeitos estatisticamente significativos (DANIEL, 1959; PORTAL ACTION, 2020a).

No gráfico de Lenth é expressa uma margem de erro (ME). Variáveis que excedem o valor de ME são consideradas significativas. No entanto, quando há muitas variáveis, pode ocorrer de uma ou duas, mesmo que não significativas, exceder o valor de ME, conduzindo a uma falsa conclusão. Por isso, é definida uma margem de erro simultânea (SME). Constrói-se então um gráfico de barras mostrando os valores absolutos dos efeitos estimados e adiciona-se as linhas de referências com os valores de ME e SME. As variáveis cujas barras ultrapassam a linha SME são consideradas significativas, enquanto aqueles cujas barras não extrapolam a linha de referência ME são consideradas não significativas. A região entre as linhas ME e SME é dita região de incerteza e, para variáveis cujas barras estão nesse intervalo, é necessário analisar minuciosamente e fundamentar a decisão da variável ser significativa ou não (LENTH, 1989; PORTAL ACTION, 2020a).

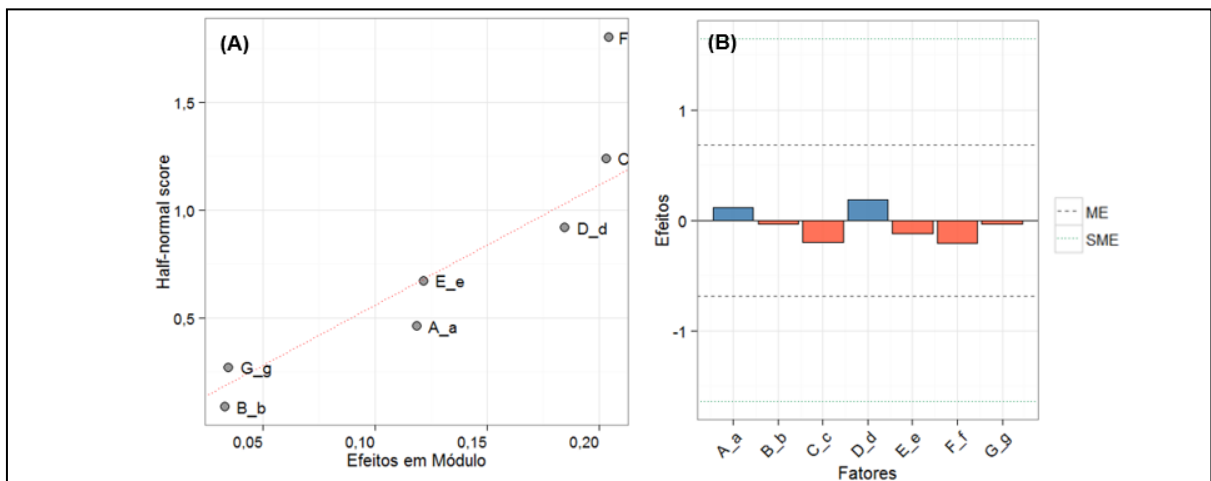
Ao observar as **Figuras 12 e 13**, verifica-se que nos gráficos de Daniel não é possível perceber deslocamento significativo de nenhum dos fatores em relação à reta e, ao analisar o gráfico de Lenth, não são observados fatores que ultrapassam a ME. Dessa forma, conclui-se que não foram detectados efeitos ativos, ou seja, o método foi robusto para todas as variações testadas, tanto para a quantificação do SLD quanto da TAD.

**Figura 12 – Gráficos de Daniel (A) e de Lenth (B) obtidos para o teste de robustez para SLD.**



**Legenda:** ME = margem de erro dos contrastes; SME = margem de erro simultânea.

**Figura 13 – Gráficos de Daniel (A) e de Lenth (B) obtidos para o teste de robustez para TAD.**



**Legenda:** ME = margem de erro dos contrastes; SME = margem de erro simultânea.

### 6.7.6 Limites de detecção e de quantificação

Os limites de detecção e quantificação teóricos, estimados pelas curvas analíticas, proporcionaram uma relação sinal/ruído muito superiores a dois e dez,



respectivamente. Então diluições foram realizadas para determinar os limites reais do método analítico. Os limites de detecção e quantificação obtidos foram de 0,0014 e 0,0042 µg/mL, respectivamente, para citrato de SLD e 0,0022 e 0,0068 µg/mL, respectivamente, para TAD.

### 6.7.7 Testes de seletividade e recuperação para diferentes diluentes

Os cromatogramas obtidos a partir da injeção de mistura de acetonitrila e água (*Diluyente 1*), ácido clorídrico 0,01 M e laurilsulfato de sódio 0,5% (p/v) apresentaram o mesmo perfil e não apareceram picos provenientes desses diluentes eluindo nos tempos de retenção do SLD e da TAD. Assim o método também é seletivo quando se utiliza ácido clorídrico e laurilsulfato de sódio como diluentes das amostras.

Foram obtidas as áreas sob os picos de SLD e TAD em cada um dos níveis, para soluções amostra preparadas com diluentes constituídos por mistura de acetonitrila e água; ácido clorídrico 0,1 M e laurilsulfato de sódio 0,5% (p/v), bem como a comparação estatística pelo teste F de ANOVA, apresentada na **Tabela 21**.

**Tabela 21– Áreas sob os picos do SLD e da TAD e comparação estatística quando são utilizados diferentes diluentes.**

Nível*	Área sob o pico do SLD (mAu.s)				Área sob o pico da TAD (mAu.s)			
	Mistura de acetonitrila e água	Ácido clorídrico 0,01 M	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>	Mistura de acetonitrila e água	Laurilsulfato de sódio 0,5% (p/v)	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>
20%	243904	244280	0,2983	7,7086	114905	117532	0,6771	7,7086
	241763	246198			121177	115177		
	248586	238910			115253	112417		
Média	244751	243129			117112	115042		
DPR (%)	1,4257	1,5538			3,0099	2,2254		
100%	1343636	1277288	2,5333	7,7086	617179	627348	0,2631	7,7086
	1313008	1209227			624517	624234		
	1292984	1307521			634843	615316		
Média	1316543	1264679			625513	622299		
DPR (%)	1,9377	3,9809			1,4187	1,0035		
180%	2298337	2367138	0,1009	7,7086	1125618	1109381	2,4798	7,7086
	2387607	2269926			1176820	1136965		
	2376562	2382483			1151060	1127539		
Média	2354169	2339849			1151166	1124628		
DPR (%)	2,0672	2,6087			2,2239	1,2467		

\*Em relação às concentrações de trabalho.

Ao analisar a **Tabela 21**, percebe-se que, para todos os níveis avaliados, não houve diferença estatística entre soluções amostra de SLD preparadas com diluente

constituído por acetonitrila e água e preparadas com ácido clorídrico 0,01 M. E também não foi observada diferença estatística entre as soluções amostra de TAD preparadas com diluente constituído por acetonitrila e água e preparadas com laurilsulfato de sódio 0,5% (p/v), uma vez que  $F_{\text{calculado}}$  foi inferior ao  $F_{\text{tabelado}}$  em ambos os casos. Então, não há diferença estatística entre as médias dos grupos comparados.

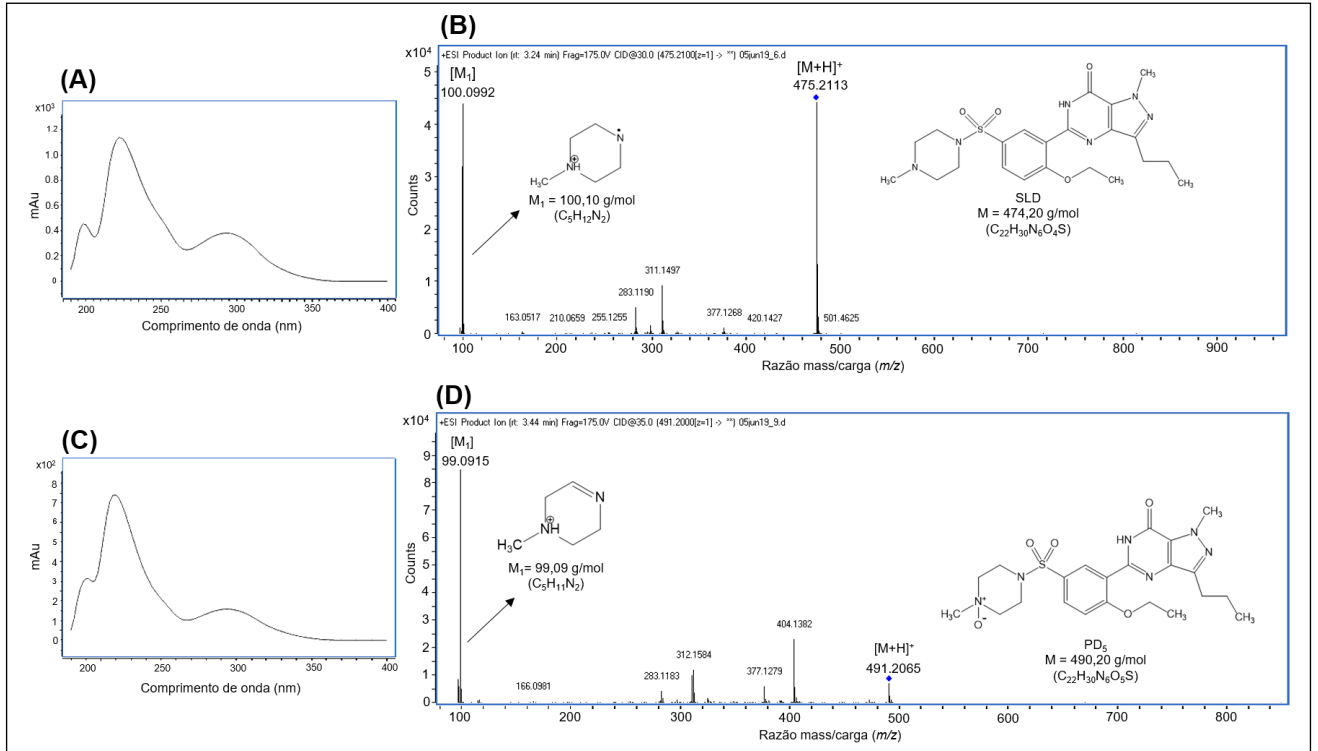
Sendo assim, conclui-se que o método analítico desenvolvido e validado conforme descrito anteriormente, pode ser aplicado nos testes de identificação, doseamento, uniformidade de conteúdo e também, para a determinação da cedência de comprimidos contendo SLD e TAD quando são utilizados como meios de dissolução ácido clorídrico 0,01 M para comprimidos contendo SLD e laurilsulfato de sódio 0,5% (p/v) para comprimidos contendo TAD.

### 6.8 Propostas de elucidação estrutural dos principais produtos de degradação

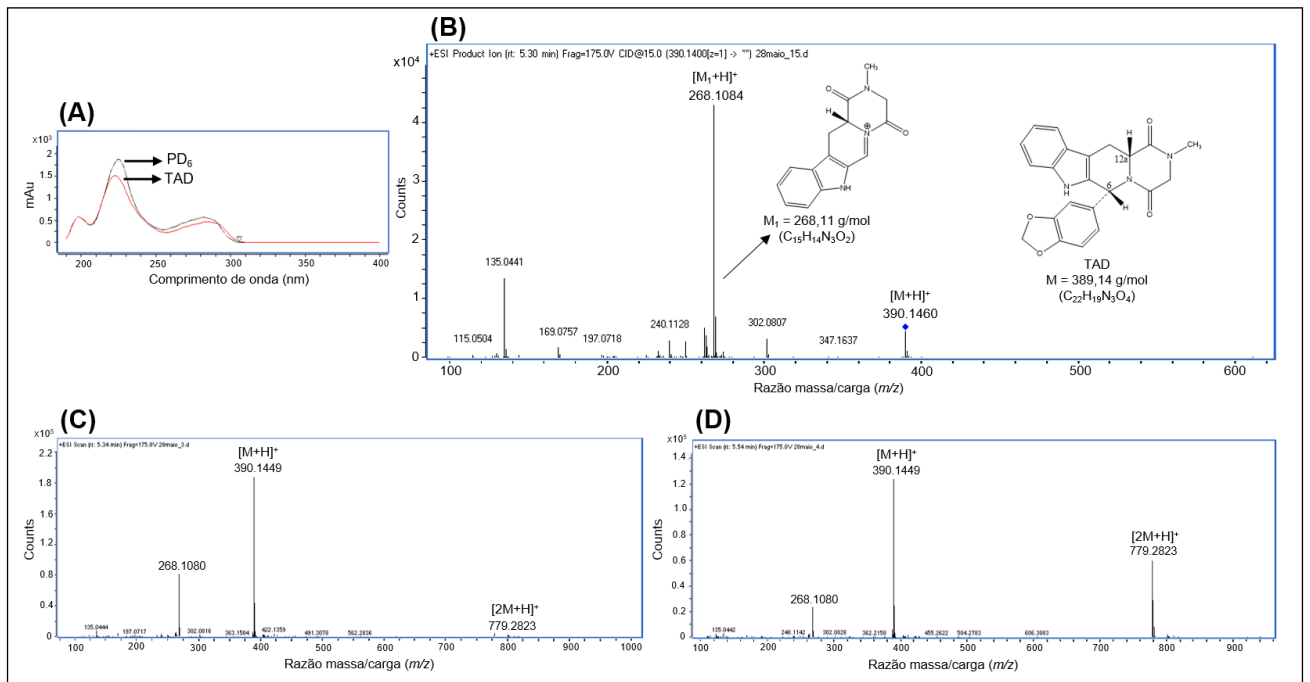
Os espectros de absorção no ultravioleta e de massas das soluções padrão contendo citrato de SLD e TAD a 100 µg/mL e amostras provenientes da degradação em meio ácido, alcalino e oxidativo foram obtidas utilizando-se um sistema UHPLC-Q-TOF-MS. Os espectros de massas de fragmentação e aqueles fornecidos pelo detector ultravioleta, para as amostras analisadas são apresentados nas **Figuras 14 e 15**.

SLD apresentou íon precursor ( $[M + H]^+$ ) com razão  $m/z$  de 475,21 e íon produto com  $m/z$  de 100,10 (**Figura 14A e 14B**). Para a TAD o íon precursor apresentou razão  $m/z$  de 390,15 e principal fragmento com  $m/z$  de 268,11, como mostrado na **Figura 15B**. Os íons precursores e os principais íons produto obtidos para os produtos de degradação majoritários, PD<sub>5</sub> e PD<sub>6</sub>, foram  $m/z$  491,21 →  $m/z$  99,09 (**Figura 14D**) e  $m/z$  390,14 →  $m/z$  268,11, respectivamente (**Figura 15D**).

**Figura 14 – Espectro no UV do SLD (A); espectro de fragmentação (MS2 full-scan) do SLD (B); espectro no UV do PD5 (C) e espectro de fragmentação (MS2 full-scan) do PD5.**



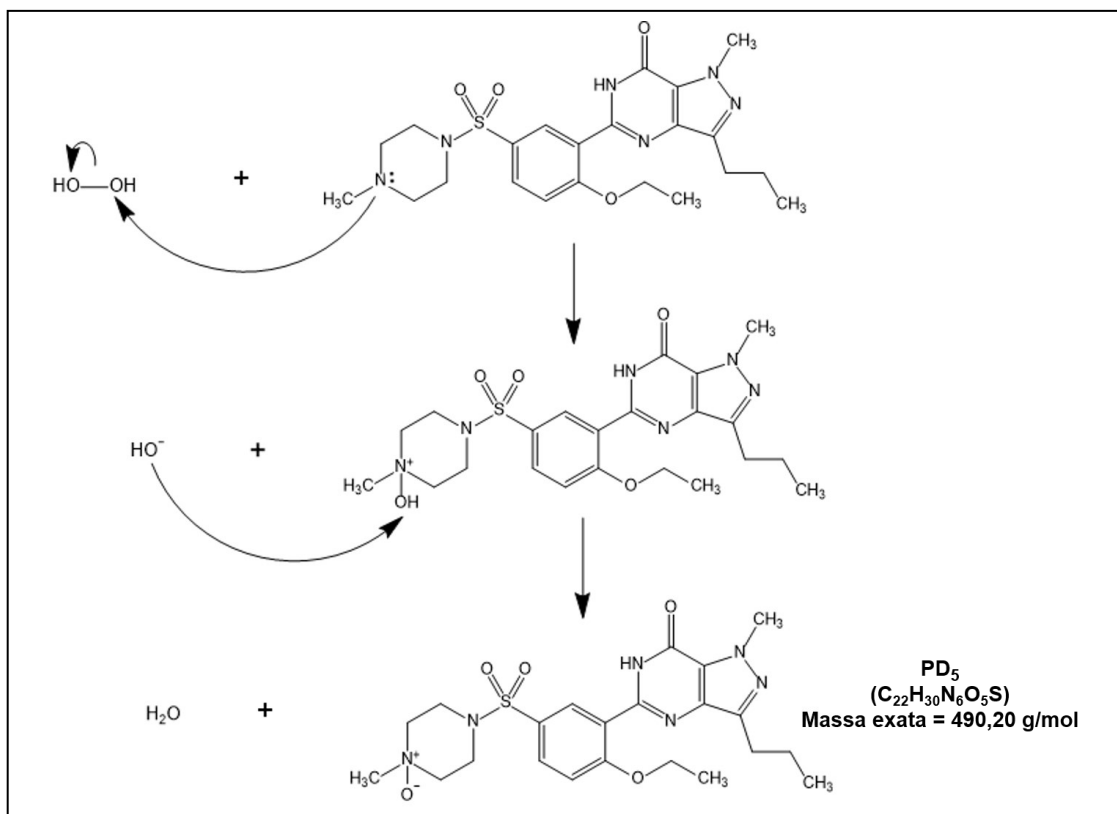
**Figura 15 – Espectros no UV da TAD e do PD6 sobrepostos (A); espectro de fragmentação (MS2 full-scan) da TAD (B); espectro de varredura (MS1 full-scan) da TAD (C) e espectro de varredura (MS1 full-scan) do PD6.**



Em meio oxidativo, SLD formou PD5 (m/z 475,20 → m/z 99,09), que provavelmente corresponde ao N-óxido de sildenafil, de fórmula molecular C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>S, derivado

do mecanismo de oxidação de aminas terciárias a óxidos de amina (HOVORKA; SCHÖNEICH, 2001). A proposta de mecanismo de formação do PD<sub>5</sub> encontra-se na **Figura 16**.

**Figura 16 – Proposta de mecanismo de formação e estrutura do PD<sub>5</sub>.**



Na **Figura 14C** é apresentado o espectro no UV do PD<sub>5</sub> e na **Figura 14D** é mostrado o espectro de massas de fragmentação (MS2 *full-scan*) e a provável estrutura química do PD<sub>5</sub> (ACEÑA *et al.*, 2014).

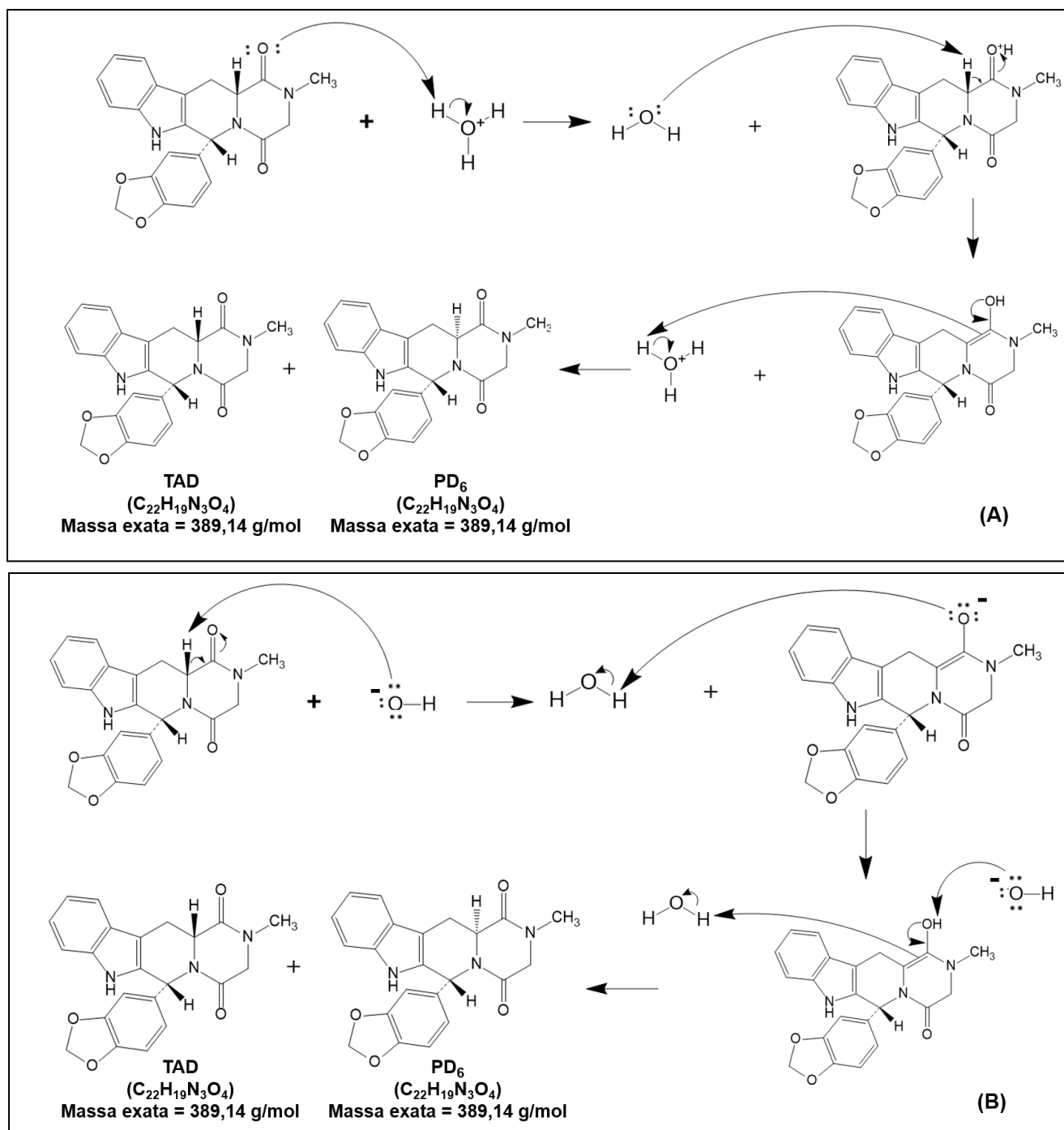
O principal produto de degradação proveniente da TAD, formado em meios ácido e alcalino (PD<sub>6</sub>), além de possuir os mesmos tempos de retenção, apresentaram o mesmo espectro UV e de massas na análise por UHPLC-Q-TOF-MS. O comprimento de onda máximo da TAD e do PD<sub>6</sub> diferiu em 2 nm (**Figura 15A**) e o espectro de varredura (MS1 *full-scan*) mostraram uma diferença de ionização entre esses compostos, com PD<sub>6</sub> apresentando um sinal significativamente mais intenso referente a [2M+H]<sup>+</sup> do que o sinal observado no espectro da TAD (**Figura 15C** e **15D**). No entanto, PD<sub>6</sub> e TAD não podem ser diferenciados pelo espectro de

fragmentação (MS2 *full-scan*). Dessa forma, provavelmente, PD<sub>6</sub> trata-se de um diastereoisômero da TAD.

Como pode ser observado na **Figura 1B**, a TAD é um composto opticamente ativo. Ela contém dois centros quirais de configuração 6R,12aR e, pode haver dois estereoisômeros *cis* (6R,12aR / 6S,12aS) e dois *trans* (6R,12aS / 6S,12aR) para essa molécula (KEE *et al.*, 2019).

Venhuis *et al.* (2010) descreveram um método por HPLC-DAD-MS capaz de separar a TAD do diastereoisômero *trans*-tadalafila encontrados em medicamentos falsificados. Para identificar de qual dos diastereoisômeros se tratava (a TAD é o 6R,12aR e os possíveis diastereoisômeros são 6R,12aS ou 6S,12aR), os pesquisadores realizaram um teste de rotação óptica e concluíram que correspondia ao (-)-*trans*-tadaladila, ou seja, 6R,12aS. Venhuis e colaboradores (2010) determinaram também, o espectro de varredura no UV da TAD e do diastereoisômero 6R,12aS, mostrando uma diferença de 2 nm entre os máximos de absorção desses analitos. Adicionalmente, o espectro de massas de varredura (MS1 *full-scan*) mostrou uma diferença de ionização entre os compostos, de forma que o diastereoisômero 6R,12aS apresentou um sinal muito mais intenso do íon de  $m/z$   $[2M+H]^+$  do que o sinal referente a esse íon no espectro da TAD, apesar dos dois não poderem ser distinguidos pelo espectro de fragmentação (MS2 *full-scan*). Os resultados referentes aos espectros UV e de massas foram os mesmos obtidos no presente trabalho para TAD e PD<sub>6</sub>. Portanto, é provável que PD<sub>6</sub> corresponda ao diastereoisômero 6R,12aS, formado via tautomerismo ceto-enólico de acordo com os mecanismos mostrados na **Figura 17**.

Figura 17 – Proposta de mecanismo de formação e estrutura do PD<sub>6</sub> via tautomerismo ceto-enólico em meios ácido (A) e alcalino (B).



Outro fato que corrobora com essa hipótese é que Jida, Tourwé e Ballet (2014) descreveram que para ser formado o diastereoisômero 6S,12aR a partir da TAD faz-se necessária a ação de irradiação de micro-ondas, aquecimento extremo e presença de ácido, uma vez que, para que ocorra a conversão via epimerização, é necessário abertura de anel e adição intramolecular. Essa reação é muito mais

complicada e difícil de ocorrer, se comparada ao tautomerismo ceto-enólico, que ocorre em condições de reação mais moderadas, o qual é proposto para a formação do PD<sub>6</sub>.

Para comprovar com total segurança de qual diastereoisômero se trata, seria necessário utilizar a cromatografia quiral, uma vez que os possíveis diastereoisômeros da TAD são enantiômeros entre si (6R,12aS ou 6S,12aR). Entretanto, diante das evidências apresentadas, acredita-se que PD<sub>6</sub> trata-se do diastereoisômero 6R,12aS.

## **6.9 Análise dos medicamentos originais e apreendidos**

### **6.9.1 Caracterização física dos comprimidos originais e apreendidos**

A primeira etapa a ser realizada no momento de verificação da autenticidade dos medicamentos é a avaliação detalhada dos elementos existentes nas embalagens, como os padrões de impressão (fontes, figuras e hologramas). O passo seguinte consiste na avaliação do perfil físico dos comprimidos (aspectos visuais, medidas de dimensões e massa) (ORTIZ *et al.*, 2012a).

Sendo assim, as amostras apreendidas foram fotografadas (**Figura 18**) e uma avaliação detalhada dos elementos presentes nas embalagens foi realizada.

As embalagens, apesar de não possuírem homogeneidade na fonte, cor da letra, nas impressões na folha de alumínio laminado e na coloração do filme de material plástico, todas, exceto a amostra 3, apresentavam-se rotuladas como “*Pramil*<sup>®</sup> - *Sildenafil 50 mg*”. A amostra 3 era identificada como “*Erectalis*<sup>®</sup> 20 mg – *Tadalafil*”. As informações presentes em todas as embalagens primárias continham os dizeres em espanhol.

Apenas pela análise das embalagens, é possível concluir que as amostras apreendidas são medicamentos ilegais, uma vez que as mesmas não possuem registro na ANVISA e, portanto, não podem ser comercializadas em território brasileiro. Entretanto, devido às nítidas diferenças entre elas, é muito provável que

algumas ou todas as amostras possam ser falsificações dos medicamentos Pramil® e Erectalis®, os quais possuem registro no Paraguai.

**Figura 18 – Imagens das amostras de medicamentos apreendidos disponibilizadas pela PF e PCMG.**



A parte de alumínio do blíster das embalagens das amostras 1, 2, 6 e 8 apresentam-se muito semelhantes, possuindo a mesma fonte e cor de letra tanto nas informações contidas no verso, quanto na frente da embalagem, na qual encontram-se várias vezes a repetição da palavra “PRAMIL”. Nessas embalagens, encontra-se a mesma sequência de informações no verso: nome do medicamento, IFA, dose, forma farmacêutica e fabricante. A parte do revestimento plástico tem coloração azulada nas amostras 2, 6 e 8, mas na amostra 1 o plástico é transparente.



As embalagens das amostras 5, 7 e 10 são diferentes das demais e não apresentam a palavra “PRAMIL” na parte da frente do alumínio do blíster. A amostra 5 possui desenho da logomarca da fabricante impresso na cor azul no verso do blíster e o revestimento plástico do blíster possui coloração amarelada. Na embalagem da amostra 7 chama atenção a fonte da letra no verso do blíster, a qual é muito diferente das demais e o filme plástico é transparente. A amostra 10 possui no verso do blíster a logomarca (colorida) impressa várias vezes e o filme de revestimento do blíster é azul.

Os medicamentos autênticos, possuem em suas embalagens as informações que são obrigatórias, de acordo com a RDC nº 71/2009 (ANVISA), que estabelece as regras para a rotulagem de medicamentos (BRASIL, 2009). Ademais, as suas embalagens apresentam itens de segurança, tais como: tinta reativa (tinta que reage quimicamente quando raspada com objeto de metal, possibilitando visualizar a palavra “Qualidade” e a logomarca da empresa titular do registro), lacre ou selo de segurança e marcações holográficas.

Em relação às características físicas dos comprimidos apreendidos (**Tabela 22**), todas as amostras rotuladas como Pramil, apresentam-se na forma de comprimidos de cor azul e redondos. Com exceção da amostra 7, todas mostram-se não seccionadas e têm de um lado gravado a logomarca da empresa e do outro o código “PR”. A amostra 7 é a única que possui ranhura central em um dos lados e a gravação “50” do outro lado. Os comprimidos da amostra 1 possuem coloração azul nitidamente mais escura e um formato menos abaulado que as demais amostras apreendidas.

**Tabela 22 – Descrição e características físicas dos medicamentos apreendidos e originais.**

Amostra	Descrição	Peso médio (mg) / DPR (%)	Comprimento ou diâmetro (mm) / DPR (%)		Espessura (mm) / DPR (%)
			Maior	Menor	
Apreendida 1	Comprimidos de cor azul, redondos, de um lado gravado com a logo da empresa e do outro gravado "PR".	132,24 / 6,7171	7,11 / 0,9731	NA	3,07 / 8,5376
Apreendida 2	Comprimidos de cor azul, redondos, de um lado gravado com a logo da empresa e do outro gravado "PR".	125,30 / 1,0595	7,06 / 0,9419	NA	3,30 / 2,8020
Apreendida 3	Comprimidos de cor amarela, redondos, com ranhura central em um dos lados e liso no outro lado, não possui gravações	189,89 / 0,8635	8,17 / 2,4138	NA	3,71 / 1,6616
Apreendida 4	Comprimidos de cor azul, redondos, de um lado gravado com a logo da empresa e do outro gravado "PR".	126,13 / 0,5279	7,11 / 3,8814	NA	3,14 / 7,4432
Apreendida 5	Comprimidos de cor azul, redondos, de um lado gravado com a logo da empresa e do outro gravado "PR".	123,50 / 0,5795	7,12 / 1,6360	NA	3,14 / 2,9304
Apreendida 6	Comprimidos de cor azul, redondos, de um lado gravado com a logo da empresa e do outro gravado "PR".	125,62 / 1,1275	7,13 / 1,1096	NA	3,36 / 1,6817
Apreendida 7	Comprimidos de cor azul, redondos, com ranhura central em um dos lados e liso do outro lado, não possui gravações.	124,93 / 1,0285	7,11 / 0,7733	NA	3,06 / 1,3972
Apreendida 8	Comprimidos de cor azul, redondos, de um lado gravado com a logo da empresa e do outro gravado "PR".	125,51 / 0,5066	7,11 / 0,3298	NA	3,41 / 0,9646
Apreendida 9	Comprimidos de cor azul, redondos, de um lado gravado com a logo da empresa e do outro gravado "PR".	125,65 / 2,5719	7,04 / 1,7087	NA	3,44 / 0,6176
Apreendida 10	Comprimidos de cor azul, redondos, de um lado gravado com a logo da empresa e do outro gravado "PR".	127,40 / 1,9216	7,12 / 0,5047	NA	3,34 / 3,0800
Viagra 1	Comprimidos de cor azul, losangulares, com marcações (um lado "Pfizer" e do outro lado "VGR50").	316,76 / 0,9654	11,43 / 1,2581	8,29 / 1,0546	4,42 / 1,1903
Viagra 2	Comprimidos de cor azul, losangulares, com marcações (um lado "Pfizer" e do outro lado "VGR50").	314,74 / 1,1411	11,38 / 0,4384	8,28 / 0,8717	4,49 / 0,8190
Genérico SLD 1	Comprimidos de cor azul, pentagonais, lisos em ambos os lados, sem marcações.	313,78 / 0,7844	9,86 / 1,1184	NA	4,27 / 1,3776
Genérico SLD 2	Comprimidos de cor azul, oblongos, lisos em ambos os lados, sem marcações.	304,36 / 0,9276	13,25 / 0,5721	6,23 / 1,2973	4,32 / 0,8840
Cialis	Comprimidos de cor amarela, em forma de amêndoa, identificados em um dos lados pelo código "C20" e o outro lado liso.	364,20 / 0,0660	12,32 / NR	NA	5,10 / NR
Genérico TAD 1	Comprimidos brancos, em forma de amêndoa, lisos em ambos os lados, sem marcações.	370,54 / 0,3891	12,70 / 0,3393	NA	5,05 / 0,7922
Genérico TAD 2	Comprimidos de cor amarela, redondo, lisos em ambos os lados, sem marcações.	372,30 / 0,7842	10,26 / 0,1009	NA	4,91 / 0,6199
Genérico TAD 3	Comprimidos de cor amarela, redondo, lisos em ambos os lados, sem marcações.	360,88 / 0,9939	10,22 / 0,3004	NA	4,61 / 0,7462

**Legenda:** NA = não se aplica; NR = não realizado.

Ao verificar os valores de peso médio (**Tabela 22**), conclui-se que os comprimidos rotulados como Pramil apresentam peso médio muito inferior aos comprimidos contendo SLD autênticos. Da mesma forma, os comprimidos da amostra 3 apresentam massa muito inferior se comparada à massa dos comprimidos contendo TAD originais. As demais dimensões (comprimento e espessura) dos comprimidos apreendidos também são inferiores às dos comprimidos autênticos. A amostra apreendida 1 foi a que apresentou um DPR mais elevado em relação às massas e à espessura dos comprimidos. Do mesmo modo, os valores de DPR obtidos para o comprimento e espessura da amostra apreendida 4 foram muito altos. Essa maior variabilidade pode ser um indício de falta de padronização e ausência de controle de qualidade rigoroso durante o processo de fabricação destes comprimidos.

Os comprimidos autênticos contendo SLD ou TAD apresentam formatos diferentes entre si, mas possuem uma padronização adequada entre as unidades de um mesmo lote, apresentando baixos valores de DPR (inferior a 1,40%) entre as medições de massa, comprimento e espessura analisadas (**Tabela 22**). Isto se deve à utilização de tecnologias avançadas na fabricação dos comprimidos, aplicação das BPF e de um rigoroso controle de qualidade durante o processo produtivo e antes da aprovação do lote para comercialização.

Dessa forma, por meio do perfil físico dos comprimidos, foi possível diferenciar e identificar a ilegalidade dos medicamentos apreendidos, uma vez que todas as amostras obtidas foram contrabandeadas, ou seja, não possuem registro na ANVISA, não sendo portanto, permitida a sua comercialização no Brasil. A investigação das embalagens e a determinação das características físicas dos medicamentos é uma maneira rápida, não destrutiva e reproduzível que pode contribuir para a conclusão de inautenticidade das amostras apreendidas antes das análises químicas, além de ser uma perspectiva útil para investigar possível origem da falsificação (ORTIZ *et al.*, 2012a).

### **6.9.2 Aplicação do método: avaliação da qualidade dos medicamentos originais e apreendidos**

Para verificar as características dos medicamentos, os quais estão disponíveis ao usuário no mercado, sejam eles ilegais ou genuínos, aplicou-se o método desenvolvido e validado na avaliação da qualidade desses produtos.

Ao realizar o teste de doseamento, além de determinar o teor nas amostras, foi possível proceder à identificação do IFA em cada uma das amostras, por meio da comparação do tempo de retenção do pico principal obtido no cromatograma das amostras com o tempo de retenção dos picos obtidos no cromatograma da solução padrão a 100% das concentrações de trabalho dos fármacos, que foram de 3,44 min para o SLD e 5,43 min para a TAD. Na **Tabela 23** encontram-se os valores de tempo de retenção e de teor obtidos a partir da análise dos comprimidos originais e apreendidos.

**Tabela 23 – Resultados obtidos no teste de identificação e doseamento das amostras apreendidas e autênticas contendo SLD e TAD.**

<b>Amostra</b>	<b>T<sub>R</sub> (min)</b>	<b>IFA identificado</b>	<b>Teor (%)</b>
Apreendida 1	3,35	SLD	27,61
Apreendida 2	3,36	SLD	98,09
Apreendida 3	5,51	TAD	101,35
Apreendida 4	3,33	SLD	92,74
Apreendida 5	3,32	SLD	92,78
Apreendida 6	3,32	SLD	97,64
Apreendida 7	3,31	SLD	98,92
Apreendida 8	3,33	SLD	94,82
Apreendida 9	3,30	SLD	93,33
Apreendida 10	3,33	SLD	100,98
Viagra 1	3,31	SLD	99,64
Viagra 2	3,25	SLD	101,21
Genérico SLD 1	3,30	SLD	99,29
Genérico SLD 2	3,31	SLD	98,80
Genérico TAD 1	5,46	TAD	100,80
Genérico TAD 2	5,46	TAD	102,34
Genérico TAD 3	5,44	TAD	100,00

Nos cromatogramas das amostras analisadas, foram observados apenas um pico referente ao IFA, não estando presente picos secundários relacionados a impurezas e produtos de degradação. Entretanto, ressalta-se que, o fato de serem desconhecidos os procedimentos de fabricação, embalagem, transporte e

armazenamento desses produtos, os mesmos podem conter contaminantes inorgânicos e/ou microbiológicos, por exemplo, os quais não foram avaliados no presente estudo, e que podem ser prejudiciais à saúde do paciente.

Como pode ser observado ao analisar a **Tabela 23**, por meio do teste de identificação pelo tempo de retenção do pico principal, foi possível comprovar que todas as amostras que continham a descrição do IFA em sua embalagem, realmente continham esse IFA. Para as amostras que não apresentavam embalagem (4 e 9), foi possível identificar a presença de SLD nas mesmas.

Em relação ao teste de doseamento, todas as amostras analisadas apresentaram teor em conformidade com a especificação farmacopeica (mínimo de 90,0% e máximo de 110,0% do valor rotulado), com exceção da amostra apreendida 1, que apresentou teor de 27,61% do valor rotulado de SLD, ou seja, correspondente a 13,81 mg de SLD, valor muito inferior à especificação (THE UNITED, 2019). Algumas amostras apreendidas (4, 5 e 9), apesar de possuírem teor de acordo com a especificação, apresentaram valores de teor próximo ao limite inferior, o que não acontece com os medicamentos autênticos, os quais apresentam teores muito próximos a 100%.

A presença do IFA na formulação em teor adequado à especificação farmacopeica, durante todo o seu prazo de validade, é fundamental para a qualidade do medicamento, uma vez que a administração de doses incorretas pelos pacientes pode provocar inefetividade terapêutica (teor inferior) ou efeitos toxicológicos (teor superior à especificação), podendo até mesmo ser letal ao paciente.

Quanto ao teste de uniformidade de conteúdo, os resultados estão apresentados na **Tabela 24**. Com exceção da amostra apreendida 1, todas as unidades de comprimidos analisadas apresentaram conteúdo do IFA adequado e VA inferior a 15,0. Os comprimidos da amostra apreendida 1, além de conteúdo de SLD inferior à especificação, apresentaram grande variação (DPR de 9,21%) entre as unidades testadas, comprovando mais uma vez a falta de padrões de qualidade durante a fabricação dessa amostra.

O resultado advindo do teste de uniformidade de doses unitárias é um parâmetro importante para avaliar se os padrões de qualidade estão sendo seguidos durante a fabricação do medicamento, uma vez que, uma mistura inadequada ou não criteriosa do pó dos comprimidos, por exemplo, pode resultar em elevadas variações de teor entre as unidades de um mesmo lote.

**Tabela 24 – Resultados obtidos no teste de uniformidade de conteúdo das amostras apreendidas e autênticas contendo SLD e TAD.**

<b>Amostra</b>	<b>Comprimido</b>	<b>Teor (%)</b>	<b>Teor médio (%)</b>	<b>DPR (%)</b>	<b>Valor de Aceitação (VA)</b>
Apreendida 1	1	25,78	26,14	9,21	78,13
	2	25,54			
	3	29,50			
	4	23,77			
Apreendida 2	1	98,11	97,06	1,53	5,01
	2	96,01			
Apreendida 3	1	100,96	101,75	1,06	2,84
	2	101,14			
	3	101,56			
Apreendida 6	1	96,17	98,31	3,07	7,45
	2	100,44			
Apreendida 10	1	99,01	99,91	0,92	2,20
	2	101,12			
	3	99,45			
	4	100,06			
Viagra 1	1	98,83	99,55	0,85	2,03
	2	99,20			
	3	100,77			
	4	99,42			
Viagra 2	1	98,69	100,08	1,72	4,41
	2	102,01			
	3	99,55			
Genérico SLD 1	1	100,01	100,15	0,84	2,02
	2	99,20			
	3	100,11			
	4	101,25			
Genérico SLD 1	1	93,36	95,53	2,02	7,61
	2	95,85			
	3	97,98			
	4	94,91			
Genérico TAD 1	1	100,56	100,65	0,80	1,94
	2	99,89			
	3	101,50			
Genérico TAD 2	1	102,25	101,90	0,36	1,27
	2	101,94			
	3	101,52			
Genérico TAD 3	1	101,31	102,12	0,89	2,79
	2	101,94			
	3	103,10			

Referente ao teste de dissolução, os resultados de cedência após 15 minutos do início do teste de dissolução das amostras de comprimidos contendo SLD (**Tabela**

25) mostram que todas as unidades, com exceção da amostra apreendida 1, estão de acordo com a especificação da Farmacopeia Americana, uma vez que todas apresentaram cedência superior a 85% (THE UNITED, 2019).

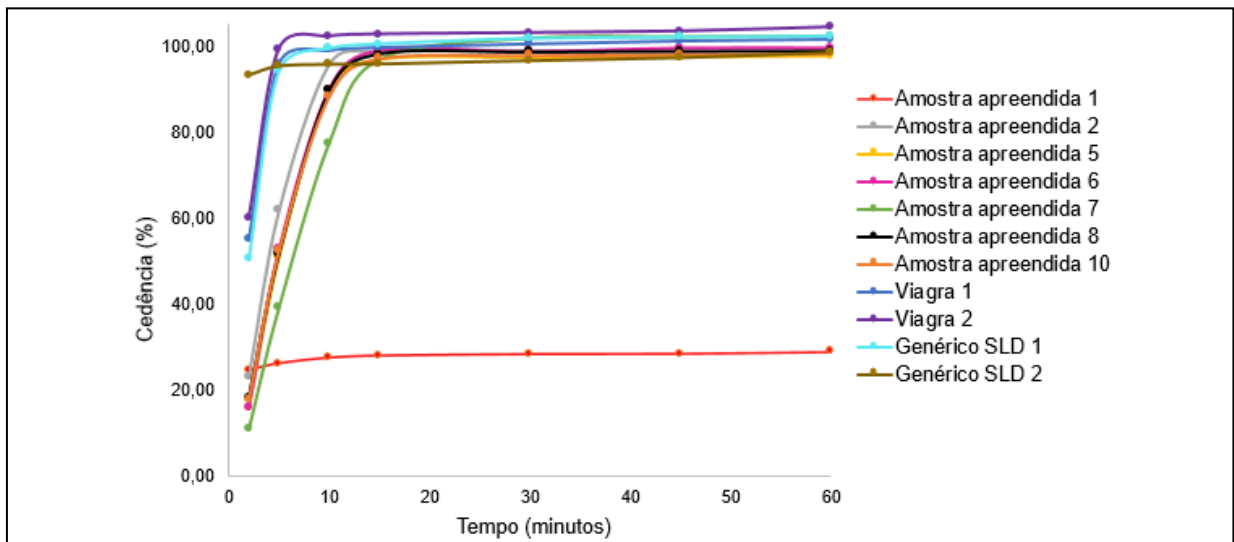
**Tabela 25 - Resultados obtidos no teste de dissolução para os comprimidos contendo SLD.**

<b>Amostra</b>	<b>Unidade</b>	<b>Cedência (%) em 15 min</b>	<b>Cedência média (%) em 15 min</b>	<b>DPR (%)</b>
Apreendida 1	1	27,26	28,01	7,92
	2	30,51		
	3	26,27		
Apreendida 2	1	98,99	100,01	0,92
	2	100,25		
	3	100,79		
Apreendida 5	1	98,48	98,07	0,59
	2	97,66		
	2	96,18		
	3	94,23		
Apreendida 6	1	99,48	100,11	0,89
	2	100,74		
Apreendida 7	1	97,57	98,39	1,18
	2	99,21		
Apreendida 8	1	98,93	99,42	0,90
	2	98,87		
	3	100,45		
Apreendida 10	1	99,77	98,31	1,51
	2	98,36		
	3	96,81		
Viagra 1	1	98,82	100,04	1,06
	2	99,60		
	3	99,23		
	4	101,59		
	5	100,98		
	6	100,04		
Viagra 2	1	102,61	103,07	1,51
	2	104,92		
	3	100,69		
	4	103,97		
	5	102,10		
	6	104,12		
Genérico SLD 1	1	102,66	100,90	1,80
	2	100,35		
	3	102,43		
	4	99,65		
	5	102,16		
	6	98,16		
Genérico SLD 2	1	93,24	94,85	1,49
	2	96,18		
	3	94,23		
	4	96,04		
	5	96,09		
	6	93,34		

As unidades da amostra apreendida 1, apresentaram cedência inferior à especificação, o que já era esperado, uma vez que, de acordo com os resultados obtidos nos testes de doseamento e uniformidade de conteúdo apresentados anteriormente, essa amostra possui teor de SLD muito abaixo da especificação. Além de uma cedência abaixo da especificação, o DPR entre a cedência das unidades da amostra apreendida 1, também foi elevado (7,92%), indicando uma falta de padronização entre as unidades, confirmando a ausência de qualidade desses comprimidos.

