

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA  
CAMPUS URUGUAIANA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**WILLIAN RICARDO DA ROSA DE ALMEIDA**

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR UFLC, ESTUDOS DE  
ESTABILIDADE E AVALIAÇÃO TECNOLÓGICA DE COMPRIMIDOS DE  
SILDENAFILA.**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Uruguaiana, RS, Brasil.**

**2016**

**WILLIAN RICARDO DA ROSA DE ALMEIDA**

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR UFLC, ESTUDOS DE ESTABILIDADE E AVALIAÇÃO TECNOLÓGICA DE COMPRIMIDOS DE SILDENAFILA.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Ernestina Barcellos da Silva.

**Uruguaiana, RS, Brasil.**

**2016**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).

A732d Almeida, Willian Ricardo da Rosa de  
Desenvolvimento de metodologia analítica por UFLC,  
estudos de estabilidade e avaliação tecnológica de  
comprimidos de Sildenafil. / Willian Ricardo da Rosa de  
Almeida.  
113 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Pampa, MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, 2016.

"Orientação: Fabiana Ernestina Barcellos da Silva".

1. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos.  
2. Estudos de estabilidade. 3. Segurança biológica. 4.  
Medicamentos suspeitos de falsificação. 5. Análise  
multivariada. I. Título.

**WILLIAN RICARDO DA ROSA DE ALMEIDA**

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR UFLC, ESTUDOS DE ESTABILIDADE E AVALIAÇÃO TECNOLÓGICA DE COMPRIMIDOS DE SILDENAFILA.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Ernestina Barcellos da Silva.

Dissertação defendida e aprovada em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Banca examinadora:

---

Profa. Dra. Fabiana Ernestina Barcellos da Silva  
(Orientadora)

---

Prof. Dr. Marco Flores Ferrão  
(UFRGS)

---

Profa. Dra. Lisiani Barjeski  
(UNIPAMPA)

**Uruguaiana, RS, Brasil.**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, minha família. Meus pais, Galdino e Dinora, meus irmãos Andrea, Allan e Giovanni, e meus sobrinhos, Antônio e Júlia, que sempre apoiaram minhas decisões e deram todo o incentivo para eu realizar este sonho. Amo muito vocês.

A minha querida chefinha, a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabiana E. Barcellos da Silva, que desde a graduação me aguenta. Sou muito grato pela sua orientação, pela paciência, pelos ensinamentos, pela amizade, pelos puxões de orelha. Enfim, obrigado por tudo.

A banca examinadora, composta pela Profa. Dra. Lisiani Barjeski e pelo Prof. Dr. Marco F. Ferrão, por terem se disponibilizado a participar da avaliação do meu trabalho. Queria agradecer desde já pelas suas futuras contribuições e sugestões. Obrigado!

Aos professores do LDCQ, Prof. Dr. Clésio S. Paim, Prof. Dr. Fávero R. Paula e Prof. Dr. Marcelo D. Malesuik, pelos conselhos neste trabalho, pela amizade, convívio, conversas e risadas.

Ao Farmacêutico Dr. Rafael S. Ortiz da Superintendência Regional da Polícia Federal do Rio Grande do Sul, ao Prof. Dr. Michel M. Machado e o Prof. Dr. Elton L. G. Denardin pela parceria neste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, por todo o conhecimento compartilhado, pelos conselhos e pela amizade construída.

As minhas queridas alunas de iniciação científica, a Karine Nicorena que praticamente me ajudou em todo o trabalho. Obrigado pela ajuda, pela amizade e pela parceria.

Aos colegas de LDCQ, pela amizade, pelas risadas, pelo café e pelos bolos. Foi muito bom ter convivido com vocês.

Aos illuminatis do LDCQ, André Bairros e Hemerson Rosa. Lhes deixo um abraço. Camigoal!

Ao doutorando do Instituto de Química da UFRGS, Marcelo C. A. Marcelo, pela parceria, pela amizade que construímos e por me dar uma ajudinha na quimiometria sempre quando precisei. Hahaha, abração!

Ao colegas de pós-graduação, Luana Michels, Maria Fernanda Leão, Jéssica Brandão, Maicon Brustolin, Gaya Freitas e Carmem Lúcia Machado, pelo convívio, pela amizade, pela ajuda e por me escutarem sempre quando necessário. Obrigado!

Aos amigos que a Farmácia me deu e que vou levar pra sempre. Ana Helena Dal Forno, Bill Bairros, Cassiano Fiad, Danillo Batista, Deividi Soares, Gabi Foresti, Gustavo Santi, José Pedro Cassol, Karol Torres e Luiz Portela, pela amizade, pelo convívio, conversas e risadas.

Aos que eu considero como irmãos, o Felipinho Machado, Fábio Barbosa e Renatinha Giacomeli. Obrigado por sempre estarem comigo, pelos conselhos, pelo carinho e pela amizade.

Aos amigos que a vida me deu. Muito obrigado por conviverem comigo, pelas conversas, futebol, festas, bebedeiras, risadas e conselhos.

Enfim, para todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram neste trabalho, direta ou indiretamente, queria agradecer do fundo do coração. Muito Obrigado!

## RESUMO

A sildenafil é um fármaco utilizado como tratamento de primeira escolha para a disfunção erétil, sendo disponível comercialmente na forma farmacêutica de comprimidos. Atualmente, a sildenafil está entre os medicamentos mais vendidos no mercado mundial. Por esta razão, também está entre os medicamentos que mais são contrabandeados e/ou falsificados. O desenvolvimento de métodos analíticos para avaliar a qualidade de produtos farmacêuticos bem como aqueles voltados para análise de amostras forenses são de extrema importância e constituem-se como ferramentas para a disponibilização de medicamentos com qualidade garantida. Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo desenvolver e validar um método analítico indicativo de estabilidade por UFLC para a quantificação de sildenafil em comprimidos, bem como avaliar a cinética de degradação fotolítica e a segurança biológica dos fotoprodutos de degradação obtidos. Ainda, amostras suspeitas de falsificação de comprimidos de sildenafil (cedidas pela Superintendência Regional da Polícia Federal do Rio Grande do Sul) foram avaliadas em relação aos critérios de qualidade estabelecidos em compêndios internacionais através dos testes de: (a) resistência mecânica, (b) desintegração, (c) dissolução, (d) teor, (e) perfil químico por espectrometria no infravermelho médio e (f) perfil físico (diâmetro, peso e altura). Os resultados foram avaliados utilizando ferramentas de controle estatístico de processo e análise multivariada. No desenvolvimento do método por UFLC, as seguintes condições foram estabelecidas: fase móvel acetonitrila:triethylamina pH 4,0 (60:40, v:v), fluxo 0,7 ml min<sup>-1</sup>, coluna C18 (100mm x 4,6mm x 5µm), temperatura 50°C e detecção em 290 nm. O método foi validado segundo a normativa do ICH e mostrou-se específico, linear, preciso, exato e robusto. A segurança biológica foi determinada pelos ensaios de: (a) de Azul de Tripán, (b) Teste de Micronúcleos e (c) Ensaio Cometa. O fármaco e seus produtos de fotodegradação apresentaram citotoxicidade, no entanto não foram observados mutagenicidade e genotoxicidade. Na avaliação dos comprimidos suspeitos de falsificação não foram encontrados desvios de qualidade e a análise multivariada (por Análise Hierárquica de Agrupamentos) se mostrou adequada para classificação das amostras quanto ao perfil físico.

**Palavras-chave:** Sildenafil, Cromatografia, Degradação, Toxicidade, Falsificação.

## ABSTRACT

Sildenafil is the first choice pharmaceutical product for erectile dysfunction treatment and commercially available in tablets dosage form. Nowadays, Sildenafil is among the largest selling pharmaceutical products in the worldwide marketing. For this reason, is also among the most falsified and/or smuggled in the world. The development of analytical techniques that aim to evaluate pharmaceutical products' quality, as well as those that aim forensic samples, are extremely valuable, once they are resources for quality guaranteed pharmaceutical products availability. Thus, our present study aimed to develop and validate a stability-indicative analytical method by UFLC, in order to quantify Sildenafil in tablets. Photolytic degradation's kinetics and biological safety of Sildenafil's photoproducts were evaluated. Additionally, Sildenafil tablets that were suspect of falsification (conceded by Regional Superintendence of Federal Police), were evaluated according to quality criteria previously established by international compendiums, being them: (a) mechanical resistance, (b) disintegration, (c) dissolution, (d) assay, (e) chemical profile by infrared spectroscopy, and (f) physical profile. The results were evaluated by control-process statistical and multivariate analysis. The following conditions were established for UFLC method: acetonitrile:triethylamine (60:40, v:v) as mobile phase, flux at  $0.7\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , C18 column (100mm x 4,6mm x  $5\mu\text{m}$ ),  $50^{\circ}\text{C}$ , pH 4.0 and 290 nm. Proposed method was validated following ICH's guidance, and showed specificity, linearity, precision, accuracy, and robustness. Biological safety was determined by the following assays: (a) Trypan Blue, (b) Micronucleus, and (c) Comet assay. The intact molecule, as well as its photoproducts showed cytotoxicity even no mutagenicity or genotoxicity was detected. Finally, tablets (suspected of falsification) had no quality deviation and multivariate analysis (Hierarchical Component Analysis) applied in physical profile showed adequate for sample's classification.

**Keywords:** Sildenafil, Chromatography, Degradation, Toxicity, Falsification

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da Sildenafil.....	22
Figura 2: Interpretação do teste de viabilidade celular (400X).....	54
Figura 3: Interpretação do teste de micronúcleos (400X). Em “A” uma célula binucleada com um micronúcleo, e em “B” outra célula binucleada com três micronúcleos. ....	55
Figura 4: Interpretação do teste cometa (400X). Observamos, da esquerda para a direita, danos progressivos de zero até três.....	56
Figura 5. Amostra apreendida de Pramil® 50 mg. ....	57
Figura 6. Curva obtida através da análise por calorimetria exploratoria de varredura. ....	64
Figura 7. Espectro de absorção na região do UV da SQR de SLD. ....	65
Figura 8. Espectro obtido na região do IV médio da SQR de SLD. ....	66
Figura 9. Cromatograma da SLD SQR na condição estabelecida: ACN:TEA 0,3% pH 4,0 (ajustado com ácido fórmico) na proporção 40:60 (v/v).....	68
Figura 10. Cromatogramas das soluções (a) SLD SQR, (b) SLD produto farmacêutico e (c) amostra simulada de excipientes. ....	70
Figura 11. Cromatogramas da degradação forçada da SLD SQR após ser submetido à exposição de radiação UV a 254 nm; (a) Tempo zero e (b) após 2 horas de exposição utilizando água como solvente.....	72
Figura 12. Cromatogramas da degradação forçada da SLD SQR após ser submetido à exposição de radiação UV a 254 nm; (a) Tempo zero e (b) após 2 horas de exposição utilizando metanol como solvente. ....	73
Figura 13. Cromatogramas da degradação forçada da SLD SQR após ser submetido à degradação térmica por a 55°C por 72 horas (a) Tempo zero e (b) após 72 horas.....	75
Figura 14. Cromatogramas da degradação forçada da SLD SQR após ser submetido à hidrólise com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10%; (a) Tempo zero e (b) após 72 horas. ....	76
Figura 15. Cromatogramas da degradação forçada da SLD SQR após ser submetido à hidrólise ácida em HCl 1 mol L <sup>-1</sup> em refluxo a 80°C; (a) Tempo zero e (b) após 6 horas.....	77
Figura 16. Cromatogramas da degradação forçada da SLD SQR após ser submetido à hidrólise básica em NaOH 1 mol L <sup>-1</sup> em refluxo a 80°C; (a) Tempo zero e (b) após 6 horas. ....	78
Figura 17. Curva de calibração média de SLD.....	79
Figura 18. Avaliação da viabilidade celular de leucócitos medido pelo corante azul de Tripán .	86