A partir dos dados de porcentagens de cedência e dos tempos de coleta (2, 5, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos), os perfis de dissolução para os medicamentos originais e apreendidos contendo SLD foram construídos e são apresentados na **Figura 19**. Observa-se que a amostra apreendida 1 libera todo o conteúdo de SLD que possui, de maneira imediata e o mesmo dissolve no meio de dissolução instantaneamente. Entretanto, como o conteúdo de SLD nessa amostra é muito baixo, a curva do perfil de dissolução apresenta-se muito distante das curvas de perfil de dissolução das demais amostras.

**Figura 19 – Perfil de dissolução das amostras contendo SLD.**



Em relação às amostras originais, percebe-se que os dois lotes de Viagra e o genérico SLD 1, apresentam perfis de dissolução muito semelhantes. As amostras de genérico SLD 1 liberam todo o conteúdo de SLD, que se dissolve no meio



prontamente, uma vez que, no primeiro tempo de coleta (2 minutos) a cedência média foi de 93,03%.

As amostras apreendidas podem ser divididas em alguns grupos, de maneira que as amostras 5, 6, 8 e 10 apresentam perfis sobrepostos, a amostra 2 possui perfil bastante semelhante a esse grupo, entretanto, com liberação e dissolução do SLD um pouco mais rápida. A amostra 7 apresenta um perfil de liberação um pouco mais lento que as demais. Mas todas elas liberaram praticamente todo o seu conteúdo de SLD ao final de 30 minutos.

Os comprimidos são obtidos a partir da compressão de uma mistura contendo o(s) IFA(s) e excipientes, que apresentam variadas funções. Eles podem ser formulados de forma a apresentar liberação imediata ou liberação modificada, de acordo com os excipientes utilizados e os processos de fabricação empregados. Todos os comprimidos contendo SLD analisados apresentaram liberação imediata e, com exceção da amostra apreendida 1, todos os lotes mostraram cedência superior a 85% após 15 minutos do início do teste de dissolução.

Para as amostras contendo TAD, os resultados de cedência após 10 e 30 minutos do início do teste de dissolução são apresentados na **Tabela 26**.

**Tabela 26 - Resultados obtidos no teste de dissolução para os comprimidos contendo TAD.**

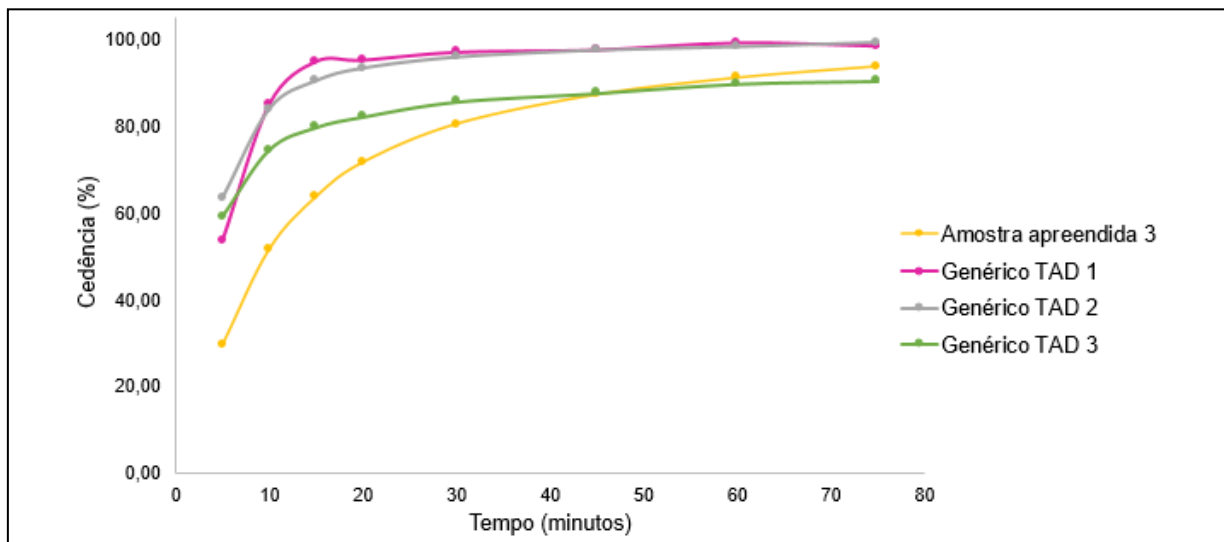
Amostra	Unidade	Cedência (%) em 10 min	Cedência média (%) / DPR (%) em 10 min	Cedência (%) em 30 min	Cedência média (%) / DPR (%) em 30 min
Apreendida 03	1	50,79		80,76	
	2	52,33	51,79 / 1,68	82,82	81,38 / 1,53
	3	52,25		80,57	
Genérico TAD 1	1	87,60		96,00	
	2	91,04	85,40 / 8,21	100,99	97,61 / 3,00
	3	77,55		95,85	
Genérico TAD 2	1	80,08		93,37	
	2	87,33	84,15 / 4,41	98,73	96,32 / 2,82
	3	85,05		96,85	
Genérico TAD 3	1	76,11		84,47	
	2	78,79	74,69 / 6,65	90,99	86,03 / 5,10
	3	69,17		82,64	

Os valores de cedência das unidades testadas deve ser de, no mínimo, 45% após 10 minutos do início do teste de dissolução e de, no mínimo, 85% após 30 minutos

(THE UNITED, 2019). Ao avaliar a **Tabela 26**, pode-se concluir que todas as unidades apresentaram cedência superior a 45% após 10 minutos de início do teste de dissolução. Entretanto, todos os comprimidos analisados da amostra apreendida 3 e dois comprimidos do medicamento genérico TAD 3, apresentaram cedência inferior a 85% após 30 minutos do início do teste. Dessa forma, essas amostras não atendem ao critério de aceitação do primeiro estágio (E<sub>1</sub>) do teste de dissolução (THE UNITED, 2019).

As curvas de perfil de dissolução obtidas a partir das cedências médias nos tempos de coleta são mostradas na **Figura 20**. Observa-se que os lotes dos genéricos TAD 1 e TAD 2 possuem perfis de dissolução muito semelhantes. Os comprimidos do medicamento genérico TAD 3 apresentaram uma dissolução um pouco mais lenta que os anteriores e a amostra apreendida 3 apresentou dissolução ainda mais lenta e, esses dois últimos não atenderam ao critério do teste de dissolução, uma vez que a cedências das unidades testadas foi inferior a 85% em 30 minutos após o início do teste de dissolução.

**Figura 20 – Perfil de dissolução das amostras contendo TAD.**



A principal função do teste de perfil de dissolução no controle de qualidade na indústria farmacêutica é a verificação da manutenção das características e parâmetros de qualidade entre diferentes lotes de um medicamento, uma vez que alterações no perfil de dissolução são indicativos de alguma alteração nos constituintes ou procedimentos de fabricação da formulação (ABDOU, 1989;

STORPIRTIS *et al.*, 1999), o que pode representar falta de padronização e afetar a qualidade da formulação.

É imprescindível que um medicamento apresente a ação farmacológica desejada e perfil toxicológico seguro. A qualidade dos medicamentos é uma exigência não apenas regulatória, mas também de caráter ético e moral e o seu não cumprimento pode provocar graves consequências à saúde pública. O acesso a medicamentos com desvio de qualidade pode colocar em risco a vida do paciente e onerar ainda mais o sistema de saúde (GIL, 2010; LOMBARDO; ESERIAN, 2017; LUIZA; CASTRO; NUNES, 1999).

Um dos controles estabelecidos pelas agências regulatórias em relação aos produtos farmacêuticos, refere-se à concessão do registro sanitário, de maneira que, apenas medicamentos registrados podem ser produzidos e comercializados no país (BRASIL, 1976). A finalidade primordial do registro é garantir que sejam comercializados apenas medicamentos com segurança e eficácia cientificamente comprovadas (LYRA; DELDUQUE, 2010). Dessa forma, ao adentrar ilegalmente no país, os medicamentos não registrados, assumem a natureza de contrabando (ANVISA, 2006) e podem promover sérias consequências à saúde pública, uma vez que não se tem conhecimento e controle da sua produção, transporte e armazenamento.

Quanto à etapa de fabricação, para atingir os pilares que garantem o sucesso terapêutico, deve-se assegurar a produção consistente e controlada dos medicamentos por meio do cumprimento das BPF e, compete ao setor de controle de qualidade realizar análises capazes de verificar a conformidade do produto com as especificações oficialmente reconhecidas (BRASIL, 2019).

Não apenas durante a sua fabricação, mas uma vez disponível no mercado, é necessário garantir a qualidade dos medicamentos. Nesse contexto, ressalta-se a importância das agências regulatórias e dos laboratórios oficiais, na avaliação da qualidade de produtos envolvidos em queixas e denúncias, bem como na participação em programas periódicos para o monitoramento de produtos comercializados ou distribuídos à população (LOMBARDO; ESERIAN, 2017).

## 7 CONCLUSÕES

Foi realizado estudo de degradação forçada completo, no qual SLD e TAD IFA foram submetidos às diversas condições de degradação forçada, que viabilizou o desenvolvimento de um método simples, rápido e seletivo para SLD e TAD na presença de seus produtos de degradação utilizando UHPLC-UV. Nesse método oito analitos foram adequadamente separados em menos de 6 minutos.

O método indicativo de estabilidade desenvolvido foi validado mostrando-se seletivo, linear, preciso, exato e robusto e pode ser usado tanto para estudos de estabilidade quanto para análises de controle de qualidade de rotina na indústria farmacêutica e por laboratórios oficiais de saúde pública.

O SLD apresentou-se susceptível à degradação em meio oxidativo com peróxido de hidrogênio, enquanto a TAD degradou em meio ácido, alcalino e oxidativo. Nesse sentido, o uso de adjuvantes e materiais de embalagem adequados deve ser considerados durante o desenvolvimento dos medicamentos. Foram propostas as estruturas químicas e mecanismos de formação dos produtos de degradação majoritários utilizando-se UHPLC-Q-TOF-MS.

Aplicou-se o método por UHPLC-UV para a avaliação da qualidade de medicamentos autênticos e apreendidos pelas PF e PCMG. Algumas amostras não atenderam aos parâmetros farmacopeicos de qualidade. Embora não tenham sido encontrados produtos de degradação nas amostras ilegais, os principais problemas observados nos medicamentos foram falta de padronização, teor abaixo da especificação, alta variação no conteúdo entre as unidades do mesmo lote e não atendimento à especificação do teste de dissolução, resultados que comprometem o efeito farmacológico desejado.

O uso de medicamentos ilegais pode representar uma séria ameaça à saúde e, a averiguação da qualidade dos medicamentos aos quais a população está tendo acesso é de extrema importância, e é recomendada que seja realizada periodicamente pelas agências regulatórias em prol da segurança dos pacientes e efetividade do tratamento.

## **CAPÍTULO II: QUANTIFICAÇÃO DE SILDENAFILA, N-DESMETIL SILDENAFILA, TADALAFILA E OUTROS SEIS FÁRMACOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DA HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR EM PLASMA HUMANO**

### **1 INTRODUÇÃO**

A Hipertensão arterial pulmonar (HAP) é uma síndrome clínica e hemodinâmica que resulta no aumento da resistência vascular na pequena circulação, elevando os níveis pressóricos na circulação pulmonar. Apesar da HAP ser uma doença rara, é grave e progressiva. Os protocolos clínicos para o seu tratamento incluem medidas não farmacológicas, tratamento medicamentoso específico (antagonistas de canal de cálcio, inibidores da PDE-5, análogos de prostaciclina e antagonistas dos receptores de endotelina) e tratamento adjuvante (anticoagulantes, diuréticos e digitálicos) (BRASIL, 2014; CALLOU, 2009; ESC, 2016).

Em razão da gravidade da HAP, da complexidade da terapêutica e da diferente evolução dos pacientes, faz-se necessária a individualização posológica e a otimização do tratamento farmacológico, com o objetivo de alcançar a máxima eficácia terapêutica com a mínima incidência de efeitos adversos. Portanto, justifica-se a monitorização terapêutica e, então, a necessidade de métodos bioanalíticos que contemplem a análise dos fármacos incluídos na terapia da HAP. Esses métodos apresentam, também, aplicabilidade nos estudos farmacocinéticos, de biodisponibilidade e bioequivalência.

Os métodos bioanalíticos constituem-se por uma etapa de preparo de amostra, seguida pela aplicação de uma técnica analítica de separação e detecção que possibilite a quantificação dos fármacos e metabólitos na matriz biológica (CASSIANO *et al.*, 2006; QUEIROZ *et al.*, 2001).

Técnicas de preparo de amostra baseadas em microextração, capazes de remover interferentes da matriz e concentrar os analitos de interesse de maneira rápida, simples, com a utilização de pequenos volumes de amostra e solventes, vêm sendo desenvolvidas como alternativas aos métodos clássicos de extração. Uma dessas técnicas é a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME, em inglês *Dispersive*

*liquid-liquid microextraction*). A extração utilizando a DLLME se deve ao processo de partição, ou seja, ao equilíbrio de distribuição do analito entre as fases doadora (amostra aquosa) e aceptora (solvente orgânico). É utilizado um sistema ternário de solventes, constituído pela amostra aquosa, solvente dispersante e solvente extrator, o que faz com que o estado de equilíbrio seja alcançado rapidamente. Essa técnica apresenta como principais vantagens o gasto de pequenos volumes de solventes, baixo custo, rapidez, alta eficiência de extração e pré-concentração, bem como potencial para aplicação em diferentes matrizes aquosas, incluindo o plasma (MARTINS *et al.*, 2012; SARAJI; BOROUJENI, 2014).

Quanto à etapa de separação e detecção, a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (HPLC-MS/MS) proporciona detectabilidade e seletividade adequadas para a determinação de fármacos e metabólitos em matrizes biológicas e, por isso, é considerada a técnica de escolha no desenvolvimento de métodos bioanalíticos (PATEL *et al.*, 2012, SHEN *et al.*, 2012).

Estão disponíveis na literatura, estudos que contemplam métodos bioanalíticos para a quantificação de SLD e/ou TAD em plasma humano. No entanto, não são encontrados métodos para a quantificação simultânea de SLD, TAD e outros fármacos presentes no protocolo terapêutico da HAP.

Ressalta-se ainda, a importância e aplicabilidade de métodos multifármacos, uma vez que um único método pode ser aplicado para quantificar diferentes fármacos administrados por um mesmo paciente, além de um único método poder ser utilizado na quantificação de fármacos em plasma de pacientes submetidos a diferentes tratamentos.

Diante do exposto, é apresentado neste Capítulo, o desenvolvimento, validação e aplicação de método bioanalítico para quantificação simultânea de TAD, SLD, seu metabólito N-desmetil sildenafil (N-DMS) e outros fármacos empregados no tratamento da HAP: besilato de anlodipino (ANLO), bumetanida (BUM), digoxina (DGX), cloridrato de diltiazem (DTZ), nifedipino (NIF) e varfarina (VAR), em plasma humano por HPLC-MS/MS, utilizando a DLLME na etapa de preparo de amostra.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Desenvolver e validar método bioanalítico para quantificação simultânea de TAD, SLD, seu metabólito N-DMS e outros seis fármacos (ANLO, BUM, DGX, DTZ, NIF e VAR) utilizados no tratamento farmacológico específico e adjuvante da HAP, em plasma humano por HPLC-MS/MS, utilizando a DLLME na etapa de preparo de amostra.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Desenvolver método por HPLC-MS/MS para a determinação simultânea de oito fármacos (SLD, TAD, ANLO, BUM, DGX, DTZ, NIF e VAR) e um metabólito (N-DMS).
- Otimizar a etapa de preparo de amostra, para extração dos nove analitos de interesse do plasma humano utilizando a técnica DLLME.
- Validar o método bioanalítico desenvolvido e otimizado seguindo as preconizações descritas nos guias nacional e internacionais.
- Aplicar o método bioanalítico desenvolvido e validado na análise de amostras de voluntários que fazem uso de algum dos fármacos abordados no presente estudo.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Métodos bioanalíticos

Os métodos bioanalíticos são aqueles utilizados para a determinação quantitativa de fármacos e de seus metabólitos em amostras biológicas. Apresentam fundamental importância para o diagnóstico clínico, monitorização terapêutica, análises toxicológicas, em estudos farmacocinéticos, de biodisponibilidade e bioequivalência (FDA, 2018; SHAH, 2007).

A HPLC-MS/MS é a técnica de escolha para o desenvolvimento de métodos bioanalíticos, uma vez que garante detectabilidade e seletividade adequadas para a análise de fármacos e metabólitos em matrizes biológicas (PATEL *et al.*, 2012; SHEN *et al.*, 2012).

Em relação à detecção do método bioanalítico, a espectrometria de massas é capaz de fornecer informações moleculares altamente específicas e, assim, representa uma poderosa ferramenta para análises de substâncias presentes em amostras complexas (SHEN *et al.*, 2012). O princípio da espectrometria de massas é a produção de íons a partir dos analitos, os quais são filtrados e detectados em função de sua razão massa/carga ( $m/z$ ). Na espectrometria de massas sequencial (MS/MS) dois analisadores de massas são acoplados. Dessa forma, é possível selecionar determinado(s) íon(s) no primeiro analisador, fragmentá-lo(s) e avaliá-lo(s) no segundo analisador favorecendo, assim, a seletividade do método (SINGH *et al.*, 2012).

No entanto, quando essa técnica é aplicada em amostras complexas, como sangue, plasma e soro, ocorrem algumas dificuldades, tendo em vista a complexidade destas matrizes. Uma grande diversidade de interferentes endógenos está presente nesses fluidos, tais como, proteínas, sais, lipídeos e anticoagulantes (CASSIANO *et al.*, 2006). Esses componentes podem levar à redução da estabilidade do fármaco na solução final da extração e são, muitas vezes, incompatíveis com as colunas cromatográficas e com os espectrômetros de massas, provocando degradação, entupimento da coluna e/ou efeito matriz (BRÊTAS, 2014; CHANG *et al.*, 2007).



Desse modo, é necessário realizar uma etapa prévia que possibilite a extração e/ou pré-concentração dos analitos, conhecida como preparo de amostra, a qual deve resultar em recuperação máxima do analito e minimizar a extração de interferentes da matriz biológica (QUEIROZ *et al.*, 2001).

### **3.1.1 Preparo de amostra**

Os objetivos da etapa de preparo de amostra são: remover os potenciais interferentes, ajustar o solvente da amostra para garantir compatibilidade com a análise subsequente, permitir concentração dos analitos dentro da faixa de trabalho e aumentar a seletividade e detectabilidade do método bioanalítico (CHANG *et al.*, 2007).

Dentre as técnicas convencionalmente utilizadas para o preparo de amostras biológicas encontram-se a precipitação de proteínas (PPT, em inglês *Protein precipitation*), extração em fase sólida (SPE, em inglês *Solid phase extraction*) e extração líquido-líquido (LLE, em inglês *Liquid-liquid extraction*).

As proteínas geralmente não são compatíveis com sistemas cromatográficos, não são voláteis e promovem interferências na maioria dos detectores. Dessa forma, o emprego da PPT visa eliminar as ligações entre as proteínas e os fármacos, para que seja possível a quantificação deste. A PPT é uma técnica de preparo de amostra antiga, mas ainda frequentemente empregada, inclusive como precursora de outras técnicas, devido à sua rapidez e simplicidade (CHANG *et al.*, 2007; POLSON, 2003).

Os mecanismos envolvidos na PPT são diversos e ocorrem na presença de solventes orgânicos, sais, ácidos ou bases fortes e metais. Os solventes orgânicos interferem tanto nas interações hidrofóbicas intramoleculares quanto reduzem a hidratação da proteína, facilitando as interações eletrostáticas entre elas e resultando na agregação. A presença de sais afeta o estado de hidratação das proteínas, uma vez que ocorre o deslocamento das moléculas de água para solvatação do sal e então, uma menor hidratação da proteína promove a redução da sua solubilidade. Os ácidos e bases alteram o estado de ionização das proteínas,

provocando a sua desnaturação. Os íons metálicos, por sua vez, levam à precipitação por alterarem o ponto isoelétrico da proteína e deslocarem os prótons dos sítios de ligação coordenada nos aminoácidos expostos, resultando na redução do pH da solução. Após a adição do agente precipitante, as proteínas são removidas por centrifugação e o sobrenadante é utilizado para prosseguir à análise (CHANG *et al.*, 2007; POLSON, 2003).

A SPE, por sua vez, consiste na utilização de sorventes empacotados em cartuchos com formato de seringa ou discos, e os mecanismos de retenção são idênticos àqueles envolvidos em cromatografia, permitindo assim, a extração de analitos com variadas características (hidrofílicos, lipofílicos, básicos, neutros ou ácidos). Apesar de fornecer extratos mais limpos, altas recuperações dos analitos e da facilidade de automação, a SPE possui como desvantagens o fato de necessitar de grandes volumes de amostra e solvente(s), a possibilidade de entupimento do cartucho e os gastos com a constante aquisição dos mesmos (CHANG *et al.*, 2007; QUEIROZ *et al.*, 2001; RANI *et al.*, 2012).

Na LLE, a extração do analito da matriz ocorre por meio da solubilidade diferencial e do equilíbrio de partição de moléculas do analito entre duas fases imiscíveis (orgânica e aquosa). Conforme relatado por Queiroz e colaboradores (2001), a eficiência da extração depende da afinidade do soluto pelo solvente extrator, da razão das fases e do número de extrações. Para alguns sistemas, o valor do coeficiente de partição ou distribuição ( $K_D$ ), entre as fases, pode ser aumentado pelo ajuste do pH, para prevenir a ionização de ácidos ou bases, pela formação de par iônico com solutos ionizáveis, pela geração de complexos lipofílicos com íons metálicos ou pela adição de sais neutros, para diminuir a solubilidade de compostos orgânicos na fase aquosa. A constante  $K_D$  é determinada conforme equação a seguir:

$$K_D = \frac{\text{Concentração de equilíbrio na fase orgânica}}{\text{Concentração de equilíbrio na fase aquosa}}$$

Ao final da extração, as fases podem ser separadas por gravidade, centrifugação, membrana semipermeável, adsorção de uma das fases a um suporte ou separação

física (pipetagem, congelamento, decantação ou sucção). Essa técnica se mostra vantajosa por ser simples, de fácil reprodução, permitir a utilização de diferentes solventes disponíveis comercialmente para que seja possível conseguir solubilidade e seletividade adequadas. Entretanto, apresenta desvantagens, tais como baixa extração pelo solvente orgânico de analitos com alta afinidade pela água, resultando em perda do analito, possibilidade de formação de emulsões, o que resulta em grande consumo de tempo e necessidade de volumes relativamente grandes de amostras e de solventes (CHANG *et al.*, 2007; QUEIROZ *et al.*, 2001).

A etapa de preparo de amostra geralmente é a que demanda mais tempo, envolve mais esforços e consumo de solventes orgânicos. Por isso, o desenvolvimento de novas técnicas de extração em matrizes complexas, que sejam eficientes, rápidas e econômicas, têm o objetivo de aumentar a velocidade de análise, precisão, exatidão, sensibilidade e reduzir o gasto de amostras e solventes a fim de se evitar, ao máximo, a produção de resíduos tóxicos que podem ser prejudiciais tanto ao meio ambiente, quanto à saúde do analista (SARAJI; BOROUJENI, 2014; WILLE; LAMBERT, 2007). Dentre as abordagens que objetivam miniaturizar a LLE, encontra-se a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME, em inglês *dispersive liquid-liquid microextraction*).

#### **3.1.1.1 DLLME**

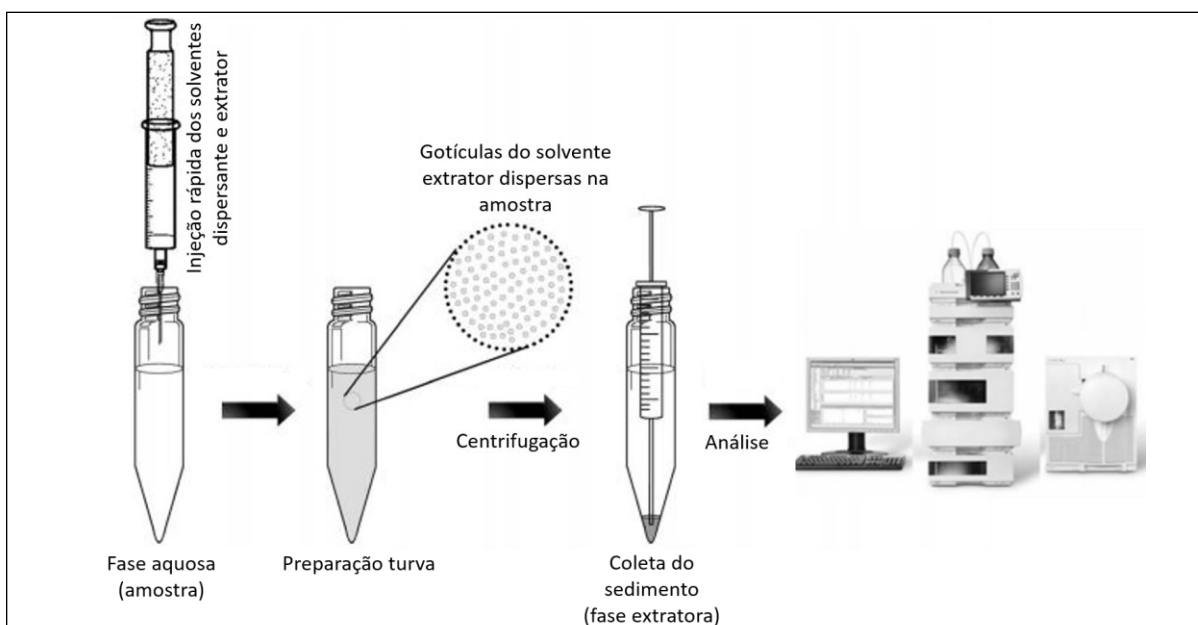
A DLLME foi descrita em 2006 por Rezaee e colaboradores. Devido à sua simplicidade de operação, curto tempo de extração, baixo custo, alta recuperação e baixo consumo de solventes orgânicos e reagentes, a DLLME vem sendo aplicada para a determinação de uma grande variedade de analitos orgânicos e inorgânicos em diferentes matrizes, tais como amostras clínicas, forenses, alimentícias e ambientais (SARAJI; BOROUJENI, 2014).

A extração com essa técnica se deve ao processo de partição, ou seja, equilíbrio de distribuição do analito entre as fases doadora (amostra aquosa) e aceptora (solvente orgânico) e é ideal para a extração de analitos com propriedades lipofílicas moderadas a altas ou que possam ter seu coeficiente de distribuição ( $K_D$ ) alterado

pelo controle do pH, ou seja, analitos ionizáveis (MOREIRA *et al.*, 2014; ZANG *et al.*, 2009).

Na DLLME é utilizado um sistema ternário de solventes, constituído pela amostra aquosa, solvente dispersante (miscível tanto com a amostra aquosa quanto com o solvente extrator) e extrator, o que faz com que o estado de equilíbrio seja alcançado rapidamente. O procedimento convencional para a realização da técnica é ilustrado na **Figura 21** e consiste em injetar rapidamente na amostra aquosa, com o auxílio de uma seringa, uma mistura contendo o solvente extrator e dispersante, resultando em uma preparação turva, devido a gotículas do solvente extrator dispersas na amostra. Dessa forma, uma área de contato infinitamente grande é gerada entre a fase aquosa e o solvente de extração e, então, os analitos são extraídos para a fase extratora rapidamente. Após a centrifugação, as gotículas do solvente extrator se depositam no fundo do tubo e esse sedimento é coletado com uma microseringa para posterior análise (MARTINS *et al.*, 2012; SARAJI; BOROUJENI, 2014).

**Figura 21 – Esquema ilustrativo das etapas envolvidas na DLLME.**



Fonte: adaptado de Saraji; Boroujeni, 2014.

Para otimizar a extração, é necessário estudar o efeito dos parâmetros experimentais que podem influenciar no desempenho da DLLME, dentre eles, o tipo e volume dos solventes extrator e dispersante, a presença de sais na fase aquosa e

a alteração do pH da fase aquosa (REZAEI *et al.*, 2006; SARAJI; BOROUJENI, 2014).

Há diversos estudos na literatura que aplicam a DLLME no preparo de amostra para determinação de fármacos e metabólitos em matrizes biológicas. Dentre os trabalhos encontrados que utilizam a técnica DLLME para extração e concentração de analitos do plasma, pode-se citar o estudo de Jouyban e colaboradores (2015) que desenvolveram e validaram um método para quantificação simultânea de metoprolol, propranolol, carvedilol, diltiazem e verapamil por HPLC-UV utilizando DLLME na etapa de preparo de amostra. Nesse trabalho foram utilizados 660  $\mu$ L de plasma, realizou-se etapa prévia de PPT, com adição de acetonitrila, a qual atuou como solvente dispersante na DLLME. Diclorometano foi o solvente extrator escolhido e a fase aquosa teve adição de cloreto de sódio a 1% (p/v) e pH ajustado para 11,5. Alcantara e colaboradores (2020) também descreveram um método para quantificação de risperidona e seu metabólito 9-hidroxisperidona, utilizando DLLME e HPLC-MS/MS. Os autores utilizaram clorobenzeno e acetona como solventes extratores e dispersante, respectivamente, o pH da amostra foi ajustado para 12,0 e foi adicionado cloreto de sódio a 10% (p/v).

Encontram-se também descritos na literatura, trabalhos que utilizam mais de um meio de promover a dispersão do solvente extrator na fase aquosa, como a DLLME assistida por vórtex e DLLME assistida por ultrassom, como justificativa para a formação de mais gotículas e aumento da taxa de transferência de massa e eficiência de extração (RUTKOWSKA *et al.*, 2017; SEIDI; YAMINI, 2012). Para exemplificar essa utilização, cita-se o trabalho de Feriduni e colaboradores (2018) que desenvolveram DLLME em pequena escala para quantificação de ácido valproico e seu metabólito (3-heptanone) em plasma humano. Para isso, realizaram uma etapa prévia de PPT adicionando ácido trifluoroacético (50  $\mu$ L) a 500  $\mu$ L da amostra. Em seguida, uma mistura de clorofórmio (20  $\mu$ L, solvente extrator) e acetonitrila (60  $\mu$ L, solvente dispersante) foi rapidamente injetada por uma seringa ao sobrenadante da PPT. Para produzir mais turbidez, ou seja, aumentar a superfície de contato entre o solvente extrator e a amostra, agitaram a amostra em vórtex por três minutos. A mistura foi então centrifugada para quebrar a emulsão e a fase orgânica foi coletada.

Após a remoção dos interferentes e a concentração dos analitos, a amostra deve ser analisada utilizando-se técnicas de separação e detecção.

### **3.1.2 Métodos bioanalíticos para quantificação de SLD e TAD em plasma humano**

Após a administração de uma dose oral em jejum, o SLD é prontamente absorvido e metabolizado, predominantemente por via hepática (citocromo P450), com formação do metabólito ativo N-DMS (SIMIELE *et al.*, 2015).

O metabólito apresenta um perfil de seletividade para as fosfodiesterases semelhante ao do SLD e uma potência de inibição *in vitro* para a PDE-5 de, aproximadamente, 50% daquela verificada para o fármaco inalterado. A concentração plasmática do N-DMS é de, aproximadamente, 40% daquela verificada para o SLD. O N-DMS é amplamente metabolizado, apresentando uma meia-vida de eliminação ( $t_{1/2}$ ) de, aproximadamente, quatro horas, enquanto o SLD apresenta  $t_{1/2}$  de três a cinco horas. O SLD e o N-DMS apresentam ligação às proteínas plasmáticas de, aproximadamente, 96%. Após administração oral, o SLD é excretado sob a forma de metabólitos, predominantemente nas fezes e em menor quantidade na urina (ANVISA, 2020a).

Nichols, Muirhead e Harness (2002) realizaram um estudo farmacocinético para SLD e N-DMS e, após a administração oral de uma dose de 50 mg de SLD, obtiveram concentração plasmática máxima ( $C_{máx}$ ) para o SLD de 271 ng/mL e de 126 ng/mL para o N-DMS após 47,4 e 46,8 minutos, respectivamente.

A TAD também é rapidamente absorvida após administração oral e a  $C_{máx}$  é atingida em um tempo médio de duas horas após a administração. Apresenta ligação a proteínas plasmáticas de 94%. É predominantemente metabolizada pelo citocromo P450 e o maior metabólito circulante é a glucuronida metilcatecol. A TAD também é excretada predominantemente como metabólitos, principalmente nas fezes e, em menor extensão, na urina (ANVISA, 2020a).

No estudo relatado por Forgue e colaboradores (2005), após duas horas da administração de comprimidos contendo 20 mg de TAD, a  $C_{m\acute{a}x}$  observada foi de 378 ng/mL e  $t_{1/2}$  de 17,5 horas (11,5 a 29,6 horas). A farmacocinética da TAD apresentou-se linear em relação à dose e ao tempo, e não é afetada por alimentos.

Encontram-se na literatura, muitos estudos nos quais são apresentados métodos bioanalíticos para a determinação de SLD e/ou TAD em plasma humano. Alguns desses, são descritos na **Tabela 27**. Como pode ser observado, há vários métodos para a quantificação de SLD e TAD de forma isolada, além de existir um número significativo de métodos para a quantificação simultânea de SLD e seu metabólito N-DMS. Os métodos descritos por Rust *et al.* (2012) e Xiao *et al.* (2013) são destinados a quantificação de SLD e TAD, além de outros fármacos da classe dos inibidores da PDE-5. Apenas o método descrito por Yokoyama e colaboradores (2014) contempla a quantificação simultânea de SLD, TAD, bosentana e ambrisentana, fármacos para tratamento específico da HAP, no qual foi utilizado SPE e HPLC-MS/MS.

Nos métodos encontrados, são gastos volumes de plasma que variam de 200 a 1500  $\mu$ L e a técnica de preparo de amostra predominantemente empregada é a LLE. Entretanto, Xiao e colaboradores (2013) utilizaram a DLLME baseada em líquido iônico para extrair SLD, vardenafila e aildenafil do plasma. Os líquidos iônicos são compostos por cátions e ânions orgânicos ou inorgânicos e podem ser utilizados na DLLME como solvente extrator, substituindo os solventes clorados, comumente empregados.

Dentre as técnicas de separação, é predominante o uso da HPLC e, para a detecção, há métodos nos quais são utilizados o detector ultravioleta e em outros, o espectrômetro de massas, com a justificativa de obter método mais seletivos e com menor limite de quantificação.

Tabela 27 – Métodos bioanalíticos para a determinação de SLD e TAD em plasma humano.

Referência	Analito(s)	Aplicação	Padrão(ões) interno(s)	Volume de amostra (µL)	Preparo de amostra	Solvente/sorvente	Cromatografia	Deteção	Faixa validada (ng/mL)	Recuperação (%)
AL-HROUB <i>et al.</i> , 2016	SLD	Monitorização terapêutica e estudos farmacocinéticos	Etoricoxibe	750	LLE	Éter etílico	HPLC C <sub>18</sub> (150,0 × 4,6 mm, 5,0 µm) Acetonitrila: água (37:63 v/v) com trietilamina 0,1% (v/v) pH 7,7	UV 230 nm	2-200	Maior que 78,4
GOFFREDO <i>et al.</i> , 2016	SLD e N-DMS	Monitorização terapêutica e estudos farmacocinéticos	Butilparabeno	500	LLE	Acetato de etila	HPLC C <sub>18</sub> (150,0 × 4,6 mm, 5,0 µm) Acetonitrila: tampão fosfato 30 mM pH 6,0 (47:53 v/v)	UV 230 nm	1-250	102,5 (SLD) 101,8 (N-DMS)
SIMIELE <i>et al.</i> , 2015	SLD e N-DMS	Monitorização terapêutica e estudos farmacocinéticos	Quinoxalina	200	PPT	Acetonitrila	UHPLC C <sub>18</sub> (150,0 × 2,1 mm, 1,8 µm) Acetonitrila com ácido fórmico 0,05% (v/v): solução aquosa com ácido fórmico 0,1% (v/v) (gradiente)	MS/MS 475→283 (SLD) 461→85 (N-DMS)	3,9-1000,0	83,2 (SLD) 84,5 (N-DMS)
LIEW <i>et al.</i> , 2014	SLD e N-DMS	Estudos de farmacocinética e bioequivalência	Loperamida	500	LLE	Éter etílico	HPLC C <sub>18</sub> (100,0 × 2,1 mm, 2,6 µm) Metanol:solução aquosa com ácido fórmico 0,1% (v/v) (80:20 v/v)	MS/MS 475→58 (SLD) 461→85 (N-DMS)	10-800 (SLD) 10-600 (N-DMS)	65,54-72,12 (SLD) 48,66-56,14 (N-DMS)
TANG <i>et al.</i> , 2014	SLD e N-DMS	Monitorização terapêutica	Não informado	1500	Extração em fase sólida magnética (MSPE)	Metilcelulose revestido-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -SiO <sub>2</sub> -fenil	HPLC C <sub>18</sub> (150,0 × 2,1 mm, 2,2 µm) Metanol:solução aquosa de ácido acético 1% (v/v) (62:38 v/v)	UV 290 nm	5-400 (SLD) 2,5-400 (N-DMS)	Não informado



Tabela 27 – Métodos bioanalíticos para a determinação de SLD e TAD em plasma humano (continuação).

Referência	Analito(s)	Aplicação	Padrão(ões) interno(s)	Volume de amostra (µL)	Preparo de amostra	Solvente/sorvente	Cromatografia	Deteção	Faixa validada (ng/mL)	Recuperação (%)
YOKOYAMA <i>et al.</i> , 2014	SLD, TAD, bosentana e ambrisentana,	Estudo farmacocinético em pacientes pediátricos com HAP	SLD d-3 TAD d-3 bosentana d-3 ambrisentana d-3	50	SPE	Copolímero	HPLC C <sub>18</sub> (75,0 × 2,0 mm, 3,0 µm) Acetonitrila:acetato de amônio 5 mM (45:55 v/v, pH 5,0)	MS/MS 475→58 (SLD) 478→61 (SLD d-3) 390→268 (TAD) 393→271 (TAD d-3)	2-1000	83,4–88,1 (SLD), 78,9–88,5 (TAD)
XIAO <i>et al.</i> , 2013	SLD, vardenafila e aildenafil	Estudos clínicos e forenses	Não utilizado	960	Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) baseada em líquido iônico (IL)	Metanol (solvente dispersante) e 1-hexafluorofosfato de octil-3-metilimidazólio como líquido iônico	HPLC C <sub>18</sub> (250,0 × 4,6 mm, 5,0 µm) Metanol:solução aquosa de ácido acético 1% (v/v) (40:60 v/v)	UV 254 nm	1-500 (SLD)	100,4
YAROSHENKO <i>et al.</i> , 2013	SLD	Estudos clínicos	Trazodona	500	SPE	C <sub>18</sub>	HPLC C <sub>18</sub> (100,0 × 2,1 mm, 3,5 µm) Acetonitrila:tampão acetato de amônio 40 mM (40:60 v/v)	UV 290 nm  MS 475 (SLD)	20-1000  5-1000	95,0±4,0
RUST <i>et al.</i> , 2012	SLD, TAD, norsildenafil, vardenafila e norvardenafila	Análise forense e monitorização terapêutica	Trimipramin d-3 SLD d-8	500	LLE	Éter etílico-acetato de etila (1:1 v/v)	HPLC C <sub>18</sub> (125,0 × 2,0 mm 3,0 µm) Acetonitrila com ácido fórmico 0,1% (v/v):formiato de amônio 50 mM pH 3,5 (gradiente)	MS/MS 475→100 (SLD) 483→108 (SLD d-8) 390→268 (TAD)	5-1000 (SLD) 5-1000 (TAD)	Maior que 57,0 para todos analitos
CHALLA <i>et al.</i> , 2010	SLD e N-DMS	Estudos de bioequivalência	SLD d-8 N-DMS d-8	250	LLE	Éter metil-terc-butílico	HPLC C <sub>18</sub> (75,0 × 4,6 mm, 3,5 µm) Acetonitrila:acetato de amônio 10 mM (95:5 v/v)	MS/MS 475→283 (SLD) 483→283 (SLD d-8) 461→283 (N-DMS) 469→283 (N-DMS d-8)	1–1000 (SLD) 0,5–500,0 (N-DMS)	73,45 (SLD) 63,97 (N-DMS)

Tabela 27 – Métodos bioanalíticos para a determinação de SLD e TAD em plasma humano (continuação).

Referência	Analito(s)	Aplicação	Padrão(ões) interno(s)	Volume de amostra (µL)	Preparo de amostra	Solvente/sorvente	Cromatografia	Deteção	Faixa validada (ng/mL)	Recuperação (%)
QUINTERO <i>et al.</i> , 2009	SLD	Estudos clínicos	Diazepam	460	LLE	Éter etílico-diclorometano (60:40 v/v)	HPLC C <sub>18</sub> (150,0 × 3,9 mm, 5,0 µm) Acetonitrila:tampão acetato de amônio 300 mM pH 6,8 (1:1 v/v)	UV 240 nm	20-1000	92,66-96,94
SHAKYA <i>et al.</i> , 2007	TAD	Estudos clínicos	Loratadina	500	LLE	Éter etílico-diclorometano (7:3 v/v)	HPLC C <sub>18</sub> (250,0 × 4,6 mm, 5,0 µm) Acetonitrila:solução aquosa contendo trietilamina 0,012 M e ácido fosfórico 0,020 M (50:50 v/v)	UV 225 nm	5-600	66,1±2,8
RAMAKRISHNA <i>et al.</i> , 2004	TAD	Estudos de farmacocinética, biodisponibilidade e bioequivalência	SLD	250	LLE	Éter etílico-diclorometano (70:30 v/v)	HPLC C <sub>18</sub> (100,0 × 3,0 mm, 3,5 µm) Acetonitrila:formiato de amônio 10 mM (10:90 v/v, pH 3,0)	MS/MS 390→268 (TAD) 475→58 (SLD)	10-1000	65,16 ± 1,81
SHEU <i>et al.</i> , 2003	SLD	Estudo de farmacocinética	Butilparabeno	1000	LLE	Solução alcalina	HPLC C <sub>18</sub> (150,0 × 4,6 mm, 5,0 µm) Acetonitrila:tampão fosfato de potássio 30 mM pH 6 (55:45 v/v)	UV 230 nm	10-1000	Maior que 75,0

**Legenda:** DMSPE: *dispersive magnetic solid phase extraction*, HIV: vírus da imunodeficiência humana; HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência, LLE: extração líquido-líquido, MS/MS: espectrometria de massas sequencial, PPT: precipitação de proteínas, SLD: sildenafil, SPE: extração em fase sólida, TAD: tadalafila, UV: ultravioleta.

Não foi encontrado na literatura método que contemple a determinação simultânea de SLD, TAD, N-DMS e outros fármacos empregados tanto no tratamento específico, quanto adjuvante da HAP. Sendo assim, considerou-se relevante o desenvolvimento e validação de método bioanalítico que possibilite a quantificação simultânea desses fármacos em plasma humano, para que o mesmo possa ser empregado para monitorização terapêutica.

### **3.2 Hipertensão arterial pulmonar (HAP)**

A HAP é definida como uma anormalidade circulatória caracterizada por aumento da resistência vascular na pequena circulação, em geral por meio de mecanismos mistos, envolvendo vasoconstrição, remodelamento da parede arterial e trombose *in situ* (BRASIL, 2014; CALLOU, 2009; ESC, 2016).

Pode ocorrer associada tanto a uma variedade de condições médicas subjacentes, quanto a uma doença que afeta exclusivamente a circulação pulmonar, sendo classificada em quatro subgrupos, entre eles a idiopática (não tem etiologia definida), hereditária, induzida por drogas e toxinas e associada a outras doenças (doenças do tecido conjuntivo, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, hipertensão portal, insuficiência cardíaca congênita e esquistossomose pulmonar) (ESC, 2016).

Apesar da HAP ser uma doença rara, ela se caracteriza por ser uma doença grave e progressiva, uma vez que o aumento gradual da resistência vascular pulmonar leva à insuficiência ventricular direita e morte precoce (BRASIL, 2014; ESC, 2016). A taxa de mortalidade de pacientes tratados é de, aproximadamente, 15% em 1 ano, 33% em 3 anos e 42% em 5 anos, com sobrevida média de 3,6 anos (THENAPPAN *et al.*, 2007).

A evolução da HAP depende de uma série de fatores, conhecidos como complicadores, agravantes ou de progressão. Grande parte desses está relacionada à extensão e gravidade da disfunção endotelial, a qual se expressa por três eventos de alta relevância fisiopatológica: vasoconstrição, inflamação e trombose. Dessa forma, a quase totalidade dos recursos terapêuticos que têm sido desenvolvidos

para o tratamento da HAP tem como alvo um ou mais desses três mecanismos (SBC, 2005).

### **3.2.2 Farmacoterapia da HAP**

A hipertensão arterial pulmonar é uma síndrome complexa para a qual não existem esquemas simples de avaliação diagnóstica e orientação terapêutica. A conduta terapêutica baseia-se nos resultados dos exames clínicos, falha/sucesso terapêutico e reações adversas apresentadas pelo paciente (SAS/MS, 2014; SBC, 2005).

Na HAP, há um aumento dos mediadores vasoconstritores endotelina-1, tromboxano A2 e serotonina, e uma diminuição dos mediadores vasodilatadores prostaciclina, óxido nítrico e peptídeo vasoativo intestinal (VIP, em inglês *vasoactive intestinal peptide*). As terapias medicamentosas visam antagonizar os mediadores vasoconstritores e aumentar a vasodilatação (BARNES, 2012).

Sendo assim, os protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas nacional e internacionais para a HAP incluem medidas/cuidados não medicamentoso (restrição de sódio na dieta, exercício físico controlado e supervisionado e oxigenoterapia), tratamento específico e tratamento adjuvante dos fenômenos associados (trombose *in situ*, hipoxemia, insuficiência cardíaca direita) (BRASIL, 2014; ESC, 2016; SAS/MS, 2014).

#### **3.2.2.1 Fármacos específicos para tratamento da HAP**

As classes de fármacos utilizados no tratamento específico da HAP incluem antagonistas de canal de cálcio, inibidores da PDE-5, análogos de prostaciclina e antagonistas dos receptores de endotelina.

O uso de fármacos bloqueadores do canal de cálcio, para promover vasodilatação, é iniciado quando os pacientes apresentam resposta positiva no teste agudo de vasorreatividade pulmonar, que consiste em um teste hemodinâmico invasivo de resposta aguda a vasodilatador (adenosina, prostaciclina intravenosa ou óxido nítrico inalatório). Os bloqueadores de canal de cálcio que têm sido relatados nos

estudos são nifedipino (NIF), diltiazem (DTZ) e anlodipino (ANLO). O tratamento deve ser iniciado com doses baixas, de modo que as doses iniciais são de 30 mg de NIF de liberação prolongada duas vezes ao dia ou 60 mg de DTZ três vezes ao dia ou 2,5 mg de ANLO uma vez ao dia, e deve ser realizado o aumento progressivo da dose conforme a tolerância do paciente (HOETTE *et al.*, 2010). As doses diárias desses medicamentos que apresentam eficácia demonstrada na HAP idiopática são relativamente altas: 120 – 240 mg para NIF, 240 – 720 mg para DTZ e até 20 mg para ANLO (ESC, 2016).