Figura 19. Efeitos da Sildenafil e Sildenafil na presença de produtos de degradação na produção de micronúcleos em culturas de células.....	87
Figura 20. Ensaio Cometa: Índice de Dano ao DNA de células expostas a diferentes concentrações de Sildenafil .....	87
Figura 21. Carta controle para o teste de dissolução de comprimidos de sildenafil.....	90
Figura 22. Carta controle para a determinação do teor de comprimidos de Sildenafil. ....	91
Figura 23. Carta controle para a altura de comprimidos de Sildenafil. ....	91
Figura 24. Carta controle para o diâmetro de comprimidos de Sildenafil.....	92
Figura 25. Carta controle para a determinação de peso de comprimidos de Sildenafil. ....	93
Figura 26. Perfil químico de comprimidos de Sildenafil. ....	93
Figura 27. Análise hierárquica de agrupamentos aplicado aos dados obtidos no perfil físico....	95
Figura 28. Espectro de Infravermelho da amostra 33 e amostra 36 na região entre 1800 a 650 $\text{cm}^{-1}$ .....	96
Figura 29. Espectro de Infravermelho da amostra 9 e amostra 14 na região entre 1800 a 650 $\text{cm}^{-1}$ .....	96
Figura 30. Espectro de Infravermelho da amostra 6 e amostra 41 na região entre 1800 a 650 $\text{cm}^{-1}$ .....	97
Figura 31. Análise hierárquica de agrupamentos aplicada aos dados obtidos por espectrofotometria de infravermelho.....	98
Figura 32. Espectro de Infravermelho da amostra 11 e amostra 43 na região entre 1800 a 650 $\text{cm}^{-1}$ .....	99

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Alterações utilizadas no desenvolvimento do método. ....	43
Tabela 2. Fatores avaliados no ensaio de robustez. ....	50
Tabela 3. Desenho experimental de Plackett–Burman para o teste da robustez.....	50
Tabela 4. Critérios de aceitação para o teste de dissolução de formas farmacêuticas de liberação imediata (USP, 2014 - adaptado). ....	59
Tabela 5. Critérios de avaliação da determinação de peso para formas farmacêuticas sólidas em dose unitária (BRASIL, 2010).....	61
Tabela 6. Parâmetros de adequabilidade do sistema para as condições testadas para no desenvolvimento do método. ....	67
Tabela 7. Percentual degradação nas diferentes condições de degradação.....	71
Tabela 8. Análise de Variância para a avaliação da linearidade do método proposto. ....	80
Tabela 9. Valores de repetibilidade e precisão intermediária. ....	81
Tabela 10. Resultados da porcentagem de recuperação para a determinação da exatidão. ....	82
Tabela 11. Resultados dos efeitos e valores de $t$ calculado para cada fator analisado no teste de robustez.....	83
Tabela 12. Teores obtidos no ensaio de robustez através do desenho experimental de Plackett–Burman para a Sildenafil.....	83
Tabela 13. Coeficientes de correlação ( $r$ ) obtidos na determinação da ordem de reação. ....	84
Tabela 14. Parâmetros cinéticos para degradação da Sildenafil em diferentes solventes.....	85

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACN – Acetonitrila

ANOVA – Análise de variância

ATR – reflexão total atenuada (do inglês, *Attenuated total reflectance*).

CART – do inglês, *Classification and Regression Trees*

CEP – Controle estatístico de processo

CLAE – Cromatografia à líquido de alta eficiência

DAD – Arranjo de diodos

DPR – Desvio padrão relativo

DSC – Calorimetria exploratória de varredura (do inglês, *Differential scanning calorimetry*).

FDA – Food and Drug Administration

GMPc – Monofosfato de guanosina cíclico

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogênio

HAP – Hipertensão arterial pulmonar

HCA – Análise Hierárquica de Agrupamentos (do inglês, *hierarchical component analysis*).

SQR – Substância química de referência.

HCl – Ácido clorídrico

ICH – International Conference on harmonisation

IV – Infravermelho

k – Constante de velocidade de reação

K – Fator capacidade

LD – Limite de detecção

LIC – Limite inferior de controle

LM – Limite médio

LQ – Limite de quantificação

LSC – Limite superior de controle

N – Número de pratos teóricos

NaOH – Hidróxido de Sódio

PBS – Solução Tampão fosfato pH 7,2

PCA – Análise de componentes principais (do inglês, *principal component analysis*).

PDE5 – Fosfodiesterase Tipo V

r – Coeficiente de correlação

RDC – Resolução da diretoria colegiada

SLD – Sildenafil

SLD-PD – Solução de Sildenafil na presença de produtos de degradação

T - Fator de cauda

$t_{50\%}$  – Tempo necessário para que o fármaco atinja 50% de seu teor declarado

$t_{90\%}$  – Tempo necessário para que o fármaco atinja 90% de seu teor declarado

TEA - Trietilamina

TR – Tempo de retenção

UFLC – cromatografia à líquido ultra rápida (do inglês *Ultra Fast Liquid Chromatography*)

UV – Ultravioleta

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 Disfunção erétil.....	20
2.2 Sildenafil.....	20
2.2.1 Propriedades físico-químicas da Sildenafil.....	22
2.2.2 Farmacodinâmica .....	22
2.2.3 Farmacocinética.....	23
2.3 Controle de qualidade de comprimidos de Sildenafil .....	24
2.3.1 Propriedades tecnológicas em comprimidos .....	25
2.3.1.1 Determinação de peso .....	25
2.3.1.2 Determinação de resistência mecânica .....	25
2.3.1.3 Teste de desintegração .....	26
2.3.1.4 Teste de dissolução.....	26
2.3.1.5 Perfil físico de comprimidos.....	27
2.3.2 Métodos físico-químicos .....	29
2.3.2.1 Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho .....	29
2.3.2.2 Cromatografia.....	30
2.3.3 Desenvolvimento de métodos analíticos indicativos de estabilidade .....	31
2.3.4 Estudos de estabilidade de medicamentos .....	32
2.3.5 Avaliação da segurança biológica.....	33
2.3.6 Aplicação de análise multivariada na avaliação de medicamentos .....	34
3 OBJETIVOS.....	37
3.1 Objetivo geral .....	37
3.2 Objetivos específicos.....	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	38
4.1 Substância química de referência e produto farmacêutico .....	38
4.2 Equipamentos e acessórios.....	38

4.3 Reagentes.....	39
4.4 Caracterização da Substância Química de Referência.....	40
4.4.1 Análise térmica por calorimetria exploratória de varredura.....	40
4.4.3 Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta.....	41
4.4.4 Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho médio.....	41
4.5 Desenvolvimento de metodologia para a quantificação de Sildenafil em comprimidos por UFLC.....	42
4.5.1 Preparo da solução contendo Substância Química de Referência de Sildenafil.....	42
4.5.2 Preparo da solução contendo comprimidos de Sildenafil.....	42
4.5.3 Condições cromatográficas testadas.....	43
4.6 Validação de metodologia para a quantificação de Sildenafil em comprimidos por UFLC.....	43
4.6.1 Especificidade.....	44
4.6.1.1 Avaliação da interferência dos excipientes da formulação.....	44
4.6.1.2 Avaliação da interferência dos produtos de degradação.....	45
4.6.1.2.2 Degradação térmica.....	45
4.6.1.2.3 Degradação oxidativa.....	46
4.6.1.2.4 Degradação ácida.....	46
4.6.1.4.5 Degradação básica.....	47
4.6.2 Linearidade.....	47
4.6.3 Limites de detecção e quantificação.....	48
4.6.4 Precisão.....	48
4.6.5 Exatidão.....	48
4.6.6 Robustez.....	49
4.7 Cinética de degradação fotolítica.....	51
4.7.1 Preparo das soluções.....	51
4.7.2 Quantificação das amostras.....	52
4.7.3 Determinação da ordem de reação e parâmetros cinéticos.....	52
4.8 Avaliação da segurança biológica.....	52

4.8.1	Preparo da amostra .....	53
4.8.2	Método do Azul de Tripán .....	54
4.8.3	Teste do micronúcleo.....	54
4.8.4	Ensaio Cometa .....	55
4.8.5	Análise estatística .....	56
4.9	Controle de qualidade de comprimidos de Sildenafil apreendidos .....	56
4.9.1	Determinação de resistência mecânica.....	57
4.9.1.1	Teste de dureza .....	57
4.9.3.1.	Teste de friabilidade .....	58
4.9.2	Teste de desintegração.....	58
4.9.3	Teste de dissolução .....	58
4.9.4	Determinação do teor.....	59
4.9.5	Avaliação do perfil físico de comprimidos.....	60
4.9.5.1	Altura e diâmetro dos comprimidos .....	60
4.9.5.2	Determinação de peso de comprimidos .....	60
4.9.6	Avaliação de comprimidos de Sildenafil através do Controle Estatístico de Processo .....	61
4.9.7	Análise multivariada aplicada ao perfil físico de comprimidos de Sildenafil .....	62
4.9.8	Análise multivariada aplicada ao perfil químico de comprimidos de Sildenafil .....	63
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	64
5.1	Caracterização da substância química de referência .....	64
5.1.1	Análise térmica calorimetria exploratória de varredura.....	64
5.1.3	Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta.....	65
5.1.4	Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho .....	65
5.2	Desenvolvimento do método analítico por UFLC.....	66
A condição 8 foi definida como a mais adequada para realizar a validação do método, pois apresentou os melhores resultados nos parâmetros de adequabilidade do sistema. ....		
5.3	Validação do método analítico por UFLC .....	68
5.3.1	Especificidade.....	68
5.3.1.1	Avaliação da interferência dos excipientes da formulação.....	69

5.3.1.2 Avaliação da interferência dos produtos de degradação .....	71
5.3.1.2.1 Degradação fotolítica .....	71
5.3.1.2.2 Degradação térmica.....	74
5.3.1.2.3 Degradação oxidativa .....	75
5.3.1.2.4 Degradação ácida.....	76
5.3.1.2.5 Degradação básica .....	77
5.3.2 Linearidade .....	79
5.3.3 Limites de detecção e quantificação .....	80
5.3.4 Precisão.....	80
5.3.5 Exatidão.....	81
5.3.6 Robustez .....	82
5.4 Cinética de fotodegradação da sildenafil .....	84
5.5 Segurança biológica de sildenafil .....	85
5.6 Avaliação de comprimidos de Sildenafil apreendidos .....	88
5.6.1 Determinação de resistência mecânica.....	88
5.6.1.1 Teste de dureza .....	88
5.6.1.2. Teste de friabilidade .....	88
5.6.4 Teste de desintegração.....	89
5.6.5 Teste de dissolução .....	89
5.6.6 Determinação do teor.....	90
5.6.7 Perfil físico de comprimidos de Sildenafil apreendidos.....	91
5.6.7.1 Altura e diâmetro .....	91
5.6.7.2 Determinação de peso em comprimidos.....	92
5.6.8 Perfil químico dos comprimidos de Sildenafil apreendidos.....	93
5.6.9 Análise multivariada do perfil físico e químico dos comprimidos apreendidos de Sildenafil .....	94
6 CONCLUSÕES.....	100
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102

## 1 INTRODUÇÃO

A disfunção erétil é uma patologia que afeta a população masculina, podendo ser causada por diversos fatores, como a idade avançada, certas doenças ou pela administração de alguns medicamentos. A Sildenafil (SLD) é o fármaco utilizado como tratamento de primeira escolha para a disfunção erétil, sendo disponível na forma farmacêutica de comprimidos. Atualmente, a SLD está entre os medicamentos mais vendidos no mercado mundial. Por esta razão, também está entre os medicamentos que mais são contrabandeados e/ou falsificados. Desta forma, o desenvolvimento de métodos analíticos para avaliar a qualidade de produtos farmacêuticos bem como aqueles voltados para análise (qualitativa e quantitativa) de amostras forenses são de extrema importância e constituem-se como ferramentas para a disponibilização de medicamentos com qualidade garantida.