Uma vez que a vasculatura pulmonar possui quantidades substanciais de PDE-5, o benefício clínico dos inibidores da PDE-5 na HAP justifica-se pela vasodilatação pulmonar significativa que provocam pelo aumento na concentração intracelular de GMPc, um potente vasodilatador e inibidor de proliferação celular (ESC, 2016; REFFELMANN; KLONER, 2009; WILKINS *et al.*, 2008). Dentre os inibidores da PDE-5 utilizados, encontram-se o SLD e a TAD.

Segundo estabelecido na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME), o SLD está disponível em forma de comprimidos, contendo 20, 25 ou 50 mg. A dose recomendada para o tratamento da HAP é de 60 mg/dia (em três administrações de 20 mg). Muitos estudos utilizaram doses maiores, sendo a máxima, em alguns estudos clínicos, de 240 mg/dia (três administrações de 80 mg). Todos os esquemas demonstraram melhora da capacidade de exercício. As doses mais altas produziram maior impacto nos parâmetros hemodinâmicos, entretanto carecem de estudos de segurança de longo prazo (GALIE *et al.*, 2005).

A TAD tem indicação proposta para tratamento de primeira linha para a hipertensão pulmonar aguda. As apresentações disponíveis no mercado são comprimidos revestidos com 20 mg de TAD e a dose diária recomendada é de 40 mg (dois comprimidos), uma vez ao dia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

A prostaciclina é produzida predominantemente por células endoteliais e induz vasodilatação potente de todos os leitos vasculares. Além disso, esses compostos atuam como potentes inibidores da agregação plaquetária e também apresentam atividades citoprotetoras e antiproliferativas (JONES *et al.*, 1995). Uma vez que

pacientes com HAP possuem desregulação das vias metabólicas da prostaciclina (GALIÈ; MANES; BRANZI, 2003), os análogos da prostaciclina foram a primeira classe a ser aprovada para tratamento específico da HAP. Dentre esses, encontra-se o iloprostá de administração inalatória (HOETTE *et al.*, 2010).

A endotelina-1 (ET-1) é encontrada em maiores quantidades no tecido pulmonar e no plasma de pacientes com HAP e esclerodermia. Promove vasoconstrição e proliferação de células musculares lisas da parede vascular pulmonar por meio da ligação em receptores de endotelina, presentes nas células do músculo liso vascular pulmonar (RUBIN *et al.*, 2002). HAP está associada a níveis elevados de ET-1 e, quanto mais elevados esses níveis, maior é a gravidade da doença e menor a sobrevivência dos pacientes (GALIE; MANES; BRANZI, 2004). Dessa forma, os antagonistas do receptor de endotelina, como ambrisentana e bosentana, bloqueiam os receptores da endotelina localizado, predominantemente, nas células musculares lisas vasculares e nos miócitos cardíacos, prevenindo a ativação mediada por endotelina de sistemas mensageiros secundários, impedindo assim, a vasoconstrição e proliferação de células musculares lisas (BRASIL, 2014; ESC, 2016).

### **3.2.2.2 Tratamento medicamentoso adjuvante**

Fazem parte do tratamento adjuvante da HAP, fármacos das classes dos anticoagulantes, diuréticos e digitálicos.

A justificativa da utilização de anticoagulantes orais no tratamento da HAP baseia-se na elevada prevalência de lesões trombóticas vasculares no exame *post-mortem* em pacientes com HAP idiopática. Além disso, a presença de anormalidades nas vias de coagulação e fibrinolíticas também foram relatadas. Adicionalmente, os pacientes com HAP apresentam fatores de risco aumentados não específicos para tromboembolismo venoso, incluindo insuficiência cardíaca e imobilidade (FUSTER *et al.*, 1984; HOEPER *et al.*, 1998). Anticoagulação oral, com o uso de derivados cumarínicos (varfarina - VAR), é indicada para HAP com o objetivo de manter o tempo de protrombina (razão normalizada internacional - RNI) entre 2 e 3 (SAS/MS, 2014).

O uso de diuréticos é recomendado, pois a insuficiência cardíaca direita descompensada leva à retenção de fluidos, aumento da pressão venosa central, congestão hepática, ascite e edema periférico (COHN, 2001). Os diuréticos de alça são os mais potentes, capazes de causar a eliminação de 15% a 25% do sódio filtrado. Os principais exemplos dessa classe de fármacos são furosemida e bumetanida (BUM) (RANG *et al.*, 2012).

Foi demonstrado que o uso de digitálicos melhora o débito cardíaco agudamente na HAP, embora sua eficácia, até o momento, seja desconhecida quando administrado cronicamente (RICH *et al.*, 1998). A DGX é um glicosídeo cardiotônico, que aumenta a contratilidade do miocárdio por atividade direta e exerce o mesmo efeito de inibição do mecanismo de troca de sódio e potássio nas células do sistema nervoso autônomo, estimulando-as a exercer, por sua vez, atividade cardíaca indireta (MEDICINANET, 2020).

### **3.3 Características físico-químicas e farmacocinéticas dos fármacos utilizados no tratamento da HAP abordados no presente estudo**

O presente estudo contempla o desenvolvimento e validação de um método bioanalítico para quantificação de fármacos específicos para tratamento da HAP, dentre eles, três bloqueadores de canal de cálcio (ANLO, DTZ e NIF) e dois inibidores da PDE-5 (SLD e TAD); e fármacos utilizados no tratamento adjuvante, sendo eles, a VAR, BUM e DGX; além do N-DMS (metabólito do SLD).

Para favorecer e embasar as escolhas e discussões durante o desenvolvimento e validação do método bioanalítico, realizou-se levantamento das propriedades físico-químicas e farmacocinéticas dos analitos, as quais são apresentadas nas **Tabelas 28 e 29**, respectivamente. Além disso, como o método de preparo de amostra utilizado foi a DLLME, foram obtidos os gráficos de log D (coeficiente de distribuição) em função do pH dos analitos e possíveis padrões internos (PI), para auxiliar na seleção e otimização dos parâmetros envolvidos na extração, os quais são apresentados na **Figura 22**.

Tabela 28 – Características físico-químicas dos analitos selecionados para desenvolvimento do método bioanalítico.

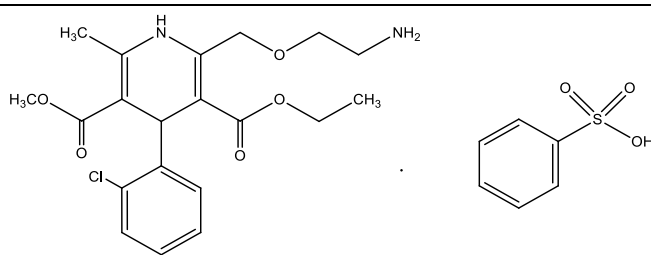
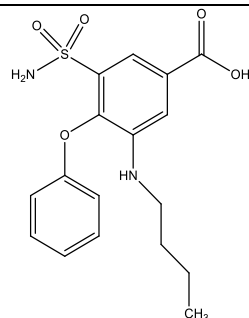
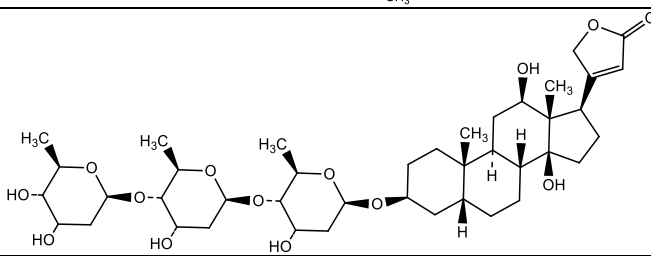
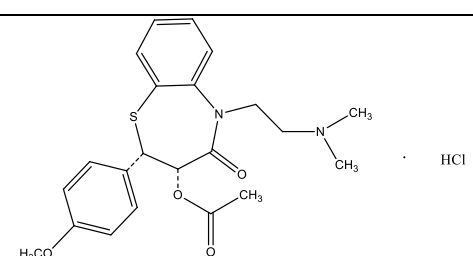
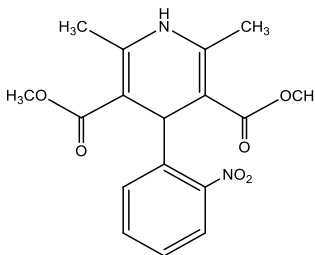
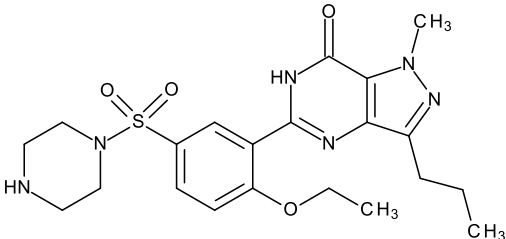
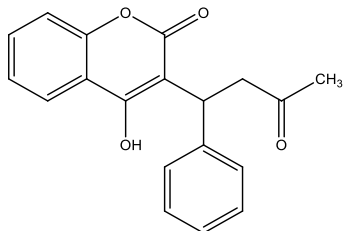
Analito	Classe farmacológica	Fórmula química	Estrutura química	Massa exata (g/mol)	pKa	Log P	Solubilidade
Besilato de anlodipino (ANLO)	Bloqueador de canal de cálcio	C <sub>20</sub> H <sub>25</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>5</sub> .C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> S C <sub>20</sub> H <sub>25</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>5</sub>		566,1489 408,1452	9,40	3,00	Pouco solúvel em água, facilmente solúvel em metanol, ligeiramente solúvel em etanol, pouco solúvel em 2-propanol
Bumetanida (BUM)	Diurético de alça	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S		364,1093	2,70	2,60	Pouco solúvel em água, solúvel em soluções alcalinas
Digoxina (DGX)	Glicosídeo cardiotônico	C <sub>41</sub> H <sub>64</sub> O <sub>14</sub>		780,4296	7,15	1,26	Praticamente insolúvel em água, facilmente solúvel em piridina, pouco solúvel em álcool diluído e em clorofórmio
Citrato de sildenafil (SLD)	Inibidor da PDE-5	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> S.C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> S	Figura 1A (página 25)	666,2319 474,2049	5,99	2,75	Pouco solúvel em água e em metanol, praticamente insolúvel em hexano
Cloridrato de diltiazem (DTZ)	Bloqueador de canal de cálcio	C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S.HCl C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S		450,1380 414,1613	8,06	2,70	Facilmente solúvel em água, clorofórmio, ácido fórmico e metanol, ligeiramente solúvel em álcool desidratado, insolúvel em éter



Tabela 28 – Características físico-químicas dos analitos selecionados para desenvolvimento do método bioanalítico (continuação).

Analito	Classe farmacológica	Fórmula química	Estrutura química	Massa exata (g/mol)	pKa	Log P	Solubilidade
Nifedipino (NIF)	Bloqueador de canal de cálcio	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>		346,1165	-	2,20	Praticamente insolúvel em água, facilmente solúvel em acetona
N-desmetil sildenafil (N-DMS)	Metabólito ativo do SLD	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> S		460,1893	-	-	-
Tadalafila (TAD)	Inibidor da PDE-5	C <sub>22</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Figura 1B (página 25)	389,1376	0,85	1,70	Praticamente insolúvel em água, facilmente solúvel em dimetilsulfóxido, pouco solúvel em cloreto de metileno
Varfarina (VAR)	Anticoagulante	C <sub>19</sub> H <sub>15</sub> O <sub>4</sub>		308,1049	5,87	2,70	Muito solúvel em água, facilmente solúvel em etanol, pouco solúvel em clorofórmio e em éter

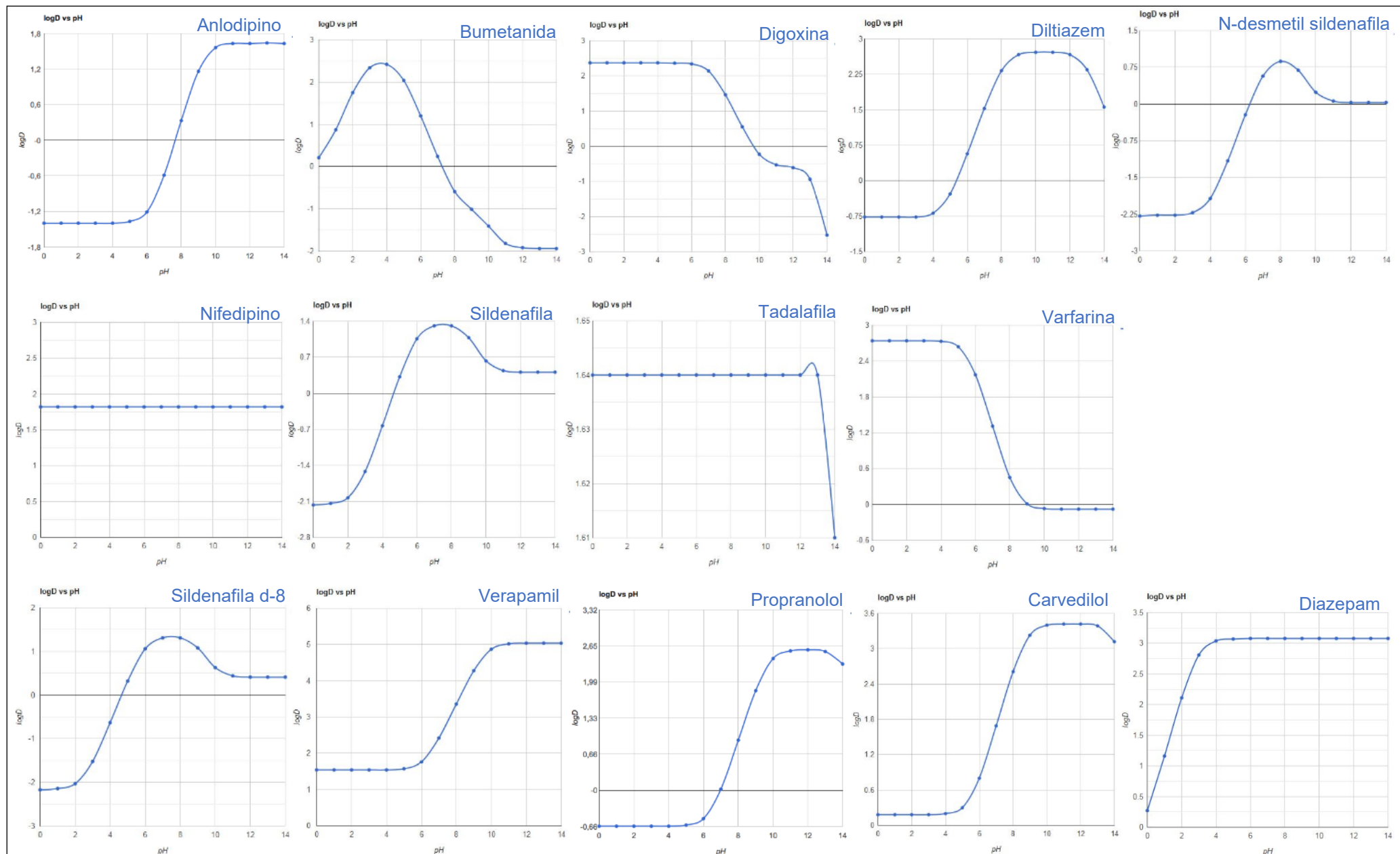
Fonte: PUBCHEM, 2020; THE UNITED, 2019.

Tabela 29 – Características farmacocinéticas dos analitos selecionados para desenvolvimento do método bioanalítico.

Analito	Concentração plasmática máxima - C <sub>MÁX</sub> (ng/mL)	Ligação a proteínas plasmáticas (%)	Meia-vida t <sub>1/2</sub> (h)	Dose diária	Formas farmacêuticas e dosagens presentes no mercado
Besilato de anlodipino (ANLO)	(18,10 ± 7,10) (após uma dose oral de 10 mg) <sup>1</sup>	(93,0 ± 1,0) <sup>1</sup>	(39,0 ± 8,0) <sup>1</sup>	2,5-20 mg <sup>4</sup>	Comprimidos 2,5; 5 e 10 mg <sup>6</sup>
Bumetanida (BUM)	(106,00 ± 22,00) (após uma dose oral de 3 mg) <sup>1</sup>	(99,0 ± 0,3) <sup>1</sup>	(0,8 ± 0,2) <sup>1</sup>	0,5-1 mg <sup>5</sup>	Comprimidos 0,5; 1 e 2 mg <sup>7</sup>
Digoxina (DGX)	(1,40 ± 0,70) (após uma dose oral de 0,31 ± 0,19 mg) <sup>1</sup>	(25,0 ± 5,0) <sup>1</sup>	(39,0 ± 13,0) <sup>1</sup>	0,75-1,50 mg (dose de ataque rápido) 0,25-0,75 mg (dose de ataque lento) 0,125-0,250 mg (dose de manutenção) <sup>5</sup>	Comprimidos 0,25 mg Elixir 0,05 mg/mL <sup>8</sup>
Cloridrato de diltiazem (DTZ)	(151,00 ± 46,00) (após uma única dose oral de 120 mg) <sup>1</sup>	(78,0 ± 3,0) <sup>1</sup>	(4,4 ± 1,3) <sup>1</sup>	60-720 mg <sup>4</sup>	Comprimidos 30, 60, 90, 12 e 180 mg <sup>6</sup>
N-desmetil sildenafil (N-DMS)	(83,42 ± 45,99) <sup>2</sup> e 126,00 <sup>3</sup>	-	-	-	-
Nifedipino (NIF)	Liberção imediata: (79,00 ± 44,00) (após uma única dose oral de 10 mg) <sup>1</sup> Liberção prolongada: (35,00 - 49,00) <sup>1</sup> (após uma única dose oral de 60 mg)	(96,0 ± 1,0) <sup>1</sup>	(1,8 ± 0,4) <sup>1</sup>	30-240 mg <sup>4</sup>	Cápsula mole 10 mg Comprimidos revestidos 10 e 20 mg Comprimidos revestidos de liberação prolongada 20, 30 e 60 mg <sup>6</sup>
Citrato de sildenafil (SLD)	(212,00 ± 59,00) (após uma única dose oral de 50 mg) <sup>1</sup>	96,0 <sup>1</sup>	(2,4 ± 1,0) <sup>1</sup>	60 mg/dia (em três administrações de 20 mg) <sup>4</sup>	Comprimidos revestidos 20; 25; 50 e 100 mg <sup>6</sup>
Tadalafila (TAD)	378,00 (após uma única dose oral de 20 mg) <sup>1</sup>	94,0 <sup>1</sup>	17,5 <sup>1</sup>	40 mg <sup>5</sup>	Comprimidos revestidos 5 e 20 mg <sup>6</sup>
Varfarina (VAR)	Enantiômero R: (900,00 ± 400,00) Enantiômero S: (500,00 ± 200,00) (estado de equilíbrio dinâmico médio, 12 horas após a dose oral diária de 6,1 ± 2,3 mg da forma racêmica) <sup>1</sup>	(99,0 ± 1,0) <sup>1</sup>	(37,0 ± 15,0) <sup>1</sup>	2,5 mg a 5 mg ao dia, com ajustes posológicos baseados nos resultados de RNI. Na maioria dos pacientes, a resposta é satisfatoriamente mantida com uma dose de 2,5 a 10 mg ao dia <sup>5</sup>	Comprimidos 1; 2; 2,5; 5; 7,5 e 10 mg <sup>6</sup>

<sup>1</sup>BRUNTON; LAZO; PARKER, 2006. <sup>2</sup>AL-GHAZAWIA; TUTUNJI; ABURUZ, 2007. <sup>3</sup>NICHOLS; MUIRHEAD; HARNESS, 2002. <sup>4</sup>ECS, 2016. <sup>5</sup>ANVISA, 2020a. <sup>6</sup>ANVISA, 2020b. <sup>7</sup>BUMEX, 2020 (não registrado no Brasil). <sup>8</sup>MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020.

Figura 22 – Gráficos de log D (coeficiente de distribuição) dos analitos em função do pH.



Fonte: CHEMAXON, 2020.

## 4 MATERIAIS

### 4.1 SQR e IFA

- As seguintes SQR foram utilizadas: bumetanida (Farmacopeia Americana - USP, lote IOC111, pureza de 100,00%), carvedilol (Farmacopeia Americana - USP, lote FOG379, pureza de 99,80%), citrato de sildenafil (Farmacopeia Europeia, lote 1.1, pureza de 98,80%), cloridrato de diltiazem (Farmacopeia Brasileira, lote 1024, pureza de 100,00%), cloridrato de propranolol (Farmacopeia Americana - USP, lote IOC170, pureza de 100,00%), diazepam (Farmacopeia Brasileira, lote 1024, pureza de 100,00%), digoxina (Farmacopeia Americana - USP, lote N-1, pureza de 100,00%), hidroclorotiazida (Farmacopeia Americana - USP, lote H, pureza de 100,00%), nifedipino (Farmacopeia Brasileira, lote 2025, pureza de 99,60%), N-desmetil sildenafil (Toronto Research Chemicals, lote 2-NOT-111-4, pureza de 98,00%), sildenafil d-8 (Toronto Research Chemicals, lote 2-OMK-8-1, pureza de 98,00%), tadalafila (Farmacopeia Europeia, lote 2.0, pureza de 99,90%), varfarina (Sigma-Aldrich, lote BCBV7416, pureza de 99,50%),
- Os IFA descritos a seguir também foram usados: besilato de anlodipino (Purifarma, lote AMB/030/04/17, pureza de 99,75%) e cloridrato de verapamil (Fagron, lote 16C04-B011-003142, pureza de 100,00%).

### 4.2 Amostras de plasma humano

Para a obtenção do plasma branco (plasma de voluntários que não estavam fazendo uso de qualquer medicação), amostras de sangue de voluntários saudáveis foram coletadas no Laboratório de Hematologia Clínica da Faculdade de Farmácia da UFMG. As amostras reais foram obtidas de pacientes voluntários atendidos no Serviço de Anticoagulação, Hematologia e Oncologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Em ambos os casos, o sangue foi coletado utilizando-se tubos para coleta contendo heparina sódica como anticoagulante. Imediatamente após a coleta, os tubos, adequadamente identificados com o código do voluntário, foram centrifugados a 480 x g durante 10 minutos a 4 °C e, em seguida, o plasma (sobrenadante) foi separado e transferido para tubos tipo *Falcon*, que foram mantidos em freezer à temperatura de 70 °C negativos. O estudo foi

aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG, protocolos CAAE 65767617.9.0000.5149 e 01455418.4.0000.5149.

### 4.3 Reagentes

- Água ultrapura.
- Reagentes grau analítico: acetato de amônio e ácido acético glacial Neon (São Paulo, Brasil), acetona e clorofórmio Dinâmica (Indaiatuba, Brasil), acetato de amônio e etanol Merck (Darmstadt, Alemanha), ácido cítrico anidro, diclorometano, hidróxido de amônio e hidróxido de sódio Synth, (Diadema, Brasil), ácido fórmico, bicarbonato de sódio, citrato de sódio tribásico di-hidratado, cloreto de sódio, clorobenzeno e 1,2-dicloroetano Sigma Aldrich (Saint Louis, EUA), ácido trifluoroacético Tedia Company (Fairfield, USA), etanolamina Carlo Erba (Barcelona, Espanha), formiato de amônio Spectrum (New Jersey, EUA) e 2-propanol J.T. Baker (Xalostoc, México).
- Solventes grau HPLC: acetonitrila Merck (Darmstadt, Alemanha), acetonitrila Tedia Company (Fairfield, USA) e metanol Sigma Aldrich (Saint Louis, EUA).

### 4.4 Materiais, vidrarias e instrumentos

- Coluna cromatográfica Phenomenex Synergi 4 $\mu$  Fusion C<sub>18</sub> - 80A (50 x 2,0 mm, 4  $\mu$ m).
- Coluna cromatográfica Phenomenex Synergi 4 $\mu$  Hydro C<sub>18</sub> - 80A (50 x 2,0 mm, 4  $\mu$ m).
- Coluna cromatográfica Phenomenex Onyx Monolithic C<sub>18</sub> (100 x 4,6 mm).
- Frasco tipo *vial total recovery* com tampa de rosca e septos de silicone.
- Filtros de seringa de PVDF com 0,45  $\mu$ m de tamanho de poro.
- Kit para filtração a vácuo.
- Membrana de celulose regenerada para filtração com 47 mm de diâmetro e poros de 0,45  $\mu$ m Sartorius Stedim Biotech.
- Microtubos de 1,5 mL e 2,0 mL.
- Pipetas automáticas.
- Ponteiras para uso em pipetas automáticas.
- Seringas de insulina de 1 mL.

- Tubos criogênicos de 2,0 mL e 5,0 mL.
- Tubos de fundo cônico tipo *Falcon* de 15 mL e 50 mL.
- Tubos para coleta de plasma de 9 mL contendo heparina sódica.

#### 4.5 Equipamentos

- Agitador tipo vórtex VELP SCIENTIFICA F202A0175.
- Aparelho de ultrassom BRANSON 3210R-MT.
- Aparelho de ultrassom UNIQUE USC750.
- Balança analítica SARTORIUS BP211D.
- Balança semi-analítica Ohaus TP2KS
- Bomba de vácuo Weg B480794.
- Centrífuga Eppendorf 5424 R
- Centrífuga JOUAN MR 23i.
- Concentrador de amostras TECNAL TecVap TE-0194
- Sistema HPLC-MS/MS composto por cromatógrafo a líquido de alta eficiência Agilent 1200 Series (equipado com desgaseificador, bomba binária, forno de colunas, injetor automático e amostrador com refrigeração) acoplado a espectrômetro de massas SCIEX QTRAP 5500 (equipado com bomba de infusão, fonte de ionização *electrospray* e analisador do tipo híbrido - quadrupolo e *ion trap*) e *software* Analyst.
- Potenciômetro METROHM 827 pH Lab.
- Sistema de purificação de água MILLIPORE DIRECT Q3.
- *Softwares* Design Expert®, Microsoft Excel® e MultiQuant®.

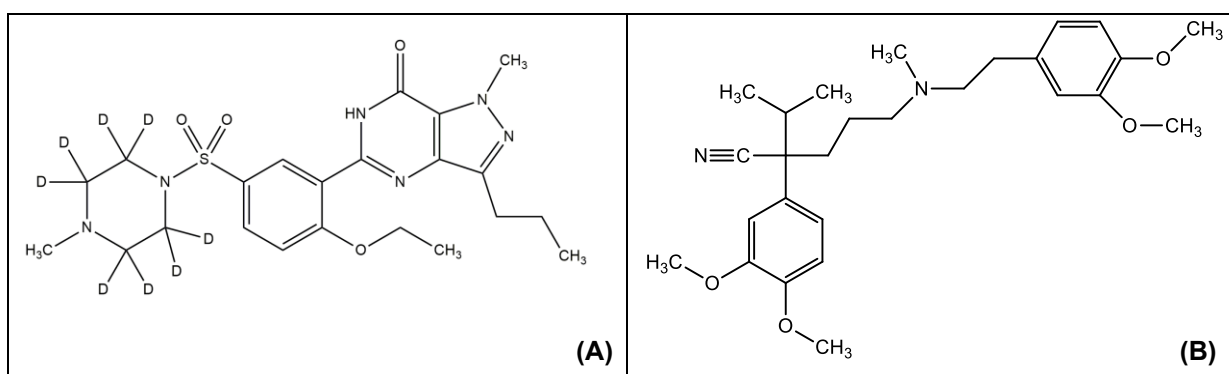
## 5 MÉTODOS

### 5.1 Desenvolvimento do método bioanalítico

Com o objetivo de desenvolver método para quantificação simultânea de SLD, N-DMS, TAD e outros fármacos empregados no tratamento da HAP (ANLO, BUM, DGX, DTZ, NIF e VAR) em plasma humano, empregou-se a DLLME na etapa de preparo de amostra, seguida pela análise por HPLC-MS/MS, com ionização por *electrospray* e analisador do tipo triplo quadrupolo.

As etapas envolvidas no desenvolvimento do método bioanalítico consistiram, sequencialmente, na determinação dos parâmetros espectrométricos, cromatográficos e de preparo de amostra. Para a quantificação dos analitos foram utilizados dois padrões internos (PI), os quais foram escolhidos conforme descrito no item **6.1.4** (página 171). Para o SLD, o PI utilizado foi o isótopo deuterado do sildenafil (SLD d-8,  $C_{22}H_{22}D_8N_6O_4S$ ), que possui massa exata de 482,2551 g/mol. Os demais analitos foram quantificados utilizando-se o verapamil (VERA,  $C_{27}H_{38}N_2O_4$ ), que possui massa exata de 454,2831 g/mol como PI. As estruturas químicas dos PI são apresentadas na **Figura 23**.

**Figura 23 – Estruturas químicas dos PI utilizados para quantificação: SLD d-8 (A) e VERA (B).**



Fonte: adaptado de PUBCHEM, 2020.

#### 5.1.1 Determinação dos parâmetros espectrométricos

Iniciou-se o desenvolvimento do método bioanalítico otimizando-se os parâmetros espectrométricos necessários para a detecção dos analitos. Para isso,

primeiramente, prepararam-se soluções padrão estoque individuais dos analitos e PI a 0,1 mg/mL em metanol. Essas soluções padrão estoque foram diluídas, utilizando-se mistura de metanol e água ultrapura 50:50 (v/v), acidificada com ácido fórmico a 0,1% (v/v) como solvente, resultando em uma solução mistura contendo 50 ng/mL de cada um dos analitos. O preparo foi feito conforme preconizado no manual do operador do espectrômetro de massas SCIEX Triple Quad e QTRAP® (SCIEX, MN.ST.004 rev.02).

Em seguida, foi realizado o procedimento de infusão direta da solução mistura no espectrômetro de massas, utilizando-se vazão de infusão de 10  $\mu$ L/min, posições dos *sprays* vertical e horizontal ajustadas em 10 e 5, respectivamente. Nessa etapa, foram definidos o modo de ionização (positivo ou negativo), os valores de potencial de desagregação, em inglês *declustering potential* (DP), a energia de colisão, em inglês *collision energy* (CE), o potencial de saída da célula, em inglês *collision cell exit potencial* (CXP) e as transições de massas de quantificação e de confirmação a serem monitoradas (íon precursor  $\rightarrow$  íon produto), para cada analito. O potencial de entrada, em inglês *entrance potential* (EP) foi mantido em 10 V.

O próximo passo consistiu na otimização dos parâmetros da fonte de ionização, sendo eles: voltagem do capilar, nível do gás de colisão, gás de contra-corrente, em inglês *curtain gas*, temperatura e, por fim, pressão dos gases de nebulização (GS1) e de secagem (GS2). Essa etapa da otimização foi realizada no modo de análise por injeção de fluxo (FIA, em inglês *flow injection analysis*), no qual utilizou-se o cromatógrafo (sem coluna) para injetar no espectrômetro de massas 20  $\mu$ L de uma solução do analito que apresentou menor intensidade de ionização, a DGX. Para isso, preparou-se uma solução de DGX a 10 ng/mL em metanol e água 50:50 (v/v). A fase móvel foi constituída por solução aquosa de ácido fórmico 0,1% (v/v) e metanol com ácido fórmico 0,1% (v/v) a uma vazão de 0,5 mL/min. O tempo de cada corrida foi de 0,7 minutos, o gás de colisão utilizado foi o nitrogênio e as posições dos *sprays* vertical e horizontal foram ajustadas em 5 e 2, respectivamente. Os valores testados durante a otimização dos parâmetros da fonte encontram-se na **Tabela 30**.



**Tabela 30 – Valores testados para os respectivos parâmetros durante a otimização da fonte de ionização.**

Parâmetro	Valores
Voltagem do capilar (V)	4000, 4500, 5000 e 5500
Gás de colisão (nível)	Baixo, médio e alto
<i>Curtain</i> gas (psi)	10, 12, 15 e 20
Temperatura da fonte (°C)	450, 500, 550, 600, 650
GS1/nebulização (psi)	40, 45 e 50
GS2/secagem (psi)	40, 45 e 50

### 5.1.2 Otimização das condições cromatográficas

Para os testes de otimização das condições cromatográficas foi utilizada uma solução mistura dos analitos a 100 ng/mL preparada em acetonitrila e água 10:90 (v/v).

Iniciou-se o desenvolvimento do método cromatográfico otimizando-se a composição da fase móvel. Como o método envolve a análise simultânea de 11 analitos que apresentam características físico-químicas distintas, utilizou-se o método de eluição em gradiente. Para a definição do eluente aquoso foram testados, como aditivos, ácido fórmico, acetato de amônio e formiato de amônio, em várias concentrações e diferentes ajustes de pH. Quanto ao eluente orgânico, testaram-se acetonitrila e metanol. Os testes foram realizados empregando-se coluna Phenomenex Synergi Fusion C<sub>18</sub> (50 x 2,0 mm, 4 µm), vazão de 0,5 mL/min, volume de injeção de 5 µL e um gradiente inicial amplo, apresentado na **Tabela 31**.

**Tabela 31 – Gradiente utilizado durante etapa inicial de desenvolvimento do método.**

Tempo (min)	A% (v/v) (eluente aquoso)	B% (v/v) (eluente orgânico)	Eluição
0 – 10	80% → 0%	20% → 100%	Gradiente linear
10 – 11	0% → 80%	100% → 20%	Gradiente linear
11 – 15	80%	20%	Re-equilíbrio

A fase móvel escolhida foi aquela que proporcionou maiores valores de razão sinal/ruído para os analitos e foi constituída por solução aquosa de ácido fórmico 0,1% (v/v) e acetonitrila.

Em seguida foram testadas colunas cromatográficas que se diferenciavam pela composição (particuladas e monolítica) e dimensões. Optou-se por utilizar a coluna

que provocou menor efeito residual e melhor aspecto dos picos cromatográficos (formato gaussiano e precisão de injeção).

O próximo passo consistiu em otimizar o gradiente e, para isso, foram propostas diversas alterações no tempo e proporção do solvente orgânico, com a finalidade de obter um fator de retenção superior a 1,5 (tentativa de reduzir a possibilidade de efeito matriz) e menor tempo de corrida. O tempo para re-equilíbrio da coluna foi estabelecido com base na avaliação dos DPR dos tempos de retenção dos analitos após cinco injeções consecutivas da solução mistura dos analitos a 100 ng/mL.

As condições cromatográficas e o gradiente do método otimizados, utilizando-se HPLC-MS/MS para análise simultânea dos nove analitos (ANLO, BUM, DGX, DTZ, N-DMS, NIF, SLD, TAD e VAR) e dos dois PI (SLD d-8 e VERA), encontram-se descritas nas **Tabelas 32 e 33**, respectivamente.

**Tabela 32 – Resumo das condições cromatográficas definitivas do método bioanalítico por HPLC-MS/MS.**

Parâmetros	Condições
Coluna	Phenomenex®, Onyx Monolithic C <sub>18</sub> (100 x 4,6 mm)
Eluente aquoso	Solução aquosa de ácido fórmico 0,1% (v/v)
Eluente orgânico	Acetonitrila
Vazão da fase móvel	0,5 mL/min
Gradiente	Descrito na <b>Tabela 31</b>
Temperatura do forno	30 °C
Volume de injeção	5 µL
Tempo de corrida	7 min seguidos de 5 min para re-equilíbrio da coluna

**Tabela 33 – Gradiente definitivo do método bioanalítico por HPLC-MS/MS.**

Tempo (min)	A% (v/v) (solução aquosa de ácido fórmico 0,1% (v/v))	B% (v/v) (acetonitrila)	Eluição
0 – 2,0	70% → 5%	30% → 95%	Gradiente linear
2,0 – 6,5	5%	95%	Isocrática
6,5 – 7,0	5% → 70%	95% → 30%	Gradiente linear
7,0 – 12,0	70%	30%	Re-equilíbrio

A última etapa da otimização do método cromatográfico consistiu na definição dos valores de *Dwell Time* para cada transição de massas monitorada, utilizando-se a equação disponível no manual do operador do espectrômetro de massas SCIEX Triple Quad e QTRAP® (SCIEX, MN.ST.004 rev.02), apresentada a seguir:

$$Dwell\ Time = \left( \frac{Largura\ do\ pico\ (min)}{\frac{n^{\circ}\ ideal\ de\ pontos}{n^{\circ}\ de\ transi\c{c}o\es\ do\ m\acute{e}todo}} \right) \times 60.000$$

Como o SLD, o N-DMS e o SLD d-8 apresentam íons produtos em comum, realizou-se teste para avaliar a ocorrência do fenômeno de *crosstalk*. Para isso, foram utilizadas uma solução branco (contendo apenas o diluente) e uma contendo SLD a 100 ng/mL em diluente. Essas soluções foram analisadas por um método que monitorava todas as transições de quantificação e confirmação correspondentes aos analitos N-DMS, SLD e SLD d-8. Para confirmar a ausência de *crosstalk*, espera-se que os sinais referentes às transições dos analitos ausentes na solução (N-DMS e SLD d-8) sejam iguais ao ruído de fundo obtido com a solução branco.

### **5.1.3 Otimização da etapa de preparo de amostra**

Os testes para otimização da etapa de preparo de amostra foram realizados a partir de amostras de plasma branco fortificadas com os analitos a 50 ng/mL. Inicialmente, o PI utilizado foi SLD d-8 em solução metanólica a 250 ng/mL.

Com o objetivo de aumentar a eficiência da extração e a recuperação dos analitos, optou-se pela realização de uma etapa prévia de limpeza da amostra por PPT. O sobrenadante obtido nessa etapa agiu como dispersante para a técnica DLLME.

Para a definição do solvente precipitante, realizou-se um experimento univariado, no qual foram testados nove diferentes agentes precipitantes, sendo eles: acetona, acetonitrila e metanol puros, com adição de ácido fórmico 0,1% (v/v) ou hidróxido de amônio 0,1% (v/v).

O teste foi feito em triplicata e, para o preparo de cada amostra partiu-se de 50 µL de plasma (contendo 50 ng/mL de cada um dos analitos) em microtubo de plástico de 1,5 mL. Em seguida, adicionaram-se 20 µL da solução contendo o PI e agitou-se em vórtex por 15 segundos. Acrescentaram-se 100 µL do solvente precipitante e homogeneizou-se em agitador do tipo vórtex por 60 segundos. Centrifugou-se a amostra durante 5 minutos a 9400 x g e 4 °C, retirou-se o sobrenadante e transferiu-

se para outro microtubo de 1,5 mL. Evaporou-se o solvente em concentrador de amostras, ressuspenderam-se os analitos em 50 µL de fase móvel (mistura de acetonitrila e solução aquosa de ácido fórmico 0,1% v/v na proporção de 30:70 v/v), agitou-se em vórtex por 30 segundos e transferiu-se para *vial*. Após análise das amostras pelo método por HPLC-MS/MS otimizado, investigaram-se os resultados por ANOVA (testes F e Tukey). A escolha do agente precipitante foi baseada nos valores de área média sob o pico dos analitos.

A otimização das variáveis quantitativas referentes à etapa de PPT, foi realizada por um planejamento composto central (CCD, em inglês *central composite design*). As variáveis independentes escolhidas para compor o planejamento foram: volume da amostra ( $X_1$ ), proporção entre volume do solvente precipitante e volume da amostra ( $X_2$ ) e tempo de agitação ( $X_3$ ). Os níveis avaliados são apresentados na **Tabela 34**.

**Tabela 34 – Variáveis e seus níveis empregadas para a otimização da etapa de PPT.**

Variável ( $X_i$ )	Níveis		
	-1	0	+1
Volume da amostra (µL) ( $X_1$ )	50	75	100
$V_{SP} / V_{amostra}$ ( $X_2$ )	2	3	4
Tempo de agitação (s) ( $X_3$ )	30	45	60

**Legenda:** SP = Solução precipitante - acetonitrila com hidróxido de amônio 0,1% (v/v); V = volume.

As amostras foram preparadas de maneira a reproduzir a matriz experimental do CCD, com três pontos centrais, totalizando 11 experimentos, os quais foram realizados de maneira aleatória. As variáveis dependentes (respostas) avaliadas foram as recuperações dos analitos obtidas em cada experimento, utilizando-se a seguinte equação:

$$\text{Recuperação (\%)} = (\text{concentração experimental} / \text{concentração teórica}) \times 100$$

A concentração teórica foi determinada por meio do preparo de amostra partindo de diferentes volumes de plasma branco (50, 75 e 100 µL), utilização do dobro de solvente precipitante e 30 segundos de agitação. A ressuspensão foi feita com soluções nas concentrações teóricas finais dos analitos.

Os resultados de recuperação obtidos foram analisados utilizando-se *software* Design Expert<sup>®</sup>. Então, os modelos matemáticos gerados para cada analito foram avaliados por ANOVA e, aqueles analitos cujos modelos apresentaram regressão significativa ( $p < 0,05$ ) e não apresentaram falta de ajuste ( $p > 0,05$ ), foram os selecionados para determinação da desejabilidade. Dessa forma, foi possível estabelecer as condições ótimas para a etapa de precipitação de proteínas.

Posteriormente, otimizou-se, de forma sequencial e univariada, os parâmetros que influenciam na DLLME, sendo eles: pH, concentração, força iônica e volume da fase aquosa, tipo e volume de solvente extrator, tipo e volume de solvente dispersante e tempo de agitação.

Durante esses testes, as amostras foram preparadas em triplicata da seguinte maneira: pipetaram-se 100  $\mu\text{L}$  da amostra de plasma (fortificado com 50 ng/mL dos analitos), que foram transferidos para microtubo de plástico de 1,5 mL. Adicionaram-se 40  $\mu\text{L}$  de solução de PI e agitou-se em vórtex por 15 segundos. Acrescentou-se o volume do solvente dispersante correspondente e homogeneizou-se em agitador do tipo vórtex por 30 segundos. Centrifugou-se a amostra durante 5 minutos a 9400  $\times g$  e 4 °C e transferiu-se o sobrenadante para outro microtubo de 1,5 mL. Adicionou-se volume correspondente do solvente extrator ao microtubo contendo o sobrenadante da etapa de PPT. Aspirou-se o conteúdo desse microtubo com uma seringa de 1 mL e o mesmo foi adicionado rapidamente em um microtubo de 2 mL contendo o tampão correspondente. Agitou-se em vórtex por tempo correspondente, centrifugou-se por 5 minutos a 9400  $\times g$  e 4 °C e aspirou-se o sedimento (fase extratora, situada na parte inferior do microtubo) com a mesma seringa de 1 mL. Transferiu-se para um microtubo de plástico de 1,5 mL e evaporou-se o solvente em concentrador de amostras. Ressuspendeu-se os analitos com 50  $\mu\text{L}$  de fase móvel, agitou-se em vórtex durante 30 segundos, transferiu-se para *vial* e injetou-se no sistema HPLC-MS/MS.

Os resultados de área média sob os picos obtida para cada analito foi plotada em gráficos em função da condição avaliada. A escolha da melhor condição foi realizada por meio da análise desses gráficos, priorizando-se a condição que proporcionou maior área sob o pico dos analitos.

Por fim, os PI a serem utilizados no método bioanalítico foram escolhidos por meio da realização do preparo de amostra em quintuplicata, utilizando-se uma mistura contendo cinco potenciais PI (SLD d-8, VERA, propranolol, carvedilol e diazepam). O teste foi realizado em quintuplicata e os PI definidos foram aqueles que proporcionaram menores valores de DPR entre as áreas dos analitos.

## **5.2 Validação do método bioanalítico**

O método bioanalítico desenvolvido foi validado de acordo com as recomendações presentes na Resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012 (ANVISA) (BRASIL, 2012), no Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos da *European Medicines Agency* (EMA) – *Guideline on bioanalytical method validation* (EMA, 2011) e no Guia proveniente do FDA - *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry* (FDA, 2018). Foram avaliados os parâmetros seletividade, efeito residual, efeito matriz, linearidade da faixa de trabalho, precisão, exatidão, recuperação e estabilidade dos analitos. Os cálculos foram procedidos com auxílio dos *softwares* Microsoft Excel® e MultiQuant®.

Antes de iniciar a validação, prepararam-se soluções estoque dos analitos em metanol e, a partir dessas, foram produzidas soluções de concentrações intermediárias, utilizando-se também metanol como solvente, para serem adicionadas ao plasma branco, de modo a obter as concentrações necessárias para a construção da curva de calibração em plasma e dos controles de qualidade. Separadamente, foi preparada uma solução metanólica contendo os padrões internos (VERA a 52,5 ng/mL e SLD d-8 a 250 ng/mL). O volume de solução metanólica adicionado foi de, no máximo, 5% do volume de plasma utilizado, com o objetivo de minimizar alterações da matriz biológica.

### **5.2.1 Seletividade**

A seletividade do método bioanalítico foi verificada analisando-se seis amostras provenientes de fontes distintas, sendo quatro amostras de plasma normal, uma amostra de plasma hemolisado e uma amostra de plasma lipêmico (proveniente de coleta pós prandial), todas sem adição de analito e PI.

Os cromatogramas obtidos com essas amostras de plasma branco foram comparados com aqueles provenientes das amostras extraídas na concentração do limite inferior de quantificação (LIQ). A presença de picos interferentes próximo ao tempo de retenção dos analitos foi aceita apenas quando apresentavam área inferior a 20% da resposta do analito nas amostras do LIQ. Quanto aos PI, as respostas dos picos interferentes deveriam ser inferiores a 5% da resposta dos PI nas respectivas concentrações de trabalho.

### **5.2.2 Efeito residual**

Para a avaliação do efeito residual foram preparadas uma amostra de plasma branco, uma amostra de plasma contendo os fármacos na concentração do limite superior de quantificação (LSQ) e uma amostra contendo os fármacos na concentração do LIQ.

Posteriormente, foi injetado no cromatógrafo a amostra branco, seguida pela injeção da amostra de LSQ e, em sequência injetou-se duas vezes a amostra branco novamente. Por fim, a amostra de LIQ foi injetada. As áreas sob os picos dos cromatogramas das amostras de plasma branco foram comparadas com aquelas obtidas a partir de amostras extraídas de LIQ.

Para que o efeito residual não comprometa a precisão e exatidão do método, a presença de interferentes nos tempos de retenção dos analitos de interesse só é aceita quando a área sob os picos interferentes é inferior a 20% das áreas dos analitos no LIQ e a 5% das áreas dos PI.