Entre os métodos analíticos propostos para a quantificação de fármacos nas suas formas farmacêuticas, os métodos cromatográficos denominados “*fast*” surgem como alternativa aos métodos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) por apresentarem melhor desempenho, menor tempo de análise e menor consumo de solventes devido ao uso de fases estacionárias com reduzido tamanho de partícula e a utilização de pressões elevadas. Como até o momento não existem procedimentos analíticos descritos nas farmacopeias para a determinação do teor de comprimidos de SLD e que sejam adequados para avaliar a degradação do fármaco frente a diferentes condições, (como temperatura, umidade e luz), há a necessidade de estabelecer um método analítico indicativo de estabilidade para esta forma farmacêutica.

A análise de amostras forenses se constitui um desafio analítico, já que não é possível estabelecer a origem geográfica e a constituição das mesmas durante a sua apreensão. Desta forma, métodos que envolvam a identificação rápida são atrativos do ponto de vista analítico. Entretanto, estes métodos devem observar a natureza multivariada destas amostras e disponibilizar resultados seguros e confiáveis para estudos de inteligência forense.

Nesse contexto, este trabalho propõe o desenvolvimento de uma metodologia analítica indicativa de estabilidade para a determinação de Sildenafil em comprimidos por cromatografia líquida ultra rápida (UFLC, do inglês *Ultra Fast Liquid Chromatography*), além de realizar a avaliação tecnológica e físico-química de comprimidos de SLD suspeitos de falsificação.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Disfunção erétil**

A disfunção erétil, também conhecida como impotência sexual masculina, é definida como a incapacidade persistente de obter e/ou manter uma ereção peniana firme o suficiente para permitir um desempenho sexual satisfatório (DE PAULA et al, 2012). Entre os fatores de risco associados a esta patologia, além da idade avançada, podemos destacar a diabetes mellitus tipo 2, o sedentarismo, os distúrbios relacionados ao sono, a obesidade, a depressão, as síndromes metabólicas e também as doenças crônicas relacionadas aos rins, fígado e pulmões. Ainda, algumas substâncias também podem estar envolvidas no desenvolvimento da disfunção erétil. Certos medicamentos que agem no sistema nervoso central, como antidepressivos e antipsicóticos; medicamentos utilizados para o tratamento da hipertensão, como diuréticos tiazídicos e beta-bloqueadores; além de substâncias psicotrópicas como a maconha, cocaína, opióides, álcool e nicotina (SHAMLOUL & GHANEM, 2013).

Os inibidores da Fosfodiesterase Tipo 5 (PDE5) são o tratamento medicamentoso de primeira escolha para disfunção erétil masculina. Os principais representantes dessa classe utilizados por via oral para o tratamento desta enfermidade são a SLD (Viagra<sup>®</sup>, Pfizer), a Iodenafila (Helleva<sup>®</sup>, Cristália), a Tadalafila (Cialis<sup>®</sup>, Eli Lilly) e a Vardenafila (Levitra<sup>®</sup>, Bayer) (RAVIPATI et al, 2007; WRIGHT, 2006).

### **2.2 Sildenafil**

A SLD foi o primeiro inibidor da PDE5 a ser liberado para tratamento da disfunção erétil em 1998 e desde então se tornou um dos medicamentos mais prescritos mundialmente (WRIGHT, 2006). Ela é comercializada na forma farmacêutica de comprimidos pela indústria farmacêutica Pfizer, com a marca Viagra<sup>®</sup>, nas doses de 25 mg, 50 mg e 100 mg. Porém, com o término da patente do Viagra<sup>®</sup> no ano de 2013, outras indústrias farmacêuticas começaram a fabricar o medicamento.

Devido ao sucesso no mercado, o alto custo e o constrangimento associado com a patologia subjacente, a SLD, junto com outros medicamentos para disfunção erétil, estão os medicamentos que mais sofrem com contrabando e/ou falsificação em 21 países, incluindo o Brasil (AMES & SOUZA, 2012; NOGUEIRA & NETO, 2011). Segundo estudo publicado por Hurtado e Lasmar em 2014 a partir de dados disponibilizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária entre os anos de 2007 e 2011, 78% das apreensões de medicamentos falsificados e contrabandeados são para o tratamento da disfunção erétil masculina, sendo o Viagra<sup>®</sup> e o Cialis<sup>®</sup> entre as principais versões apreendidas (HURTADO & LASMAR, 2014). Análogos estrangeiros, sem registro para comercialização em território nacional, também são alvo de apreensões e perícia por parte das forças policiais brasileiras, como as amostras uruguaias Plenovit<sup>®</sup>, Maxfil<sup>®</sup>, Vimax<sup>®</sup>, Sildenafil Lazer<sup>®</sup> e Libiden<sup>®</sup>, e as paraguaias da linha Pramil<sup>®</sup> e Erofast<sup>®</sup> (ORTIZ et al, 2010).

No ano de 2005, o FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) aprovou o uso da SLD para o tratamento de outra patologia, a hipertensão arterial pulmonar (HAP) em adultos e crianças com idades entre 1 e 17 anos. Em adultos, a SLD é utilizada em doentes com HAP de classe funcional II (limitação ligeira da atividade física) ou de classe funcional III (limitação acentuada da atividade física). Esta apresentação farmacêutica começou a ser comercializada com a marca Revatio<sup>®</sup> 20 mg pela indústria farmacêutica Pfizer, na forma farmacêutica de comprimidos. Após alguns anos, foi lançada no mercado Revatio<sup>®</sup> 10mg/12,5mL, na forma farmacêutica de solução intravenosa e Revatio<sup>®</sup> 10mg/mL na forma farmacêutica de pó para suspensão oral. Entretanto, dado o número de doentes afetados por HAP ser reduzido, a doença é considerada rara, e o Revatio<sup>®</sup> foi designado medicamento órfão (medicamento utilizado em doenças raras). Sendo assim, este medicamento somente pode ser adquirido quando solicitado por um médico com experiência em tratamento de HAP (EMA, 2012).

### 2.2.1 Propriedades físico-químicas da Sildenafil

Aparência: Pó cristalino branco.

Apresenta-se na forma de sal citrato.

Fator de equivalência sal/base: 1,40

Fórmula molecular:  $C_{22}H_{30}N_6O_4S$

Nome químico: 5-[2-ethoxy-5-(4-methylpiperazin-1-yl) sulfonylphenyl]-1-methyl-3-propyl-4H-pyrazolo [4,3-d] pyrimidin-7-one.

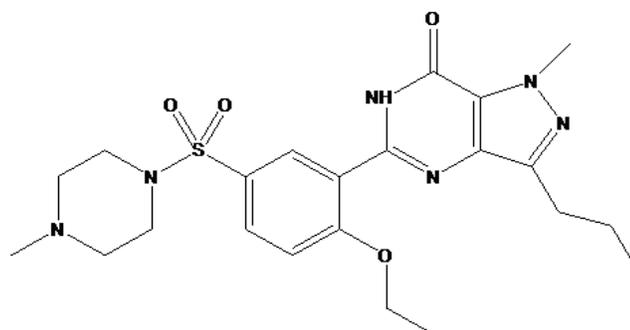
Massa molecular:  $474,5764 \text{ g mol}^{-1}$

pKa: 5,99

Solubilidade: Dimetilsulfóxido ( $23 \text{ mg mL}^{-1}$ ), Metanol e Dimetilformamida ( $14 \text{ mg mL}^{-1}$ ), Água ( $3,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e etanol ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) (BARROS, 2014; O'NEIL et al, 2001).

A estrutura química da SLD está representada na Figura 1.

Figura 1. Estrutura química da Sildenafil



Fonte: Adaptado da USP, 2014.

### 2.2.2 Farmacodinâmica

A SLD atua na potencialização da ereção, intensificando seu mecanismo fisiológico. Durante o estímulo sexual no homem, ocorre liberação fisiológica de óxido

nítrico no corpo cavernoso do pênis, que se difunde nas células musculares lisas nos corpos cavernosos, ativando a enzima guanilato ciclase. Isto resulta no aumento da concentração de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), relaxando a musculatura lisa do pênis, permitindo um aumento no fluxo sanguíneo e consequente tumescência peniana. Como a SLD é um inibidor seletivo da PDE5, que é responsável pela degradação do GMPc, tornando-o inativo, atua prolongando a ereção, visto que a PDE5 está inibida (RAVIPATI et al, 2007; WRIGHT, 2006).

Por ser um inibidor seletivo e potente da PDE5 específica para o GMPc, que se encontra em grande quantidade nos pulmões, a SLD causa a inibição da PDE5 também nos pulmões, com consequente vasodilatação pulmonar (OLIVEIRA & AMARAL, 2005).

### **2.2.3 Farmacocinética**

A SLD é rapidamente absorvida após sua administração oral, entretanto durante esse processo sofre um extenso metabolismo na mucosa gastrointestinal. Após sofrer metabolismo de primeira passagem, cerca de 40% da dose se encontra biodisponível na circulação sistêmica. A SLD apresenta uma farmacocinética dose-proporcional, sendo que sua concentração plasmática máxima é alcançada em torno de 60 minutos após a administração oral em jejum. Entretanto, quando administrada após refeição rica em lipídeos, a taxa de absorção é retardada, e aproximadamente 29% de concentração máxima é alcançada em torno de 120 minutos (PADMA-NATHAN & GIULIANO, 2001; WRIGHT, 2006).

A SLD e o seu principal metabolito, N-desmetil-SLD apresentam uma ligação às proteínas plasmáticas de aproximadamente 96%, sendo a ligação proteica independente da concentração total do fármaco. De modo geral, a SLD é amplamente distribuída no organismo, no entanto apresenta distribuição limitada no sêmen após administração oral, com menos de 0,001% da dose administrada estava presente no sêmen, 90 minutos após a administração do fármaco em indivíduos saudáveis. Tais concentrações não são susceptíveis de causar efeitos em parceiros sexuais expostos ao sêmen (PADMA-NATHAN & GIULIANO, 2001; WRIGHT, 2006).