### **5.2.3 Efeito matriz**

A avaliação do efeito matriz foi realizada para o procedimento de preparo de amostra otimizado por DLLME e também para a etapa que compreende apenas o preparo de amostra por PPT. Em ambas as análises foram utilizadas oito amostras de plasma branco de voluntários diferentes, sendo quatro de plasma normal, duas de plasma hemolisado e duas de plasma lipêmico.

Foi necessário primeiramente preparar soluções contendo os analitos e PI em diluente constituído por mistura de acetonitrila e água (30:70 v/v) nas concentrações referentes ao controle de qualidade de baixa concentração (CQB) e controle de qualidade de alta concentração (CQA). Parte dessas soluções foi transferida para *vial* e outra parte foi utilizada para a ressuspensão das amostras de plasma branco, conforme descrito a seguir.

O efeito matriz do procedimento de preparo de amostra por DLLME, foi avaliado utilizando-se 100 µL de cada amostra de plasma branco e adicionando-se, em seguida, 40 µL de metanol. A extração de cada amostra prosseguiu-se conforme o método otimizado (item 6.1.4, página 171). Após evaporação em concentrador de amostras, ressuspenderam-se o resíduo com as soluções contendo os analitos e PI nas concentrações do CQB e do CQA, separadamente, e transferiu-se para *vials*.

Na avaliação do efeito matriz do procedimento de preparo de amostra por PPT, a 100 µL de cada amostra de plasma branco, adicionaram-se 40 µL de metanol e agitou-se em vórtex por 15 segundos. Em seguida adicionaram-se 200 µL de acetonitrila com hidróxido de amônio 0,1% (v/v) e homogeneizou-se em vórtex por 30 segundos. As amostras foram então centrifugadas durante 5 minutos a 9400 x g e 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um microtubo de 1,5 mL e evaporado em concentrador de amostras. Após evaporação em concentrador de amostras, adicionaram-se 50 µL das soluções contendo os analitos e PI nas concentrações do CQB e do CQA, separadamente. Agitou-se em vórtex durante 30 segundos e transferiu-se para *vials*.

As soluções de CQB e CQA, assim como as amostras provenientes das extrações dos plasmas brancos (por DLLME e por PPT), foram injetadas no sistema HPLC-MS/MS. Para cada uma das amostras foi obtido o fator de matriz normalizado por PI (FMN), conforme a seguinte equação:

$$FMN = \frac{\text{Resposta do analito em matriz/Resposta do PI em matriz}}{\text{Resposta do analito em solução/Resposta do PI em solução}}$$



Em seguida, determinou-se o DPR ou coeficiente de variação (CV) dos FMNs referentes a todas as oito amostras. O valor obtido para os DPR deve ser inferior a 15% para todos os analitos nos dois níveis de concentração avaliados.

#### 5.2.4 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada por meio da construção de três curvas de calibração contendo oito concentrações distintas dos analitos em três dias diferentes de análise. Em cada um dos dias, foram realizadas extrações de duas amostras branco (plasma branco sem adição dos PI), duas amostras zero (plasma branco com a adição dos PI na concentração de trabalho) e duas amostras de cada um dos oito níveis de concentração dos analitos. Adicionalmente, para verificação da precisão e exatidão do método, foram extraídas amostras, em quintuplicata, referentes aos controles de qualidade: controle de qualidade do limite inferior de quantificação (CQLIQ), CQB (correspondente a três vezes a concentração do LIQ), controle de qualidade de média concentração (CQM, correspondente a concentração média entre o LIQ e LSQ), CQA (correspondente a 80% do LSQ) e controle de qualidade de diluição (CQD, correspondendo a concentração acima do LSQ). No presente estudo, o CQD foi diluído na proporção de 1:4 por meio da adição de plasma branco.

Os níveis de concentração para a construção da curva de calibração, bem como dos controles de qualidade enriquecidos, são apresentados na **Tabela 35**.

**Tabela 35 – Concentrações dos analitos nas amostras de plasma enriquecidas para avaliação da linearidade, precisão e exatidão do método.**

Amostra	Concentração em plasma (ng/mL)								
	ANLO	BUM	DGX	DTZ	N-DMS	NIF	SLD	TAD	VAR
Nível 1 / LIQ	1,0	5,0	0,7	5,0	1,0	5,0	5,0	5,0	25,0
Nível 2	2,5	10,0	1,0	10,0	5,0	10,0	10,0	10,0	50,0
Nível 3	5,0	25,0	2,5	50,0	10,0	25,0	50,0	50,0	75,0
Nível 4	10,0	50,0	5,0	100,0	25,0	50,0	100,0	100,0	100,0
Nível 5	25,0	75,0	7,5	250,0	50,0	75,0	250,0	250,0	250,0
Nível 6	50,0	100,0	10,0	500,0	100,0	100,0	500,0	500,0	500,0
Nível 7	75,0	250,0	25,0	750,0	250,0	250,0	750,0	750,0	750,0
Nível 8 / LSQ	100,0	500,0	30,0	1000,0	500,0	500,0	1000,0	1000,0	1000,0
CQB	3,0	15,0	2,1	15,0	3,0	15,0	15,0	15,0	75,0
CQM	50,0	250,0	15,0	500,0	250,0	250,0	500,0	500,0	500,0
CQA	80,0	400,0	24,0	800,0	400,0	400,0	800,0	800,0	800,0
CQD	-	-	-	1500,0	-	-	-	-	3000,0

**Legenda:** LIQ: limite inferior de quantificação; LSQ: limite superior de quantificação; CQB: controle de qualidade de baixa concentração; CQM: controle de qualidade de média concentração; CQA: controle de qualidade de alta concentração; CQD: controle de qualidade de diluição.

A concentração de cada ponto da curva foi calculada considerando a razão entre a área dos analitos e a área dos respectivos PI, ou seja, as áreas sob os picos de ANLO, BUM, DGX, DTZ, N-DMS, NIF, TAD e VAR foram normalizadas pela área de VERA e as áreas sob o pico de SLD foi normalizada pela área de SLD d-8. Construíram-se, então, as três curvas de calibração, priorizando-se o modelo matemático mais simples e o fator de ponderação com o menor valor para a soma dos erros relativos das concentrações nominais *versus* os valores calculados pela equação da curva, quando a variância do erro não foi constante em toda a faixa de trabalho.

Para a avaliação da curva de calibração, foram considerados os desvios das concentrações calculadas em relação às concentrações nominais para cada ponto. O desvio máximo permitido para os padrões do LIQ foi de 20% e, para os demais níveis de concentração foi de 15%. A curva de calibração deve possuir, no mínimo, 75% dos pontos com desvios inferiores aos descritos e seis padrões de concentrações diferentes, incluindo o LIQ e o LSQ em conformidade com os desvios permitidos.

#### **5.2.5 Precisão e exatidão**

A precisão e exatidão intracorrída (em uma mesma corrida) e intercorrídas (em três dias de análise) foram avaliadas simultaneamente à determinação da linearidade da faixa de trabalho, por meio da análise de amostras de plasma em cinco concentrações referentes ao LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD, em quintuplicata, após a injeção das amostras da curva de calibração.

A precisão foi determinada por meio do cálculo do DPR, com base em todos os valores obtidos. Os valores de DPR devem ser menores que 15%, exceto para o CQLIQ, para o qual são admitidos valores menores ou iguais a 20%.

A exatidão foi expressa pelo erro padrão relativo (EPR), com base em todos os valores obtidos, conforme a seguinte equação:

$$\text{EPR (\%)} = \frac{(\text{Concentração média experimental} - \text{Valor nominal}) \times 100}{\text{Valor nominal}}$$

São aceitáveis valores de EPR na faixa de  $\pm 20\%$  do valor nominal para o CQLIQ e  $\pm 15\%$  para as demais amostras de controle de qualidade (CQ).

### **5.2.6 Recuperação**

Para a verificação da recuperação, a qual é recomendada apenas no Guia proveniente do FDA - *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry* (FDA, 2018), primeiramente prepararam-se soluções contendo os analitos e PI em diluente constituído por mistura de acetonitrila e água (30:70 v/v) nas concentrações de CQB, CQM e CQA.

Em seguida, extraíram-se amostras de plasma branco e, ao final ressuspendeu-se o resíduo com as soluções contendo os analitos e PI nas concentrações referentes a CQB, CQM e CQA separadamente, de maneira a obter quintuplicata de cada concentração. Esse preparo representa 100% de recuperação. Então comparou-se com as áreas das amostras dos CQs extraídas e analisadas no mesmo dia.

Não é exigido que a recuperação seja de 100%, mas a extensão da recuperação de um analito e dos PI deve ser constante e precisa (FDA, 2018).

### **5.2.7 Estabilidade dos analitos em plasma humano**

Avaliou-se a estabilidade dos analitos por meio dos estudos de estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento (ECC), estabilidade de curta duração (ECD), estabilidade de longa duração (ELD) e estabilidade pós-processamento (EPP), levando-se em consideração o tempo necessário para o armazenamento, preparo e análise das amostras em estudo, assim como as temperaturas de armazenamento utilizadas.

Determinaram-se o EPR e o DPR para as amostras de estabilidade. Os desvios entre as concentrações obtidas nas amostras de estabilidade devem ser inferiores a

15%, quando essas amostras forem comparadas com o valor de concentração nominal.

Para o estudo da ECC, as amostras de plasma branco fortificado com os analitos nas concentrações de CQB e CQA foram inicialmente congeladas em ultrafreezer a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  (mesma temperatura utilizada no armazenamento das amostras reais). Após 24 h essas amostras foram mantidas à temperatura ambiente até que se encontrassem completamente descongeladas. Em seguida, foram novamente transferidas para ultrafreezer a  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  negativos, onde permaneceram por 24 h. Os ciclos de descongelamento e congelamento sucederam-se até que foram completados três ciclos, quando então, as amostras foram extraídas e analisadas.

As amostras do estudo de ECD foram mantidas em temperatura ambiente durante quatro horas antes de serem extraídas e analisadas, período de tempo superior ao que as amostras poderiam ser mantidas nas mesmas condições antes do início do preparo de amostra.

Para verificar a ELD, as amostras foram processadas e analisadas após serem armazenadas em ultrafreezer a  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  negativos por 30 dias.

A EPP foi demonstrada por meio da re-análise de amostras previamente analisadas, armazenadas no amostrador automático do cromatógrafo a  $6\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 30 horas, para simular o intervalo de tempo compreendido entre o término de preparo das amostras e o final da corrida analítica mais longa.

### **5.3 Análise de amostras reais**

O método foi aplicado para a determinação da concentração plasmática dos fármacos presentes nas amostras de 10 pacientes voluntários, pertencentes a um grupo que recebia atendimento no Serviço de Anticoagulação, Hematologia e Oncologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. A análise das amostras provenientes de cada voluntário foi feita em triplicata, seguindo o método bioanalítico desenvolvido, otimizado e validado.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Desenvolvimento do método bioanalítico

#### 6.1.1 Determinação dos parâmetros espectrométricos

A primeira etapa da otimização consistiu em obter os espectros de varredura dos íons precursores e comparar as intensidades dos sinais desses íons obtidos nos modos positivo e negativo de ionização. O modo positivo de ionização normalmente é utilizado para análise de substâncias que possuem grupos funcionais básicos (aminas, amidas e ésteres), devido à facilidade de protonação, enquanto que substâncias contendo funções ácidas (ácidos carboxílicos e fenóis), são analisadas geralmente no modo negativo, por serem mais facilmente desprotonadas. Dessa forma, conforme o esperado, uma vez que os analitos de interesse possuem grupamentos básicos em suas estruturas, as intensidades dos sinais dos íons precursores, no modo positivo de ionização, foram superiores às intensidades dos íons precursores no modo negativo. Assim, para garantir maior detectabilidade ao método, optou-se por utilizar o modo positivo de ionização (ESI(+)).

Os íons precursores provenientes da ionização no modo positivo foram fragmentados, gerando assim os íons produto. A partir dos resultados obtidos, foram escolhidas as transições de massas de quantificação e de confirmação para cada analito, que estão apresentadas na **Tabela 36**.

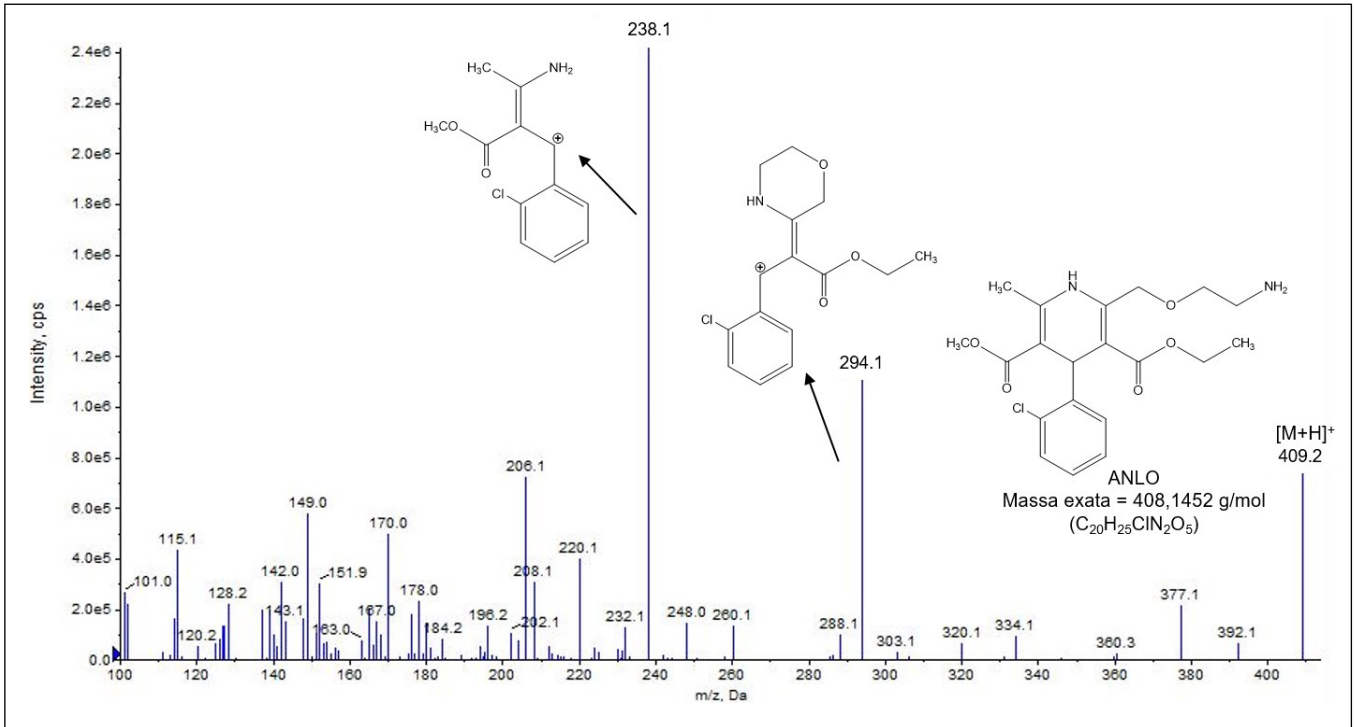
Encontram-se também na **Tabela 36**, os valores otimizados de DP, CE e CXP, os quais foram determinados de forma automatizada pelo espectrômetro de massas e seu *software* Analyst, a partir da infusão direta de uma solução mistura contendo todos os analitos na concentração de 50 ng/mL.

**Tabela 36 – Transições de massas monitoradas e valores de *Dwell Time*, DP, CE e CXP otimizados.**

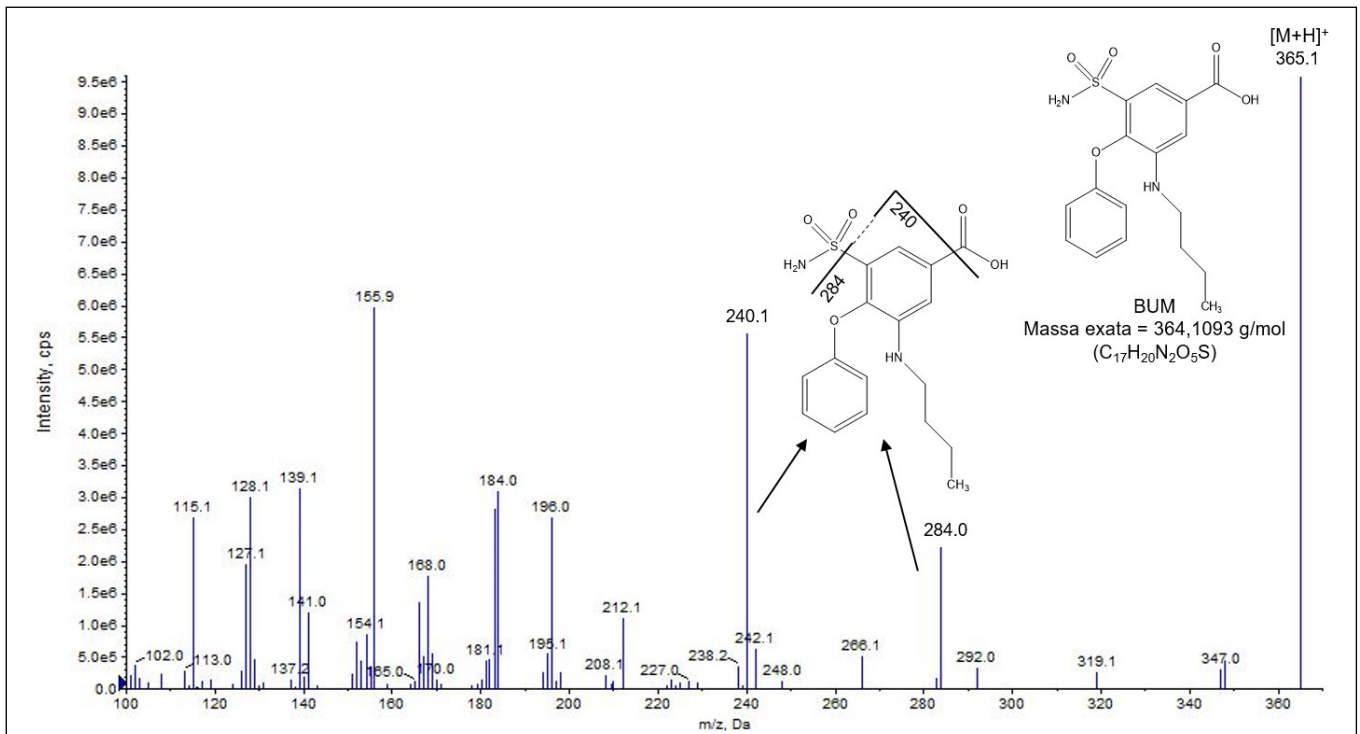
Analito	Massa exata (g/mol)	Transições de massas de quantificação (Q) e confirmação (C)	<i>Dwell Time</i> (ms)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
ANLO	408,1452	409 → 238 (Q) 409 → 294 (C)	63	66	15 13	10 10
BUM	364,1093	365 → 240 (Q) 365 → 284 (C)	86	65	23 19	14 12
DGX	780,4296	781 → 651 (Q) 781 → 391 (C)	63	67	15 23	24 16
DTZ	414,1613	415 → 310 (Q) 415 → 370 (C)	58	64	29 35	18 18
N-DMS	460,1893	461 → 283 (Q) 461 → 85 (C)	76	80	49 47	12 10
NIF	346,1165	347 → 315 (Q) 347 → 254 (C)	82	56	11 25	16 14
SLD	474,2049	475 → 283 (Q) 475 → 100 (C)	71	71	51 37	16 16
TAD	389,1376	390 → 268 (Q) 390 → 169 (C)	80	66	19 75	12 12
VAR	308,1049	309 → 163 (Q) 309 → 251 (C)	86	77	21 27	10 8
SLD d-8	482,2551	483 → 62 (Q) 483 → 108 (C)	71	45	99 37	10 16
VERA	454,2831	455 → 165 (Q) 455 → 150 (C)	76	141	37 45	14 16

As transições de massas de quantificação e confirmação escolhidas foram aquelas que proporcionaram sinais analíticos de maior intensidade. Entretanto, no caso do DTZ, foi necessário escolher transições de massas menos intensas, para que se conseguisse alcançar o limite superior de quantificação (LSQ) adequado, sem que ocorresse saturação do detector. Os espectros de massas de fragmentação obtidos para todos os analitos são apresentados nas **Figuras 24 a 34**. Foram mostradas as estruturas químicas ou fragmentações para formação dos íons produto monitorados (ACEÑA *et al.*, 2014; EICHHORN *et al.*, 2012; GRATZ; GAMBLE; FLURER, 2006; NIESSEN, 2011; HANDA; SINGH; SINGH, 2014; JAHN *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2010; RAVI *et al.*, 2020; REGALADO *et al.*, 2013; SANZ-NEBOT *et al.*, 2001).

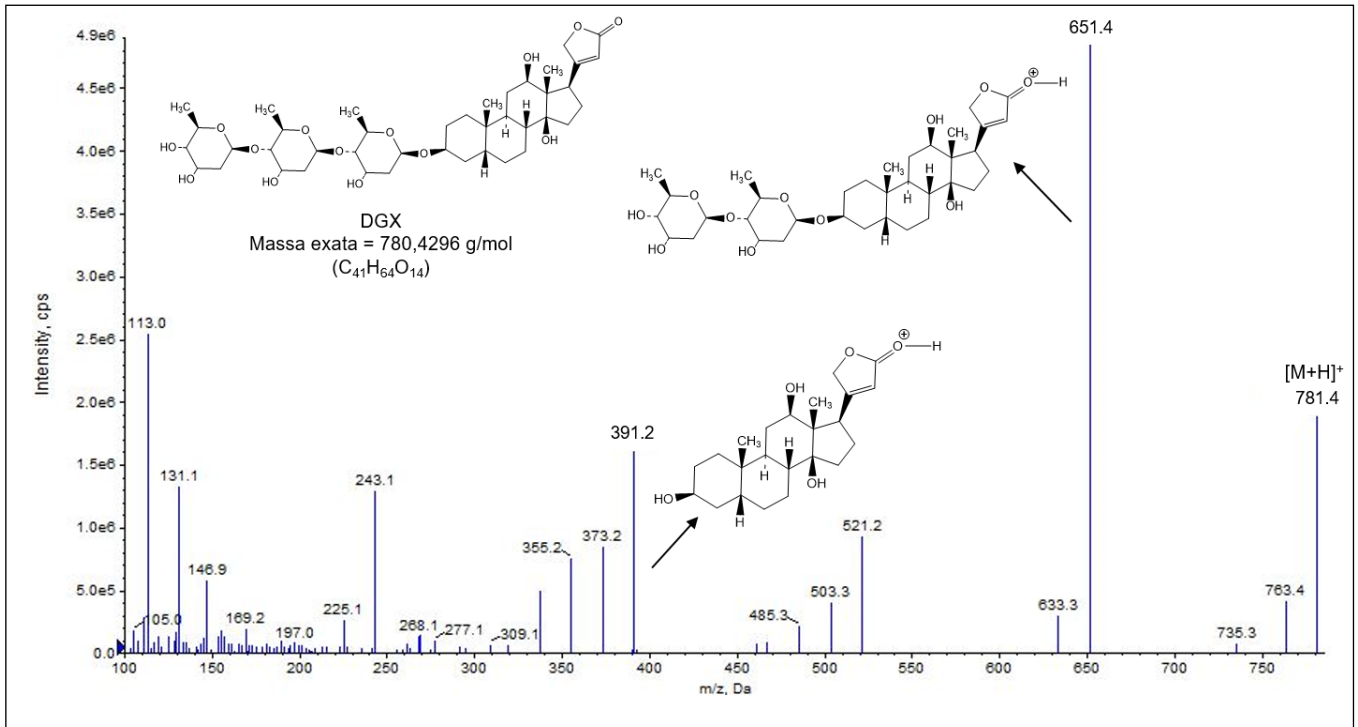
**Figura 24 - Espectro obtido após fragmentação do íon precursor  $m/z$  409, proveniente da ionização no modo positivo do anlodipino (ANLO).**



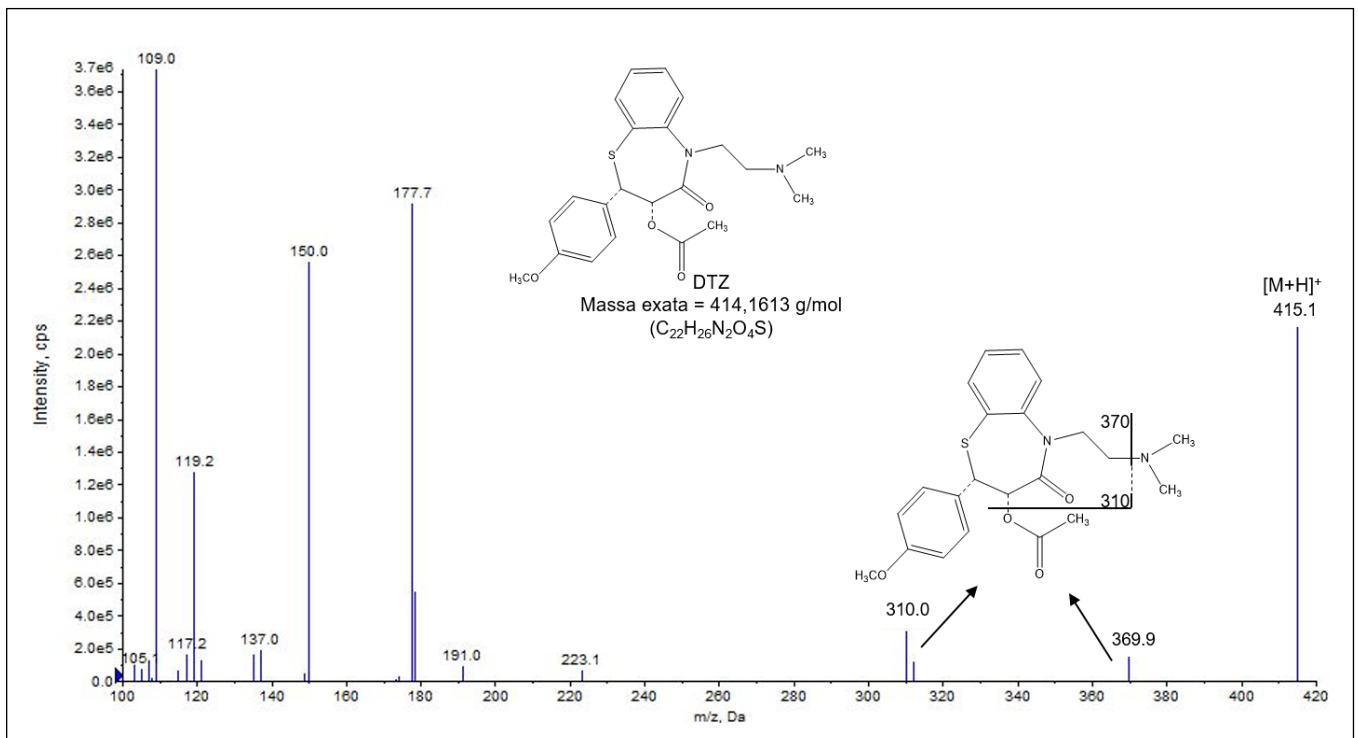
**Figura 25 - Espectro obtido após fragmentação do íon precursor  $m/z$  365, proveniente da ionização no modo positivo da bumetanida (BUM).**



**Figura 26 - Espectro obtido após fragmentação do íon precursor  $m/z$  781, proveniente da ionização no modo positivo da digoxina (DGX).**

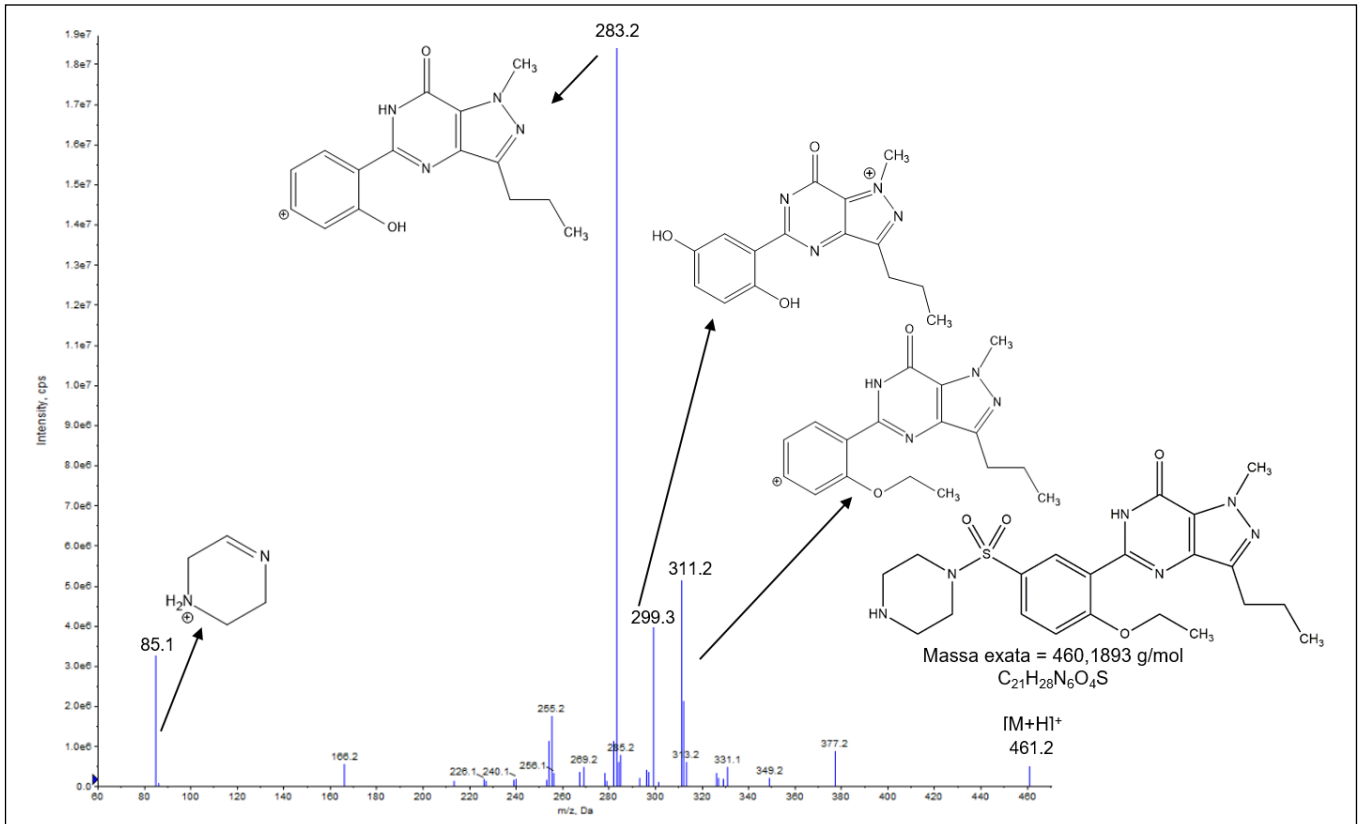


**Figura 27 - Espectro obtido após fragmentação do íon precursor  $m/z$  415, proveniente da ionização no modo positivo do diltiazem (DTZ).**

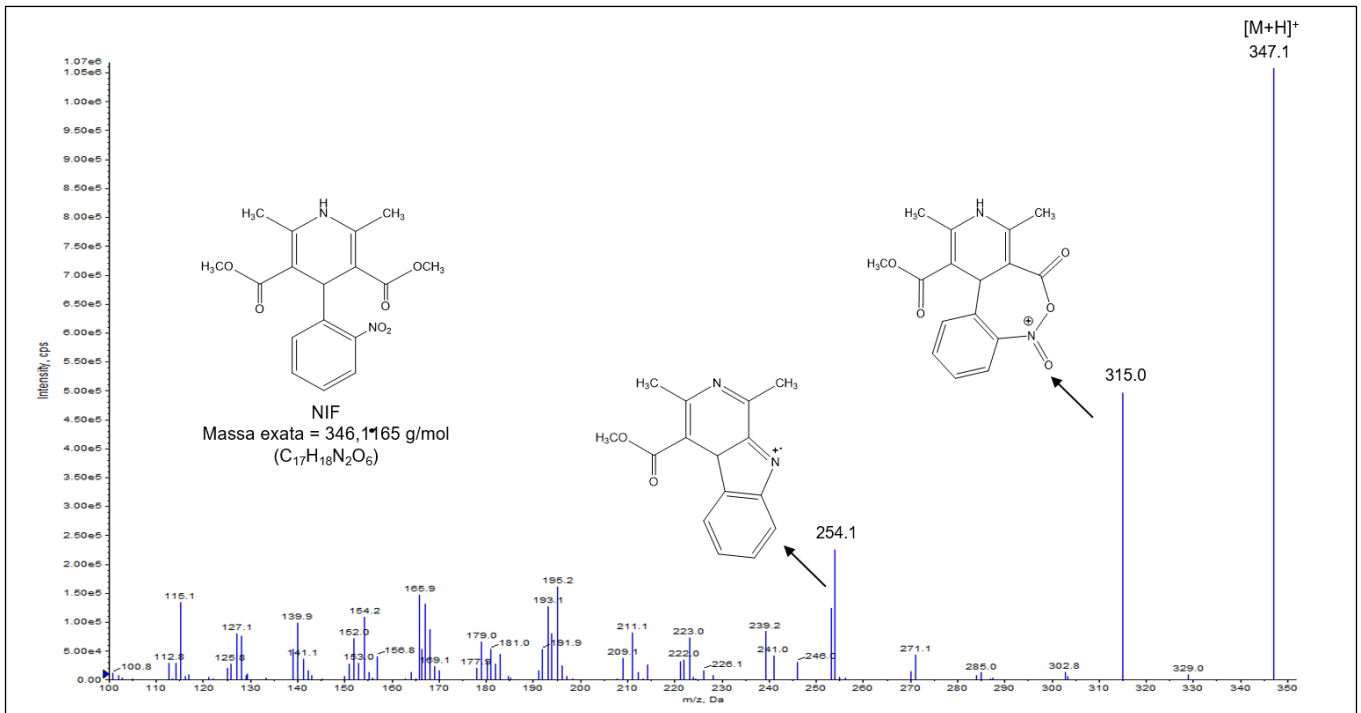




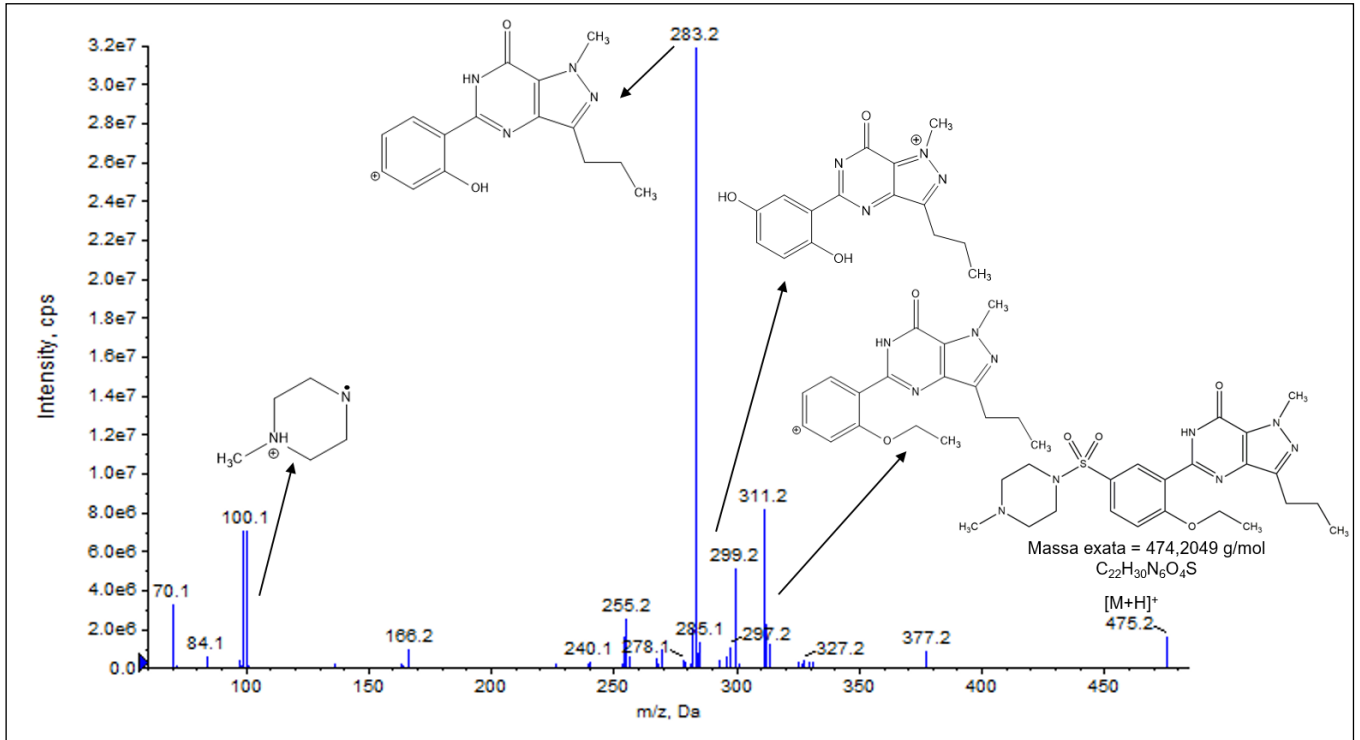
**Figura 28 - Espectro obtido após fragmentação do íon precursor  $m/z$  461, proveniente da ionização no modo positivo do N-desmetil sildenafil (N-DMS).**



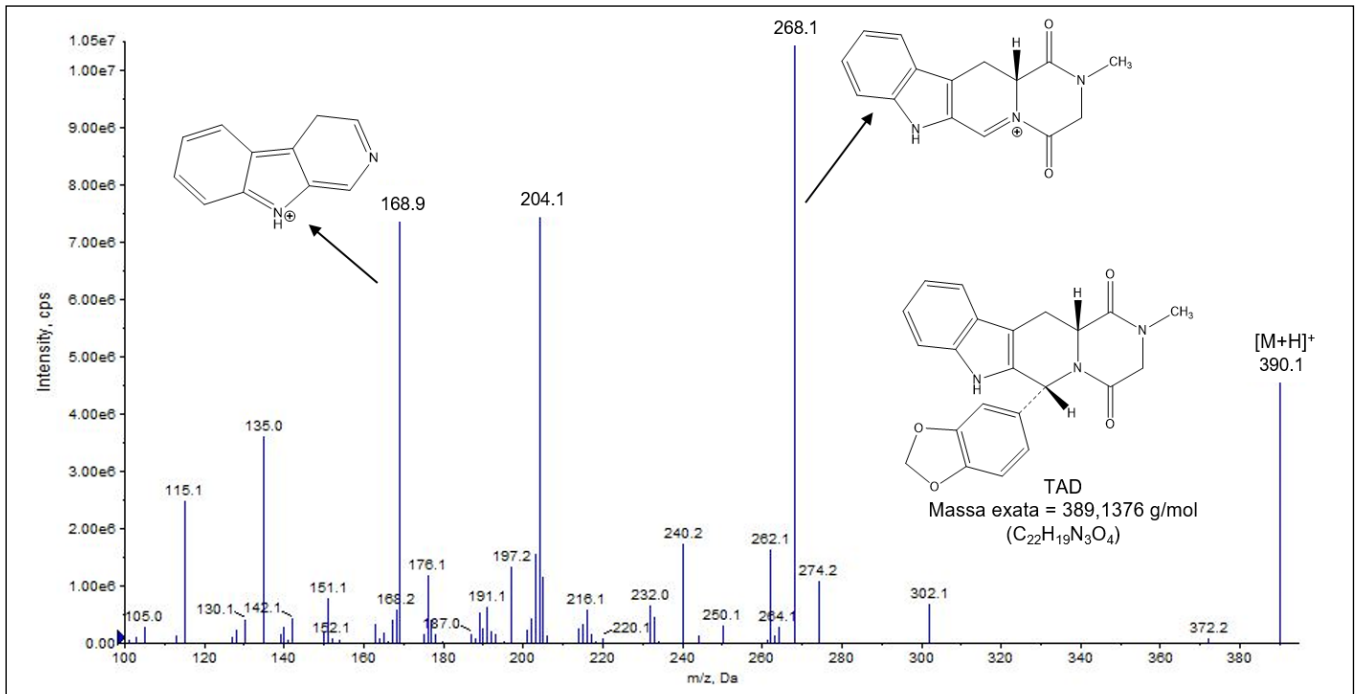
**Figura 29 - Espectro obtido após fragmentação do íon precursor  $m/z$  347, proveniente da ionização no modo positivo do nifedipino (NIF).**



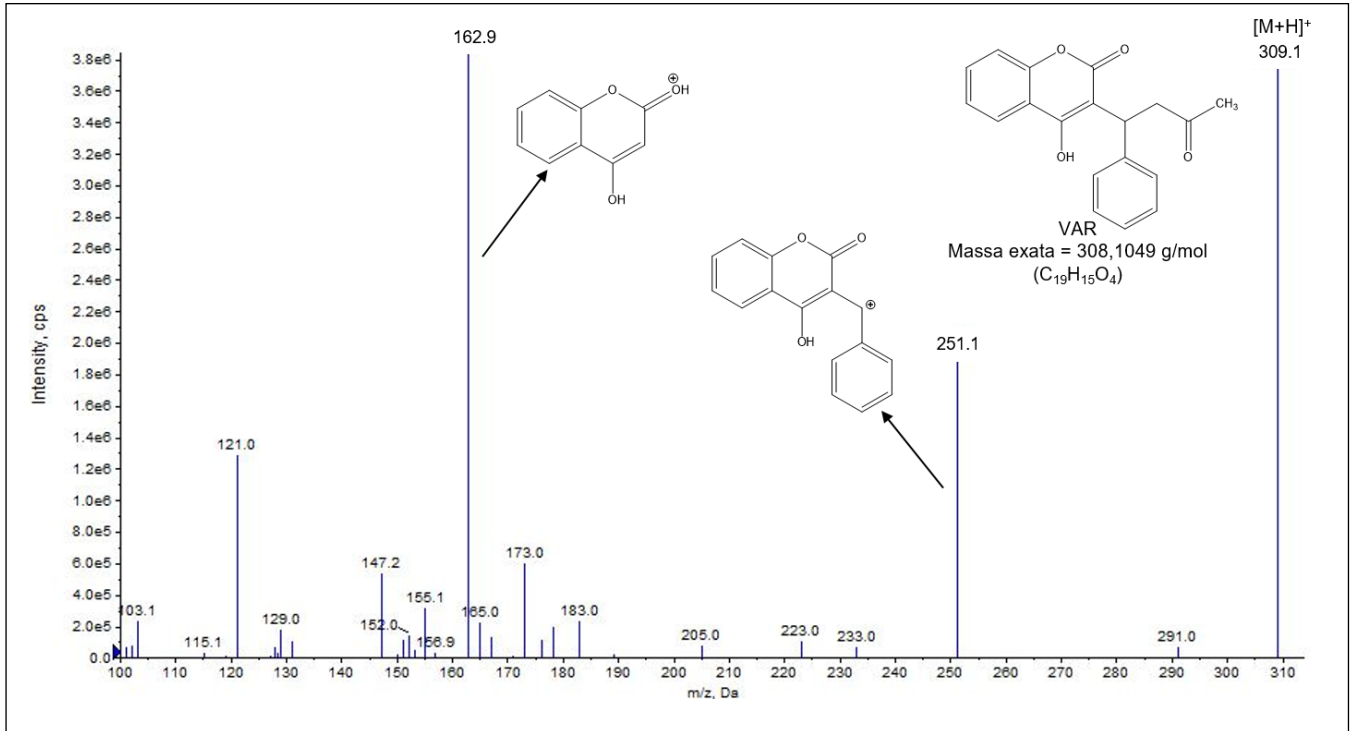
**Figura 30 - Espectro obtido após fragmentação do íon precursor  $m/z$  475, proveniente da ionização no modo positivo do sildenafil (SLD).**



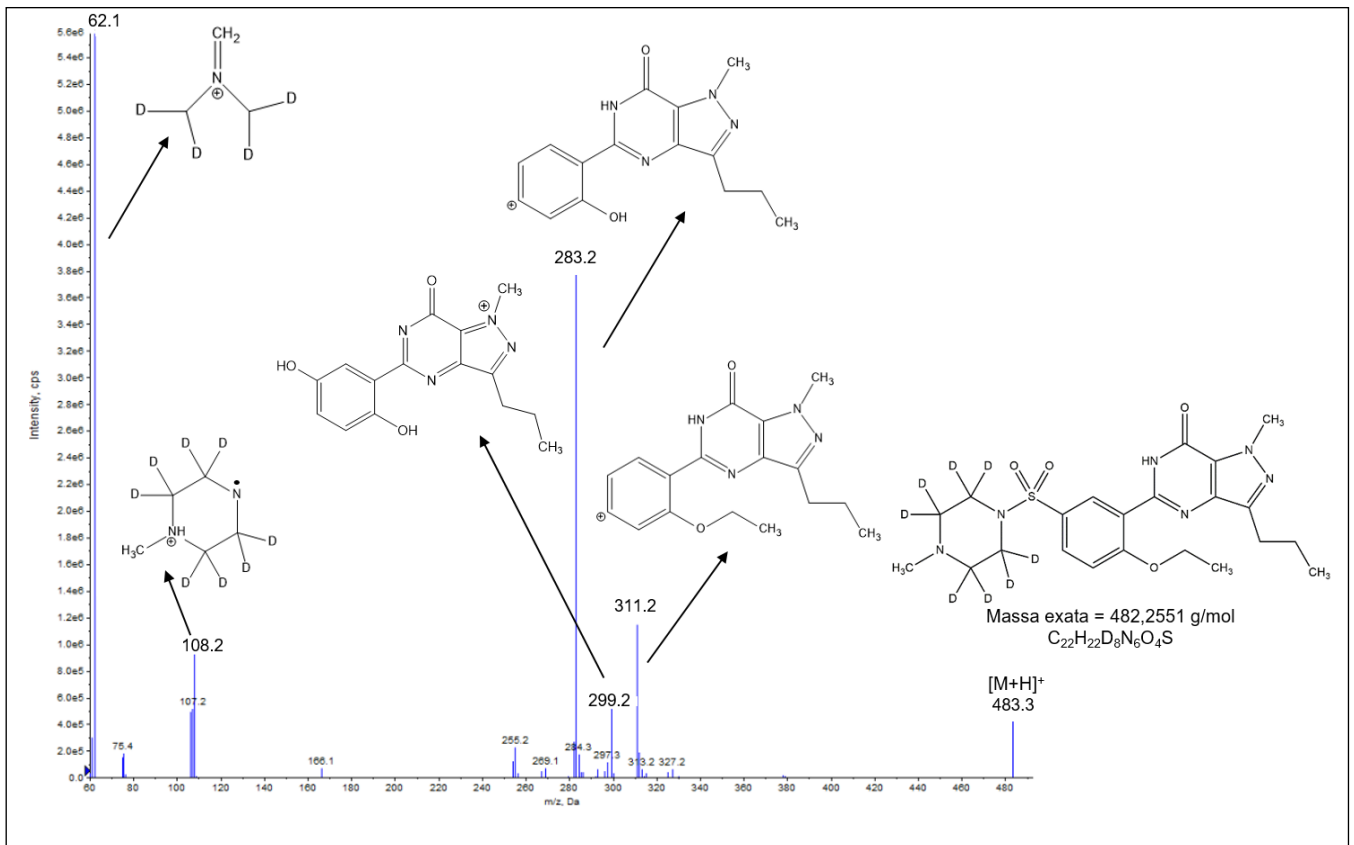
**Figura 31 - Espectro obtido após fragmentação do íon precursor  $m/z$  390, proveniente da ionização no modo positivo da tadalafila (TAD).**



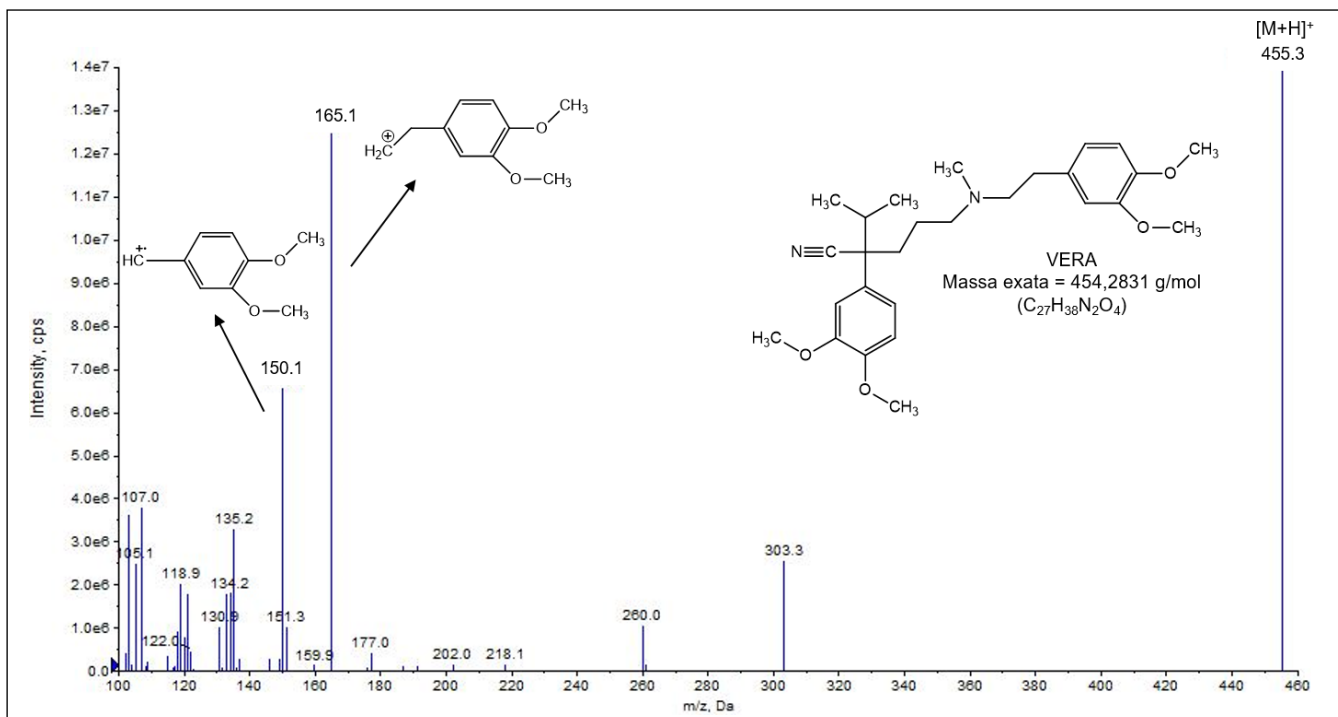
**Figura 32 - Espectro obtido após fragmentação do íon precursor  $m/z$  309, proveniente da ionização no modo positivo da varfarina (VAR).**



**Figura 33 - Espectro obtido após fragmentação do íon precursor  $m/z$  483, proveniente da ionização no modo positivo do sildenafil d-8 (SLD d-8).**



**Figura 34 - Espectro obtido após fragmentação do íon precursor  $m/z$  455, proveniente da ionização no modo positivo do verapamil (VERA).**



Para a otimização dos parâmetros da fonte por FIA, utilizou-se uma solução de DGX a 10 ng/mL em mistura de metanol e água 50:50 (v/v). A escolha da DGX nessa etapa se deu pelo fato de ela ter sido o analito que apresentou menor intensidade de sinal durante as etapas de otimização anteriores. Além disso, dentre os fármacos analisados, ela é o que possui menor  $C_{max}$  e, portanto, é necessário obter um LIQ menor para ela. Os parâmetros de ionização da fonte otimizados são apresentados na **Tabela 37**.

**Tabela 37 – Parâmetros de ionização da fonte otimizados por FIA.**

Voltagem do capilar (V)	Counter gas (psi)	Gás de colisão (nível)	Temperatura da fonte (°C)	GS1 (psi)	GS2 (psi)
5000	20	médio	550	45	45

### 6.1.2 Otimização das condições cromatográficas

A primeira etapa do desenvolvimento do método cromatográfico consistiu na definição da fase móvel. Para isso, foram testados diferentes eluentes aquosos, como solução aquosa de ácido fórmico 0,01%, 0,05% e 0,1% (v/v); solução aquosa de ácido fórmico 0,1% (v/v) com formiato de amônio 5 mM; solução aquosa de

acetato de amônio 5 mM e 10 mM pH 5,5 e solução aquosa de formiato de amônio 5 mM e 10 mM pH 4,0. Como eluente orgânico testaram-se acetonitrila e metanol.

Uma vez que o método deve apresentar detectabilidade suficiente para quantificar os analitos em plasma humano, optou-se por utilizar fase móvel constituída por solução aquosa de ácido fórmico 0,1% (v/v) e acetonitrila, uma vez que foi a que proporcionou maiores valores de razão sinal/ruído para todos os analitos.

Quanto à escolha da coluna cromatográfica a ser utilizada, observou-se que colunas particuladas como as colunas cromatográficas Phenomenex Synergi Fusion C<sub>18</sub> (50 x 2,0 mm, 4 µm) e Phenomenex Synergi Hydro C<sub>18</sub> (50 x 2,0 mm, 4 µm) levaram à formação de significativo efeito residual (*carry over*) para alguns analitos, como DTZ, SLD e TAD. O efeito residual, também conhecido como *carry over*, refere-se ao aparecimento ou aumento do sinal do analito devido a contaminação proveniente de amostras analisadas anteriormente. É frequentemente observado com compostos básicos, uma vez que os mesmos podem ser adsorvidos aos silanóis residuais presentes na fase estacionária, ficando mais fortemente retidos e não sendo eluídos durante aquela corrida cromatográfica. O efeito residual pode ser fonte de imprecisão e inexatidão do método cromatográfico e, por isso, precisa ser eliminado (SAKAMAKI *et al.*, 2015).

Dessa forma, para tentar solucionar esse problema, além de testar diferentes gradientes com força eluente maior, optou-se por testar uma coluna monolítica, a Phenomenex Onyx Monolithic C<sub>18</sub> (100 x 4,6 mm), a qual eliminou o efeito residual e proporcionou picos com formato gaussiano. Ademais, ao injetar cinco vezes consecutivas a mesma solução, demonstrou reprodutibilidade dos tempos de retenção e das áreas sob os picos dos analitos.

A fase monolítica é um meio contínuo de separação (fase ou suporte contendo uma "partícula única"), comumente em formato cilíndrico. Possui uma estrutura sólida e altamente porosa, de pequenos domínios e canais relativamente grandes, que fornecem altas permeabilidade e eficiência cromatográfica (FARIA *et al.*, 2006). A utilização dessa fase foi benéfica para solucionar o problema de *carry over*, que ocorre comumente em métodos cromatográficos.

Outro problema que deve ser contornado durante o desenvolvimento de um método bioanalítico por HPLC-MS/MS, é a eliminação do efeito matriz, o qual acontece devido à coeluição de componentes da matriz com os analitos de interesse, interferindo dessa forma, na eficiência de ionização da fonte ESI, podendo provocar efeitos de supressão ou indução iônica. Muitos mecanismos já foram propostos, mas acredita-se que ocorre pela presença de substâncias não voláteis ou solutos menos voláteis que mudam a eficiência da formação de gotículas ou a evaporação, o que por sua vez, afeta a quantidade de íons carregados na fase gasosa que finalmente atinge o detector. Dentre as hipóteses descritas, uma delas é que o composto endógeno pode competir com os analitos pela carga ou pelo acesso à superfície das gotículas para a transferência para a fase gasosa. Outra hipótese considera os efeitos de um aumento na viscosidade e tensão superficial das gotículas provocada pelos compostos interferentes, reduzindo a evaporação do solvente e a habilidade do analito em atingir a fase gasosa (EECKHAUT *et al.*, 2009; KING *et al.*, 2000; TAYLOR, 2005).

Grande parte das impurezas do plasma apresentam características polares e, dessa forma, possuem menor retenção quando se utiliza coluna cromatográfica de fase reversa, sendo então eluídos em menor tempo. Por isso, testaram-se diversos gradientes, alterando-se as proporções dos eluentes aquoso e orgânico ao longo do tempo, com o objetivo de se obter um fator de retenção superior a 1,5 (para que ocorresse uma separação adequada entre os interferentes endógenos e os analitos de interesse) e, ao mesmo tempo, garantir um tempo de corrida mais curto.

O gradiente definitivo (**Tabela 33**, página 127) proporcionou tempo de retenção do primeiro analito (N-DMS) de 4,97 minutos e fator de retenção de 1,99. Para o re-equilíbrio da coluna, testaram-se os tempos de dois a oito minutos e, concluiu-se que cinco minutos eram suficientes para garantir tempos de retenção reprodutíveis para todos os analitos. Os tempos de retenção e respectivos DPR para todos os analitos são apresentados na **Tabela 38**.

Observa-se que os analitos eluem com tempos de retenção que variam entre 4,97 e 6,32 minutos. Ao utilizar a detecção por espectrometria de massas, cada analito é monitorado por uma transição de massa distinta, não sendo necessário, portanto,

obter separação a nível de linha de base entre os picos cromatográficos, o que proporcionou um método de análise rápido.

**Tabela 38 – Tempos de retenção médios obtidos para os 11 analitos utilizando-se as condições cromatográficas otimizadas.**

Analito	Tempo de retenção ( $t_R$ ) (média $\pm$ DPR)
ANLO	5,33 $\pm$ 0,11
BUM	6,11 $\pm$ 0,09
DGX	5,18 $\pm$ 0,11
DTZ	5,24 $\pm$ 0,11
N-DMS	4,97 $\pm$ 0,20
NIF	6,19 $\pm$ 0,09
SLD	5,04 $\pm$ 0,11
TAD	5,85 $\pm$ 0,17
VAR	6,32 $\pm$ 0,09
SLD d-8	5,02 $\pm$ 0,12
VERA	5,36 $\pm$ 0,00

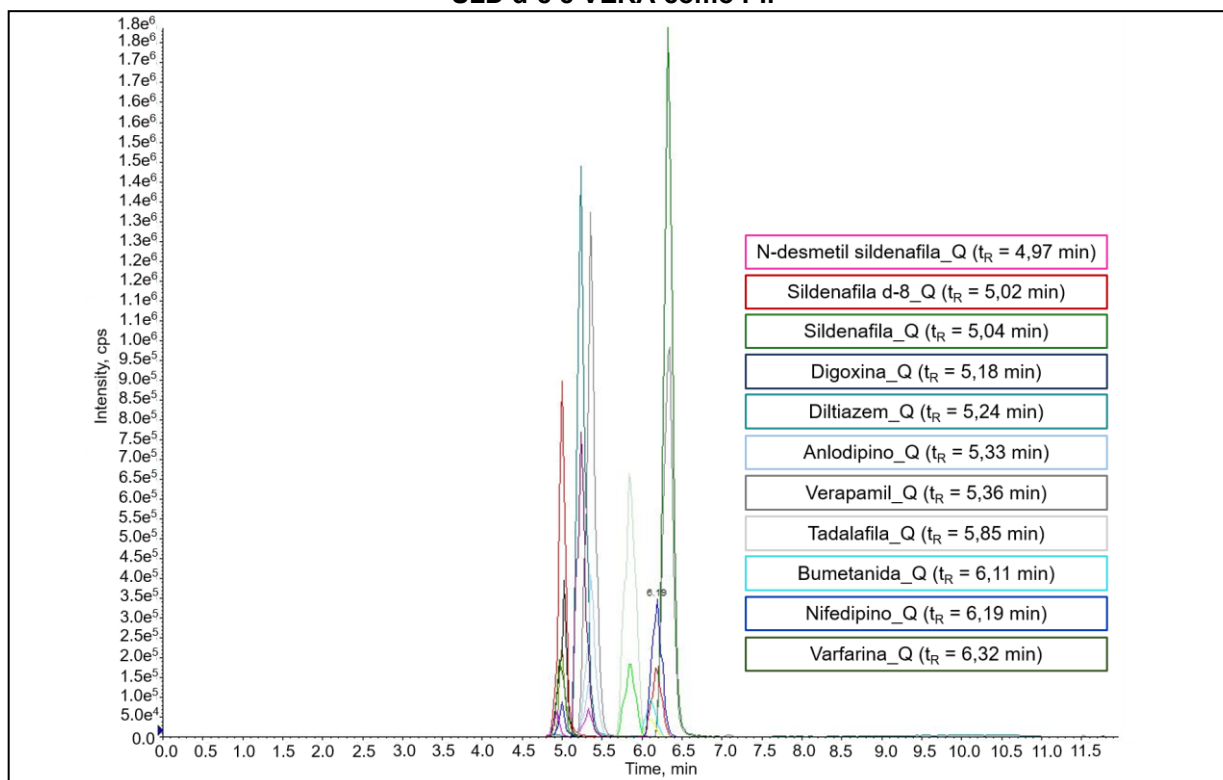
Outro importante parâmetro a ser otimizado em métodos por HPLC-MS/MS é o *Dwell Time*. Um valor ideal de *Dwell Time* produz um pico cromatográfico com 15 a 20 pontos (SCIEX, MN.ST.004 rev.02). Para definir o *Dwell Time* para cada transição monitorada, utilizou-se a equação apresentada no item **5.1.2**, (página 126) e um valor ideal de pontos igual a 15. Os valores de *Dwell Time* definitivos são apresentados na **Tabela 36** (página 139).

Por fim, avaliou-se a ocorrência de *crosstalk*, o qual pode ser observado quando se utiliza o método de monitoramento de reações múltiplas (MRM) e os íons do fragmento de uma transição monitorada são verificados durante a detecção de uma outra transição. Esse fenômeno geralmente ocorre, pois os íons não são completamente eliminados da região da célula de colisão quando a próxima transição começa a ser monitorada. Esses íons são, conseqüentemente, associados à transição errada. Dessa forma, métodos por HPLC-MS/MS rápidos, com limites de quantificação muito baixos, ampla faixa de quantificação, principalmente, quando são usados PI de isótopos deuterados e ocorre co-eluição de analitos que têm o mesmo íon produto, podem ser afetados pela ocorrência de *crosstalk*. Esse efeito pode ser eliminado definindo-se um atraso apropriado (tempo de pausa) entre as transições monitoradas, longo o suficiente para limpar todos os íons do sistema (MORIN *et al.*, 2011).

Considerando-se que os analitos N-DMS, SLD e SLD d-8 apresentam tempos de retenção, estruturas químicas muito parecidas e, que, a partir de todos os íons precursores analisados, foram formados os íons produto de razão  $m/z$  283; 311 e 299, como pode ser observado nos espectros de fragmentação (**Figuras 28, 30 e 33**, páginas 142-144), realizou-se o teste para averiguar a existência de *crosstalk*, que poderia interferir na precisão dos resultados, conforme descrito no item **5.1.2** (página 128). Foi utilizado um tempo de pausa (intervalo de tempo entre transições monitoradas) de 5 milissegundos. Ao analisar o cromatograma da solução contendo apenas SLD, observou-se que os sinais referentes às transições monitoradas para N-DMS e SLD d-8 apresentaram o mesmo aspecto daqueles observados quando se injetou a solução branco. Sendo assim, pode-se concluir que não ocorre *crosstalk* na determinação desses analitos, ou seja, não há interferências no monitoramento de transições de massas que apresentam o mesmo íon produto.

Na **Figura 35** encontra-se o cromatograma obtido com a utilização das condições cromatográficas e do gradiente do método otimizados, os quais estão descritos nas **Tabelas 32 e 33** (página 127), respectivamente.

**Figura 35 – Cromatograma obtido a partir das condições cromatográficas otimizadas para a determinação simultânea de ANLO, BUM, DGX, DTZ, N-DMS, NIF, SLD, TAD, VAR utilizando SLD d-8 e VERA como PI.**



O cromatograma foi obtido após extração de uma amostra de plasma branco fortificada com os analitos na concentração correspondente ao nível 5 da curva de calibração (**Tabela 35**, página 134).



### **6.1.3 Otimização da etapa de preparo de amostra**

A última etapa do desenvolvimento do método bioanalítico consistiu em determinar os parâmetros para extração dos analitos do plasma, de modo a obter um método eficaz, reprodutível e que forneça soluções finais mais limpas quanto for possível. Além disso, foi priorizada a utilização de uma técnica miniaturizada, a DLLME, na qual são empregados pequenos volumes de amostra e de solvente.

Duas ou mais técnicas de preparo de amostra associadas são frequentemente utilizadas quando se deseja aumentar a eficácia da extração. Conforme descrito na revisão publicada por Saraji e Boroujeni (2014), dentre as estratégias para melhorar a seletividade e a capacidade de limpeza da DLLME, muitos estudos descrevem a realização de uma etapa prévia de PPT com um solvente adequado que, posteriormente atuará como dispersante na DLLME.

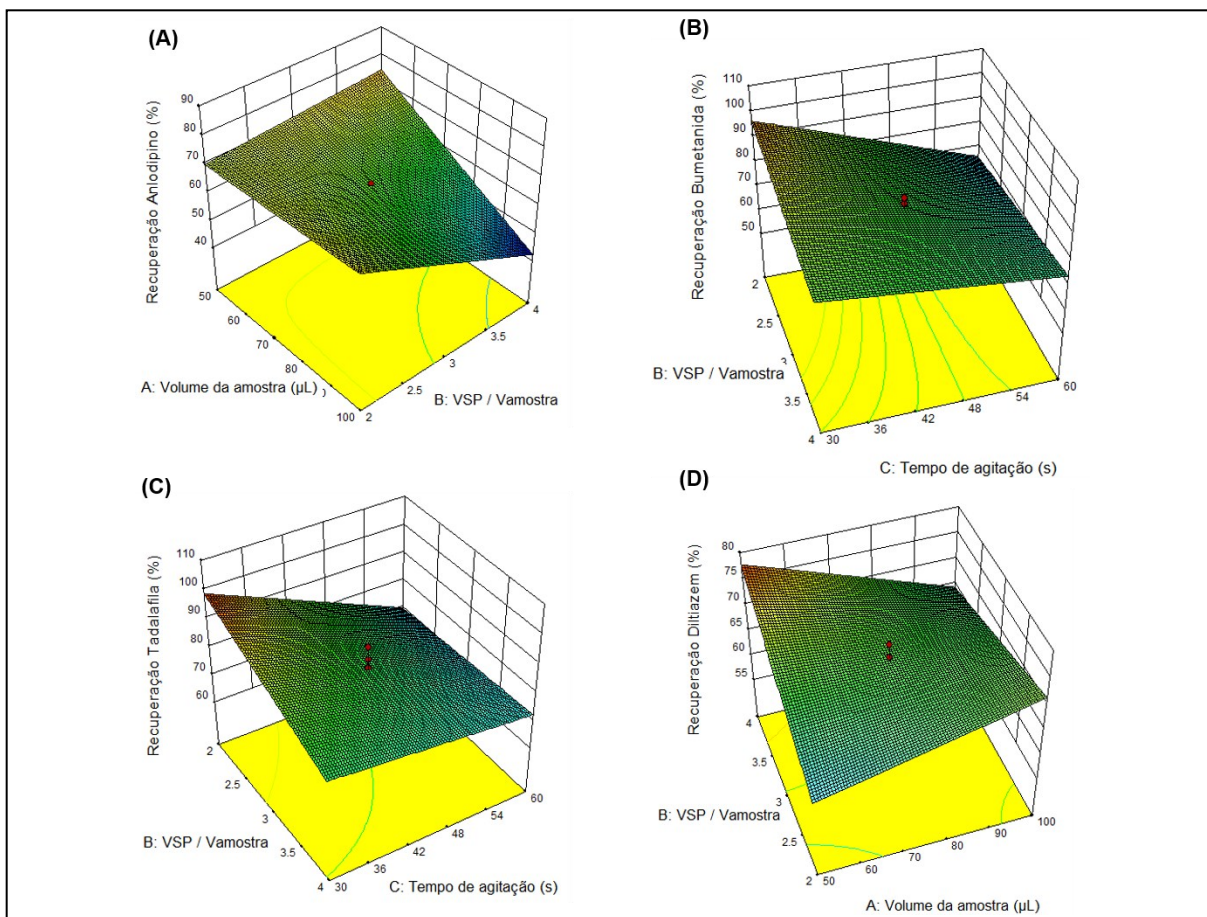
Dessa forma, optou-se por realizar uma etapa de limpeza prévia da amostra por meio do emprego da PPT, e o sobrenadante resultante foi usado como dispersante na etapa subsequente da DLLME. Essa mesma sequência de procedimentos de preparo de amostra foi realizada no estudo descrito por Jouyban e colaboradores (2015), os quais desenvolveram um método por HPLC-UV para quantificação de cinco fármacos antiarrítmicos em plasma humano.

A análise estatística do experimento univariado realizado para definir o melhor agente precipitante levou à escolha de acetonitrila com hidróxido de amônio 0,1% (v/v), uma vez que esse solvente promoveu maiores valores de área sob o pico, ou seja, maior recuperação, para a maioria dos analitos.

Após a realização do CCD para a otimização das variáveis quantitativas referentes à PPT, as recuperações obtidas os analito em cada um dos experimentos foram inseridos no *software* Design Expert® e procedeu-se à interpretação dos resultados. Não houve falta de ajuste ao modelo linear para nenhum dos analitos. Para os analitos ANLO, BUM, DTZ e TAD a regressão do modelo matemático proposto foi significativa e então foram obtidas as suas superfícies de resposta. Nas superfícies de resposta apresentadas na **Figura 26**, foram plotadas as interações das variáveis

que apresentaram efeito secundário mais significativo, enquanto a terceira variável foi fixada em seu nível central.

**Figura 36 – Superfícies de resposta obtidas para recuperação de ANLO (A), BUM (B), TAD (C) e DTZ (D) durante a otimização da etapa de PPT usando planejamento CCD.**



Ao analisar a **Figura 36A**, verifica-se que uma maior recuperação do ANLO é alcançada quando é utilizado um menor volume de amostra e maior volume de solvente precipitante. Já para a BUM (**Figura 36B**), a recuperação aumenta com a utilização de uma menor proporção de volume do solvente extrator e menores tempos de agitação. A recuperação de TAD (**Figura 36C**) é maximizada com a utilização de menores volumes de solvente extrator e menor tempo de agitação. Por fim, para o DTZ (**Figura 36D**), recuperações superiores são obtidas com uso de um menor volume de amostra e maiores volumes de solvente extrator. Uma vez que, para cada fármaco analisado ocorreu o direcionamento para condições ótimas distintas, optou-se por utilizar a função desejabilidade, visando uma condição ótima que proporcionasse a maximização das recuperações de todos simultaneamente.

Os resultados obtidos para uma desejabilidade de 0,802, ou seja, os valores considerados ótimos para maximizar a recuperação dos analitos, consistiram na utilização de 100 µL de amostra (plasma), 200 µL do solvente precipitante (acetonitrila com hidróxido de amônio 0,1% v/v) e tempo de agitação de 30 segundos.

Prosseguiu-se a otimização da etapa de preparo de amostra por meio sequencial e univariado, determinando-se os parâmetros que influenciam na DLLME, conforme apresentado nas seções a seguir.

#### **6.1.3.1 Determinação do pH da fase aquosa (tampão)**

Para se obter resultados de recuperação mais elevados, é recomendado ajustar o pH da fase aquosa, de maneira a manter os analitos predominantemente na sua forma não ionizada e, assim, aumentar sua afinidade pelo solvente extrator. Além disso, considerou-se interessante utilizar uma solução tampão como fase aquosa, objetivando-se resultados reprodutíveis.

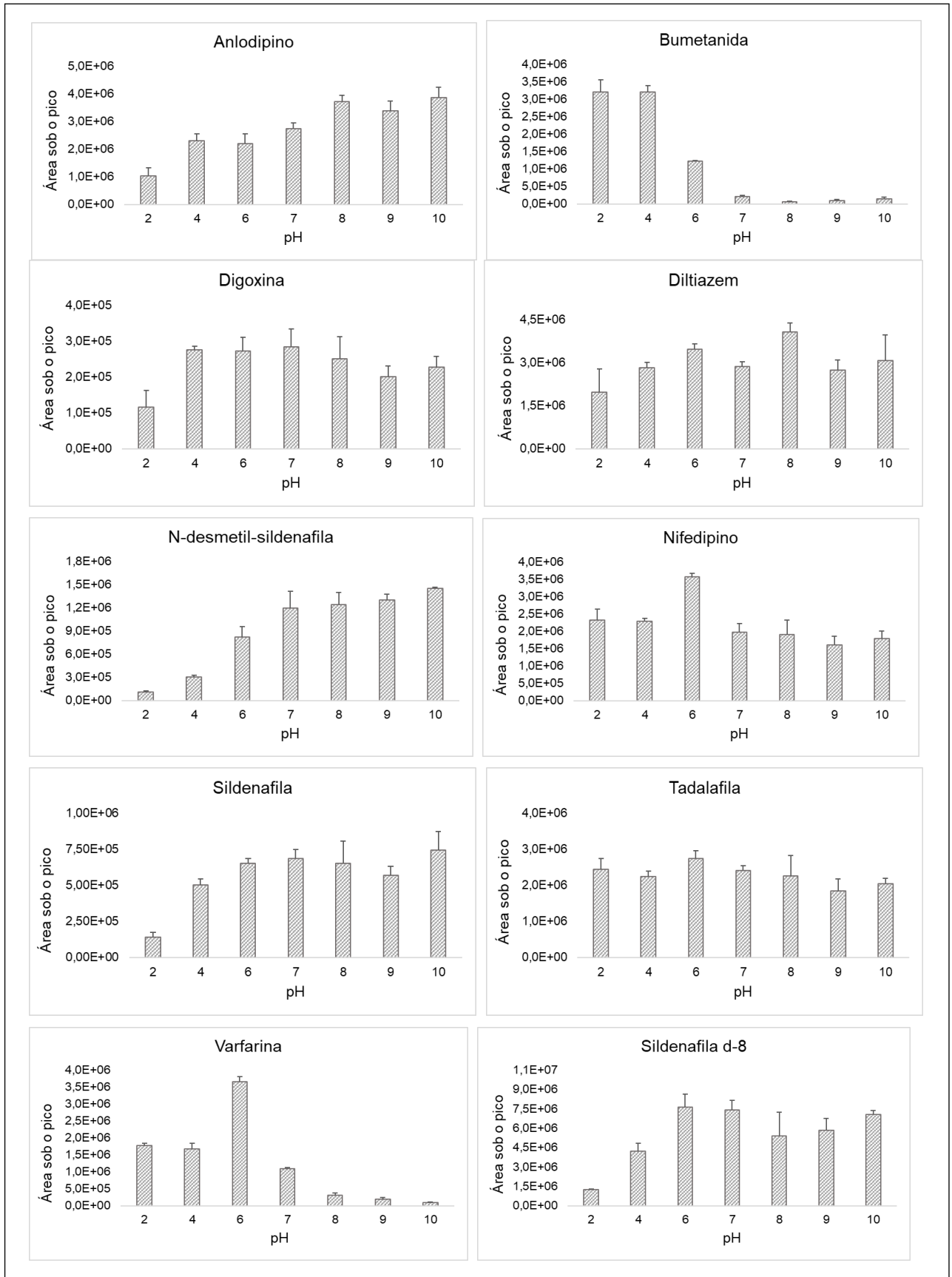
Dessa forma, para a escolha do pH da fase aquosa, foram testados tampões na faixa de pH de 2 a 10, sendo utilizados para isso, tampões fosfato pH 2, 7 e 8, acetato pH 4, citrato pH 6 e etanolamina pH 9 e 10. As soluções tampão foram preparadas a 100 mM e o ajuste de pH foi realizado com soluções de hidróxido de sódio ou ácido clorídrico. Para que a força iônica (concentração de íons) não interferisse na escolha do pH do tampão, a mesma foi padronizada, adicionando-se quantidades adequadas de cloreto de sódio. Para a determinação da força iônica utilizou-se a equação apresentada a seguir:

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i z_i^2$$

em que:  $I$  = força iônica;  $c_i$  = concentração molar do íon (mol/L);  $z_i$  = carga do íon.

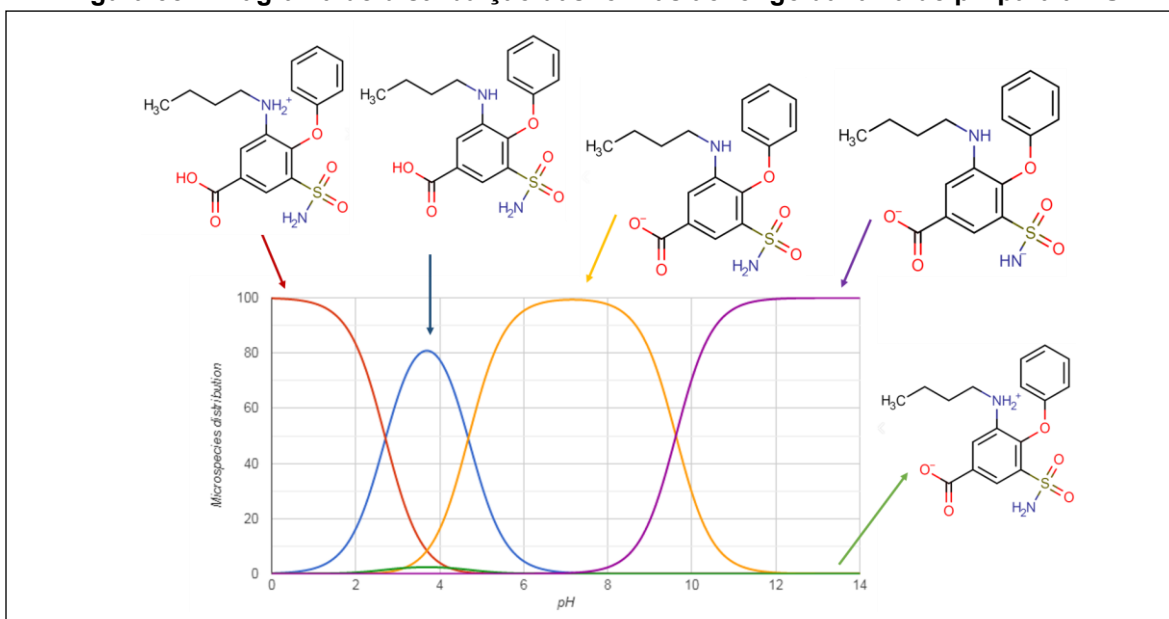
Os resultados obtidos para a otimização do pH da fase aquosa a ser utilizada na DLLME são apresentados na **Figura 37**.

Figura 37 – Avaliação do pH do tampão a ser utilizado na DLLME.



Verificou-se, experimentalmente (**Figura 37**), que para a BUM, os tampões pH 2 e pH 4 proporcionaram maiores recuperações e, a partir do pH 6, há uma queda drástica da sua recuperação, o que pode ser explicado observando-se o seu diagrama de ionização ao longo da faixa de pH (**Figura 38**), no qual verifica-se que, em valores de pH superior a 6, a BUM encontra-se, predominantemente, nas suas formas ionizadas, não apresentando, portanto, muita afinidade pelo solvente extrator, que possui característica apolar, sendo assim, menos extraída da fase aquosa. Ao analisar o gráfico de log D predito em função do pH, apresentado na **Figura 22** (página 120), observa-se também que, valores máximos de log D para BUM são obtidos em meios com pH entre 2 e 5,5. Em valores de pH maiores que 5,5 o log D começa a reduzir drasticamente.

**Figura 38 – Diagrama de distribuição das formas ao longo da faixa de pH para a BUM.**



Fonte: CHEMAXON, 2018.

Entretanto, a utilização de fases aquosas com valores de pH muito baixos, promoveram reduzidas recuperações para SLD e N-DMS, uma vez que, como pode ser observado na **Figura 22** (página 120), os gráficos de log D predito em função do pH desses analitos mostram que, em pH 2 e 4, ambos possuem log D negativo e, portanto, encontram-se majoritariamente na forma ionizada, não tendo portanto, afinidade pelo solvente orgânico, sendo por isso, pouco extraídos nessa condição.

Já para o ANLO, valores de pH superiores a 8 proporcionam log D maior que 1,0 (**Figura 22**, página 120). Sendo assim, como observado experimentalmente (**Figura 37**), a utilização dos tampões pH 8, 9 e 10, proporcionaram os maiores valores de recuperação para esse analito.

Como o método a ser desenvolvido deve permitir a extração de analitos que apresentam diferentes características físico-químicas (principalmente log D e pKa), optou-se por escolher o tampão citrato pH 6 como fase aquosa para a DLLME, uma vez que a utilização do mesmo possibilitou recuperações não tão altas, mas consideradas aceitáveis para ANLO e BUM, recuperações intermediárias para N-DMS, SLD, DGX e DTZ, além de ter sido a melhor condição para NIF, TAD e VAR.

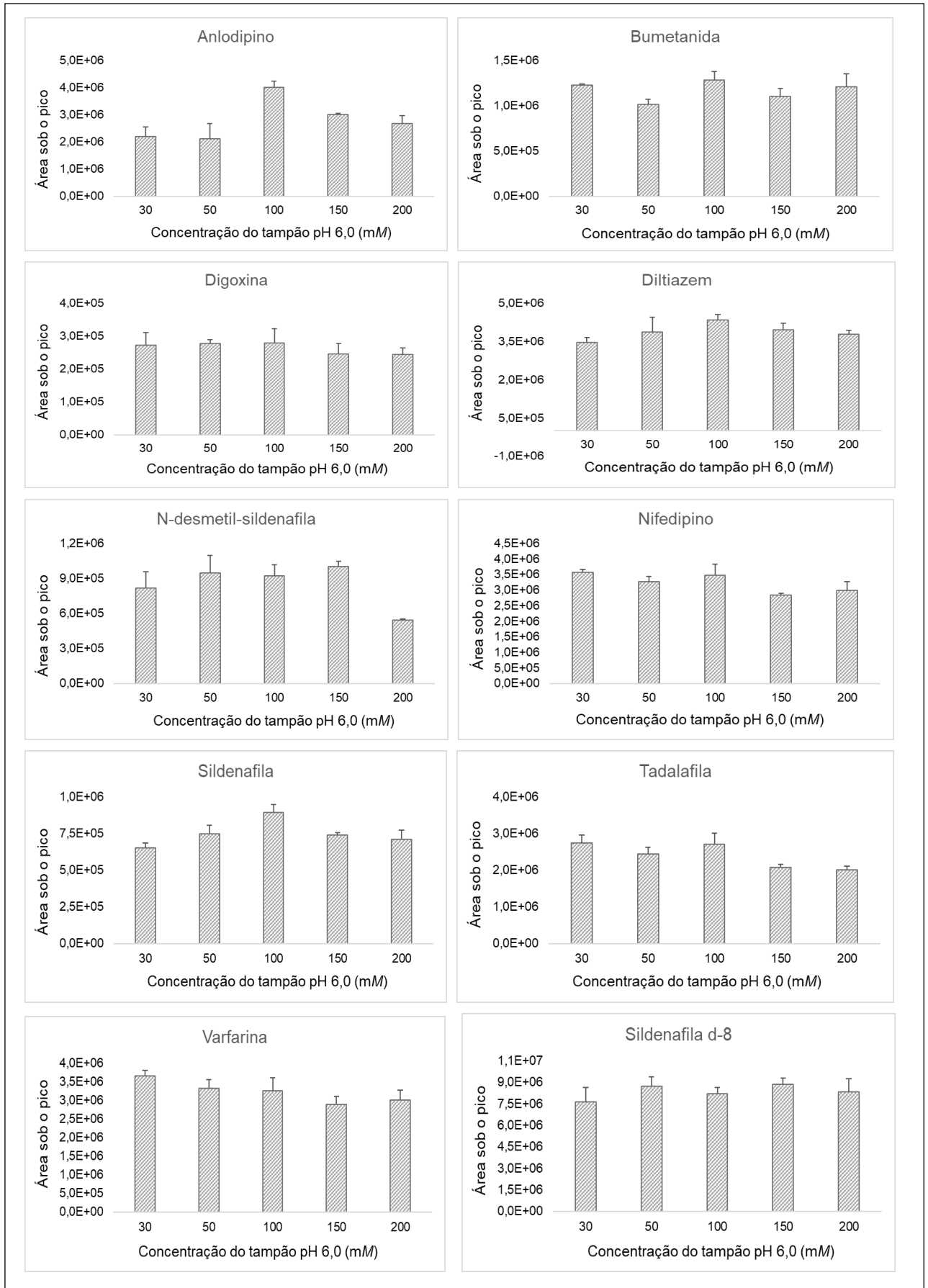
#### **6.1.3.2 Determinação da concentração do tampão**

O tampão escolhido na etapa anterior foi preparado e testado nas concentrações de 30, 50, 100, 150 e 200 mM. Assim como no teste anterior, para o preparo das diferentes concentrações dos tampões, a força iônica também foi padronizada.

Os resultados obtidos para a otimização da concentração do tampão citrato pH 6 a ser utilizado como fase aquosa na DLLME são apresentados na **Figura 39**.

Ao observar a **Figura 39**, é possível perceber que o tampão pH 6 na concentração de 100 mM promoveu maior média da área sob o pico para a maioria dos analitos (ANLO, BUM, DGX, DTZ, SLD e TAD). Inclusive, para o ANLO, que é um dos analitos que apresenta menor  $C_{max}$ . Por isso, definiu-se a utilização de tampão pH 6 100 mM na etapa de preparo de amostra por DLLME.

**Figura 39 – Avaliação da concentração do tampão a ser utilizada na DLLME.**



### 6.1.3.3 Determinação da força iônica do tampão

Para avaliar a influência da força iônica do tampão na extração dos analitos, testou-se a utilização de solução tampão pH 6 100 mM preparado sem a adição de cloreto de sódio e contendo 1%, 2%, 4%, 6%, 8% e 10% (p/v) desse sal.

A presença de sal na solução aquosa pode favorecer a extração dos analitos, uma vez que, para analitos que são relativamente solúveis em água, o efeito *salting-out* pode reduzir a solubilidade do mesmo em água.

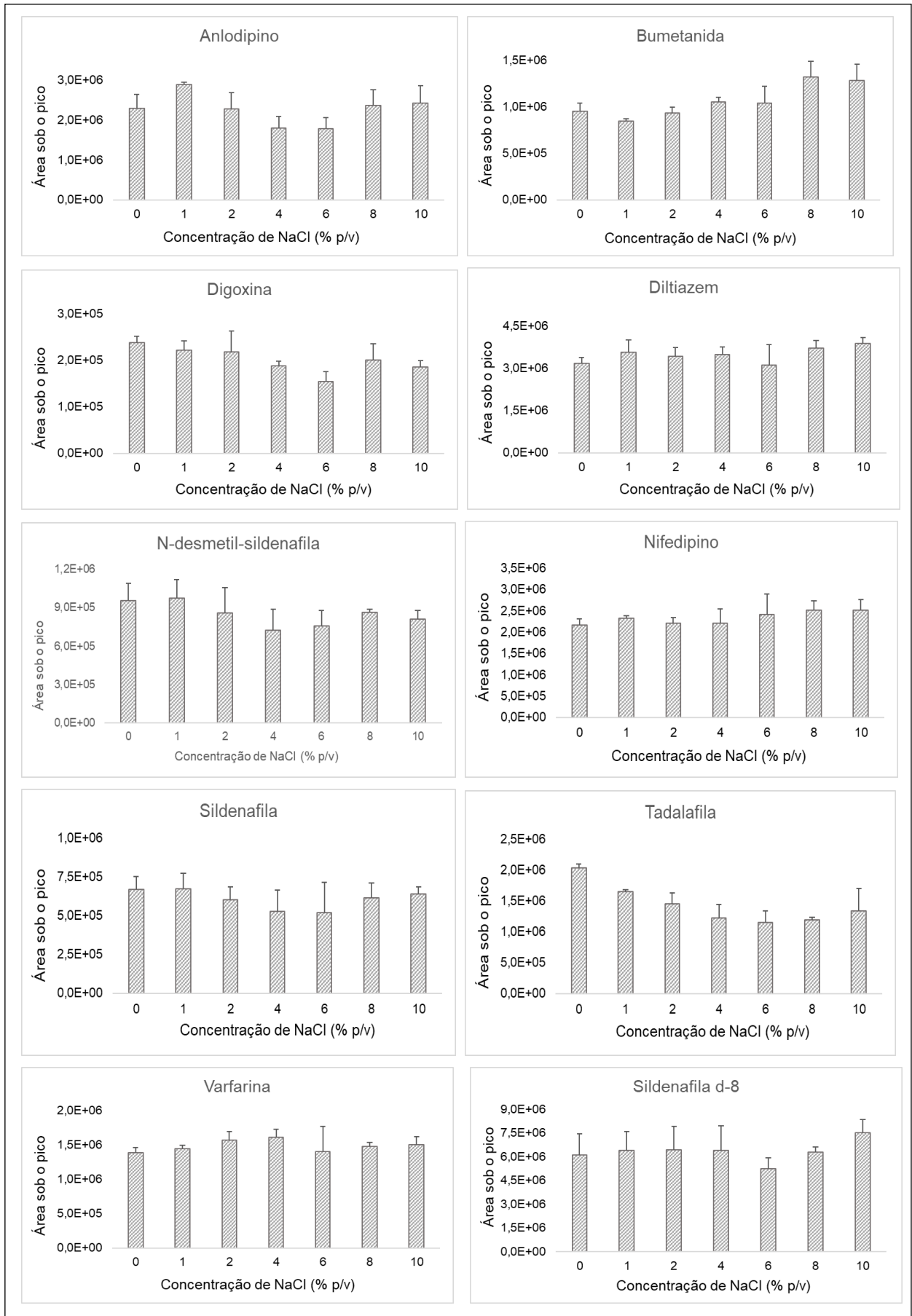
O efeito *salting-out* pode ser definido como um fenômeno que ocorre quando a concentração de sal em uma solução aquosa torna-se muito alta e, então, provoca redução na solubilidade de moléculas orgânicas. Dessa forma, se essas moléculas orgânicas são analitos parcialmente solúveis em água, ocorrerá uma redução drástica da solubilidade dos mesmos na fase aquosa, fazendo com que aumente a partição no solvente orgânico (TANG; WENG, 2013).

Ao verificar os resultados mostrados na **Figura 40**, percebe-se que a concentração de cloreto de sódio não interferiu de forma muito significativa na extração dos analitos de interesse. As concentrações 1% (p/v) e 10% (p/v) de cloreto de sódio foram as que promoveram maiores valores de áreas sob o pico para a maioria dos analitos. Entretanto, dentre essas duas concentrações, 1% (p/v) foi melhor para ANLO e DGX, que são fármacos com baixos valores de  $C_{máx}$  e também para N-DMS, para o qual será necessário baixo limite de quantificação por se tratar de um metabólito. Dessa forma, definiu-se a utilização de tampão pH 6 100 mM com cloreto de sódio 1% (p/v) na DLLME.

O preparo do tampão pH 6 100 mM com cloreto de sódio 1% (p/v), escolhido como fase aquosa do método de extração por DLLME, foi preparado pesando-se 1,1764 g de citrato de sódio tribásico di-hidratado, 1,1526 g de ácido cítrico e 1 g de cloreto de sódio em béquer de 100 mL. Adicionaram-se, em seguida, 90 mL de água e ajustou-se o pH para 5,99 pela adição de solução de hidróxido de sódio 10% (p/v). Transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL, completou-se o volume com água e homogeneizou-se.



**Figura 40 – Avaliação da força iônica do tampão a ser utilizado na DLLME.**



#### 6.1.3.4 Determinação do solvente extrator

Avaliou-se a extração utilizando-se diclorometano, clorofórmio, clorobenzeno e 1,2-dicloroetano como solvente extrator.

A escolha de um solvente extrator apropriado é muito importante para a eficiência da extração por DLLME. O solvente extrator deve apresentar os seguintes requisitos: capacidade e seletividade de extração dos analitos de interesse em relação aos componentes da matriz, baixa solubilidade em água, formação de pequenas gotículas na presença do solvente dispersante, comportamento cromatográfico adequado e uma densidade diferente da fase aquosa para tornar possível a separação de fases (JOUYBAN *et al.*, 2015; SARAJI; BOROUJENI, 2014).