O SLD sofre depuração hepática pelas isoenzimas do citocromo P450, a CYP3A4 (via principal) e a CYP2C9 (via secundária). O principal metabolito circulante, que resulta a partir de desmetilação da SLD, tem um perfil de seletividade para as isoformas da enzima fosfodiesterase semelhante à do fármaco original. A sua potência *in vitro* é de aproximadamente 50% do fármaco original. As concentrações plasmáticas do metabolito N-desmetil-SLD são aproximadamente 40% em relação as concentrações de SLD. Entretanto, a relação do efeito farmacológico do N-desmetil-SLD para a SLD é de aproximadamente 20%. O metabolito N-desmetil-SLD apresenta uma meia-vida de cerca de 4 horas, semelhante à da SLD. O fármaco é excretado na forma de metabolitos nas fezes (80%) e na urina (13%) (PADMA-NATHAN & GIULIANO, 2001).

### **2.3 Controle de qualidade de comprimidos de Sildenafil**

De maneira geral, os compêndios oficiais de cada país descrevem quais testes devem ser realizados para garantir a qualidade dos medicamentos comercializados (BRASIL, 2010; USP, 2014; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009; JAPANESE PHARMACOPOEIA, 2011; INTERNATIONAL PHARMACOPOEIA, 2015). Para avaliar características tecnológicas, os principais testes a serem realizados são: a determinação de peso, a determinação de resistência mecânica, o teste de desintegração e o teste de dissolução. O FDA também estabelece guias voltados para a indústria que estabelecem as condições de como alguns destes testes devem ser realizados para os medicamentos que ainda não possuem monografia (FDA, 2008; FDA, 2015). Para o controle físico-químico, deve-se seguir o procedimento analítico estabelecido na monografia publicada pelo compêndio, sendo esta específica para o medicamento. Caso ainda não exista, este procedimento deve ser devidamente validado conforme o guia Q2 (R1) estabelecido pelo FDA (FDA, 2005).

A monografia para a determinação do teor da SLD em matéria-prima encontra-se publicada na Farmacopeia Americana (2014). Entretanto para a forma farmacêutica de comprimidos não existe monografia publicada. Atualmente, existem diversos relatos na literatura sobre a determinação de SLD em diferentes amostras utilizando diversas

técnicas, como voltametria (BATISTA et al, 2010; MENDONÇA et al, 2015; OSKAN, 2004; RODRIGUEZ et al, 2004; TYSZCZUK & KOROLCZUK, 2010), análise térmica por calorimetria exploratória de varredura (JULIO et al, 2013), eletroforese capilar (QIN & LI 2002), espectrofotometria de ultravioleta (AMIN & EL-BESHBESHY, 2001; DINESH et al, 2002; KUCHEKAR et al, 2005; WEINERT et al, 2008), espectrometria de ressonância magnética nuclear (WAWER et al, 2005), cromatografia eletrocínica micelar (NEVADO et al, 2002; RODRIGUEZ et al, 2004), HPLC (ABOUL-ENEIN & HEFNAWY, 2003; DINESH et al, 2002; ERGUN et al, 2005; SAWATDEE & SRICHANA, 2013; MANNUR et al, 2011) e UPLC (ORTIZ et al, 2010; ORTIZ et al, 2013a). Entretanto, não existem relatos na literatura sobre metodologias indicativas de estabilidade para determinação de SLD em comprimidos.

### **2.3.1 Propriedades tecnológicas em comprimidos**

#### **2.3.1.1 Determinação de peso**

A determinação de peso para produtos em dose unitária tem por objetivo verificar se as unidades de um mesmo lote apresentam uniformidade de peso. Para isto deve-se definir o peso médio de um determinado lote e avaliar a variação da massa de cada amostra em relação ao seu peso médio, de acordo com critério estabelecido pela Farmacopéia (USP, 2014). A Farmacopéia Americana (2014) estabelece os limites de variação permitidos para a determinação de peso em comprimidos. Esta variação leva em consideração o peso médio das amostras, sendo que se pode tolerar não mais que duas unidades fora dos limites em relação ao peso médio e nenhuma destas acima ou abaixo do dobro das porcentagens indicadas.

#### **2.3.1.2 Determinação de resistência mecânica**

Os testes de resistência mecânica, tais como dureza e friabilidade, são considerados oficiais dentro do contexto legal da Farmacopeia, constituindo-se em

elementos úteis na avaliação da qualidade integral dos comprimidos. Estes testes visam demonstrar a resistência dos comprimidos à ruptura provocada por quedas ou fricção (USP, 2014).

Segundo a Farmacopéia Americana (2014), o teste de dureza consiste em submeter o comprimido à ação de um aparelho que meça a força necessária para esmagá-lo, sendo esta força determinada em Newtons. Para fins de aprovação, nenhuma unidade testada deve apresentar dureza inferior a 30 Newtons.

O teste de friabilidade permite determinar a resistência dos comprimidos à abrasão, quando submetidos à ação mecânica de aparelhagem específica. A diferença entre o peso inicial e o final após o teste representa a friabilidade, sendo considerados aceitáveis os comprimidos com perda igual ou inferior a 1,5% do seu peso inicial (BRASIL, 2010).

#### **2.3.1.3 Teste de desintegração**

O teste de desintegração permite verificar se a forma farmacêutica se desintegra dentro do limite de tempo especificado quando amostras do mesmo lote são submetidas à ação de aparelhagem específica em condições experimentais descritas. Para os fins desse teste, a desintegração é definida como o estado no qual nenhum resíduo das unidades testadas permanece na tela metálica do aparelho de desintegração, salvo fragmentos insolúveis de revestimento de comprimidos ou invólucros de cápsulas (FDA, 2008; USP, 2014). Segundo a Farmacopéia Americana (2014), para comprimidos não revestidos e revestidos com filme, o tempo estabelecido para o teste é de 30 minutos. Para comprimidos com revestimento açucarado, este tempo é de 60 minutos.

#### **2.3.1.4 Teste de dissolução**

O teste de dissolução constitui um dos instrumentos essenciais para avaliação das propriedades biofarmacotécnicas das formulações, além de fornecer informações

úteis tanto para a pesquisa e desenvolvimento, como para a produção e controle de qualidade dos medicamentos. No desenvolvimento farmacotécnico, permite a avaliação de novas formulações, a verificação da estabilidade e possibilita estudos de correlação *in vitro* – *in vivo*. Durante a fase de produção e controle de qualidade esses testes permitem detectar desvios de fabricação, de uniformidade do produto e de reprodutibilidade lote a lote (MALESUIK et al, 2006).

O teste possibilita determinar uma quantidade mínima de substância ativa que é dissolvida no meio de dissolução quando o produto é submetido à ação de aparelhagem específica por determinado intervalo de tempo (BRASIL, 2010; FDA, 2015; USP, 2014). Muitas monografias oficiais estabelecem que não menos que 75% do fármaco devem dissolver em 45 minutos. A Farmacopeia Britânica adota esse critério para a quase totalidade de suas monografias. Entretanto, este critério pode variar de acordo com a solubilidade da amostra (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2003). O FDA (2015), estabeleceu um guia com os critérios e especificações do teste de dissolução para novas formas farmacêuticas sólidas orais que pertencem a Classe 1 ou Classe 3 pelo Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), onde o percentual dissolvido deve ser superior a 80% em 30 minutos e 15 minutos, respectivamente.

### **2.3.1.5 Perfil físico de comprimidos**

Diferentes estágios de produção de comprimidos podem gerar um conjunto de características físicas e químicas do produto final. Entre os principais estágios, estão a adição de adjuvantes tecnológicos à substância ativa e a etapa de compressão. A adição de adjuvantes tecnológicos, que viabiliza a produção da forma farmacêutica, é denominada como característica de pré-compressão de lote (WEYERMANN et al., 2008). As características que são determinadas após a compressão da mistura pulveréa podem ser definidas como propriedade de pós-compressão de lote (MARQUIS et al, 2008). Tais características de pós-compressão, como altura, peso e diâmetro podem gerar um perfil físico de um determinado conjunto de comprimidos, podendo ser

úteis para caracterizar lotes de produção (ORTIZ et al., 2012; MARQUIS et al, 2008; MILLIET et al, 2009).

Esta análise é relativamente simples e não necessita de instrumentação avançada para a obtenção dos dados. Entretanto, estas informações não são obrigatórias numa rotina de controle de qualidade na indústria farmacêutica, pois não estão descritas nos compêndios oficiais. Estas informações são bastante utilizadas em situações que envolvem análise forense de medicamentos, pois podem relacionar um ciclo de compressão em comum, e, em conjunto com outros dados obtidos a partir de testes físicos e químicos, podem caracterizar falsificações e também relacionar lotes apreendidos de comprimidos (MARQUIS et al, 2008; MILLIET et al, 2009; ORTIZ et al, 2012). Para a avaliação simultânea dos dados sobre o perfil físico de comprimidos, os métodos de classificação realizados através da análise multivariada vêm sendo empregados com sucesso para caracterizar e relacionar lotes de apreensões (ANZANELLO et al, 2014a; CUSTERS et al, 2015;; MARQUIS et al, 2008; MILLIET et al, 2009; ORTIZ et al, 2012).

O controle estatístico de processo (CEP) pode ser considerado como uma ferramenta de monitoramento *online* da qualidade pelo qual se consegue uma descrição detalhada do comportamento de um processo de produção, identificando sua variabilidade e possibilitando seu controle ao longo do tempo (WARHOLAK & NAU, 2010). Na indústria farmacêutica, o CEP pode ser empregado para avaliar as operações dentro da linha de produção, visando garantir as boas práticas de fabricação e por consequência, a qualidade do produto final (ALENCAR et al., 2004). Através de gráficos denominados cartas de controle, a ferramenta tem por objetivo detectar desvios de parâmetros representativos do processo, como por exemplo, variações de peso ou altura em comprimidos. Sua utilização pressupõe que o processo seja estatisticamente estável, ou seja, que não há variação na produção. Entre as cartas controles disponíveis para a aplicação do CEP, as cartas controle clássicas (de Shewhart) são gráficos que apresentam os valores de medição da variável de interesse no eixo vertical e os pontos das medições no eixo horizontal, e que são interpretados em função das linhas horizontais denominadas Limite Superior de Controle (LSC), Linha Média (LM) e Limite Inferior de Controle (LIC) (ALENCAR et al., 2004). Não está descrito na literatura

o uso desta ferramenta na análise de amostras forenses (provenientes de lotes de apreensões).

### **2.3.2 Métodos físico-químicos**

A análise qualitativa e/ou quantitativa de medicamentos está baseada em métodos físico-químicos descritos nos compêndios oficiais e amplamente utilizados no desenvolvimento de metodologias analíticas adequadas. Os métodos utilizados neste trabalho estão descritos a seguir:

#### **2.3.2.1 Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho**

A região do infravermelho (IV) do espectro eletromagnético pode ser dividida em três regiões, o IV próximo ( $12500$  a  $4000\text{ cm}^{-1}$ ), o IV médio ( $4000$  a  $200\text{ cm}^{-1}$ ) e o IV longínquo ( $200$  a  $10\text{ cm}^{-1}$ ). A interação entre a radiação infravermelha e a matéria causa transições nos estados vibracionais e rotacionais associados com o estado eletrônico fundamental da molécula. Somente as ligações que apresentam um momento de dipolo como consequência do seu movimento rotacional ou vibracional são capazes de absorver radiação no IV (SKOOG et al, 2006; PAVIA et al, 2012).