Os quatro hidrocarbonetos halogenados testados nessa etapa apresentam as características físico-químicas necessárias para atuarem como extrator na DLLME, tais como baixa solubilidade e maior densidade que a água, conforme apresentado na **Tabela 39**

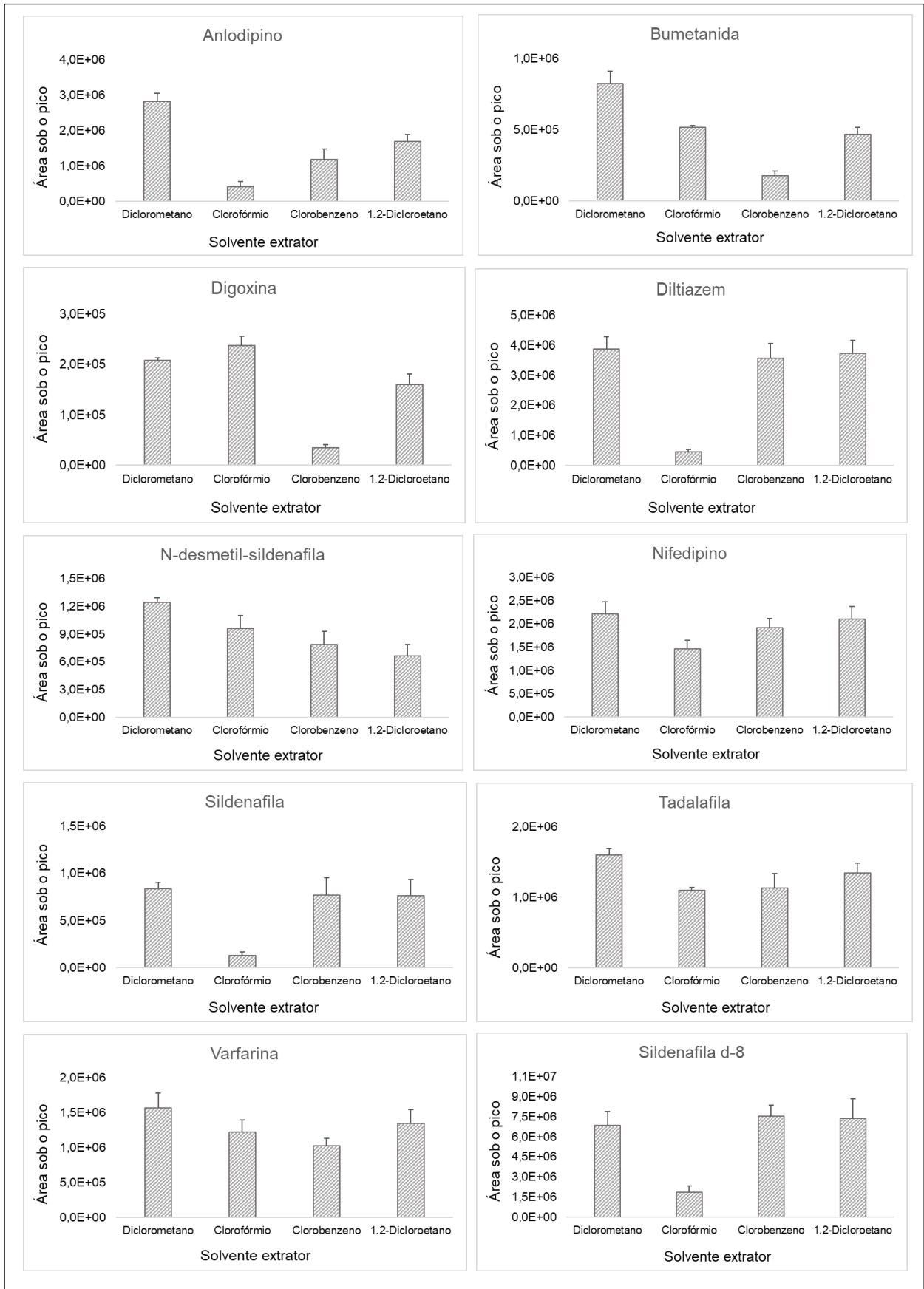
**Tabela 39 – Propriedades físico-químicas dos solventes extratores avaliados durante otimização da DLLME.**

Solvente extrator	Fórmula química	Massa molar (g/mol)	Solubilidade em água (g/L, 20-25°C)	Densidade (g/cm <sup>3</sup> , 20°C)
Diclorometano	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	84,93	20	1,33
Clorofórmio	CHCl <sub>3</sub>	119,38	8,7	1,48
Clorobenzeno	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Cl	112,56	0,2	1,11
1,2-dicloroetano	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub>	98,96	7,9	1,25

Fonte: MERCK, 2020.

Como pode ser observado na **Figura 41**, a utilização do diclorometano proporcionou valores de área sob o pico significativamente maiores para todos os analitos, com exceção da DGX. Apesar de não ter sido o solvente que proporcionou maior área sob o pico da DGX, o diclorometano proporcionou valores elevados de extração deste analito e, portanto, foi o solvente extrator escolhido para a DLLME.

Figura 41 –Avaliação do tipo do solvente extrator a ser utilizado na DLLME.



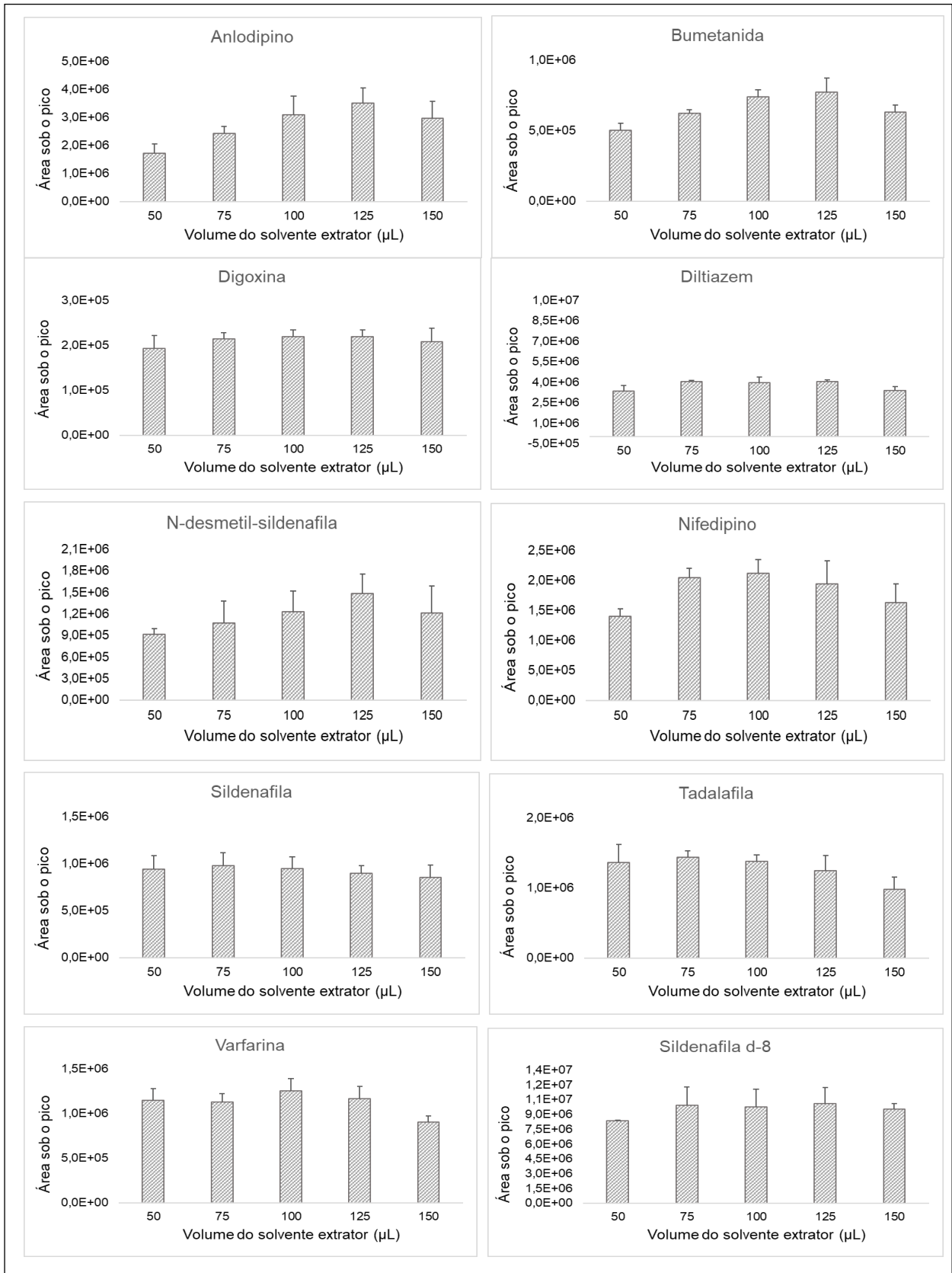
#### **6.1.3.5 Determinação do volume do solvente extrator**

Para definir o volume de solvente extrator a ser utilizado, adicionaram-se diferentes volumes (50, 75, 100, 125 e 150  $\mu\text{L}$ ) de diclorometano ao sobrenadante resultante da etapa de PPT e então prosseguiu-se às etapas necessárias à DLLME.

O volume do solvente extrator tem efeito importante na eficiência da extração, uma vez que volumes menores de extrator promovem aumento do fator de enriquecimento (definido como a razão entre a concentração do analito na fase extraída e concentração inicial do analito na amostra), devido à redução do volume do sedimento e, além disso, devido à toxicidade da maioria dos solventes extratores, o volume utilizado deve ser o mais baixo possível (SARAJI; BOROUJENI, 2014).

Na **Figura 42** encontram-se os resultados obtidos. Para a maioria dos analitos, a recuperação foi maior com a utilização de 100  $\mu\text{L}$  ou 125  $\mu\text{L}$  de solvente extrator. Portanto, para que haja um menor consumo de solvente orgânico, optou-se por utilizar 100  $\mu\text{L}$  de diclorometano como solvente extrator.

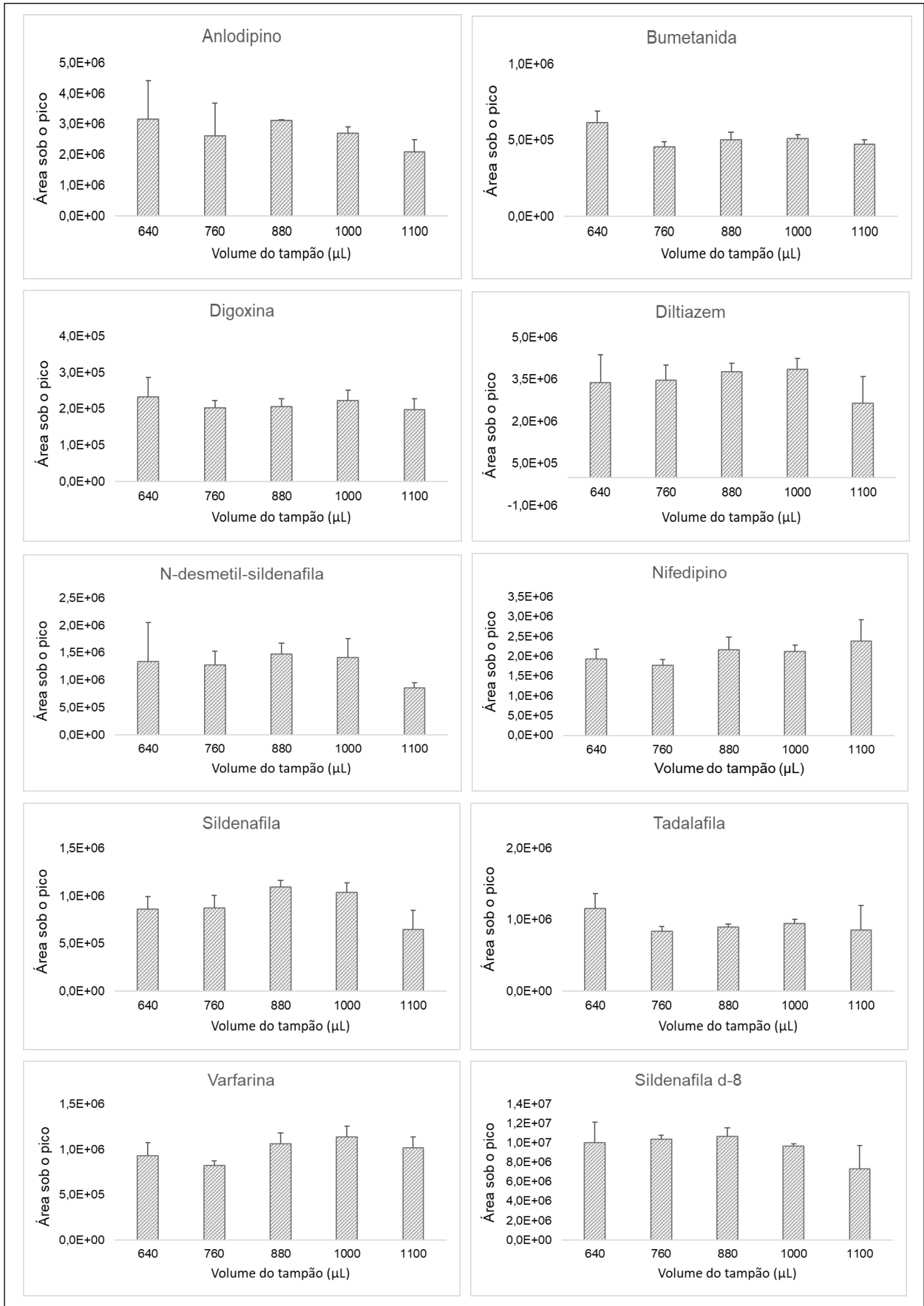
**Figura 42 – Avaliação do volume do solvente extrator a ser utilizado na DLLME.**



#### **6.1.3.6 Determinação do volume do tampão**

Os resultados de áreas sob o pico obtidas para os analitos com o uso de diferentes volumes de tampão (640, 760, 880, 1000 e 1100  $\mu\text{L}$ ) são apresentados na **Figura 43**. Optou-se por utilizar 880  $\mu\text{L}$  de tampão pois, apesar de não ter sido a condição que promoveu maior valor de área para todos os analitos, proporcionou menor DPR entre as réplicas para todos os analitos, favorecendo assim, a reprodutibilidade do método.

**Figura 43 –Avaliação do volume do tampão a ser utilizado na DLLME.**



### **6.1.3.7 Determinação do solvente dispersante**

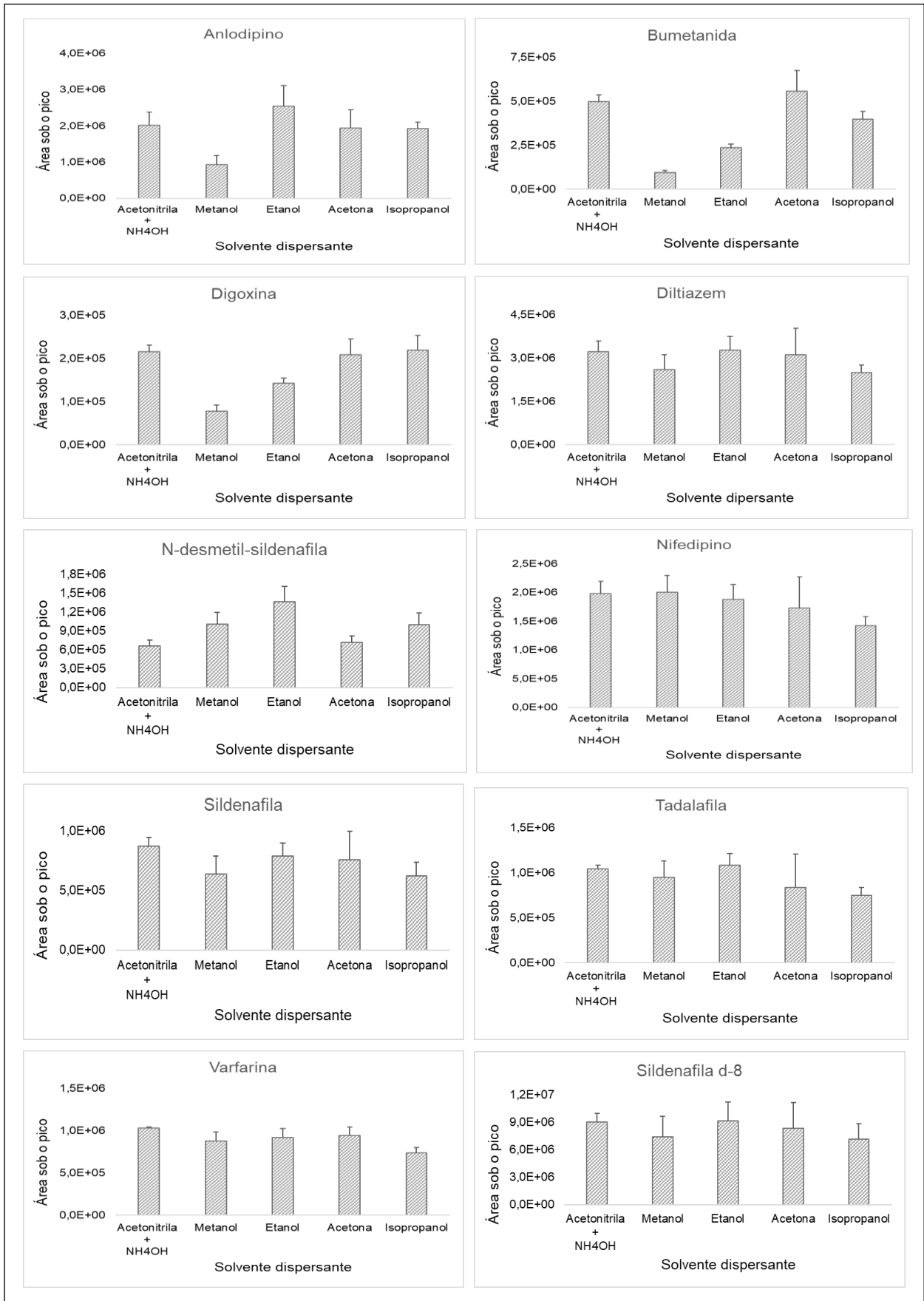
A seleção do solvente dispersante é baseada na sua miscibilidade em ambas as fases aquosa (amostra) e orgânica (solvente extrator). Os solventes mais usados como dispersantes são acetona, metanol e acetonitrila (SARAJI; BOROUJENI, 2014).

Até este momento do trabalho, a acetonitrila com hidróxido de amônio 0,1% (v/v), utilizada como agente precipitante de proteínas, estava sendo empregada como dispersante na etapa subsequente de extração por DLLME. Entretanto, optou-se por testar se outros solventes usualmente aplicados como dispersantes em DLLME seriam mais eficazes para recuperar os analitos da matriz biológica. Dentre esses, testaram-se, além da acetonitrila com hidróxido de amônio 0,1% (v/v), metanol, etanol e isopropanol.

A utilização de acetonitrila com hidróxido de amônio 0,1% (v/v) produziu uma boa dispersão, por meio da formação de intensa turbidez no momento da adição da mistura contendo amostra, dispersante e extrator na fase aquosa. Além disso, como pode ser observado nos resultados apresentados na **Figura 44**, acetonitrila com hidróxido de amônio 0,1% (v/v) resultou em maiores valores de área sob o pico e valores de DPR adequados para a maior parte dos analitos e, portanto, optou-se por manter a utilização desse solvente como dispersante.



Figura 44 –Avaliação do solvente dispersante a ser utilizado na DLLME.



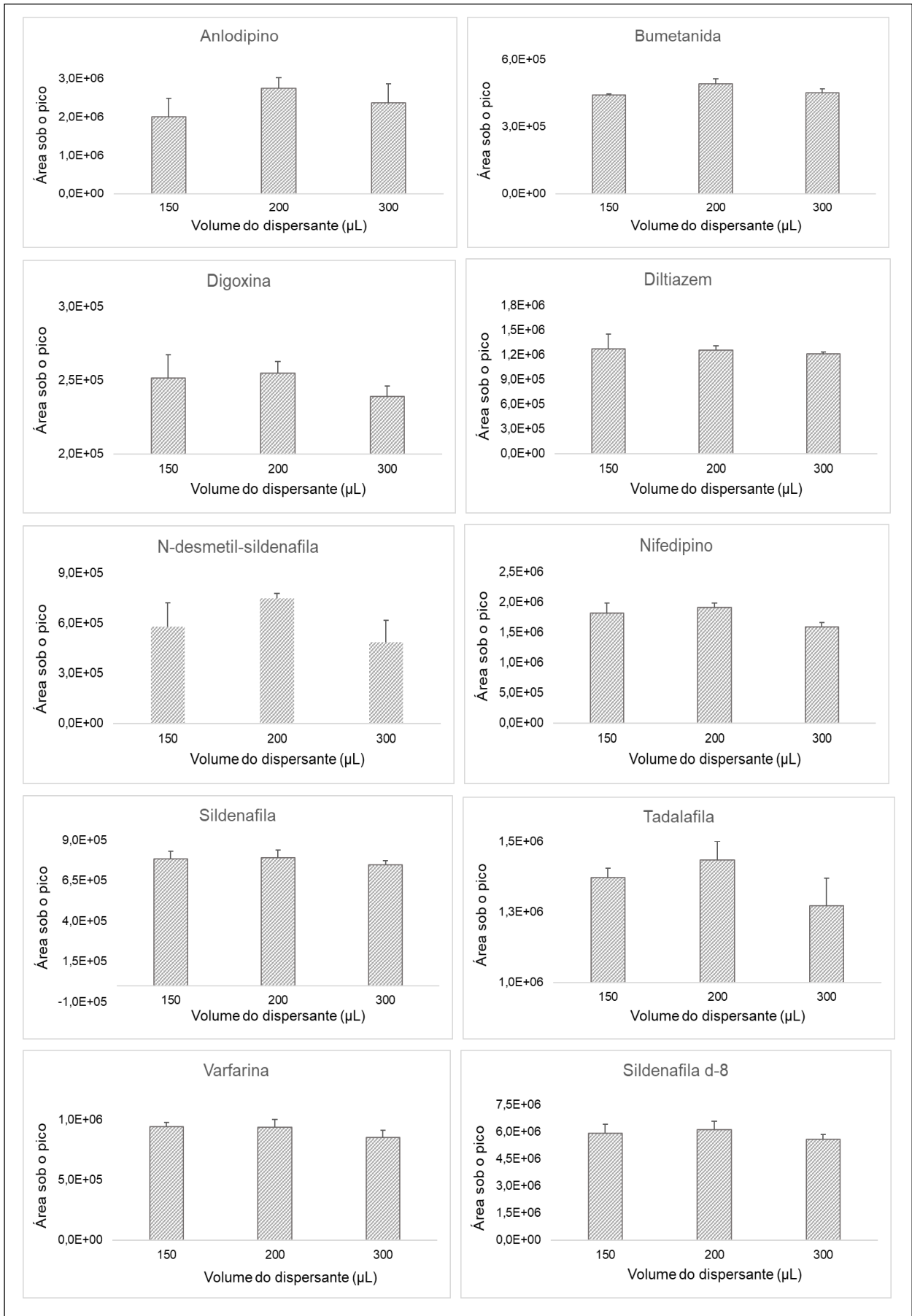
#### **6.1.3.8 Determinação do volume do solvente dispersante**

O volume de solvente dispersante influencia diretamente a formação do sistema de microgotas de água-solvente dispersante-solvente extrator, o grau de dispersão do solvente na fase aquosa e, conseqüentemente, a eficiência da extração (ANTHEMIDIS; IOANNOU, 2009; MARTINS *et al.*, 2012).

O volume adequado de solvente dispersante para maximizar a formação das microgotículas depende tanto do volume da fase aquosa quanto do volume do solvente extrator (MARTINS, 2012). Por isso, apesar do volume de dispersante já ter sido avaliado durante a otimização da etapa de PPT, após a otimização e padronização dos volumes de fase aquosa e orgânica, optou-se por verificar se a utilização de 150  $\mu\text{L}$  e 300  $\mu\text{L}$ , além dos 200  $\mu\text{L}$  de solvente dispersante favoreceria a recuperação dos analitos.

Como pode ser observado nos resultados apresentados na **Figura 45**, a utilização de 200  $\mu\text{L}$  de acetonitrila com hidróxido de amônio 0,1% (v/v) (solvente precipitante e dispersante) foi a condição que promoveu a melhor recuperação para a maior parte dos analitos. E, portanto, foi mantido esse volume de solvente precipitante/dispersante.

**Figura 45 –Avaliação do volume do solvente dispersante a ser utilizado na DLLME.**

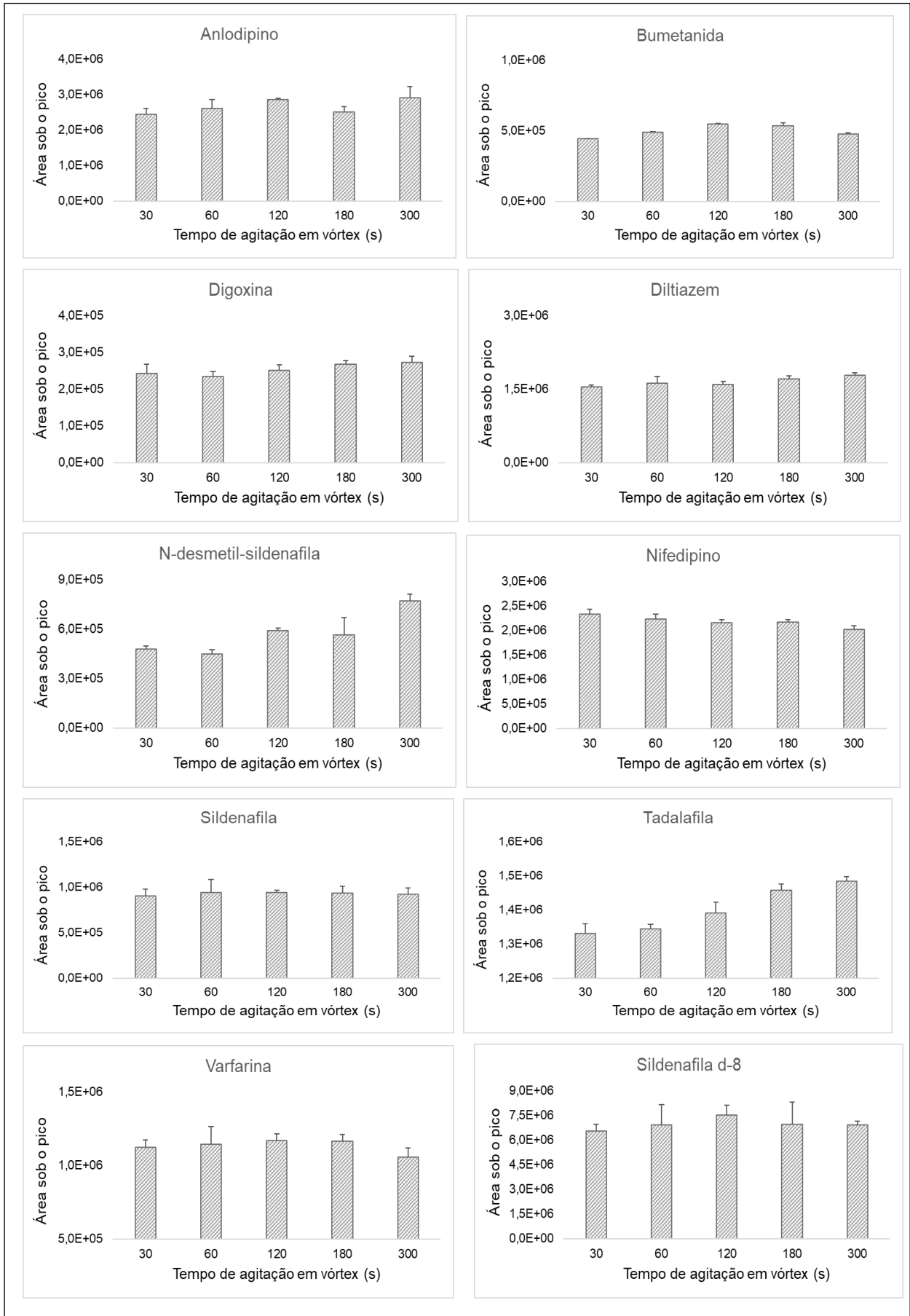


### **6.1.3.9 Determinação do tempo de agitação**

Com o objetivo de favorecer a formação de gotículas do solvente extrator dispersas na amostra e, conseqüentemente aumentar a eficiência de extração, após a etapa de adição da mistura contendo os solventes dispersantes e extrator na fase aquosa, testou-se agitar o microtubo de 2 mL em vórtex durante 30, 60, 120, 180 e 300 segundos a uma velocidade de 3000 rpm.

Ao analisar os resultados obtidos, apresentados na **Figura 46**, verifica-se que o aumento do tempo de agitação em vórtex não proporcionou alteração representativa na recuperação para a maioria dos analitos. Entretanto, para o ANLO, foi obtido um maior valor de área média sob o pico quando utilizada agitação por 120 segundos. Além disso, para BUM, TAD e N-DMS, o uso de 120 segundos de agitação proporcionou aumento significativo da recuperação quando comparado com os tempos de 30 e 60 segundos. Apesar de 300 segundos de agitação em vórtex ter favorecido a extração de TAD e N-DMS, considerou-se que, se esse tempo fosse escolhido, o preparo de amostra seria demorado e, portanto, optou-se por padronizar a agitação em vórtex durante 120 segundos.

**Figura 46 – Avaliação do tempo de agitação em vórtex a ser utilizado na DLLME.**



#### 6.1.4 Definição dos padrões internos (PI) e método DLLME otimizado

Em métodos bioanalíticos por HPLC-MS/MS deve-se utilizar um PI com o objetivo de conseguir resultados com precisão e exatidão satisfatórios, uma vez que o PI se destina a corrigir possíveis variabilidades e perdas que podem ocorrer devido aos procedimentos envolvidos na etapa de preparo de amostra (diluição, evaporação, degradação, recuperação, adsorção) e corrigir erros referentes à etapa de detecção.

O PI pode ser um isótopo ou um análogo estrutural do analito, com propriedades físico-químicas semelhantes às do analito de interesse (STOKVIS; ROSING; BEIJNEN, 2005). PI isotopicamente marcados são os preferidos para detecção por espectrometria de massas, uma vez que são quimicamente idênticos ao analito, apresentando apenas massas diferentes. Portanto, para a quantificação de SLD optou-se por utilizar um isótopo deuterado do sildenafil, o sildenafil d-8 (SLD d-8), como PI.

Para os demais analitos, foram testados propranolol, carvedilol, VERA e diazepam como PI. Uma vez que a extração na DLLME se deve ao processo de partição do analito entre a fase orgânica e aquosa, selecionaram-se substâncias que possuem diferentes valores de log D predito em pH 6 (pH do meio onde ocorrerá a extração) para serem testadas como PI. Como pode ser observado na **Figura 22** (página 120), em pH 6, os valores de log D para esses analitos são de, aproximadamente, -0,5 para propranolol, 0,8 para carvedilol, 1,6 para VERA e 3,0 para diazepam. Então verificou-se qual dessas substâncias proporcionaria melhor reprodutibilidade dos resultados. Os resultados obtidos encontram-se na **Tabela 40**.

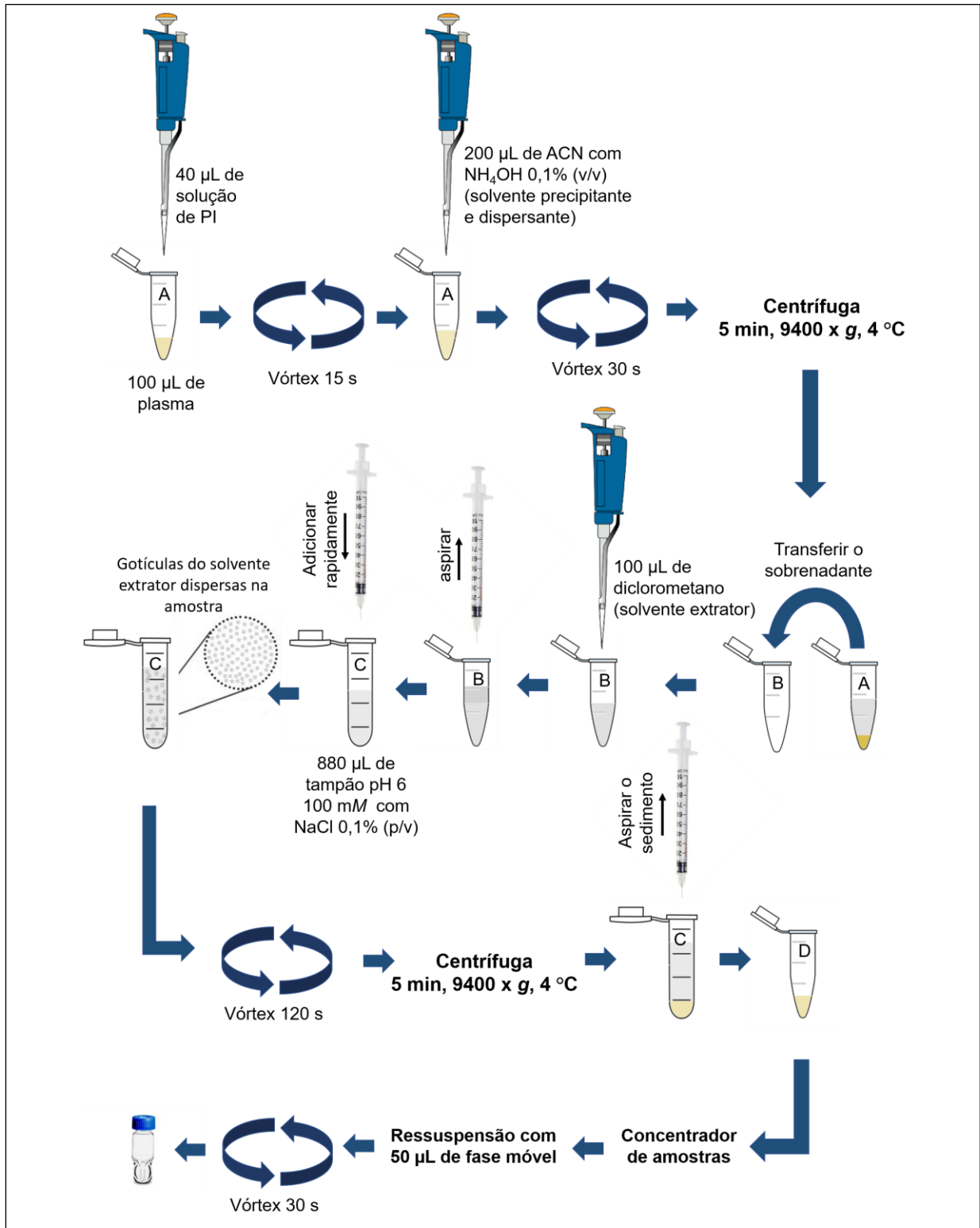
**Tabela 40 – Resultados de DPR da área sob o pico normalizada com a utilização de diferentes substâncias como PI.**

Analito	DPR da área sob o pico normalizada (%)			
	Propranolol	Carvedilol	VERA	Diazepam
ANLO	22,87	10,10	7,24	16,18
BUM	18,30	12,48	6,31	17,99
DGX	15,18	8,89	2,94	19,16
DTZ	16,65	9,47	3,10	18,96
N-DMS	29,87	18,74	13,94	22,55
NIF	24,78	14,48	11,52	10,93
TAD	21,27	10,73	6,65	14,27
VAR	23,62	14,47	11,07	14,68

O PI escolhido para os analitos (com exceção do SLD) foi o VERA, uma vez que o DPR entre a razão da área dos analitos pela área do VERA em todas as cinco réplicas proporcionou valores de DPR inferiores a 15% para todos analitos.

As etapas do método DLLME otimizado são apresentadas na **Figura 47**.

**Figura 47 – Etapas do método DLLME otimizado.**



**Legenda:** ACN = acetonitrila;  $\text{NH}_4\text{OH}$  = hidróxido de amônio; NaCl = cloreto de sódio; PI = Padrões internos.

Portanto, a etapa de preparo de amostra por DLLME otimizada consistiu em transferir 100  $\mu\text{L}$  de plasma para microtubo de plástico de 1,5 mL. Em seguida, adicionar 40  $\mu\text{L}$  de solução metanólica de PI (contendo VERA a 52,5 ng/mL e SLD d-8 a 250 ng/mL) e agitar em vórtex por 15 segundos. Acrescentar 200  $\mu\text{L}$  de acetonitrila com hidróxido de amônio 0,1% (v/v) (solvente precipitante e dispersante) e homogeneizar em agitador do tipo vórtex por 30 segundos. Centrifugar durante 5 minutos a 9400 x g e 4 °C e transferir o sobrenadante para outro microtubo de 1,5 mL. Adicionar 100  $\mu\text{L}$  de diclorometano (solvente extrator) e aspirar o conteúdo desse microtubo com uma seringa de 1 mL e adicioná-lo rapidamente em um microtubo de 2 mL contendo 880  $\mu\text{L}$  de tampão pH 6 100 mM com cloreto de sódio 1% (p/v). Agitar em vórtex por 120 segundos, centrifugar por 5 minutos a 9400 x g e 4 °C e, em seguida aspirar com a mesma seringa, 120  $\mu\text{L}$  do sedimento (fase extratora, situada na parte inferior do microtubo). Transferir para um microtubo de plástico e evaporar o solvente em concentrador de amostras. Ressuspender os analitos com 50  $\mu\text{L}$  de fase móvel, agitar em vórtex durante 30 segundos e transferir para *vial*.

## 6.2 Validação do método bioanalítico

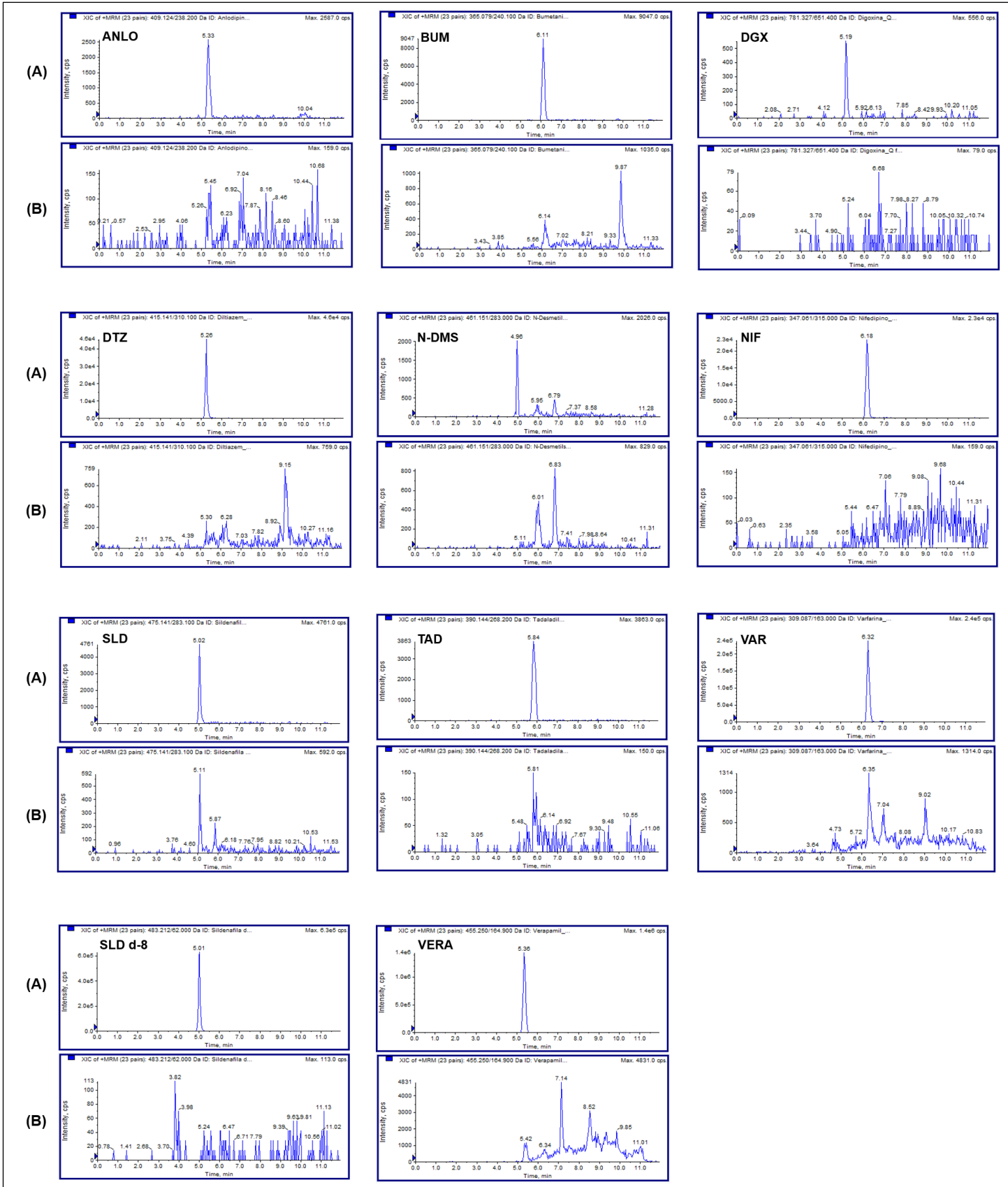
### 6.2.1 Seletividade

A seletividade do método bioanalítico foi demonstrada extraíndo-se quatro amostras de plasma normal, uma amostra de plasma hemolisado e uma amostra de plasma lipêmico.

Na **Figura 48** são apresentados, como exemplos, os cromatogramas obtidos para uma das amostras de plasma branco normal e para uma amostra de LIQ (destaca-se que as escalas do eixo y são diferentes). Um dos objetivos da etapa de preparo de amostra é eliminar os possíveis interferentes provenientes da matriz biológica. Dessa forma, o método de preparo de amostra otimizado mostrou-se adequado. Ademais, com a utilização da espectrometria de massas sequencial, a qual promove maior seletividade ao método analítico, foi possível obter um método seletivo para todos os analitos e PI.



**Figura 48 – Cromatogramas obtidos para uma amostra de LIQ (A) e uma amostra plasma branco normal (plasma normal 1) (B) para avaliação da seletividade do método bioanalítico.**



Como pode ser observado na **Tabela 41**, em nenhuma das amostras de plasma branco normal, hemolisado e lipêmico houve interferentes com tempo de retenção próximo dos analitos de interesse com área superior a 20% da área do respectivo analito no LIQ. Além disso, picos eluindo próximo ao tempo de retenção dos PI apresentaram valor de área inferior a 5% das áreas dos PI, estando de acordo com o preconizado nos guias de validação de métodos bioanalíticos nacional e internacionais.

**Tabela 41 – Porcentagem da área de picos interferentes em relação à área do analito de interesse no LIQ.**

Analito	Porcentagem da área de picos interferentes em relação ao LIQ (%)					
	Plasma normal 1	Plasma normal 2	Plasma normal 3	Plasma normal 4	Plasma hemolisado	Plasma lipêmico
ANLO	0,19	10,25	7,37	8,31	3,17	3,68
BUM	8,02	9,69	8,55	8,02	8,84	8,93
DGX	1,12	5,99	8,94	0,87	4,08	5,27
DTZ	0,02	1,39	1,52	0,41	0,02	0,81
N-DMS	2,30	6,52	1,16	1,22	0,78	1,65
NIF	0,72	0,42	0,48	11,67	1,11	0,61
SLD	0,89	10,83	4,93	0,28	0,55	0,37
TAD	0,00	2,33	3,03	0,00	3,78	2,87
VAR	1,79	3,89	2,54	2,22	10,70	2,97
SLD d-8	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00
VERA	0,11	0,12	0,12	0,11	0,19	0,09

### 6.2.2 Efeito residual

Com o objetivo de evitar a ocorrência de efeito residual, a lavagem da agulha do injetor foi programada para ser realizada entre as injeções das amostras, com uma solução de lavagem constituída por mistura de água, metanol e acetona (40:40:20 v/v) acidificada com ácido fórmico a 0,1% (v/v).

A ausência de efeito residual no método foi confirmada (**Tabela 42**), uma vez que não foram observados, nas injeções de amostra branco subsequentes à injeção da amostra de LSQ, picos interferentes com áreas superiores a 20% da área dos analitos nas amostras de LIQ e maiores que 5% das áreas dos PI.

**Tabela 42 – Porcentagem da área de picos interferentes na amostra de plasma branco após injeção da amostra de LSQ em relação à área do analito de interesse no LIQ para determinação do efeito residual.**

Analito	Área do pico interferente na amostra de plasma branco após injeção da amostra de LSQ	Área do analito na amostra de LIQ	Efeito residual (%)
ANLO	2,91x10 <sup>3</sup>	2,68x10 <sup>4</sup>	10,86
BUM	7,98x10 <sup>3</sup>	8,31x10 <sup>4</sup>	9,61
DGX	4,15x10 <sup>2</sup>	3,56x10 <sup>3</sup>	11,64
DTZ	1,16x10 <sup>4</sup>	1,79x10 <sup>5</sup>	6,47
N-DMS	6,87x10 <sup>1</sup>	4,56x10 <sup>3</sup>	1,51
NIF	2,19x10 <sup>3</sup>	1,96x10 <sup>5</sup>	1,12
SLD	3,39x10 <sup>2</sup>	1,53x10 <sup>4</sup>	2,21
TAD	1,78x10 <sup>4</sup>	2,34x10 <sup>5</sup>	7,58
VAR	3,21x10 <sup>4</sup>	7,57x10 <sup>5</sup>	4,24
SLD d-8	9,93x10 <sup>2</sup>	2,93x10 <sup>6</sup>	0,03
VERA	7,96x10 <sup>4</sup>	4,82x10 <sup>6</sup>	1,65

### 6.2.3 Efeito matriz

Os resultados obtidos encontram-se na **Tabela 43**.

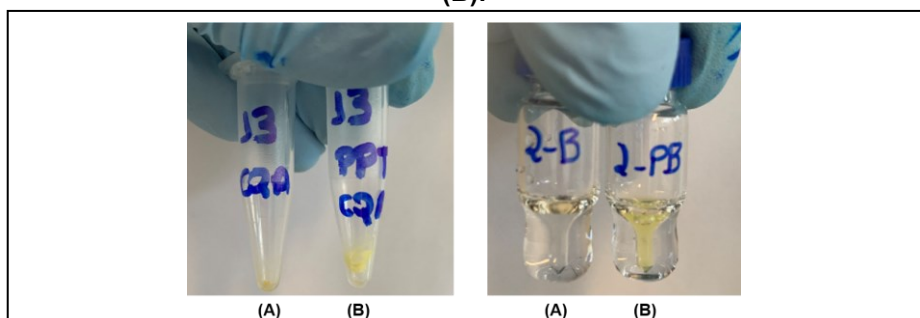
**Tabela 43 - Avaliação do efeito matriz utilizando o FMN para as amostras provenientes do preparo de amostra por DLLME e por PPT.**

Analito	Concentração	DLLME		PPT	
		Média FMN	DPR (%)	Média FMN	DPR (%)
ANLO	CQB (3 ng/mL)	1,32	13,65	1,29	16,47
	CQA (80 ng/mL)	1,03	10,85	0,54	5,30
BUM	CQB (15 ng/mL)	1,30	8,15	0,34	71,39
	CQA (400 ng/mL)	0,87	7,01	0,16	8,06
DGX	CQB (2,1 ng/mL)	1,49	14,43	0,63	32,02
	CQA (24 ng/mL)	0,91	12,49	0,36	8,14
DTZ	CQB (15 ng/mL)	1,17	4,64	0,70	14,28
	CQA (800 ng/mL)	1,07	5,98	0,63	8,13
N-DMS	CQB (3 ng/mL)	1,14	14,46	1,55	9,07
	CQA (400 ng/mL)	1,19	10,42	1,06	20,42
NIF	CQB (15 ng/mL)	1,88	8,15	1,24	16,97
	CQA (400 ng/mL)	1,00	8,11	0,63	8,00
SLD	CQB (15 ng/mL)	0,91	11,44	1,15	21,70
	CQA (800 ng/mL)	1,03	3,13	1,34	4,43
TAD	CQB (15 ng/mL)	1,33	6,27	0,33	79,66
	CQA (800 ng/mL)	1,00	11,08	0,17	6,37
VAR	CQB (75 ng/mL)	1,35	6,95	0,79	13,64
	CQA (800 ng/mL)	0,83	6,19	0,56	10,36

Percebe-se que os valores de DPR obtidos para todos os analitos, quando se utiliza o preparo de amostra por DLLME, são inferiores a 15%, ou seja, abaixo do limite preconizado nos guias vigentes e, por isso, o método analítico pode ser utilizado para todas as amostras. Por outro lado, ao verificar os valores de DPR encontrados para os analitos quando apenas a etapa de precipitação de proteínas é realizada, é possível concluir que existe efeito matriz para todos os analitos, com exceção do DTZ e VAR.