Entre as três regiões, a espectrofotometria na região do IV médio é mais comumente utilizada na análise de fármacos, principalmente na identificação de substâncias ativas. A análise nesta região permite fornecer informação estrutural de uma molécula, já que a absorção de cada tipo de ligação corresponde a regiões específicas do espectro IV (PAVIA et al, 2012). Também é recomendada para a identificação de compostos puros, pois como cada tipo de ligação tem sua própria frequência natural de vibração, o espectro de IV médio gerado a partir de uma amostra pode ser comparado a de um padrão conhecido, sendo que se a sobreposição dos picos coincidirem, as substâncias serão as mesmas. Com o uso desta técnica também é possível a detecção de impurezas presentes em uma amostra, pois pequenas diferenças na estrutura e na constituição resultam em mudanças significativas na

distribuição das bandas de absorção (VOGEL, 2008). Recentemente esta técnica tem sido utilizada em análise forense para a classificação de lotes de apreensão e no desenvolvimento de métodos quantitativos associado à análise multivariada (CUSTERS et al, 2015).

### **2.3.2.2 Cromatografia**

A cromatografia é um método físico-químico de separação que está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias a torna uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação (DEGANI et al, 1998).

A CLAE é uma das técnicas mais utilizadas para a análise nas indústrias químicas e farmacêuticas. A técnica utiliza como fase móvel uma mistura de solventes e como fase estacionária colunas fechadas que são empacotadas com partículas muito pequenas, com tamanho entre 1,7 a 5  $\mu\text{m}$ . Estas partículas proporcionam uma separação mais eficiente em relação às outros tipos de cromatografia, entretanto necessitam de pressões mais elevadas para forçar a passagem da fase móvel pela fase estacionária em um fluxo constante (HARRIS, 2012).

Associada a essa expansão nas últimas décadas, o desenvolvimento da CLAE tem sido direcionado à necessidade de análises mais rápidas, porém sem o comprometimento do desempenho cromatográfico. Para isso, a redução do tamanho das partículas da fase estacionária e das colunas foi a alternativa mais atrativa, porém ficou limitada por um período por causa da elevada pressão resultante desta concomitante redução, que não é compatível com os sistemas cromatográficos convencionais. Entretanto, o uso de fases estacionárias com reduzido tamanho de partícula deram origem a métodos cromatográficos denominados “fast”, como a UFLC e a cromatografia à líquido de ultra eficiência (CLUE) (MALDANER & JARDIM, 2009).

A UFLC e a CLUE são as mais recentes das técnicas de separação. Estão baseadas nos mesmos princípios da CLAE, porém utilizam fases estacionárias com

partículas menores que 2  $\mu\text{m}$ . O uso destas partículas em conjunto com as altas velocidades lineares da fase móvel aumenta a resolução e diminui o tempo das análises. Para tornar isto possível, uma vez que a atual tecnologia de instrumentação disponível para a CLAE não é projetada para trabalhar em altas pressões, um novo equipamento que pode operar em pressões acima de 100 MPa foi introduzido e adaptado às necessidades atuais. As modificações requeridas foram: capacidade de trabalhar a pressões muito altas (100 MPa), volumes internos muito menores (conexões, alça de amostragem, cela do detector, bombas), celas do detector sem dispersão e com alta taxa de aquisição, melhoramento no sistema de controle e de dados, colunas resistentes para trabalharem a altas pressões e com baixo volume morto, injetores com precisão na faixa de volumes pequenos (MALDANER & JARDIM, 2009).

### **2.3.3 Desenvolvimento de métodos analíticos indicativos de estabilidade**

Os métodos analíticos indicativos de estabilidade são utilizados para avaliar quantitativamente a variação da substância ativa na presença de possíveis interferentes e devem ser validados de acordo com as diretrizes estabelecidas no guia Q2 (R1) do ICH (do inglês, *International Conference on Harmonisation*) (ICH, 2005). No Brasil, a Resolução RDC nº 899 de 29 de maio de 2003 estabelece o guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos (BRASIL, 2003). Os parâmetros a serem avaliados são especificidade, linearidade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), precisão, exatidão e robustez (ICH, 2005; BRASIL, 2003).

O método deve medir com precisão as mudanças na concentração de produtos ativos, sem a interferência de outros produtos de degradação, impurezas e excipientes (BLESSY et al, 2014). Nesse contexto, a cromatografia líquida vem sendo a ferramenta analítica mais utilizada para a separação e quantificação das impurezas dos fármacos. Entre os tipos de cromatografia líquida, aquelas consideradas “fast” vêm sendo mais empregadas para este fim por apresentarem melhor desempenho, menor tempo de análise e menor consumo de solventes (MALDANER & JARDIM, 2009).

### 2.3.4 Estudos de estabilidade de medicamentos

Os estudos da estabilidade de fármacos e medicamentos são realizados a fim de obter uma visão sobre o mecanismo de degradação e uma estimativa da data de validade de tal substância. Desta forma, estes estudos desempenham um papel fundamental no desenvolvimento de medicamentos, de forma a garantir a qualidade do produto final (MELVEGER E HUYNH-BA, 2009; MURAKAMI et al., 2009). Segundo a RDC nº 1, de 29 de julho de 2005, os estudos de estabilidade podem ser classificados como estudos de estabilidade acelerada, estudos de acompanhamento e estudos de longa duração (BRASIL, 2005).

Além destes estudos, o teste de estresse ou teste de degradação forçada tem por finalidade avaliar a exposição do fármaco quando submetido a condições mais severas de degradação, excedendo as condições utilizadas nos estudos de estabilidade acelerada (BRASIL, 2012). Um dos principais objetivos a serem atingidos através desse teste é demonstrar a especificidade ao desenvolver um método indicativo de estabilidade, sobretudo quando poucas informações estão disponíveis sobre os possíveis produtos de degradação (SILVA et al, 2009a). A exposição do insumo farmacêutico ativo ou do produto acabado à condições de estresse, como estresse térmico, hidrólise em meio alcalino e em meio ácido, oxidação e fotólise fornece informações importantes acerca da estabilidade intrínseca da molécula e de suas possíveis rotas de degradação (ICH, 2003).

Os estudos de degradação forçada também contribuem para a obtenção de dados cinéticos a respeito da decomposição do fármaco. A avaliação da cinética de degradação é fundamental para avaliar seu mecanismo de degradação, e assim estabelecer uma relação entre a degradação do fármaco, a possível formação de produtos de degradação e o tempo (SINKO, 2008).

Uma cinética de degradação envolve principalmente dois fatores, a ordem de reação e a velocidade de reação, sendo que ao determinar a ordem de reação, é possível definir como a velocidade de reação varia de acordo com a concentração dos reagentes. As principais ordens de reação relacionadas a degradação de

medicamentos são estabelecidas em ordem zero, primeira ordem e segunda ordem. As reações de ordem zero são aquelas em que a velocidade de reação não depende da concentração dos reagentes. Nas reações de primeira ordem a velocidade de reação é proporcional à concentração de um dos reagentes, enquanto nas reações de segunda ordem a velocidade de reação é proporcional à concentração dos dois reagentes ou à segunda potência da concentração de um dos reagentes (NULDEMAN, 1975; SINKO, 2008).

### **2.3.5 Avaliação da segurança biológica**

A avaliação da toxicidade de qualquer agente pode ser realizada por estudos que utilizam modelos experimentais *in vitro* e/ou *in vivo*, sendo que estes podem prever os efeitos nocivos que o organismo humano pode desencadear quando expostos as substâncias (CAZARIN et al, 2004). Desta forma, estes modelos são ferramentas de suma importância na avaliação da segurança biológica de produtos de degradação presentes em fármacos e medicamentos em quantidades superiores ao especificado (ICH, 2006).

A legislação brasileira, conforme descrito na RDC nº 58, de 20 de Dezembro de 2013, estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos. Segundo a resolução, a necessidade de notificar, identificar e/ou qualificar o produto de degradação no decorrer do estudo de estabilidade do medicamento deve ser considerada em relação à dose máxima administrada por dia e o percentual degradado do fármaco após teste de degradação forçada. Caso seja necessário qualificar o produto de degradação, deve-se estabelecer o perfil de segurança através da avaliação de estudos de segurança biológica, como estudos de citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade (BRASIL, 2013). A citotoxicidade, ou teste de viabilidade celular, avalia a perda da integridade da membrana celular (BUROW et al, 1998). Já a mutagenicidade avalia a frequência de micronúcleos em linfócitos de sangue e a genotoxicidade avalia o dano genético

através da avaliação das quebras de cadeias de DNA (SCHMID, 1975; FENECH, 2000; SIGH, 1995).

### **2.3.6 Aplicação de análise multivariada na avaliação de medicamentos**

Nos últimos anos, a análise multivariada vem se tornando uma ferramenta importante no campo das ciências farmacêuticas. Devido ao desenvolvimento dos equipamentos analíticos somados a melhoria da tecnologia dos computadores pessoais, a ferramenta vem sendo utilizada para diversos fins analíticos (FERREIRA, 1999). Segundo Rajalahti & Ekalheim (2011), a ferramenta pode ser de extrema importância na área, pois consegue extrair o máximo de informação relevante dos dados obtidos experimentalmente através de ferramentas matemáticas e estatísticas, onde se considera mais de uma variável simultaneamente. Sendo assim, pode-se conseguir uma interpretação mais fácil dos resultados, além da possibilidade de classificar as amostras e prever resultados. Ainda, a análise multivariada pode ser utilizada na obtenção de um desenho experimental, assim é possível obter dados relevantes em um número reduzido de experimentos.

Os métodos de análise multivariada podem ser divididos em métodos de classificação, onde as amostras analisadas são agrupadas de acordo com a similaridade, e métodos de regressão, onde é possível quantificar os componentes da amostra. Os métodos de classificação, também conhecidos como métodos de reconhecimento de padrões, podem ser agrupados em supervisionados e não supervisionados (ROGGO et al, 2007).

Recentemente, a análise multivariada vem sendo empregada para o monitoramento de fenômenos físicos e químicos no processo de fabricação na indústria farmacêutica associada a técnicas como espectrofotometria de infravermelho (IV) médio (CORNEL et al, 2008; TOGKALIDOU et al, 2002), espectrofotometria de IV próximo (OTSUKA et al, 2002; RANTANEN et al, 2005; ROGGO et al, 2007) e espectrofotometria Ramam (CORNEL et al, 2008; ROGGO et al, 2010; ŠAŠIĆ, 2007; SIMONE et al, 2014).

Além disso, a análise multivariada é também utilizada no controle de qualidade físico-químico para a determinação do teor de medicamentos. Diversos trabalhos foram publicados utilizando métodos de regressão associado às técnicas de espectrofotometria de IV médio (MULLER et al, 2011; PARISOTTO et al, 2009; SILVA et al, 2009b), espectrofotometria de IV próximo (MARQUES JR et al, 2015; SARRAGUÇA et al, 2011), espectrofotometria Raman (FRANSSON et al, 2010; SILVA et al, 2011), espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) e visível (AHMED et al., 2013; CANTARELLI et al., 2011; FERRARO et al., 2004; KHISHAYAND et al., 2010; MOT et al, 2010; NAGAVALLI et al, 2010; SENA et al, 2004), cromatografia acoplada a diferentes detectores (DINÇ et al., 2006; ORTIZ et al, 2010, ORTIZ et al, 2013a; SIVAKUMAR et al, 2007). Ainda, a ferramenta pode ser empregada para estudos de estabilidade em medicamentos (ALMEIDA et al, 2015; SOUZA et al, 2012)

Além do controle de qualidade de medicamentos, estudos de perfil físico-químico associados à análise multivariada de dados podem ser aplicados nas ciências forenses, sendo de grande utilidade para as autoridades policiais. Através das informações obtidas podem ser estabelecidos vínculos químicos e tecnológicos entre as amostras, permitindo que materiais de diferentes apreensões possam ser classificados em grupos de amostras relacionadas. Vários trabalhos que combinam a análise multivariada com diferentes técnicas instrumentais para a identificação de medicamentos falsificados vêm sendo publicados nos últimos anos (ANZANELLO et al, 2014a; ANZANELLO et al 2014b; CUSTERS et al, 2015; SABIN et al, 2013; SHAH et al, 2007; AVERJ et al, 2008; ORTIZ et al, 2013a; ORTIZ et al, 2013b; DECONINCK et al, 2014).

Ortiz e colaboradores (2012) avaliaram as propriedades de pós-compressão de comprimidos apreendidos de Cialis<sup>®</sup> e de Viagra<sup>®</sup>. Através do teste de estatístico de Fisher, todas as amostras falsificadas de Viagra e Cialis foram diferenciadas das autênticas, por meio de medidas de comprimento, espessura e peso. Utilizando a ferramenta de análise multivariada, a Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA, do inglês *Hierarchical Cluster Analysis*), os comprimidos com perfis físicos semelhantes foram agrupados, o que pode indicar uma produção ilícita em comum. Observou-se que a utilização das características de pós-compressão podem gerar, de um modo rápido, confiável e sem preparo de amostra, um perfil tecnológico que se una aos demais

métodos analíticos utilizados na rotina forense de detecção de falsificações de Cialis<sup>®</sup> e de Viagra<sup>®</sup>.

Custers et al (2015) discriminaram amostras genuínas das ilegais de Viagra<sup>®</sup> e Cialis<sup>®</sup> através de dados relacionados ao perfil físico. Cinco características de pós-compressão de comprimidos foram consideradas: cor, peso, comprimento e espessura. A ferramenta de análise multivariada CART (do inglês, *Classification and Regression Trees*) resultou em uma boa discriminação entre os medicamentos genuínos e ilegais (98,93% de taxa de classificação correta para o Viagra<sup>®</sup> e 99,42% para Cialis<sup>®</sup>), sugerindo que o peso e comprimento foram as características físicas fundamentais que determinam a discriminação observada.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Desenvolver e validar uma metodologia analítica indicativa de estabilidade por UFLC para a determinação de SLD e avaliar a qualidade de comprimidos suspeitos de falsificação utilizando ferramentas de análise multivariada.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Caracterizar a Substância Química de Referência da SLD.
- Desenvolver e validar uma metodologia por UFLC indicativa de estabilidade para a quantificação de SLD em comprimidos.
- Avaliar a cinética de fotodegradação da SLD.
- Avaliar a segurança biológica dos produtos de fotodegradação através dos testes de citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade.
- Avaliar a qualidade de comprimidos de SLD suspeitos de falsificação utilizando testes de resistência mecânica, teste de desintegração, teste de dissolução e de determinação do teor.
- Avaliar o perfil físico de comprimidos de SLD suspeitos de falsificação através da determinação da altura, do diâmetro e do peso utilizando análise hierárquica por agrupamentos.
- Avaliar o perfil químico de comprimidos de SLD suspeitos de falsificação por espectrofotometria no IV utilizando análise hierárquica por agrupamentos.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Substância química de referência e produto farmacêutico

Substância química de referência (SQR): A SLD utilizada como SQR foi adquirida junto à empresa Pharmanostra (São Paulo, SP), com teor declarado em 99,70 %. Esta foi devidamente caracterizada e utilizada no desenvolvimento e validação do método analítico por UFLC e na avaliação da segurança biológica dos produtos de degradação formados.

Produto farmacêutico adquirido comercialmente: Para o desenvolvimento e validação do método analítico por UFLC, foram adquiridas no comércio local amostras de Viagra<sup>®</sup> 50 mg (Pfizer), contendo quantidade declarada de 50 mg de SLD por comprimido.

Produto farmacêutico apreendido: Para análise das características físico-químicas e tecnológicas utilizando ferramentas de análise multivariada foram utilizadas 50 amostras apreendidas de SLD da marca Pramil<sup>®</sup> 50 mg (Novophar, Paraguai), contendo quantidade declarada de 50 mg de SLD por comprimido e cedidas pela Superintendência Regional da Polícia Federal do Estado do Rio Grande do Sul. O teor da amostra apreendida foi determinado por UFLC (de acordo com a metodologia desenvolvida neste trabalho).

### 4.2 Equipamentos e acessórios

Os seguintes equipamentos foram utilizados para a realização do trabalho:

- Aquecedor Nalgon – modelo 3320
- Balança Shimadzu – modelo AY220<sup>®</sup>.
- Calorímetro exploratório diferencial Shimadzu - modelo DSC-60.
- Câmara horizontal de vidro espelhada internamente.
- Cromatógrafo a líquido Shimadzu – Prominence<sup>®</sup>.

- Desintegrador Nova Ética<sup>®</sup> - modelo 301-3.
- Dissolutor Varian<sup>®</sup> - modelo VK2000.
- Durômetro Nova Ética<sup>®</sup> - modelo 298.
- Espectrofotômetro de infravermelho Perkin Elmer – modelo Frontier Óptica
- Espectrofotômetro UV/Visível Perkin Elmer – modelo Lambda 35
- Estufa Nova Ética – Série 400<sup>®</sup>.
- Friabilômetro Nova Ética<sup>®</sup> - modelo 300/1.
- Lavadora Ultrassônica Unique – modelo USC 2850A<sup>®</sup>.
- Microcomputador Dell, com processador core i7 3.40 GHz e 2 GB de memória RAM.
- Paquímetro digital Pantec<sup>®</sup>.
- Ponto de fusão Gehake<sup>®</sup> - modelo PF1500.
- Potenciômetro HANNA<sup>®</sup> - modelo 2220.
- Sistema de Filtração Ocean<sup>®</sup>.
- Sistema purificador de água, Millipore – Direct-Q 3 UV Ultrapure Water Systems<sup>®</sup>.
- Software The Unscrambler<sup>®</sup> X

### 4.3 Reagentes

Os seguintes reagentes foram utilizados para a realização do trabalho:

- Acetonitrila grau HPLC – J. T. Baker<sup>®</sup>
- Ácido clorídrico 37% grau P. A. – Neon<sup>®</sup>
- Ácido fórmico 85% grau P. A. – Synth<sup>®</sup>
- Água ultrapura
- Hidróxido de sódio grau P. A. – Impex<sup>®</sup>
- Metanol grau P. A. – Neon<sup>®</sup>
- Peróxido de hidrogênio 30% grau P. A. – Fmaia<sup>®</sup>

- Trietilamina grau P. A. – Merck®

#### **4.4 Caracterização da Substância Química de Referência**

As seguintes técnicas foram utilizadas para a caracterização da SQR de SLD.

##### **4.4.1 Análise térmica por calorimetria exploratória de varredura**

A análise térmica por DSC pode ser utilizada na área farmacêutica para a caracterização térmica e determinação de pureza de fármacos, que pode ser realizada pelo simples acompanhamento visual da curva DSC, observando a presença dos eventos térmicos característicos do fármaco (OLIVEIRA et al., 2011). Para determinar a faixa fusão, deve-se observar a porção endotérmica da curva DSC que se afasta da linha de base, retornando posteriormente à mesma. O início extrapolado da curva determina a temperatura de fusão (RODRIGUES et al., 2005).

Para a análise de SLD por DSC, utilizou-se um calorímetro exploratório diferencial por fluxo de calor, com controlador de fluxo para gás de purga nitrogênio, com fluxo de 50 mL min<sup>-1</sup>. Transferiu-se aproximadamente 3 mg de SLD para o porta-amostra de alumínio, na qual foi selado e colocado no equipamento. A taxa de aquecimento utilizada foi de 10°C min<sup>-1</sup> na faixa de temperatura entre 25 a 400°C. O resultado obtido foi comparado à faixa de fusão da matéria-prima de SLD obtida experimentalmente através da análise no equipamento de ponto de fusão, onde uma pequena quantidade de amostra é compactada em um tubo capilar e observada na célula de aquecimento até sua fusão (BRASIL, 2010). Os resultados obtidos foram comparados com dados disponíveis na literatura.

#### 4.4.3 Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta

A absorção da radiação UV pelas moléculas causa uma variação de energia, do estado normal para um estado de maior energia ou estado excitado. A passagem ao estado excitado não é de natureza contínua realizando-se, geralmente, em etapas chamadas de transições. Na região do UV as transições são eletrônicas e ocorrem em porções da molécula chamadas de cromóforos. A identificação de substâncias farmacêuticas pode ser realizada utilizando a região do UV. Os espectros obtidos devem ser comparados frente ao espectro da SQR ou a dados disponíveis na literatura (BRASIL, 2010).

O espectro de absorção no UV da matéria-prima de SLD foi obtido em solução metanólica, na concentração de  $45 \mu\text{g mL}^{-1}$ . A análise foi realizada na faixa entre 200 a 400 nm, utilizando cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico. Os resultados obtidos foram comparados com dados disponíveis na literatura.

#### 4.4.4 Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho médio

A espectrofotometria de absorção no IV baseia-se no movimento vibracional dos átomos da molécula. A presença de bandas características dos grupos funcionais da molécula permite, através da análise do espectro, fornecer informações para ajudar na elucidação estrutural da molécula (PAVIA et al, 2012). Entretanto, a análise de dados obtidos por outras técnicas devem ser utilizados em conjunto para uma análise qualitativa mais detalhada (SILVERSTEIN et al., 2007).

O espectro de absorção no IV da matéria-prima de SLD foi obtido utilizando o acessório de reflexão total atenuada (ATR, do inglês *Attenuated Total Reflectance*). A amostra, sem prévio tratamento, foi colocada sobre o acessório e o espectro foi coletado na faixa de  $4000$  a  $650 \text{ cm}^{-1}$ , com resolução de  $1 \text{ cm}^{-1}$  e 16 varreduras realizadas. Os resultados obtidos foram avaliados de acordo com as bandas de absorção específicas da molécula de SLD.