Ao observar a **Figura 49**, a qual apresenta os microtubos após a etapa de evaporação do solvente extrator em concentrador de amostra, é visualmente perceptível a diferença em relação à seletividade de extração quando se utiliza apenas a PPT e quando é realizada, adicionalmente, a DLLME em uma mesma amostra. Verifica-se que o microtubo proveniente da extração por PPT encontra-se com muito mais sujidades provenientes do plasma do que o microtubo resultante da DLLME. Além disso, é possível verificar também que, após ressuspensão, a amostra oriunda da PPT encontra-se amarelada, enquanto aquela proveniente da DLLME é translúcida.

**Figura 49 – Microtubo após etapa de evaporação do solvente extrator proveniente da DLLME (A) e PPT (B) e vial contendo amostra ressuspensa após procedimento da DLLME (A) e PPT (B).**



Sabendo-se que o efeito matriz é causado pela supressão ou indução de ionização do analito por componentes da matriz biológica quando a espectrometria de massas é empregada, é possível afirmar que o preparo de amostra utilizando DLLME foi capaz de eliminar os interferentes que estavam causando efeito matriz, quando apenas a etapa de PPT foi utilizada. Ressalta-se, portanto, a importância da utilização de técnicas de preparo de amostra que sejam capazes de promover seletividade ao método analítico.

#### 6.2.4 Linearidade

A definição da faixa de trabalho para cada um dos analitos foi realizada com base nos dados disponíveis na literatura referentes a  $C_{MÁX}$ ,  $t_{1/2}$ , dose diária recomendada para o tratamento e dosagem das formulações disponíveis no mercado (**Tabela 29**, página 119). Os LIQ e LSQ foram escolhidos de modo a garantir aplicabilidade do método desenvolvido na monitorização terapêutica de fármacos utilizados no tratamento da HAP, o que não exclui sua aplicação em amostras de pacientes que apresentam outras doenças, cujos tratamentos incluem os mesmos tipos de fármacos.

Ao analisar as amostras branco, não foram verificados picos de interferentes nos tempos de retenção com áreas superiores a 20% das áreas dos analitos no LIQ e a 5% das áreas dos PI. As áreas dos PI nas amostras zero foram semelhantes àquelas obtidas para as demais amostras das curvas de calibração.

Para as três curvas de calibração, os modelos matemáticos linear e quadrático foram avaliados utilizando-se o *software* MultiQuant® e, nos casos em que a variância do erro não foi constante em toda a faixa de quantificação do método analítico, testaram-se diferentes fatores de ponderação ( $1/x$ ;  $1/x^2$ ;  $\ln(x)$ ;  $1/y$ ;  $1/y^2$  e  $\ln(y)$ ).

A escolha do modelo matemático mais simples foi realizada por meio do menor valor obtido para a soma dos erros relativos dos valores nominais dos padrões de calibração *versus* seus valores obtidos pela equação da curva.

Durante a avaliação dos resultados, aqueles pontos que apresentaram desvios em relação à concentração nominal, acima do valor preconizado, foram excluídos, sendo então desconsiderados na determinação da equação da reta.

As equações das retas e os respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) obtidos são apresentados na **Tabela 44**. O modelo matemático mais simples, que promoveu melhor ajuste e menor valor da soma dos erros relativos foi a regressão linear, com fator de ponderação  $1/x^2$  para todos os analitos, com exceção da DGX e N-DMS, para os quais o fator de ponderação utilizado foi  $1/x$ .

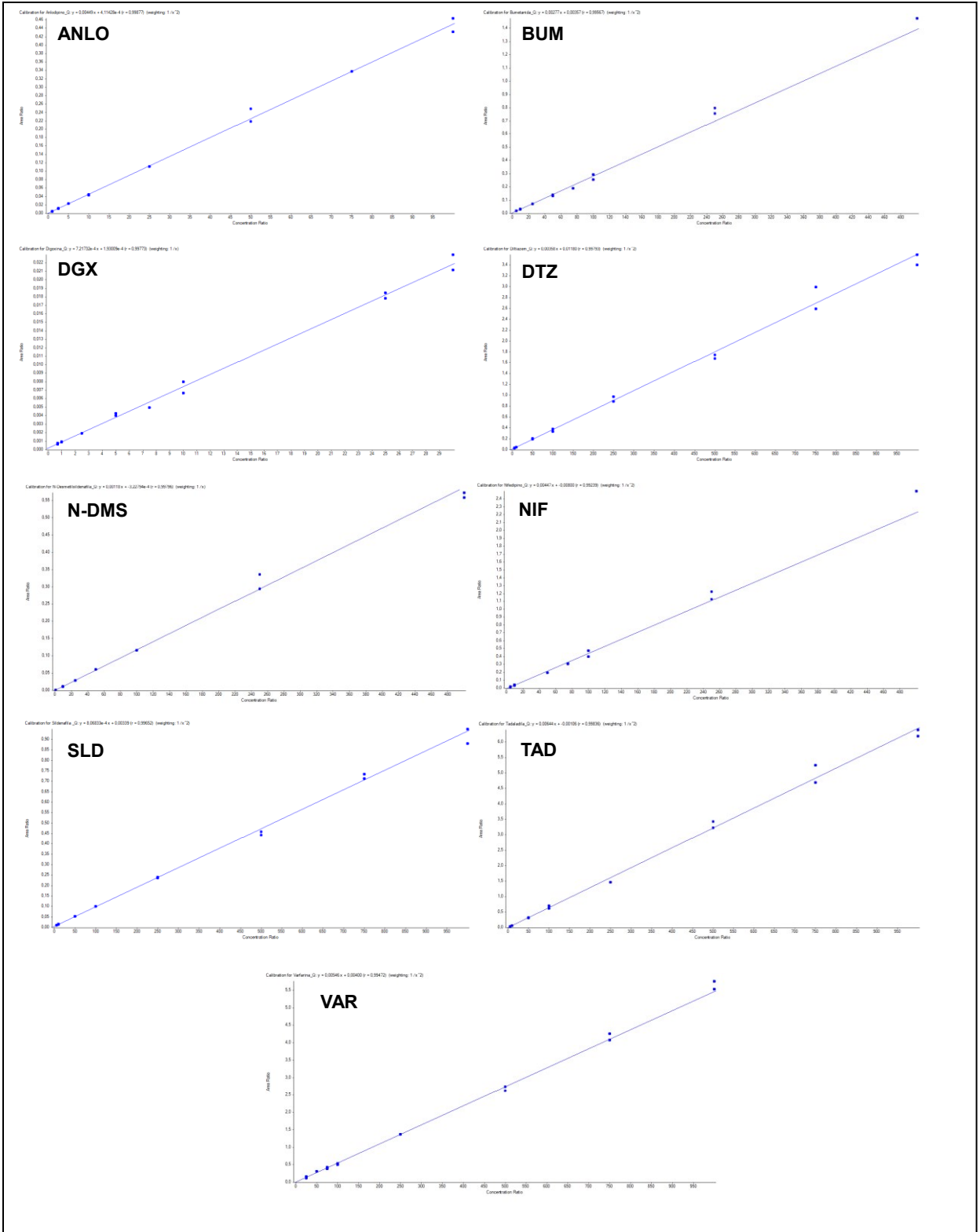
**Tabela 44 - Equações da reta e coeficientes de determinação obtidos para os analitos durante avaliação da linearidade da faixa de trabalho.**

Analito	Curva de calibração	Equação da reta	R <sup>2</sup>
ANLO	1	$y = 2,87 \times 10^{-3}x - 7,50 \times 10^{-4}$	0,9933
	2	$y = 3,23 \times 10^{-3}x + 1,13 \times 10^{-4}$	0,9926
	3	$y = 4,49 \times 10^{-3}x + 4,11 \times 10^{-4}$	0,9975
BUM	1	$y = 1,21 \times 10^{-3}x - 4,05 \times 10^{-4}$	0,9910
	2	$y = 2,41 \times 10^{-3}x + 2,40 \times 10^{-3}$	0,9906
	3	$y = 2,77 \times 10^{-3}x + 3,57 \times 10^{-3}$	0,9914
DGX	1	$y = 3,91 \times 10^{-4}x - 1,39 \times 10^{-5}$	0,9913
	2	$y = 6,92 \times 10^{-4}x - 3,55 \times 10^{-4}$	0,9905
	3	$y = 7,22 \times 10^{-4}x + 1,93 \times 10^{-4}$	0,9955
DTZ	1	$y = 3,72 \times 10^{-3}x + 7,69 \times 10^{-3}$	0,9948
	2	$y = 3,30 \times 10^{-3}x + 3,70 \times 10^{-3}$	0,9941
	3	$y = 3,58 \times 10^{-3}x + 1,18 \times 10^{-2}$	0,9959
N-DMS	1	$y = 1,27 \times 10^{-3}x - 5,06 \times 10^{-4}$	0,9941
	2	$y = 1,13 \times 10^{-3}x - 8,47 \times 10^{-4}$	0,9968
	3	$y = 1,18 \times 10^{-3}x - 3,46 \times 10^{-4}$	0,9959
NIF	1	$y = 4,56 \times 10^{-3}x - 7,55 \times 10^{-4}$	0,9935
	2	$y = 3,59 \times 10^{-3}x - 8,59 \times 10^{-3}$	0,9910
	3	$y = 4,47 \times 10^{-3}x - 8,00 \times 10^{-3}$	0,9848
SLD	1	$y = 9,34 \times 10^{-4}x + 5,32 \times 10^{-3}$	0,9983
	2	$y = 7,22 \times 10^{-4}x + 2,83 \times 10^{-3}$	0,9926
	3	$y = 8,06 \times 10^{-4}x + 3,39 \times 10^{-3}$	0,9931
TAD	1	$y = 2,57 \times 10^{-3}x + 1,76 \times 10^{-3}$	0,9962
	2	$y = 4,81 \times 10^{-3}x + 2,26 \times 10^{-3}$	0,9917
	3	$y = 6,44 \times 10^{-3}x - 1,06 \times 10^{-4}$	0,9967
VAR	1	$y = 5,25 \times 10^{-3}x + 3,69 \times 10^{-2}$	0,9907
	2	$y = 4,75 \times 10^{-3}x - 5,86 \times 10^{-3}$	0,9887
	3	$y = 5,46 \times 10^{-3}x + 4,00 \times 10^{-3}$	0,9895

As três curvas de calibração foram consideradas aprovadas, uma vez que, apresentaram, no mínimo, 75% dos pontos (12 pontos) com desvios inferiores a 20% para o LIQ e 15% para os demais pontos, além de, no mínimo, seis níveis de concentração, incluindo o LIQ e o LSQ, aprovados conforme os critérios de aceitação descritos nos guias de validação.

Como exemplo, as curvas de calibração obtidas para todos os analitos no terceiro dia de avaliação são apresentadas na **Figura 50**.

**Figura 50 – Curvas de calibração obtidas durante a avaliação da linearidade no terceiro dia de análise.**



### 6.2.5 Precisão, exatidão e recuperação

Os resultados obtidos para a avaliação da precisão e exatidão intracorrida e intercorridas, assim como os resultados obtidos de recuperação do método bioanalítico são apresentados na **Tabela 45**.

**Tabela 45 – Valores de DPR e EPR obtidos durante a avaliação da precisão e exatidão intracorrida e intercorridas e recuperação do método bioanalítico.**

Analito	Nível	Precisão (DPR%)				Exatidão (EPR%)				Recuperação média (%) (DPR %)
		Intracorrida			Intercorridas	Intracorrida			Intercorridas	
		1º dia	2º dia	3º dia		1º dia	2º dia	3º dia		
ANLO	CQLIQ	4,41	4,76	8,87	7,20	14,18	7,10	3,24	8,17	-
	CQB	6,76	10,80	2,82	8,24	3,27	-5,04	5,91	1,38	42,25 (5,10)
	CQM	10,41	8,59	4,69	7,80	0,58	-2,72	-1,46	-1,20	36,97 (12,92)
	CQA	4,22	8,56	7,97	7,67	5,49	-3,19	-2,21	0,03	43,64 (13,35)
BUM	CQLIQ	11,08	7,72	7,49	8,96	5,48	2,51	-2,36	1,84	-
	CQB	8,49	4,16	6,99	6,69	-3,20	1,80	-3,13	-1,51	22,53 (5,74)
	CQM	5,40	5,96	3,26	7,41	5,02	2,66	-7,65	0,01	23,04 (8,16)
	CQA	9,56	4,10	2,46	6,67	0,60	9,05	2,42	4,02	26,40 (11,56)
DGX	CQLIQ	8,11	9,78	5,88	7,55	4,15	3,13	2,00	3,09	-
	CQB	9,21	8,17	9,70	8,86	4,07	-0,51	-2,65	0,30	51,73 (13,68)
	CQM	3,23	10,71	8,79	8,27	8,35	-0,35	2,49	3,50	53,01 (13,28)
	CQA	6,06	4,93	4,74	6,64	-1,19	9,31	7,74	5,29	58,11 (10,45)
DTZ	CQLIQ	4,84	10,20	9,45	8,22	5,27	4,63	-0,34	3,19	-
	CQB	5,86	6,76	8,74	6,97	-0,64	3,97	0,99	1,44	99,77 (6,54)
	CQM	8,15	5,50	3,66	6,01	2,20	3,16	-1,50	1,29	89,98 (12,75)
	CQA	6,29	6,35	7,34	6,28	3,04	5,54	3,38	3,98	99,63 (3,12)
	CQD	4,70	3,77	6,75	5,09	3,94	7,95	5,31	5,73	-
N-DMS	CQLIQ	9,12	5,97	7,77	8,06	6,76	2,10	-2,01	2,28	-
	CQB	6,75	7,97	8,53	7,94	4,81	-1,57	-2,71	0,18	43,12 (10,38)
	CQM	4,28	11,88	6,99	7,80	2,95	-0,75	0,42	0,87	55,50 (10,04)
	CQA	7,81	5,93	5,05	6,54	3,92	-1,49	4,82	2,41	44,25 (12,60)
NIF	CQLIQ	8,24	6,06	2,33	9,27	-5,03	-0,96	12,98	2,20	-
	CQB	7,41	3,20	5,52	7,19	-4,86	-8,29	2,43	-3,57	50,96 (14,14)
	CQM	7,30	6,11	5,48	7,56	2,17	-6,29	-7,63	-3,92	54,43 (5,03)
	CQA	6,60	4,22	2,77	4,55	1,55	0,92	3,35	1,94	62,72 (13,76)
SLD	CQLIQ	1,34	12,25	2,03	6,84	-2,35	0,13	0,36	-0,61	-
	CQB	3,84	4,11	6,04	4,91	6,68	1,59	5,45	4,57	86,47 (8,57)
	CQM	5,58	10,18	2,54	7,65	-6,54	0,86	2,89	-0,93	85,82 (10,31)
	CQA	4,21	9,66	9,41	7,70	4,67	3,33	0,56	2,85	93,74 (10,05)
TAD	CQLIQ	7,11	7,32	10,27	8,06	0,63	4,56	-1,03	1,39	-
	CQB	7,77	4,79	7,65	6,49	5,43	2,83	2,89	3,72	63,38 (8,16)
	CQM	4,54	3,88	8,90	6,69	6,81	2,69	-2,04	2,49	73,51 (8,72)
	CQA	6,35	3,35	5,27	7,03	-2,71	10,01	2,01	3,11	71,95 (11,39)
VAR	CQLIQ	11,05	8,84	8,28	9,03	-0,23	4,15	5,20	3,04	-
	CQB	2,54	5,21	7,17	8,59	-3,02	10,66	-4,71	0,98	66,12 (8,79)
	CQM	8,05	4,81	4,94	6,25	2,53	0,46	-3,35	-0,12	74,20 (9,36)
	CQA	5,92	5,03	4,15	8,71	-7,81	6,30	-8,54	-3,35	61,34 (11,56)
	CQD	8,95	3,76	7,07	7,01	2,51	8,09	1,15	3,92	-



Ao analisar a **Tabela 45**, verifica-se que os valores de DPR foram inferiores a 20% para o CQLIQ e a 15% para os demais CQ, e que os valores de EPR encontram-se na faixa de  $\pm 20\%$  do valor nominal para o CQLIQ e  $\pm 15\%$  do valor nominal para os demais CQ. Dessa forma, o método bioanalítico pode ser considerado preciso e exato.

Durante a etapa de otimização do método de preparo de amostra, diferentes níveis das variáveis que influenciam na extração por DLLME foram avaliados visando-se uma maior extração dos analitos. Os resultados de recuperação obtidos mostram que, apesar das recuperações médias não serem próximas a 100% para a maior parte dos analitos, a reprodutibilidade do método é adequada, uma vez que o DPR entre os valores de recuperação obtidos entre as cinco réplicas, em cada um dos níveis de concentração avaliados, foi inferior a 15%.

### 6.2.6 Estabilidade dos analitos em plasma

Os resultados obtidos para as amostras de estabilidade referente aos estudos de ECC, ECD, ELD e EPP são apresentadas na **Tabela 46**. Conforme pode ser observado, os valores de EPR para todas as amostras encontraram-se na faixa de  $\pm 15\%$  do valor nominal e, além disso, os valores de DPR obtidos foram inferiores a 15%. Esses resultados evidenciam que as amostras de estabilidade apresentam exatidão e precisão adequadas e que os resultados das análises das amostras de validação e de voluntários não sofrem alterações provenientes de uma possível degradação dos analitos.

**Tabela 46 – Resultados de exatidão (EPR) e precisão (DPR) obtidos para as amostras provenientes dos estudos de estabilidade.**

Analito	Nível	ECC		ECD		ELD		EPP	
		Exatidão (EPR%)	Precisão (DPR%)	Exatidão (EPR%)	Precisão (DPR%)	Exatidão (EPR%)	Precisão (DPR%)	Exatidão (EPR%)	Precisão (DPR%)
ANLO	CQB	5,86	1,17	10,11	4,79	0,04	4,73	3,79	3,61
	CQA	3,06	1,67	-0,61	4,51	7,19	4,59	-3,44	3,34
BUM	CQB	-2,91	5,86	-0,13	-1,29	-1,18	6,29	9,58	10,30
	CQA	14,95	3,45	4,50	6,80	2,49	4,78	-3,21	3,49
DGX	CQB	6,41	7,70	-3,30	7,26	5,63	11,14	10,73	7,43
	CQA	-9,17	11,60	6,99	2,69	2,33	5,72	-1,50	3,63

**Tabela 46 – Resultados de exatidão (EPR) e precisão (DPR) obtidos para as amostras provenientes dos estudos de estabilidade (continuação).**

Analito	Nível	ECC		ECD		ELD		EPP	
		Exatidão (EPR%)	Precisão (DPR%)	Exatidão (EPR%)	Precisão (DPR%)	Exatidão (EPR%)	Precisão (DPR%)	Exatidão (EPR%)	Precisão (DPR%)
DTZ	CQB	7,98	3,62	-1,31	10,40	2,07	7,69	1,00	8,20
	CQA	5,65	2,33	4,20	1,95	-1,24	5,64	-2,58	4,20
N-DMS	CQB	5,40	3,64	12,11	7,07	3,53	5,69	-1,31	11,84
	CQA	0,63	1,86	7,01	2,78	4,87	2,73	-2,41	10,41
NIF	CQB	0,42	8,21	4,36	6,59	-4,27	9,12	-9,63	6,49
	CQA	12,00	3,38	2,52	4,59	-1,53	4,51	-1,48	5,98
SLD	CQB	8,62	4,96	5,24	2,48	5,51	6,24	-5,98	10,15
	CQA	-0,40	4,38	4,15	8,67	5,47	5,67	1,93	10,72
TAD	CQB	4,58	6,93	2,76	6,83	-3,82	5,08	-2,67	6,59
	CQA	-2,36	3,94	-1,57	1,91	0,95	3,56	5,33	3,54
VAR	CQB	1,16	8,31	2,17	5,34	-5,91	7,21	4,64	14,74
	CQA	0,33	4,04	2,29	5,78	9,67	4,26	1,85	2,38

### 6.3 Análise de amostras reais

As concentrações dos fármacos encontrados no plasma de pacientes voluntários atendidos no Serviço de Anticoagulação, Hematologia e Oncologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais são apresentadas na **Tabela 47** e os cromatogramas obtidos para as amostras de plasma dos voluntários 2 e 7, a título de exemplificação, são apresentados na **Figura 51**.

Infelizmente não se tem informações a respeito da posologia do tratamento dos pacientes voluntários e não se sabe o horário no qual os medicamentos foram administrados antes da coleta de sangue. Dessa forma, torna-se inviável discutir a respeito das concentrações plasmáticas encontradas. No entanto, é possível verificar que foram encontrados nas amostras reais os fármacos ANLO, DTZ e VAR. Para todas amostras analisadas, o DPR das concentrações plasmáticas obtidas entre as três réplicas analisadas foi inferior a 15%, o que evidencia a adequabilidade do método bioanalítico desenvolvido e validado.

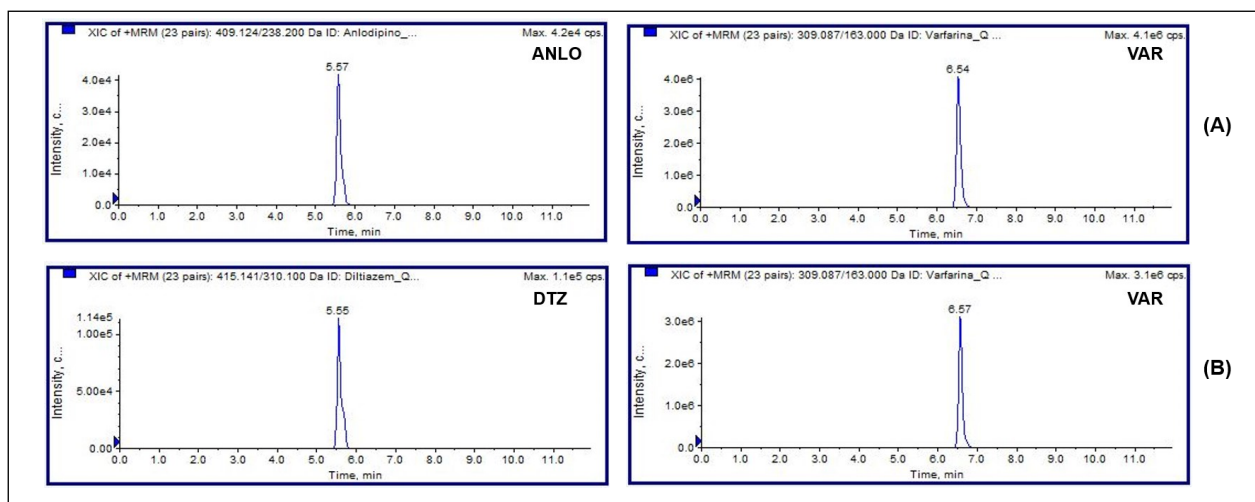
Estava previsto no projeto submetido e aprovado pelo COEP (protocolo CAAE 65767617.9.0000.5149) a administração de SLD a voluntários, para que, o método desenvolvido e validado pudesse ser aplicado na determinação de SLD e N-DMS

em amostras reais. Entretanto, essa etapa não pôde ser realizada até o momento, devido às restrições decorrentes do isolamento social necessário ao controle da pandemia de COVID-19.

**Tabela 47 – Concentrações plasmáticas obtidas em plasma de pacientes voluntários atendidos no Serviço de Anticoagulação, Hematologia e Oncologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.**

Voluntário	Fármaco	Concentração plasmática média (ng/mL)	DPR (%)
1	DTZ	382,21	9,18
2	ANLO	11,77	9,24
	VAR	782,32	14,93
3	VAR	619,13	14,45
4	ANLO	2,75	13,43
	VAR	965,57	1,06
5	VAR	789,65	2,96
6	DTZ	544,44	7,95
7	DTZ	356,07	7,49
	VAR	548,83	5,55
8	VAR	784,71	3,37
9	ANLO	13,04	9,25
	VAR	729,18	13,59
10	VAR	452,68	12,63

**Figura 51 – Cromatogramas obtidos na análise da amostra de plasma dos pacientes 2 (A) e 7 (B).**



## 7 CONCLUSÕES

Um método bioanalítico multifármacos, moderno, eficaz e que emprega HPLC-MS/MS e preparo de amostra miniaturizado por DLLME foi desenvolvido e validado para a quantificação simultânea de SLD, TAD e mais seis fármacos presentes nos protocolos terapêuticos para HAP (ANLO, BUM, DGX, DTZ, NIF e VAR), além do metabólito N-DMS, em plasma humano.

As etapas de desenvolvimento do método analítico consistiram na otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas, da fonte de ionização, definição das transições de massas a serem monitoradas e das condições cromatográficas.

Na etapa de preparo de amostra, diferentes fatores que afetam o procedimento DLLME, como pH, concentração, força iônica e volume da fase aquosa, tipo e volume dos solventes dispersante e extrator, além do tempo de agitação foram investigados e otimizados. O método de preparo de amostra miniaturizado, apresentou-se seletivo e reprodutível. Além disso, são necessários pequenos volumes de plasma (100 µL) e de solventes orgânicos.

A validação do método foi realizada de acordo com os guias nacional e internacionais vigentes e os resultados foram satisfatórios para seletividade, efeito residual, efeito matriz, linearidade, precisão, exatidão, recuperação e estabilidade dos analitos em plasma. A faixa de trabalho contemplou concentrações de 0,7 a 30 ng/mL para DGX, 1 a 100 ng/mL para ANLO, 1 a 500 ng/mL para N-DMS, 5 a 500 ng/mL para BUM e NIF, 5 a 1000 ng/mL para SLD e TAD, 5 a 1500 ng/mL para DTZ, e 25 a 3000 ng/mL para VAR.

O método desenvolvido e validado se mostrou adequado e reprodutível na determinação de fármacos em amostras de voluntários, podendo assim, ser empregado na rotina de laboratórios de análises de fármacos e metabólitos em plasma humano para monitorização terapêutica.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

No Capítulo I, a fim de determinar SLD, TAD e seus potenciais produtos de degradação simultaneamente em medicamentos originais e ilegais, foi apresentado um detalhado estudo de degradação forçada, no qual os IFA foram submetidos a condições ácida, neutra, alcalina, oxidativa, calor, luz e presença de íons metálicos. A seguir, um método simples e rápido utilizando UHPLC-UV e coluna com partículas superficialmente porosas foi desenvolvido e validado para quantificação de SLD e TAD na presença de seus produtos de degradação. As estruturas químicas e mecanismos de formação para os principais produtos de degradação foram propostas com base nos espectros obtidos por UHPLC-MS/MS.

O método por UHPLC-UV foi então aplicado na avaliação da qualidade de medicamentos originais e apreendidos pelas autoridades policiais brasileiras para a verificação das características farmacêuticas dos medicamentos aos quais a população está tendo acesso.

No Capítulo II foi descrito o desenvolvimento de um método bioanalítico a ser aplicado na monitorização farmacêutica de pacientes com HAP. O método contemplou a quantificação simultânea de TAD, SLD, N-DMS e mais seis fármacos presentes no protocolo da HAP (ANLO, BUM, DGX, DTZ, NIF e VAR) em plasma humano, utilizando uma técnica de preparo de amostra miniaturizada e ambientalmente correta, a DLLME, e HPLC-MS/MS para separação e detecção dos analitos.

Portanto, conclui-se que os objetivos pretendidos foram alcançados, uma vez que foram desenvolvidos, validados e aplicados métodos modernos, simples, rápidos, ambientalmente corretos e eficientes na determinação de SLD e TAD em medicamentos e em plasma humano.

## REFERÊNCIAS

- ABD-ELBARY, A.; FODA, N. H.; EL-GAZAYERLY, O. N. Stability indicating high performance liquid chromatographic assay for the determination of sildenafil citrate in bulk and in formulations. *Chromatographia*, v. 59, p. 561-566, 2004.
- ABDOU, H. M. *Dissolution, Bioavailability & Bioequivalence*. Easton: Mack Publishing Company, 1989.
- ACEÑA, J.; PÉREZ, S.; GARDINALI, P.; ABAD, J. L.; EICHHORN, P.; HEUETT, N. Structure elucidation of phototransformation products of unapproved analogs of the erectile dysfunction drug sildenafil in artificial freshwater with UPLC-Q Exactive-MS. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 49, p. 1279–1289, 2014.
- AHN, H. S.; FOSTER, M.; CABLE, M. PITTS, B. J.; SYBERTZ, E. J. Ca/CaM-stimulated and cGMPspecific phosphodiesterases in vascular and non-vascular tissues. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 308, p. 191–7, 1991.
- ALCANTARA, G. K. S.; CALIXTO, L. A.; ROCHA, B. A.; BARBOSA JÚNIOR, F.; de OLIVEIRA, A. R. M.; GAITANI, C. M. A fast DLLME-LC-MS/MS method for risperidone and its metabolite 9-hydroxyrisperidone determination in plasma samples for therapeutic drug monitoring of patients. *Microchemical Journal*, v. 156, p. 1-10, 2020.
- AL-GHAZAWIA, M.; TUTUNJI, M.; ABURUZ, S. Simultaneous determination of sildenafil and N-desmethyl sildenafil in human plasma by high-performance liquid chromatography method using electrochemical detection with application to a pharmacokinetic study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 43, p. 613-618, 2007.
- AL-HROUB, H.; ALKHAWAJA, B.; ALKHAWAJA, E.; ARAFAT, T. Sensitive and rapid HPLC-UV method with back-extraction step for the determination of sildenafil in human plasma. *Journal of Chromatography B*, v. 15, p. 1009-1010, 2016.
- ALI, I.; AL-OTHMAN, Z. A.; NAGAE, N.; GAITONDE, V. D.; DUTTA, K. K. Recent trends in ultra-fast HPLC: New generation superficially porous silica columns. *Journal of Separation Science*, v. 35, p. 3235–3249, 2012.
- AL-SAYAH, M. A.; RIZOS, P.; ANTONUCCI, V.; WU, N. High throughput of active pharmaceutical ingredients by UPLC. *Journal of Separation Science*, v. 31, p. 2167-2172, 2008.
- AMES, J.; SOUZA, D. Z. Falsificação de medicamentos no Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v. 46, p.154-159, 2012.
- AMPARO, M. R.; FRANZINI, A. D.; SCHIAVON, B.; CARVALHO, L. S.; NETO, A. J. S. Influência dos parâmetros instrumentais sobre o desempenho de coluna de HPLC com partículas superficialmente porosas sub-3 µm. *Scientia Chromatographica*, v. 3, n. 2, p. 51-66, 2011.

ANTHEMIDIS, A. N.; IOANNOU, K. I. G. Recent developments in homogeneous and dispersive liquid-liquid extraction for inorganic elements determination. A review. *Talanta*, v. 80, p. 413-421, 2009.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Bulário eletrônico. Disponível em: < [http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila\\_bula/index.asp](http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/index.asp)>. Acesso em: 16 nov. 2020a.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Lista de medicamentos de referência. Disponível em: < <http://antigo.anvisa.gov.br/documents/33836/4412457/Lista+A+Inclu%C3%ADdos+06+11+2020+%281%29.pdf/d6ca4081-7141-489e-b264-589533468b83>>. Acesso em: 18 nov. 2020b.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Medicamento Falsificado - Especialistas discutem combate à pirataria. *Boletim Informativo da ANVISA*, ed. n. 63, 2006.

BAERTSCHI, S. W.; ALSANTE, K. M.; REED, R. A. *Pharmaceutical stress testing: predicting drug degradation*. 2. ed. London: Informa Healthcare, 2011.

BARNES, P. J. Farmacologia Pulmonar. In: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. *Goodman & Gilman's basis of therapeutics*. 12. ed. Porto Alegre: AMGH Editora Ltda, 2012. P. 1059.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. *Como fazer experimentos – Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. 2. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2001.

BORGES, E. M; GORAIEB, K.; COLLINS, C. H. O desafio de analisar solutos básicos por cromatografia líquida em modo reverso: Algumas alternativas para melhorar as separações. *Química Nova*, v. 35, n. 5, p. 993-1003, 2012.

BRASIL. Lei de Crimes Contra a Saúde Pública - Lei nº 9677, de 2 de julho de 1998 – Altera dispositivos do Capítulo III do Título VIII do Código Penal, incluindo na classificação dos delitos considerados hediondos crimes contra a saúde pública, e dá outras providências. Legislação Federal e marginalia.

BRASIL. Lei nº 1976 de 23 de setembro de 1976 - Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências. Brasília, DF, *Diário Oficial da União*, 24 set. 1976.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 71 de 22 de dezembro de 2009. Estabelece regras para a rotulagem de medicamentos. Ministério da Saúde / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder Executivo, Brasília, DF, *Diário Oficial da União*, 23 dez. 2009.

BRASIL. Portaria nº 35, de 16 de janeiro de 2014. Aprova o Protocolo Clínico Diretrizes Terapêuticas da Hipertensão Arterial Pulmonar. Ministério da Saúde / Secretaria de Atenção à Saúde. Poder Executivo, Brasília, DF, *Diário Oficial da União*, 23 set. 2014.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 31, de 11 de agosto de 2010. Dispõe sobre a realização dos estudos de equivalência farmacêutica e de perfil de dissolução comparativo. Ministério da Saúde / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder Executivo, Brasília, DF, *Diário Oficial da União*, 12 ago. 2010.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 53 de 4 de dezembro de 2015. Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. Ministério da Saúde / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder Executivo, Brasília, DF, *Diário Oficial da União*, 8 dez. 2015.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 71, de 22 de dezembro de 2009. Estabelece regras para a rotulagem de medicamentos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, DF, *Diário Oficial da União*, 16 dez. 2009.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, DF, *Diário Oficial da União*, 25 jul. 2017.

BRASIL. Resolução RE nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, maio 2012.

BRASIL. Resolução RE nº 301, de 21 de agosto de 2019. Dispõe sobre as Diretrizes Gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 22 ago. 2019.

BRÊTAS, J. M. *Avaliação da influência de anticoagulantes sobre parâmetros da validação de métodos bioanalíticos para estudos farmacocinéticos e de biodisponibilidade/bioequivalência de naproxeno sódico e succinato de sumatriptano*. 2014. 192f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - MG, 2014.

BRITISH Pharmacopoeia. London: Her majesty's Stationary Office, 2014.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. Goodman & Gilman. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2006.

BUMEX. Disponível em: <[https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2010/018225s024lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/018225s024lbl.pdf)>. Acesso em 18 nov. 2020.

CALLOU, M. R. A.; RAMOS, P. R. M. Hipertensão arterial pulmonar. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 93 (6 sup. 1), p. e110-e178, 2009.

CARSON, C. C.; NOH, C. H. Distal penile prosthesis extrusion: treatment with distal corporoplasty or Gortex windsock reinforcement. *International Journal of Impotence Research*, v. 14, p. 81-84, 2002.



CASSIANO, N. M.; LIMA, V. V.; OLIVEIRA, R. V.; DE PIETRO, A. C.; CASS, Q. B. Development of restricted-access media supports and their application to the direct analysis of biological fluid samples via high-performance liquid chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 384, p. 1462–1469, 2006.

CHALLA, B. R.; AWEN, B. Z.; CHANDU, B. R.; KHAGGA, M.; BANNOTH, C. K.; KANALA, K.; Gogineni, R. Sildenafil and N-desmethyl sildenafil quantification in human plasma by HPLC coupled with ESI-MS/MS detection: Application to bioequivalence study. *Analytical Methods*, v. 2, n. 8, p. 1043-1050, 2010.

CHANG, M.S.; JI, Q.; ZHANG, J.; EL-SHOUBAGY, T.A. Historical Review of Sample Preparation for Chromatographic Bioanalysis: Pros and Cons. *Drug Development Research*, v. 68, n. 3, p. 107-133, 2007.

CHEMAXON (United States). Chemicalize. Disponível em <<http://www.chemicalize.org/>>. Acesso em: 15 nov. 2018.

CHEMAXON (United States). Log D Predictor. Disponível em <<https://disco.chemaxon.com/calculators/demo/plugins/logd/>>. Acesso em: 10 jun. 2020.

COELHO NETO, J.; LISBOA, F. L. C. ATR-FTIR characterization of generic brand-named and counterfeit sildenafil- and tadalafil-based tablets found on the Brazilian market. *Science and Justice*, v. 57, p. 283-295, 2017.

COHN, J. N. Optimal diuretic therapy for heart failure. *The American Journal of Medicine*, v. 111, n. 7, p. 577, 2001.

DANIEL, C. Use of half-normal plots in interpreting factorial two-level experiments. *Technometrics*, v. 1, n. 4, p. 311-341, 1959.

DARAGHMEH, N.; AL-OMARI, M.; BADWAN, A. A. JABER, A. M. Y. Determination of sildenafil citrate and related substances in the commercial products and tablet dosage form using HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 25, p. 483-492, 2001.

DÉGARDIN, K.; ROGGO, Y.; MARGOT, P. Understanding and fighting the medicine counterfeit market. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 87, p. 167-175, 2014.

DESTEFANO, J. J.; LANGLOIS, T. J.; KIRKLAND, J. J. Characteristics of Superficially-Porous Silica Particles for Fast HPLC: Some Performance Comparisons with Sub-2- $\mu$ m Particles. *Journal of Chromatographic Science*, v. 46, 2008.

DOLAN, J. *Why Do Peaks Tail? LC Troubleshooting*. 2003.

DUBOSE, M. M. Criminal enforcement of intellectual property laws in the twenty-first century. *Columbia Journal of Law and the Arts*, v. 29, p. 481-484, 2006.

EECKHAUT, A. V.; LANCKMANS, K.; SARRE, S.; SMOLDERS, I.; MICHOTTE, Y. Validation of bioanalytical LC–MS/MS assays: Evaluation of matrix effects. *Journal of Chromatography B*, v. 877, p. 2198–2207, 2009.

EICHHORN, P.; PÉREZ, S.; ACEÑA, J.; GARDINALI, P.; ABADC, J. L.; BARCELÓA, D. Identification of phototransformation products of sildenafil (Viagra) and its N-demethylated human metabolite under simulated sunlight. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 47, p. 701-711, 2012.

EMA. European Medicines Agency. *Guideline on bioanalytical method validation*. London, jul. 2011. Disponível em: <[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/Document\\_library/Scientific\\_guideline/2011/08/WC500109686.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/Document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf)>. Acesso em: 17 nov. 2018.

ESC. European Society of Cardiology. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *European Heart Journal*, v. 37, p. 67-119, 2016.

FARIA, A. M.; BOTTOLI, C. B. G.; JARDIM, C. S. F.; COLLINS, C. H. Fases estacionárias monolíticas para separações cromatográficas. *Química Nova*, v. 29, n.2, p. 300-309, 2006.

FARMACOPEIA Brasileira. 6. ed. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019.

FDA. Food and Drug Administration. *Guidance for Industry: Analytical Procedures and Methods Validation*, 2000.

FDA. U.S. Food and Drug Administration. *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry*. Rockville, mai, 2018. Disponível em <<https://www.fda.gov/media/70858/download>>. Acesso em: 05 jun. 2020.

FERIDUNI, B.; FARAJZADEH, M. A.; BARZEGAR, M.; SADEGHVAND, S.; KHOUBNASABJAFARI, M. JOUYBAN, A. Simultaneous determination of valproic acid and its main metabolite in human plasma using a small scale dispersive liquid–liquid microextraction followed by gas chromatography–flame ionization detection. *Journal of the Iranian Chemical Society*, v. 15, P. 2503-2510, 2018.

FIDAN, A. K.; BAKIRDERE S. Simultaneous Determination of sildenafil and tadalafil in legal drugs, illicit/counterfeit Drugs, and wastewater samples by High-performance liquid chromatography. *Journal of AOAC International*, v. 99, p. 923-928, 2016.

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

FORGUE, S. T.; PATTERSON, B. E.; BEDDING, A. W.; PAYNE, C. D.; PHILLIPS, D. L.; WRISHKO, R. E.; MITCHELL, M. I. Tadalafil pharmacokinetics in healthy subjects. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 61, n. 3, p. 280-288, 2005.

FUSTER, V.; STEELE, P. M.; EDWARDS, W. D.; GERSH, B. J.; MCGOON, M. D.; FRYE, R. L. Primary pulmonary hypertension: natural history and the importance of thrombosis. *Circulation*, v. 70, p. 580–587, 1984.

GALIE, N.; GHOFRANI, H. A.; TORBICKI, A.; BARST, R. J.; RUBIN, L. J.; BADESCH, D.; FLEMING, T.; PARPIA, T.; BURGESS, G.; BRANZI, A.; GRIMMINGER, F.; KURZYNA, M.; SIMONNEAU, G. Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *New England Journal of Medicine*, v. 353, p. 2148–2157, 2005.

GALIE, N.; MANES, A.; BRANZI, A. The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. *Cardiovascular Research*, v. 61, n. 2, p. 227-37, 2004.

GALIÈ, N.; MANES, A.; BRANZI, A. Prostanoids for pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 2, p. 123–137, 2003.

GIL, E. S. *Controle físico químico de qualidade de medicamentos*. 3. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2010.

GOFFREDO, B. M.; CAIROLI, S.; VITALE, A.; CORSETTI, T. M. PASTORE, A. Reverse-phase high-performance liquid chromatography for the simultaneous determination of sildenafil and N-desmethyl sildenafil in plasma of children. *Biomedical Chromatography*, v. 30, n. 12, p. 2070-2073, 2016.

GRATZ, S. R.; GAMBLE, B. M.; FLURER, R. A. Accurate mass measurement using Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for structure elucidation of designer drug analogs of tadalafil, vardenafil and sildenafil in herbal and pharmaceutical matrices. *Rapid communications in mass spectrometry*, v. 20, p. 2317-1327, 2006.

GRESSER, U.; GLEITER, C. H. Erectile dysfunction: comparison of efficacy and side effects of the PDE-5 inhibitors sildenafil, vardenafil and tadalafil review of the literature. *European Journal of Medical Research*, v. 7, p. 435-446, 2002.

GREEN, J. M. A practical guide to analytical method validation. *Analytical Chemistry*, Washington, v. 68, p. 305A-309A, 1996.

GUILLARME, D.; RUTA, J.; RUDAZ, J.; VEUTHEY, J. New trends in fast and high-resolution liquid chromatography: a critical comparison of existing approaches. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 397, p. 1069-1082, 2010.

HANDA, T.; SINGH, S.; SINGH, I. P. Characterization of a new degradation product of nifedipine formed on catalysis by atenolol: A typical case of alteration of degradation pathway of one drug by another. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 89, p. 6-17, 2014.

HOEPER, M. M.; SOSADA, M.; FABEL, H. Plasma coagulation profiles in patients with severe primary pulmonary hypertension. *European Respiratory Journal*, v. 12, p. 1446-1449, 1998.

HOETTE S.; JARDIM C.; SOUZA R. Diagnóstico e tratamento da hipertensão pulmonar: uma atualização. *Jornal Brasileiro Pneumologia*, v. 36, n. 6, p. 795-811, 2010.

HOVORKA, S. W.; SCHÖNEICH, C. Oxidative degradation of pharmaceuticals: Theory, mechanisms and inhibition. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 90, p. 253–269, 2001.

HURTADO, R. L.; LASMAR, M. C. Medicamentos falsificados e contrabandeados no Brasil: panorama geral e perspectivas de combate ao seu consumo. *Cadernos de Saúde Pública do Rio de Janeiro*, v. 30, p. 891-895, 2014.

ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, *Guideline Q1B – stability testing: photostability testing of new drug substances and products*, 1996.

ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, *Guideline Q2(R1) – Validation of analytical procedures: text and methodology*, 2005.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial DOQ-CGCRE-008, revisão 07. *Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos*. Rio de Janeiro, 2018.

JAHN, S.; BAUMANN, A.; ROSCHER, J.; HENSE, K.; ZAZZERONI, R.; KARST, U. Investigation of the biotransformation pathway of verapamil using electrochemistry/liquid chromatography/mass spectrometry – A comparative study with liver cell microsomes. *Journal of Chromatography A*, v. 1218, p. 9210-9220, 2011.

JIDA, M.; TOURWÉ, D.; BALLEST, S. Highly stereoselective one-pot construction of trisubstituted tetrahydro- $\beta$ -carboline-fused diketopiperazines: A synthetic route towards cialis analogues. *RSC Advances*, v. 4, p. 38159–38163, 2014.

JONES, D. A.; BENJAMIN, C. W.; LINSEMAN, D. A. Activation of thromboxane and prostacyclin receptors elicits opposing effects on vascular smooth muscle cell growth and mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Molecular Pharmacology*, v.48, p. 890–896, 1995.

JOUYBAN, A.; SOROURADDIN, M. H.; FARAJZADEH, M. A.; SOMI, M. H.; FAZELI-BAKHTIYARI, R. Determination of five antiarrhythmic drugs in human plasma by dispersive liquid–liquid microextraction and high-performance liquid chromatography. *Talanta*, v. 134, p. 681-689, 2015.

KEE, C. L.; CHIN, L. C.; CHEAH, N. P.; GE, X.; LOW, M. Y.; Elucidation of the absolute configuration of a tadalafil analogue found as adulterant in a health supplement by mass spectrometry, chiroptical methods and NMR spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 173, p. 47–55, 2019.

KING R.; BONFIGLIO R.; FERNANDEZ-METZLER C.; MILLER-STEIN C.; OLAH T. Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *Journal*

of the American Society for Mass Spectrometry, v. 11, p. 942 – 950, 2000.

KRAKOWSKA, B.; CUSTERS, D.; DECONINCK, E.; DASZYKOWSKI, M. Chemometrics and the identification of counterfeit medicines - A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 127, p. 112-122, 2016.

LENTH, R. V. Quick and easy analysis of unreplicated factorials. *Technometrics*, v. 31, n. 4, p. 469-473, 1989.

LI, S.; LIU, G.; JIA, J.; MIAO, Y.; GU, S.; MIAO, P.; SHI, X.; WANG, Y.; YU, C. Therapeutic monitoring of serum digoxin for patients with heart failure using a rapid LC-MS/MS method. *Clinical Biochemistry*, v. 43, p. 307–313, 2010.