#### **4.5 Desenvolvimento de metodologia para a quantificação de Sildenafil em comprimidos por UFLC**

O método proposto foi desenvolvido utilizando um cromatógrafo a líquido Shimadzu Prominence® UFLC, equipado com desgaseificador DGU-20A3, bombas LC-20AD, injetor automático SIL-20AC HT, forno de coluna CTO-20AC, detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M20A e software LC Solution V. 1.24 SP1. Como fase estacionária foi utilizada uma coluna Thermo Scientific C-18 (100,0 mm x 4,6 mm x 3,0 µm). As fases móveis foram filtradas à vácuo, em membrana de nylon de diâmetro do poro de 0,45 µm e desgaseificadas em banho de ultrassom por 10 minutos. Para todas as condições testadas o comprimento de onda mais adequado foi determinado a partir da realização de varredura nos comprimentos de ondas de 200 a 400 nm. Os parâmetros de adequabilidade do sistema foram avaliados e levados em consideração para a escolha do método analítico mais adequado.

##### **4.5.1 Preparo da solução contendo Substância Química de Referência de Sildenafil**

Cerca de 22,5 mg de SLD foi pesada e transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 50 mL com o auxílio de 30 mL de metanol. Após a solução ser submetida a banho ultrassônico por 20 minutos, o volume foi completado com metanol, obtendo-se uma solução na concentração de 450 µg mL<sup>-1</sup> de SLD. Uma alíquota de 1 mL desta solução foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL, e o seu volume completado com metanol, obtendo a solução de trabalho na concentração de 45 µg mL<sup>-1</sup>.

##### **4.5.2 Preparo da solução contendo comprimidos de Sildenafil**

Levando em consideração o valor do peso médio dos comprimidos de SLD, cerca de 2,25 mg de SLD foi pesada e transferida quantitativamente para um balão

volumétrico de 50 mL com o auxílio de 30 mL de metanol. Após a solução ser submetida a banho ultrassônico por 20 minutos, o volume foi completado com metanol, obtendo-se a solução de trabalho na concentração de  $45 \mu\text{g mL}^{-1}$  de SLD.

#### 4.5.3 Condições cromatográficas testadas

Para a definição inicial da fase móvel a ser utilizada no desenvolvimento do método, foi levado em consideração a monografia descrita na Farmacopeia Americana (2014) para a quantificação de SLD em matéria-prima, que utiliza uma fase móvel composta por Acetonitrila (ACN) como solvente orgânico e Trietilamina (TEA) como solvente aquoso na temperatura de  $50^{\circ}\text{C}$ . Assim, foram propostas alterações na proporção do solvente orgânico, no fluxo e no pH, conforme demonstrado na Tabela 1.

**Tabela 1. Alterações utilizadas no desenvolvimento do método.**

Condição	Valores utilizados
Solvente orgânico – ACN (%)	40 – 50 – 60
Fluxo ( $\text{mL min}^{-1}$ )	0,7 – 0,8 – 0,9
pH	3,0 – 4,0

#### 4.6 Validação de metodologia para a quantificação de Sildenafil em comprimidos por UFLC

Para a validação do método analítico proposto, foram levadas em consideração as diretrizes estabelecidas no guia Q2 (R1) do ICH (ICH, 2005) e na RDC nº 899 de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003). Os parâmetros validados foram especificidade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez.

#### **4.6.1 Especificidade**

É a capacidade que o método possui de determinar exatamente um composto em presença de interferentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003).

A especificidade do método proposto foi determinada através da avaliação da possível interferência dos excipientes da formulação e de potenciais produtos de degradação na detecção e quantificação da SLD. Desta forma, a amostra de SLD SQR foi submetida a condições de degradação forçada (luz, calor, oxidação, hidrólise ácida e hidrólise básica). A interferência dos excipientes e dos prováveis produtos de degradação formados na análise de SLD foi avaliada através da pureza do pico cromatográfico, sendo considerados adequados valores de pureza de pico  $\geq 99,99\%$  (BRASIL, 2003).

##### **4.6.1.1 Avaliação da interferência dos excipientes da formulação**

Para o preparo da amostra simulada de excipientes foram utilizados os excipientes descritos na bula do medicamento de referência (Viagra<sup>®</sup>). As concentrações utilizadas foram com base na especificação máxima de cada excipiente, obtida na literatura e estimadas a partir do peso médio dos comprimidos (KIBBE et al, 2000). Os excipientes utilizados foram celulose microcristalina, fosfato de cálcio dibásico anidro, croscarmelose sódica, estearato de magnésio, hipromelose, lactose, triacetina, índigo carmim alumínio laca e dióxido de titânio.

#### **4.6.1.2 Avaliação da interferência dos produtos de degradação**

##### **4.6.1.2.1 Degradação fotolítica**

Para a avaliação da especificidade frente à degradação fotolítica foi avaliada a influência de dois solventes, água e metanol, com o objetivo de observar possíveis diferenças na formação de produtos de degradação.

Cerca de 22,5 mg de SLD SQR foi pesada e transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 50 mL com o auxílio de 30 mL do solvente. Após a solução ser submetida a banho ultrassônico por 20 minutos, o volume foi completado obtendo-se uma solução na concentração de  $450 \mu\text{g mL}^{-1}$  de SLD. Alíquotas de 1 mL foram transferidas para cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm e submetidas a radiação de lâmpada UVC-254 nm por 2 horas em uma câmara horizontal de vidro espelhada internamente (80 x 25 x 35cm). Após, o volume foi transferido para um balão de 10 mL e o volume completado com o solvente, obtendo-se uma concentração teórica de  $45 \mu\text{g mL}^{-1}$  de SLD. Filtrou-se a solução em filtro de membrana de nylon de  $0,45 \mu\text{m}$  antes das injeções. Preparou-se uma solução controle para a análise do tempo zero, sob as mesmas condições e protegidas da luz. O procedimento foi realizado para cada solvente estabelecido. As soluções foram preparadas em triplicata.

##### **4.6.1.2.2 Degradação térmica**

Cerca de 22,5 mg de SLD SQR foi pesada e transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 50 mL com o auxílio de 30 mL de água. Após a solução ser submetida a banho ultrassônico por 20 minutos, o volume foi completado com água, obtendo-se uma solução na concentração de  $450 \mu\text{g mL}^{-1}$  de SLD. Esta solução foi mantida em repouso por 72 horas em estufa pré-aquecida a  $55^{\circ}\text{C}$ . Após esse período, uma alíquota de 1 mL foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e o seu volume foi completado com metanol, obtendo-se uma concentração teórica de  $45 \mu\text{g mL}^{-1}$  de SLD. Filtrou-se a solução em filtro de membrana de nylon de  $0,45 \mu\text{m}$  antes das

injeções. Preparou-se uma solução controle para a análise do tempo zero. As soluções foram preparadas em triplicata.

#### **4.6.1.2.3 Degradação oxidativa**

Cerca de 22,5 mg de SLD SQR foi pesada e transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 50 mL com o auxílio de 10 mL de metanol. Após a solução ser submetida a banho ultrassônico por 20 minutos, o volume foi completado com peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 10%, obtendo-se uma solução na concentração de  $450 \mu\text{g mL}^{-1}$  de SLD. Esta solução foi armazenada por 72 horas, protegida de luz e calor. Uma alíquota de 1 mL foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e o seu volume foi completado com metanol, obtendo-se uma concentração teórica de  $45 \mu\text{g mL}^{-1}$  de SLD. Filtrou-se a solução em filtro de membrana de nylon de  $0,45 \mu\text{m}$  antes das injeções. Preparou-se uma solução controle para a análise do tempo zero. As soluções foram preparadas em triplicata.

#### **4.6.1.2.4 Degradação ácida**

Cerca de 22,5 mg de SLD SQR foi pesada e transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 50 mL, onde o volume foi completado com ácido clorídrico (HCl)  $1 \text{ mol L}^{-1}$ , obtendo-se uma solução na concentração de  $450 \mu\text{g mL}^{-1}$  de SLD. Esta solução foi levada a refluxo a  $80^\circ\text{C}$  por 6 horas. Uma alíquota de 1 mL foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL, neutralizada com 1 mL de hidróxido de sódio (NaOH)  $1 \text{ mol L}^{-1}$  e o seu volume foi completado com metanol, obtendo-se uma concentração teórica de  $45 \mu\text{g mL}^{-1}$  de SLD. Filtrou-se a solução em filtro de membrana de nylon de  $0,45 \mu\text{m}$  antes das injeções. Preparou-se uma solução controle para a análise do tempo zero. As soluções foram preparadas em triplicata.

#### 4.6.1.4.5 Degradação básica

Cerca de 22,5 mg de SLD SQR foi pesada e transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 50 mL, onde o volume foi completado com NaOH 1 mol L<sup>-1</sup>, obtendo-se uma solução na concentração de e 450 µg mL<sup>-1</sup> de SLD. Esta solução foi levada a refluxo a 80°C por 6 horas. Uma alíquota de 1 mL foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL, neutralizada com 1 mL de HCl 1 mol L<sup>-1</sup> e o seu volume foi completado com metanol, obtendo-se uma concentração teórica de 45 µg mL<sup>-1</sup> de SLD. Filtrou-se a solução em filtro de membrana de nylon de 0,45 µm antes das injeções. Preparou-se uma solução controle para a análise do tempo zero. As soluções foram preparadas em triplicata.

#### 4.6.2 Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003). A linearidade foi determinada pela construção de três curvas de calibração com cinco pontos cada. Para a construção da curva de calibração, pesou-se cerca de 15 mg de SLD SQR, e transferiu-se quantitativamente para um balão volumétrico de 50 mL com o auxílio de 30 mL de metanol. Após a solução ser submetida a banho ultrassônico por 20 minutos, o volume foi completado com metanol, obtendo-se uma solução na concentração de 300 µg mL<sup>-1</sup> de SLD. Desta solução, foram transferidas alíquotas de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mL com o auxílio de uma bureta para balões de 10 mL, sendo o volume completado com metanol, obtendo-se as concentrações finais de 15,0; 30,0; 45,0; 60,0 e 75,0 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

Com os resultados obtidos foi traçado um gráfico a partir da plotagem das áreas obtidas em função das respectivas concentrações de SLD. A linearidade foi avaliada a partir do coeficiente de correlação (r) e da análise de variância (ANOVA).

#### 4.6.3 Limites de detecção e quantificação

O LD e LQ foram calculados a partir das fórmulas descritas na RDC nº 899 de 23 de maio de 2003 (BRASIL, 2003), baseadas na razão entre o desvio padrão dos coeficientes lineares das curvas de calibração obtidas no ensaio de linearidade e a média dos coeficientes angulares destas respectivas curvas, multiplicados por 3,0 e 10,0, respectivamente.

#### 4.6.4 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade (precisão intradia) e precisão intermediária (precisão interdía). Para o cálculo da repetibilidade foi considerado o desvio padrão relativo (DPR) da quantificação de seis amostras do produto farmacêutico de SLD na concentração 45  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em um único ensaio. Para o cálculo da precisão intermediária, foi considerado o DPR da comparação entre seis amostras do produto farmacêutico de SLD na concentração 45  $\mu\text{g mL}^{-1}$  realizadas em três dias diferentes, por analistas diferentes. Os resultados foram considerados precisos para DPR não superiores a 2% (BRASIL, 2003).