LIEW, K. B.; LOH, G. O. K.; TAN, Y. T. F.; PEH, K. K. Simultaneous quantification of sildenafil and N-desmethyl sildenafil in human plasma by UFLC coupled with ESI-MS/MS and pharmacokinetic and bioequivalence studies in Malay population. *Biomedical Chromatography*, v. 29, p. 953-960, 2014.

LIEW, K. B.; PEH, K. K. Stability indicating HPLC method for simultaneous quantification of sildenafil citrate and dapoxetine hydrochloride in Pharmaceutical products. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 31, n. 6, p. 2515-2522, 2018.

LOMBARDO, M.; ESERIAN, J. K. A análise da qualidade de medicamentos e o papel do laboratório oficial no contexto da saúde pública. *Revista de Administração em Saúde*, v. 17, n. 67, 2017.

LUIZA, V. L.; CASTRO, C. G. S. O.; NUNES, J. M. Aquisição de medicamentos no setor público: o binômio qualidade-custo. *Caderno de Saúde Pública*, v. 15, n. 4, p. 769-776, 1999.

LYRA, D.; DELDUQUE, M. C. O ato administrativo de concessão de registro de medicamentos na Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Revista de Direito Sanitário*, v. 10, n. 3, p. 11-26, 2010.

MARTINS, K. C. *Avaliação e comparação da cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia líquida de ultra eficiência empregando fármacos antidiabéticos orais como modelo*. 2012. 63f. Monografia de Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - MG, 2012.

MARTINS, M. L.; PRIMEL, E. G.; CALDAS, S. S.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações. *Scientia Chromatographica*, v. 4, n. 1, p. 35-51, 2012.

MEDICINANET. Bula eletrônica Digoxina. Disponível em: <<https://bula.medicinanet.com.br/bula/1931/digoxina.htm>>. Acesso em: 18 nov. 2020.

MERCK. Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos – FISPQ. Disponível em: <<https://www.merckmillipore.com/BR/pt>>. Acesso em: 17 nov. 2020.

MICHEL, T.; HOFFMAN, B. B. Tratamento da isquemia miocárdica e da hipertensão. In: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. *As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman*. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012, p. 745-788.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. *Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME)*. Brasília – DF. 2020. Disponível em: <<http://www.famurs.com.br/wp-content/uploads/2020/04/RELA%C3%87%C3%83O-NACIONAL-DE-MEDICAMENTOS-ESSENCIAIS-2020.pdf>>. Acesso em 18 nov. 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Relatório de Recomendação da Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (CONITEC) - Tadalafila para o tratamento da hipertensão pulmonar. 2013.

MOREIRA, B. J.; YOKOYA, J. M. C.; GAITANI, C. M. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME): fundamentos, inovações e aplicações biológicas. *Scientia Chromatographica*, v. 6, n. 3, p. 186-204, 2014.

MORIN, L. P.; MESS, J. N.; FURTADO, M.; GAROFOLO, F. Reliable procedures to evaluate and repair crosstalk for bioanalytical MS/MS assays. *Bioanalysis*, v. 3, n. 3, p. 275-283, 2011.

NGUYEN, D. T. T.; GUILLARME, D.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. L. Chromatographic behaviour and comparison of column packed with sub-2  $\mu\text{m}$  stationary phases in liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1128, p. 105–113, 2006.

NICHOLS, D. J.; MUIRHEAD, G. J.; HARNESS, J. A. Pharmacokinetics of sildenafil after single oral doses in healthy male subjects: absolute bioavailability, food effects and dose proportionality. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 53, p. 5S-12S, 2002.

NIESSEN, W. M. A. Fragmentation of toxicologically relevant drugs in positive-ion liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Mass Spectrometry Review*, v. 30, p. 626-663, 2011.

NOGUEIRA, N. M.; SOARES, B. T. M.; ANDRADE, A. B. N.; SINGH, A. K. Méritos comparativos da cromatografia em fase líquida de alta eficiência em escala convencional e minituarizada. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 92, n. 2, p.44–50, 2011.

ORSI, D.; PELLEGRINI, M.; MARCHEI, E.; NEBULONI, P.; GALLINELLA, G.S. MARTUFI, A.; GAGLIARD, L.; PICHINI, S. High performance liquid chromatography-diode array and electrospray-mass spectrometry analysis of vardenafil, sildenafil, tadalafil, testosterone and local anesthetics in cosmetic creams sold on the Internet web sites. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 50, p. 362-369, 2009.

ORTIZ, R. S. *Perfil químico e tecnológico de medicamentos falsificados: uma abordagem estatística multivariada para os casos do Viagra e do Cialis*. 2013. 90f. Tese de doutorado (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, 2013.

ORTIZ, R. S.; ANTUNES, M. V.; LINDEN, R. Determinação de citrato de sildenafil e de tadalafila por cromatografia líquida de ultraeficiência com detecção por arranjo de diodos (CLUE-DAD). *Química Nova*, v. 33, n.2, p. 289-393, 2010.

ORTIZ, R. S.; MARIOTTI, K. C.; FANKA, B.; LIMBERGER, R. P.; ANZANELLO, M. J.; MAYORGAB, P. Counterfeit Cialis and Viagra fingerprinting by ATR-FTIR spectroscopy with chemometry: Can the same pharmaceutical powder mixture be used to falsify two medicines? *Forensic Science International*, v. 226, n. 1-3, p. 282-289, 2013.

ORTIZ, R. S., MARIOTTI, K. C.; LIMBERGER, R. P.; MAYORGA, P. Profile of counterfeit tablets Viagra® and Cialis®. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 48, n. 3, p. 487-495, 2012a.

ORTIZ, S. R., MARIOTTI, K. C.; ROMÃO, W.; EBERLIN, M. N.; LIMBERGER, R. P.; MAYORGA, P. Chemical Fingerprinting of Counterfeits of Viagra and Cialis Tablets and Analogues via Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *American Journal of Analytical Chemistry*, v. 2, p. 919-928, 2011.

ORTIZ, S. R., MARIOTTI, K. C.; SCHWAB, N. V.; SABIN, G. P.; ROCHA, W. F. C.; de CASTRO, E. V. R.; LIMBERGER, R. P.; MAYORGA, P.; BUENO, M. I. M. S.; ROMÃO, W. Fingerprinting of sildenafil citrate and tadalafil tablets in pharmaceutical formulations via X-ray fluorescence (XRF) spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 58, p. 7-11, 2012b.

PATEL, D. P.; SHARMA, P.; SANYAL, M.; SINGHAL, P.; SHRIVASTAV, P. S. Challenges in the simultaneous quantitation of sumatriptan and naproxen in human plasma: Application to a bioequivalence study. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 902, p. 122-131, 2012.

PATEL, J. K.; PATEL, N. K. Stability-Indicating RP-HPLC Method for the Determination of Ambrisentan and Tadalafil in Pharmaceutical Dosage Form. *Scientia Pharmaceutica*, v. 82, p. 749-763, 2014.

POLSON, C.; SARKAR, P.; INCLEDON, B.; RAGUVARAN, V.; GRANT, R. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, v. 785, p. 263-275, 2003.

PORTAL ACTION. Experimentos fatoriais sem réplicas. Disponível em: <<http://www.portalaction.com.br/planejamento-de-experimento/33-experimentos-fatoriais-sem-replicas>>. Acesso em: 24 abr. 2020a.

PORTAL ACTION. Linearidade. Disponível em: <<http://www.portalaction.com.br/validacao-de-metodologia-analitica/112-linearidade>>. Acesso em: 22 dez. 2020b.

PRADO, L. M. F. *Avaliação de diferentes tipos de fases estacionárias para separações rápidas em cromatografia líquida utilizando antidiabéticos orais como modelo*. 2013. 189f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG, 2013.

PUBCHEM Source Information. The PubChem Project. USA: National Center for Biotechnology Information. Disponível em <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em 17 nov. 2020.

QUEIROZ, S. C. N.; CAROL H.; COLLINS, I. C. S. F. J. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. *Química Nova*, v. 24, p. 68-76, 2001.

QUINTERO, A.; CALDERA, A.; MILANO, B.; ODREMAN, I.; HURTADO, A.; MANZANARES, L.; VILLAMIZAR, J. Validation of an HPLC method for sildenafil citrate analysis in human plasma samples. *Pharmazie*, v. 64, p. 796-799, 2009.

RAMAKRISHNA, N. V. S.; VISHWOTTAM, K. N.; PURAN, S.; KOTESHWARA, M.; MANOJ, S.; SANTOSH, M.; CHIDAMBARA, J.; WISHU, S.; SUMATHA, B. Quantitation of tadalafil in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry with electrospray ionization. *Journal of Chromatography B*, v. 809, p. 243–249, 2004.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON G. *Rang & Dale. Farmacologia*. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

RANI, S.; MALIK, A. K.; SINGH, B. Novel micro-extraction by packed sorbent procedure for the liquid chromatographic analysis of antiepileptic drugs in human plasma and urine. *Journal of Separation Science*, v. 35, n. 3, p. 359-366, 2012.

RAO, R. N.; TALLURI, M. V. N. K. An overview of recent applications of inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) in determination of inorganic impurities in drugs and pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 43, p. 1-13, 2007.

RAO, D. V. S.; RADHAKRISHNANAND, P.; HIMABINDU V. Stress degradation studies on tadalafil and development of a validated stability-indicating LC assay for bulk drug and pharmaceutical dosage form. *Chromatographia*, v. 67, v. 183-188, 2008.

RAVI, B. G.; GUARDIAN, M. G. E.; DICKMAN, R.; WANG, Z. Q. Profiling and structural analysis of cardenolides in two species of *Digitalis* using liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1610, 2020.



REFFELMANN, T.; KLONER, R. A. Phosphodiesterase 5 inhibitors: are they cardioprotective? *Cardiovascular Research*, v. 83, p. 204-212, 2009.

REGALADO, E. L.; SCHAFER, W.; MCCLAIN, R.; WELCH, C. J. Chromatographic resolution of closely related species: Separation of warfarin and hydroxylated isomers. *Journal of Chromatography A*, v. 1314, p. 266-275, 2013.

REZAEI, M.; ASSADI, Y.; HOSSEIN, M. M.; AGHAEI, E.; AHMADIA, F.; BERIJANI, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal Chromatography A*, v. 1116, p. 1-9, 2006.

RICH, S.; SEIDLITZ, M.; DODIN, E.; OSIMANI, D.; JUDD, D.; GENTHNER, D.; MCLAUGHLIN, V.; FRANCIS, G. The short-term effects of digoxin in patients with right ventricular dysfunction from pulmonary hypertension. *Chest*, v. 114, p. 787-792, 1998.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 6. ed. London: Pharmaceutical Press, 2009.

RSC (Royal Society of Chemistry). *Analytical Methods Committee Brief: Is my calibration linear?*, 2005.

RUBIN, L. J.; BADESCH, D. B.; BARST, R. J.; GALIE, N.; BLACK, C.M.; KEOGH, A.; PULIDO, T.; FROST, A.; ROUX, S.; LECONTE, I.; LANDZBERG, M.; SIMONNEAU, G. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *New England Journal of Medicine*, v. 346, p. 896-903, 2002.

RUST, K. Y.; WILKENS, H.; KAISER, R.; BREGEL, D.; WILSKE, J.; KRAEMER, T. Detection and Validated Quantification of the Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors Sildenafil, Vardenafil, Tadalafil, and 2 of Their Metabolites in Human Blood Plasma by LC-MS/MS—Application to Forensic and Therapeutic Drug Monitoring Cases. *Therapeutic Drug Monitoring*, v. 34, n. 6, p. 729-735, 2012.

RUTKOWSKA, M. OWCZAREK, K.; de la GUARDIA, M.; PŁOTKA-WASYLKA, J.; NAMIEŚNIK, J. Application of additional factors supporting the microextraction process. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 97, p. 104-119, 2017.

SACRÉ, P. Y.; DECONINCKA, E.; CHIAPC, P.; CROMMENB, J.; MANSIONB, F.; ROZETD, E.; COURSELLEA, P.; DE BEERA, J. O. Development and validation of a ultra-high-performance liquid chromatography-UV method for the detection and quantification of erectile dysfunction drugs and some of their analogues found in counterfeit medicines. *Journal of Chromatography A*, v. 1218, p. 6439-6447, 2011.

SANZ-NEBOT, V.; TORO, I.; BERGES, R.; VENTURA, R.; SEGURA, J.; BARBOSA, J. Determination and characterization of diuretics in human urine by liquid chromatography coupled to pneumatically assisted electrospray ionization mass Spectrometry. *Journal of mass spectrometry*, v. 36, p. 652-657, 2001.

SARAJI, M.; BOROUJENI, M. K. Recent developments in dispersive liquid-liquid microextraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 406, p. 2027-2066, 2014.

SAS/MS. Secretaria de Atenção à Saúde - Ministério da Saúde. *Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas – Hipertensão Arterial Pulmonar*. Portaria SAS/MS nº 35, de 16 de janeiro de 2014, republicada em 06 de junho de 2014 e 23 de setembro de 2014.

SATHEESH, B.; SREE GANESH, K. K.; SARAVANAN D. Simultaneous determination of tadalafil and its related compounds in pharmaceutical dosage forms by UPLC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 36, n. 10, p. 1451-1465, 2012.

SBC. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Diagnóstico, Avaliação e Terapêutica da Hipertensão Pulmonar. *Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia*, 2005.

SCIEX. Espectrometria de Massas Triple Quad e QTRAP®. *Manual do operador*. 1 MN.ST.004 rev.02.

SEGALL, A. I.; VITALE, M. F.; PEREZ, V. L.; PALACIOS, M. L.; PIZZORNO, M. T. Reversed-phase HPLC determination of sildenafil citrate in the presence of its oxidative-induced degradation products. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 23, n. 9, p. 1377-1386, 2000.

SEIDI, S.; YAMINI, Y. Analytical sonochemistry; developments, applications, and hyphenations of ultrasound in sample preparation and analytical techniques. *Central European Journal of Chemistry*, v. 10, n. 4, p. 938-976, 2012.

SEN, D. J.; PATEL, A. K. Degradation and kinetic study of tadalafil and chiral separation by RP-HPLC. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 4, n. 5, p. 1283-1305, 2015.

SHAH, V. P. The History of Bioanalytical Method Validation and Regulation: Evolution of a Guidance Document on Bioanalytical Methods Validation. *The AAPS Journal*, v. 9, n. 1, p. 43-47, 2007.

SHAKYA, A. K.; ABU-AWWAD, A. N. A.; ARAFAT, T. A.; MELHIM, M. Validated liquid chromatographic-ultraviolet method for the quantitation of tadalafil in human plasma using liquid-liquid extraction. *Journal of Chromatography B*, v. 852, p. 403-408, 2007.

SHEN, L.; ZHANG, J.; YANG, Q.; MANICKE, N.E.; OUYANG, Z. High throughput paper spray mass spectrometry analysis. *Clinica Chimica Acta*, v. 420, p. 1-6, 2012.

SHEU, M. T.; WU, A. B.; YEH, G. C.; HSIA, A.; HO, H. Development of a liquid chromatographic method for bioanalytical applications with sildenafil. *Journal of Chromatography B*, v. 791, p. 255-262, 2003.

SILVA, K.; ALVES, L. D. S.; SOARES, M.; PASSOS, R.; FARIA, A.; ROLIM NETO, P. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicada*, v. 30, n. 2, p. 129-135, 2009.

SIMIELE, M.; PENSA, D.; PASEROB, D.; IVALDIB, F.; RINALDIB, M.; DI PERRIA, G.; RANIERIB, V. M.; D'AVOLIO, A. Development and validation of an ultra performance liquid chromatography tandem mass method for sildenafil and N-demethyl sildenafil plasma determination and quantification. *Journal of Chromatography B*, v. 1001, p. 35-40, 2015.

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

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. *Practical HPLC method development*. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 1997.

SOUZA, S. V. C. *Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análise de alimentos*. 2007. 297f. Tese de doutorado (Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG, 2007.

SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Analytica Chimica Acta*, v. 552, p. 25-35, 2005.

STOKVIS, E.; ROSING, H. BEIJNEN, J. H. Stable isotopically labeled internal standards in quantitative bioanalysis using liquid chromatography/ mass spectrometry: necessity or not? *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 19, p. 401-407, 2005.

STORPIRTIS, S.; de OLIVEIRA, P. G.; RODRIGUES, D.; MARANHO, D. Considerações biofarmacotécnicas relevantes na fabricação de medicamentos genéricos: fatores que afetam a dissolução e a absorção de fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 35, n. 1, p. 1-16, 1999.

TAMBE, V. S.; DEODHAR, M. N.; PRAKYA, V. Stability-indicating UPLC-MS/UV method for simultaneous determination of sildenafil citrate and dapoxetine hydrochloride from bulk and formulation. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 78, n. 5, p. 663-672, 2016.

TANG, M.; WANG, Q.; JIANG, M.; XU, L.; SHI, Z.; ZHANG, T.; LIU, Y. Magnetic solid-phase extraction based on methylcellulose coated-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub>-phenyl for HPLC-DAD analysis of sildenafil and its metabolite in biological samples. *Talanta*, v. 130, p. 427-432, 2014.

TANG, Y. Q.; WENG, N. Salting-out assisted liquid-liquid extraction for bioanalysis. *Bioanalysis*, v. 5, n. 12, p. 1583–1598, 2013.

TAYLOR, P. J. Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry*, v. 38, p. 328-334, 2005.

THE EUROPEAN Pharmacopoeia. 9 ed. Strasbourg: Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe (EDQM), 2017.

THENAPPAN T.; SHAH S.J.; RICH S.; GOMBERG-MAITLAND M. A USA-based registry for pulmonary arterial hypertension: 1982-2006. *European Respiratory Journal*, v. 30, n. 6, p. 1103-1110, 2007.

THE UNITED States Pharmacopeia. USP 42. 42 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2019.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure and Applied Chemistry*. v. 74, n. 5, p. 835–855, 2002.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). *Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods*. Rockville: FDA, 33 p. 1994.

VEJI, M.; DENECKERE, A.; VANDENABEELE, P.; KASTE, D.; MOENS, L. Detection of counterfeit Viagra® with Raman spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 46, n. 2, p. 303-309, 2008.

VENHUIS, B. J.; ZOMER, G.; VREDENBREGT, M. J.; KASTE, D. The identification of (-)-trans-tadalafil, tadalafil, and sildenafil in counterfeit Cialis® and the optical purity of tadalafil stereoisomers. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 51, p. 723-727, 2010.

WANG, Y.; CHOW, M. S. S.; ZUO, Z. Mechanistic analysis of pH-dependent solubility and trans-membrane permeability of amphoteric compounds: Application to sildenafil. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 352, p. 217-224, 2008.

WHO. Department of Essential Drugs and Other Medicines. *Counterfeit Drugs: Guidelines for the Development of Measures to Combat Counterfeit Drugs*. World Health Organization: Geneva, 1999.

WHO. *Global Surveillance and Monitoring System for substandard and falsified medical products*. World Health Organization: Geneva, 2017.

WILKINS, M. R.; WHARTON, J.; GRIMMINGER, F.; GHOFrani, H. A. Phosphodiesterase inhibitors for the treatment of pulmonary hypertension. *The European Respiratory Journal*, Copenhagen, v. 32, p. 198-209, 2008.

WILLE, S.; LAMBERT W. Recent developments in extraction procedures relevant to analytical toxicology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 388, n. 7, p. 1381-1391, 2007.

WREN, S. A. C.; TCHELITCHEFF, P. Use of ultra-performance liquid chromatography in pharmaceutical development. *Journal of Chromatography A*, v. 1119, p. 140-146, 2006.

XIAO, C.; TANG, M.; LI, J.; YIN, C.; XIANG, G.; XU, L. Determination of sildenafil, vardenafil and aildenafil in human plasma by dispersive liquid-liquid microextraction-

back extraction based on ionic liquid and high performance liquid chromatography-ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B*, v. 931, p. 111-116, 2013.

YANG, Y. J.; SONG, D. M.; JIANG, W. M.; XIANG, B. R. Rapid resolution RP-HPLC-DAD method for simultaneous determination of sildenafil, vardenafil, and tadalafil in pharmaceutical preparations and counterfeit drugs. *Analytical Letters*, v. 43, p. 373-380, 2010.

YAROSHENKO, D. V.; GRIGORIEV, A. V.; SIDOROVA, A. A.; KARTSOVA, L. A. Chromatographic determination of sildenafil in blood plasma using spectrophotometric and mass spectrometric detection. *Journal of Analytical Chemistry*, v. 68, n. 9, p. 801-808, 2013.

YOKOYAMA, Y.; TOMATSURI, M.; HAYASHI, H.; HIRAI, K.; ONO, Y.; YAMADA, Y.; TODOROKI, K.; TOYO'OKA, T.; YAMADA, H.; ITOH, K. Simultaneous microdetermination of bosentan, ambrisentan, sildenafil, and tadalafil in plasma using liquid chromatography/tandem mass spectrometry for pediatric patients with pulmonary arterial hypertension. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 89 p. 227-232, 2014.

YOU DEN, W. J.; STEINER, E. H. *Statistical Manual of the Association of Official Analytical Chemists*. 48. ed. Arlington: AOAC, 1975.

ZANG X.; WU Q.; ZHANG M.; XI G.; WANG Z. Developments of Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Technique. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, v. 37, n. 2, p. 161-8, 2009.

APÊNDICE A – Artigo publicado no *Journal of Chromatographic Science* -  
<https://doi.org/10.1093/chromsci/bmaa073>.



*Journal of Chromatographic Science*, 2021, Vol. 59, No. 1, 30–39

doi: 10.1093/chromsci/bmaa073

Advance Access Publication Date: 27 October 2020

Article

OXFORD  
UNIVERSITY PRESS

Article

## UHPLC for Quality Evaluation of Genuine and Illegal Medicines Containing Sildenafil Citrate and Tadalafil

Naialy Fernandes Araújo Reis<sup>1</sup>, Luiz Felipe Gomes da Silva<sup>1</sup>,  
 Mateus Araújo Castro e Souza<sup>1</sup>, Silvia Ligório Fialho<sup>2</sup>,  
 Carolina Paula de Souza Moreira<sup>2</sup>, Marcus Vinicius de Oliveira Andrade<sup>3</sup>,  
 Washington Xavier de Paula<sup>4</sup>, Maria Beatriz Abreu Gloria<sup>1</sup>,  
 Gerson Antônio Pianetti<sup>1</sup>, and Christian Fernandes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos, Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil, <sup>2</sup>Serviço de Desenvolvimento Tecnológico Farmacêutico, Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento, Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, MG, Brazil, <sup>3</sup>Setor Técnico Científico, Superintendência de Polícia Federal, Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil, and <sup>4</sup>Instituto de Criminalística, Polícia Civil, Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

\*Author to whom correspondence should be addressed. Email: cfernandes@farmacia.ufmg.br

Received 23 March 2020; Editorial Decision 6 September 2020

### Abstract

One of the highest incidences of illegal drug products is related to phosphodiesterase-5 inhibitors, used in treatment of erectile dysfunction, including those containing sildenafil citrate and tadalafil. In this context, comprehensive evaluation of the quality of genuine and illegal medicines was performed. A simple and rapid ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC-UV) method to quantify sildenafil and tadalafil in the presence of six degradation products was developed and validated. Sildenafil and tadalafil were submitted to forced degradation. The separation was carried out on a Kinetex C<sub>18</sub> (50 × 2.1 mm; 1.7 μm) column with mobile phase composed of acetonitrile and aqueous triethylamine solution. The calibration curves were linear in the range of 14–126 μg mL<sup>-1</sup> for sildenafil citrate and 4–36 μg mL<sup>-1</sup> for tadalafil and the method proved to be selective, precise, accurate and robust. Sildenafil degraded in oxidative media, whereas tadalafil degraded in acidic, alkaline and oxidative environment. The chemical structures and the mechanisms for the formation of the main degradation products were proposed by UHPLC coupled to tandem mass spectrometry. The UHPLC-UV method was applied in the pharmaceutical analysis of genuine and seized medicines. Some of them did not meet quality standards, mainly due to contents below specifications and the large variation on contents between units within a batch.

APÊNDICE B – Artigo publicado na revista Química Nova -  
<https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170565> (trabalho em colaboração).

Quim. Nova, Vol. XY, No. 00, 1-15, 200\_

<http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170565>

EVOLUÇÃO DA LEGISLAÇÃO E DAS TÉCNICAS ANALÍTICAS APLICADAS A ESTUDOS DE ESTABILIDADE DE INSUMOS E PRODUTOS FARMACÊUTICOS

Julia Facc<sup>a</sup>, Luan F. Diniz<sup>a</sup>, Naialy F. A. Reis<sup>a</sup> e Christian Fernandes<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte – MG, Brasil

Recebido em 12/02/2020; aceito em 22/04/2020; publicado na web em 10/06/2020

Revisão

EVOLUTION OF LEGISLATION AND ANALYTICAL TECHNIQUES APPLIED TO STABILITY STUDIES FOR ACTIVE INGREDIENTS AND PHARMACEUTICAL PRODUCTS. Stability is an important parameter to evaluate the quality, safety and efficacy of drug substances and pharmaceutical products. The stability studies aim to determine the ability of a formulation to maintain its specifications, in order to establish shelf life and recommended storage conditions. Despite the extensive relevance, until the 1980's the stability assessment methods complied with technical and scientific principles without the intervention of regulatory acts by health authorities. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) establishment in the 1990's boosted the regulation on this issue, not only in the attended countries, but worldwide. In the Brazilian context, the first regulatory norm for stability studies was published in 2002 and it implied the requirement of the submission of a stability report for the sanitary registration of medicines. The development of the Brazilian legislation resulted, among other factors, from the progress of the analytical methods that have become increasingly efficient, sensitive and selective, which allows the achievements of results with greater accuracy and speed; and the use of modern techniques of solid form characterization, which provide important information about the stability of active ingredients and pharmaceutical products.

Keywords: legislation; drug stability; analytical methods; pharmaceutical products; stability studies.

INTRODUÇÃO

A Farmacopeia Brasileira 6ª edição<sup>1</sup> define medicamento como “produto farmacêutico, tecnicamente obtido ou elaborado, que contém um ou mais fármacos e outras substâncias, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico”. Já a estabilidade de produtos farmacêuticos é definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como a capacidade destes manterem as suas características químicas, físicas, microbiológicas e biofarmacêuticas especificadas durante todo o prazo de validade.<sup>2</sup> Portanto, a avaliação da estabilidade constitui um importante parâmetro para assegurar a qualidade e, conseqüentemente, a segurança e eficácia dos insumos farmacêuticos ativos (IFAs) e dos produtos farmacêuticos. Neste sentido, os estudos de estabilidade consistem em um conjunto de testes sistematizados que visam não apenas determinar a capacidade de uma formulação manter as suas características, mas também estabelecer o prazo de validade, as condições adequadas de armazenamento e transporte do medicamento e prever a data de reteste dos IFAs.<sup>2,3</sup> A data de reteste é uma data estabelecida pelo fabricante do IFA com base nos estudos de estabilidade e que, ao ser atingida, deve ser realizada a retestagem do IFA para assegurar que o mesmo se mantém adequado para utilização.<sup>3</sup>

Diversos fatores estão relacionados à estabilidade dos medicamentos, como aqueles relativos à formulação, os fatores intrínsecos e extrínsecos, o processo de fabricação, bem como o material de embalagem e o transporte. Os fatores intrínsecos consistem em interações entre fármacos, interação entre fármaco e excipientes ou solventes, tamanho das partículas, pH do meio, qualidade da embalagem e condições nas quais o fármaco pode sofrer oxidação, hidrólise ou fotólise.<sup>4</sup> Por outro lado, os extrínsecos abrangem as condições de estocagem e transporte, nas quais o fármaco pode sofrer alterações devido à temperatura, luz, ar e umidade.<sup>4</sup>

Ainda que os excipientes sejam caracterizados como substâncias inertes, eles são capazes de interagir com outras substâncias, tanto no estado sólido como em solução.<sup>3</sup> Além disto, a degradação em produtos farmacêuticos frequentemente ocorre em decorrência da reação dos princípios ativos com os excipientes utilizados na formulação.<sup>3,6</sup> Assim, muitas das reações de incompatibilidade reportadas envolvem hidrólise, oxidação ou interação específica dos princípios ativos com impurezas reativas presentes nos excipientes.<sup>3,6</sup> Portanto, a presença de traços de impurezas nos excipientes pode afetar a qualidade, segurança e eficácia dos medicamentos, devido à formação de produtos de degradação ativos ou tóxicos, ou à redução da potência do insumo ativo.<sup>6</sup> Por conseguinte, os estudos de estabilidade são fundamentais para a garantia da saúde dos pacientes, uma vez que a perda de estabilidade dos medicamentos relaciona-se à perda do efeito terapêutico ou à formação de produtos de degradação tóxicos.<sup>7</sup>

A despeito de tamanha relevância, até a década de 1980 os métodos de avaliação da estabilidade seguiam princípios científicos e técnicos sem interferência de atos regulatórios de autoridades sanitárias. Diante disto, tornou-se evidente a necessidade da regulamentação dos parâmetros e métodos para a avaliação da estabilidade. Com a criação, na década de 1990, do comitê denominado *The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH), por meio da reunião das agências regulatórias do Japão, Estados Unidos e União Europeia, buscou-se regulamentar e harmonizar os atos normativos relacionados à produção e controle de qualidade de medicamentos, incluindo os estudos de estabilidade.<sup>8</sup>

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os estudos de estabilidade são classificados em acelerado, longa duração, acompanhamento, degradação forçada e, mais recentemente, estabilidade pós-reconstituição ou diluição e estabilidade em uso.<sup>9</sup> O estudo acelerado requer a utilização de condições forçadas de armazenamento, de modo a acelerar a degradação do produto farmacêutico para avaliar o impacto de exposições rápidas a condições fora do estabelecido, o que pode acontecer durante o transporte, por

\*e-mail: cfernandes@farmacia.ufmg.br

APÊNDICE C – Artigo publicado no *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* - <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113403> (trabalho em colaboração).

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 188 (2020) 113403



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jpba](http://www.elsevier.com/locate/jpba)



Short communication

## A simple and sensitive HPLC-FL method for simultaneous determination of angiotensin II receptor antagonists in human plasma



Mateus Araújo Castro e Souza, Naialy Fernandes Araújo Reis, Isabella Marques da Silva Leite, Maria Beatriz A. Gloria, Gerson Antônio Pianetti, Maria Auxiliadora Parreiras Martins, Isabella Cristina Plácido de Oliveira Pacheco, Christian Fernandes\*

Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos 6627, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 3 February 2020

Received in revised form 22 May 2020

Accepted 23 May 2020

Available online 4 June 2020

#### Keywords:

Angiotensin receptor blockers

Liquid chromatography

Fluorescence

Protein precipitation

Microextraction by packed sorbent

Liquid-liquid extraction

### ABSTRACT

Angiotensin II receptor antagonists are one of the most widely used classes of antihypertensive drugs. In this study, an HPLC fluorescence method after protein precipitation (PPT) extraction was developed and validated for determination of olmesartan, losartan, irbesartan, and valsartan in human plasma. The separation was carried out on a Luna cyano (250 × 4.6 mm i.d.; 5 μm particle size) column and the mobile phase was composed of acetonitrile and 0.1 % phosphoric acid in gradient elution, at a flow rate of 1.2 mL min<sup>-1</sup>. A PPT method was optimized by a two-level factorial design with triplicate at the central point. The parameters that could affect the extraction (sample volume and acetonitrile/plasma volume ratio) were evaluated and the method was compared to microextraction by packed sorbent (MEPS) and liquid-liquid extraction (LLE). The developed method allowed the simultaneous quantification of the analytes employing a simple and cheap sample preparation method and a short chromatographic run (13 min). This method was fully validated showing selectivity, precision, accuracy, and linearity over the range of 25.0–1500.0 ng mL<sup>-1</sup> for olmesartan and valsartan, 25.0–2500.0 ng mL<sup>-1</sup> for irbesartan, and 35.0–2500.0 ng mL<sup>-1</sup> for losartan. Finally, the method was successfully applied in the analysis of human plasma from volunteers.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Cardiovascular diseases (CVDs) are the major causes of mortality in the world, accounting for approximately 17 million deaths each year, nearly 31 % of the total, with hypertension as one of the main risk factors for development of CVDs. Hypertension is characterized by a systolic blood pressure equal to or above 140 mmHg and/or diastolic blood pressure values equal to or above 90 mmHg [1].

Angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor antagonists (ARA-II) are the most widely used drugs for the treatment of hypertension. Several ARA-II are commercially available, including irbesartan (IRB), losartan (LOS), olmesartan (OLM), and valsartan (VAL) (Fig. 1). For OLM, a prodrug is administered, olmesartan medoxomil, which is rapidly and completely metabolized to OLM by esterases. Due to the wide range of therapeutic

doses for ARA-II (10 mg for olmesartan medoxomil up to 320 mg for VAL) commonly used in pharmacological therapy for hypertension, plasma concentrations can vary from ng mL<sup>-1</sup> (LOS and OLM) to μg mL<sup>-1</sup> (IRB and VAL) [2].

When evaluating characteristics of patients with hypertension and coronary artery disease, among patients receiving antihypertensive drugs (80 %), less than 25 % had controlled blood pressure [3]. One significant cause is non-adherence to treatment. Therefore, therapeutic drug monitoring may be important to avoid complications related to hypertension.

Analytical methods for the simultaneous determination of some ARA-II in human plasma are available in the literature employing different detection techniques, most of which used UV [4], fluorescence [5–7], and mass spectrometry [8–15]. However, to the best of our knowledge, none investigated the simultaneous quantification of OLM, IRB, LOS, and VAL in human plasma. Moreover, a comprehensive comparison of different approaches (protein precipitation, liquid-liquid extraction, and microextraction by packed sorbent) for the extraction of these drugs from human plasma has

\* Corresponding author.

E-mail address: [cfernandes@farmacia.ufmg.br](mailto:cfernandes@farmacia.ufmg.br) (C. Fernandes).



APÊNDICE D – Artigo publicado no *Current Pharmaceutical Analysis* - DOI:  
10.2174/1573412914666180730123426 (trabalho em colaboração).

Send Orders for Reprints to [reprints@benthamscience.net](mailto:reprints@benthamscience.net)

5

*Current Pharmaceutical Analysis*, 2020, 16, 5-11



RESEARCH ARTICLE

An Easy and Rapid Spectrophotometric Method for Determination of Chloroquine Diphosphate in Tablets

Mateus Araújo Castro e Souza<sup>1,\*</sup>, Naialy Fernandes Araújo Reis<sup>1</sup>, Larissa de Souza Batista<sup>1</sup>, Isabela da Costa César<sup>1</sup>, Christian Fernandes<sup>1</sup> and Gerson Antônio Pianetti<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Quality Control Laboratory for Medicines and Cosmetics, Department of Pharmaceutical Products, Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

**Abstract:** *Introduction:* Malaria, an infectious disease caused by protozoa of the genus *Plasmodium*, is highly prevalent in the Brazilian Amazon. Chloroquine is the first-choice drug for the treatment of malaria caused by *P. vivax* and *P. malariae*. The humid and hot climate characteristic of the Brazilian endemic region favors drug degradation and modification of its biopharmaceutical properties, which may result in subtherapeutic dosage, formation of degradation products that can be toxic to humans and appearance of parasitic resistance. Thus, it is necessary to monitor the quality of chloroquine tablets.

*Materials and Methods:* An analytical method was developed and validated to determine chloroquine content in tablets by ultraviolet spectrophotometry. The diluent consisted of 0.06 M monosodium phosphate buffer pH 6.8 and detection was performed at 343 nm.

*Results and Conclusion:* The method proved to be linear in the range of 7.2 to 19.2 µg mL<sup>-1</sup>, precise, accurate, selective, robust, and statistically equivalent to a liquid chromatographic method by the United States Pharmacopeia. The developed method was applied to determine chloroquine content in six batches of the drug. The evaluated batches were considered adequate for identification, assay, dissolution, disintegration and uniformity of dosage units, and were found to be inadequate in terms of friability.

ARTICLE HISTORY

Received: January 30, 2018  
Revised: July 05, 2018  
Accepted: July 23, 2018

DOI:  
10.2174/1573412914666180730123426



CrossMark

**Keywords:** Malaria, chloroquine diphosphate, tablets, ultraviolet spectrophotometry, analytical method development, quality control.

1. INTRODUCTION

Malaria is the most common and important infectious disease in humans. It is estimated that around 3 billion people worldwide are at risk of contracting malaria, mainly in Asia, Africa and Central and South America. In Brazil, up to 20% of the population is at risk of infection [1].

The National Program for Malaria Control (PNCM), established by Brazilian government, aims to reduce fatality, severity and disease incidence, eliminate transmission in urban areas and maintain absence of disease in the regions where the transmission has already been interrupted. Through the PNCM, the Ministry of Health distributes drugs to control malaria in the Unified Health System, and chloroquine is the drug of first choice for the treatment of uncomplicated malaria [2].

Chloroquine diphosphate, chemically known as N4-(7-chloro-4-quinolinyl)-N1,N1-diethyl-1,4-pentanediamine

diphosphate (Fig. 1), molecular mass of 515.86 g.mol<sup>-1</sup>, is a 4-aminoquinoline commonly prescribed for the treatment of malaria [3, 4].

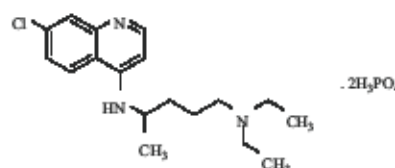
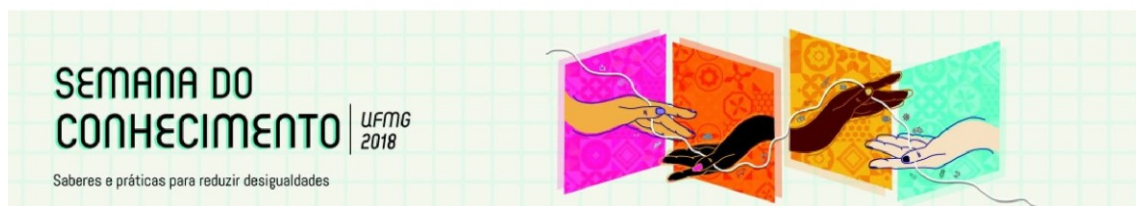


Fig. (1). Chemical structure of chloroquine diphosphate.

The high temperature (average of 28 °C) and humidity (88% in the rainy season and 77% in the dry season), characteristic of the Brazilian malaria endemic region [5], favors the degradation and alteration of the biopharmaceutical properties of the drugs. This may result in sub-therapeutic dosage and formation of degradation products toxic to humans. Thus, the parasites are more likely to develop resistance to antimalarial and, therefore, the treatment goals may not be achieved [6, 7]. To ensure the efficacy and safety of

\*Address correspondence to this author at the Quality Control Laboratory for Medicines and Cosmetics, Department of Pharmaceutical Products, Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; E-mail: [mateusaraujo@yahoo.com.br](mailto:mateusaraujo@yahoo.com.br)

**ANEXO A – Certificados de apresentação e de Relevância Acadêmica na XXVII  
Semana de Iniciação Científica / PRPQ (Semana do Conhecimento UFMG 2018).**



## CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado " DETERMINAÇÃO DE SILDENAFILA E TADALAFILA EM AMOSTRAS FALSIFICADAS E DE CONTRABANDO EMPREGANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA ", foi apresentado na XXVII SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA / PRPQ, promovida pela Pró-Reitoria de Pesquisa, no período de 15-10-2018 a 19-10-2018.

Autor(a): LUIZ FELIPE GOMES DA SILVA

Orientador(a): CHRISTIAN FERNANDES do(a) FACULDADE DE FARMÁCIA.

Co-Autores: SILVA, LFG, REIS, NFA, FERNANDES, C

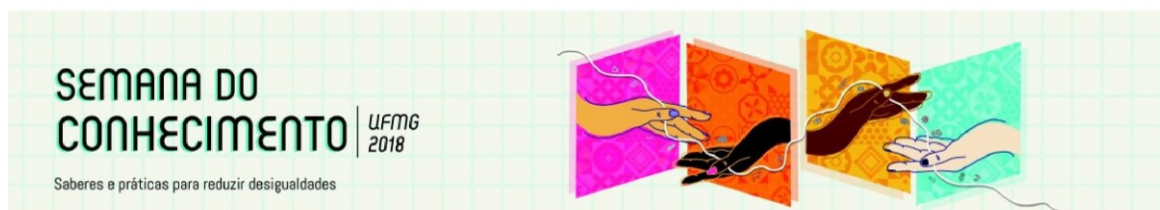
Prof. Mario Montenegro Campos  
Pró-Reitor de Pesquisa

Profª. Andréa Máris Campos Guerra  
Diretora de Fomento à Pesquisa

SEMANA  
NACIONAL DE  
CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA 2018

Realização:

UFMG



## CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado " DETERMINAÇÃO DE SILDENAFILA E TADALAFILA EM AMOSTRAS FALSIFICADAS E DE CONTRABANDO EMPREGANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA ", foi apresentado na XXVII SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA / PRPQ, promovida pela Pró-Reitoria de Pesquisa, no período de 15-10-2018 a 19-10-2018, tendo sido selecionado como Relevância Acadêmica

Autor(a): LUIZ FELIPE GOMES DA SILVA

Orientador(a): CHRISTIAN FERNANDES do(a) FACULDADE DE FARMÁCIA.

Co-Autores: SILVA, LFG, REIS, NFA, FERNANDES, C

Prof. Mario Montenegro Campos  
Pró-Reitor de Pesquisa

Profª. Andréa Máris Campos Guerra  
Diretora de Fomento à Pesquisa

SEMANA  
NACIONAL DE  
CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA 2018

Realização:

UFMG

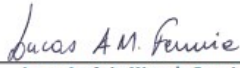
**ANEXO B – Certificado 1 de apresentação na sessão de pôsteres do III  
Simpósio Nacional em Ciências Farmacêuticas (SINCIFAR – 2018).**



## Certificado

Certificamos que **Luiz Felipe Gomes da Silva** apresentou o trabalho intitulado **ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA E CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO PARA SILDENAFILA E TADALAFILA** do(s) autor(es) **SILVA, L. F. G.1; REIS, N. F. A.1; GLÓRIA, M. B. A.2; PIANETTI, G. A.1; FERNANDES, C.1** na modalidade de **pôster** durante o **III Simpósio em Ciências Farmacêuticas – SINCIFAR**.

Belo Horizonte, 09 de novembro de 2018.

  
 Lucas Antônio Miranda Ferreira  
 Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
 Faculdade de Farmácia – UFMG

  
 Saulo Fehelberg Pinto Braga  
 Membro da Comissão Organizadora  
 III SINCIFAR

UFMG



**ANEXO C – Certificado 2 de apresentação na sessão de pôsteres do III  
Simpósio Nacional em Ciências Farmacêuticas (SINCIFAR – 2018).**



## Certificado

Certificamos que **Naialy Fernandes Araújo Reis** apresentou o trabalho intitulado **AValiação DA QUALIDADE DE MEDICAMENTOS ORIGINAIS E APREENDIDOS CONTENDO CITRATO DE SILDENAFILA E TADALAFILA UTILIZANDO UHPLC-UV** do(s) autor(es) **REIS, N. F. A.; SILVA, L. F. G.; GLÓRIA, M. B. A.; FERNANDES, C.; PIANETTI, G. A.** na modalidade de **pôster** durante o **III Simpósio em Ciências Farmacêuticas – SINCIFAR**.

Belo Horizonte, 09 de novembro de 2018.

  
 Lucas Antônio Miranda Ferreira  
 Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
 Faculdade de Farmácia – UFMG

  
 Saulo Fehelberg Pinto Braga  
 Membro da Comissão Organizadora  
 III SINCIFAR


UFMG



**ANEXO D – Certificado de apresentação na sessão de pôsteres do IV Congresso of the Brazilian Association of Pharmaceutical Sciences (ABCF Congress - 2018).**

## CERTIFICATE

We certify that the work DEVELOPMENT OF UHPLC METHOD USING FUSED CORE COLUMN FOR QUALITY CONTROL OF COUNTERFEIT AND GENUINE DRUGS CONTAINING SILDENAFIL CITRATE AND/OR TADALAFIL, authorship of NAIALY FERNANDES ARAÚJO REIS NAIALY REIS, LUIZ FELIPE GOMES DA SILVA LUIZ SILVA, MARIA BEATRIZ ABREU GLÓRIA MARIA GLÓRIA, GERSON ANTÔNIO PIANETTI GERSON PIANETTI, CHRISTIAN FERNANDES CHRISTIAN FERNANDES, was presented as POSTER PRESENTATION at the IV Congress of the Brazilian Association of Pharmaceutical Sciences - Biological Drugs: From Technology to Pharmaceutical Care, held in São Paulo (SP), Brazil, from September 6 to 8, 2018.

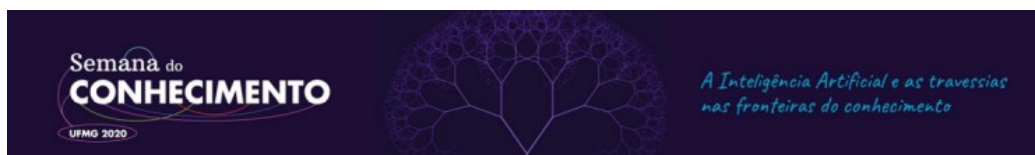
  
Maria José Soares Mendes Giannini  
President Congress

  
Teresa Dalla Costa  
President ABCF



ABCF - 2018  
BRAZILIAN ASSOCIATION OF PHARMACEUTICAL SCIENCES  
*Biological Drugs: from Technologies to Pharmaceutical Care*  
September 06 to 08, 2018  
CENTRO FECOMERCO DE EVENTOS, SÃO PAULO, SP

**ANEXO E – Certificado de apresentação na XXIX Semana de Iniciação Científica / PRPQ (Semana do Conhecimento UFMG 2020).**



## CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE FÁRMACOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DA HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR EM PLASMA HUMANO UTILIZANDO CLAE-EM/EM, foi apresentado na XXIX Semana de Iniciação Científica, promovida pela Pró-Reitoria de Pesquisa, no período de 10/08/2020 a 23/10/2020.

De autoria de: ISABELA RIZZARDI DOS SANTOS, NAIALY FERNANDES ARAUJO REIS

Orientador(a): CHRISTIAN FERNANDES

Ana Maria Hermeto  
Diretora de Fomento à Pesquisa

Mario Fernando Montenegro Campos  
Pró-Reitor de Pesquisa



Código de autenticação: b395e787493784f0296c434196f064b198835544e080539deb3af03536aacc338234  
Este documento dispensa carimbo e assinatura. Verifique sua autenticidade com o QRCode.

SEMANA NACIONAL DE  
CIÊNCIA E TECNOLOGIA 2020

Realização UFMG