#### 4.6.5 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, nove determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, três concentrações, baixa, média e alta, com três réplicas cada. A exatidão é expressa pela relação entre a

concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (BRASIL, 2003).

Para o ensaio da exatidão, pesou-se cerca de 15 mg de SLD SQR, e transferiu-se quantitativamente para um balão volumétrico de 50 mL com o auxílio de 30 mL de metanol. A amostra simulada de excipientes foi adicionada, e a solução foi submetida a banho ultrassônico por 20 minutos. Após, o volume foi completado com metanol, obtendo-se uma solução na concentração de  $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Após a filtração da solução, foram transferidas alíquotas de 1,0; 1,5 e 2,0 mL com o auxílio de uma bureta para balões de 10 mL, sendo o volume completado com metanol, obtendo-se as concentrações de 30,0; 45,0 e 60,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente.

#### **4.6.6 Robustez**

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Esse parâmetro indica sua confiança durante o uso normal (BRASIL, 2003).

O ensaio de robustez foi realizado através de uma análise fatorial, com a utilização do desenho experimental de Plackett–Burman, que permite não somente variar uma série de fatores em um número reduzido de experimentos, como também possibilita determinar o efeito de cada um dos fatores no sistema cromatográfico. A partir dos parâmetros normais, são feitas pequenas alterações em um nível acima e um nível abaixo para cada fator avaliado (HEYDEN et al., 2001). As condições testadas para a robustez estão na Tabela 2.

Tabela 2. Fatores avaliados no ensaio de robustez.

Parâmetro	Nível (-)	Condição normal	Nível (+)
pH	3,8	4	4,2
Proporção de ACN	38	40	42
Temperatura do forno da coluna	45	50	55
Fluxo da fase móvel	0,67	0,7	0,73
Comprimento de onda de detecção	287	290	293
Coluna cromatográfica	10 cm	10 cm	15 cm

A realização do ensaio de robustez foi conduzida a partir da análise de soluções com a amostra simulada de excipientes, a SLD SQR e a SLD produto farmacêutico, em duplicata, para cada condição estabelecida. A Tabela 3 demonstra os níveis e os fatores avaliados para cada experimento. Os fatores *Dummy* foram utilizados apenas para completar o número de fatores no desenho experimental e para calcular o erro do experimento (HEYDEN et al., 2001).

Tabela 3. Desenho experimental de Plackett–Burman para o teste da robustez.

Experimento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
pH	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-
<i>Dummy</i>	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-
Temperatura	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-
Detecção	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-
<i>Dummy</i>	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-
<i>Dummy</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
<i>Dummy</i>	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
% ACN	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
Coluna	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-
Fluxo	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-
<i>Dummy</i>	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-

O efeito de cada um dos fatores é calculado pela Equação 1:

$$E_x = \frac{\sum Y(+)}{N/2} - \frac{\sum Y(-)}{N/2} \quad (1)$$

onde  $E_x$  é o efeito do fator,  $\sum Y(+)$  e  $\sum Y(-)$  a soma das respostas do fator em análise em seu nível acima (+) e em seu nível abaixo (-) e N é o número de experimentos no desenho experimental (HEYDEN et al., 2001).

Para calcular a estimativa do erro experimental, usou-se a Equação 2:

$$E_e = \sqrt{\frac{\sum E_{Dummy}^2}{n_{erro}}} \quad (2)$$

onde  $E_e$  é a estimativa do erro aleatório do experimento e  $\sum E_{dummy}^2$  é a soma quadrada do  $n_{erro}$  dos Dummy (HEYDEN et al., 2001).

A significância dos fatores em análise foi determinada através do teste *t de Student*. O valor de *t* calculado foi comparado com o de *t* tabelado para um nível de significância de 5 %.

## 4.7 Cinética de degradação fotolítica

### 4.7.1 Preparo das soluções

A degradação fotolítica foi conduzida em dois solventes (água e metanol) com o objetivo de observar possíveis diferenças na formação de produtos de degradação e comparar os parâmetros cinéticos ao submeter o fármaco aos solventes com diferentes propriedades.

Uma solução de  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  foi preparada através da pesagem de 25 mg de SLD, sendo transferido para balão volumétrico de 50 mL com o auxílio de 30 mL do

respectivo solvente. Após ser submetido a banho ultrassônico por 20 minutos, o volume foi completado. Alíquotas de 1 mL foram transferidas para cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm e submetidas a radiação. As soluções foram analisadas nos tempos 30, 60, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos para o solvente aquoso e 30, 45, 60, 90 e 120 minutos para solvente metanólico. Após, o volume da cubeta foi diluído 10 vezes utilizando balão volumétrico de 10 mL. Preparou-se uma solução controle para a análise do tempo zero para ambas as condições e protegidas da luz.

#### **4.7.2 Quantificação das amostras**

Após a coleta, as amostras foram submetidas à análise por UFLC, utilizando as condições estabelecidas no desenvolvimento do método proposto neste trabalho.

#### **4.7.3 Determinação da ordem de reação e parâmetros cinéticos**

A ordem de reação foi estabelecida pela relação obtida entre a concentração da substância reagente em função do tempo (ordem zero), o logaritmo da concentração da substância reagente em função do tempo (primeira ordem) e o inverso da concentração da substância reagente em função do tempo (segunda ordem). A ordem de reação foi definida a partir do coeficiente de correlação (obtido a partir da regressão linear característico de cada ordem) mais próximo da unidade.

Após determinar a ordem da reação, os seguintes parâmetros cinéticos foram calculados:  $t_{50\%}$ , que é o tempo necessário para que o fármaco atinja 50% de seu teor declarado (tempo de meia vida), e  $t_{90\%}$ , que é o tempo necessário para que o fármaco atinja 90% de seu teor inicial e a constante de velocidade de reação (k).

#### **4.8 Avaliação da segurança biológica**

Nos ensaios de citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade foram avaliados os efeitos da SLD SQR e da solução de SLD SQR em meio aquoso na presença de

produtos de fotodegradação (SLD-PD) em cultura de leucócitos humanos. A citotoxicidade foi avaliada através do parâmetro de viabilidade celular; a mutagenicidade através da frequência de micronúcleo em linfócitos; e a genotoxicidade através do índice de dano ao DNA, pelo Ensaio Cometa.

As culturas de leucócitos foram preparadas por meio de uma amostra de sangue coletada através da punção venosa de um voluntário. Este procedimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria (Carta de aprovação nº 23.081.012330/2006-94). Para o preparo da suspensão de células, 7,5 mL de sangue foram imediatamente transferidos para um meio de cultura contendo 75 mL de RPMI 1640, suplementado com 25% de soro fetal bovino e 3,0% de estreptomicina / penicilina, 2% fitohemaglutinina conforme descrito por Montagner e colaboradores (2010). Os ensaios de segurança biológica foram realizados em parceria com o laboratório Nubiotoxim (Unipampa, Campus Uruguiana).

#### **4.8.1 Preparo da amostra**

Para avaliação da segurança biológica, uma solução  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  de SLD SQR foi preparada utilizando água como solvente, sendo esta definida como solução estoque. Esta solução foi diluída utilizando uma solução de tampão fosfato pH 7,4 (PBS) até as concentrações de  $1,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $1,6 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Alíquotas destas soluções foram adicionadas a suspensão celular até obter as concentrações de 120, 160 e  $200 \text{ ng mL}^{-1}$ . Em seguida, a cultura de células contendo as amostras foram homogeneizadas e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 72 horas. As diluições da solução de SLD-PD obtidas frente à exposição fotolítica por 90 minutos foram processadas da mesma forma que as realizadas para a solução estoque. Um controle negativo utilizando PBS adicionado de uma suspensão celular também foi utilizado no ensaio, assim como um grupo controle positivo onde se preparou uma suspensão celular a qual foi adicionada de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $100 \mu\text{M}$ ).

#### 4.8.2 Método do Azul de Tripán

O método do Azul de Tripán avalia a viabilidade celular através da perda da integridade da membrana, procedimento descrito por Burow e colaboradores (1998). Uma alíquota celular proveniente das culturas de leucócitos foi misturada ao corante Azul de Tripán, colocada em câmara de Neubauer e visualizada no microscópio em aumento de 400x. A diferenciação entre células viáveis e inviáveis se deu pela observação da cor azul nas células inviáveis (Figura 2).

**Figura 2: Interpretação do teste de viabilidade celular (400X).**

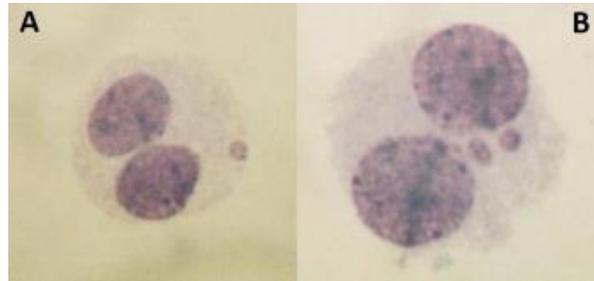


(Fonte: autor).

#### 4.8.3 Teste do micronúcleo

A avaliação da frequência de micronúcleos em linfócitos humanos foi avaliada através do Teste do Micronúcleo, de acordo com a técnica descrita por Schmid (1975). Nesta técnica, as lâminas foram analisadas em microscópio em um aumento de 1000x e classificadas de acordo com a presença de: células mononucleadas com a presença de um, dois ou três micronúcleos, além de células em necrose ou apoptose (Figura 3). Os resultados são apresentados como Índice de Divisão Nuclear, calculado de acordo com Fenech (2000).

**Figura 3: Interpretação do teste de micronúcleos (400X). Em “A” uma célula binucleada com um micronúcleo, e em “B” outra célula binucleada com três micronúcleos.**

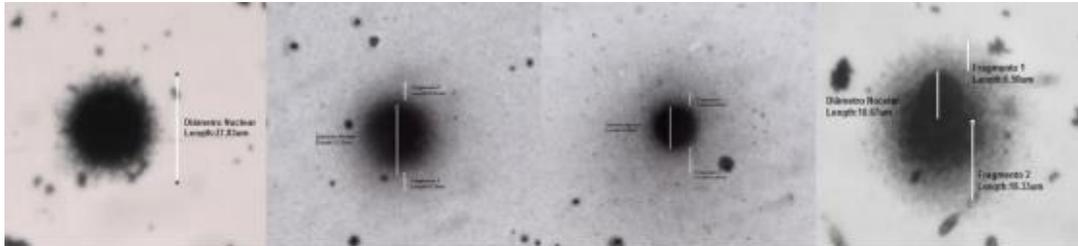


(Fonte: autor)

#### **4.8.4 Ensaio Cometa**

O Ensaio Cometa é realizado a partir da técnica descrita por Singh (1995). Após a incubação e homogeneização das amostras celulares com agarose de baixo ponto de fusão, as mesmas foram colocadas sobre lâminas pré-cobertas com agarose 1,5% e incubadas em solução de lise. Após, as lâminas foram submetidas à corrida eletroforética – 20 min, 300 mA, 25 V; em tampão NaOH 300 mM e pH>13. Posterior ao processo de eletroforese, as lâminas foram neutralizadas e secas em temperatura ambiente. Após secagem, as lâminas foram fixadas, secas novamente, reidratadas e coradas com solução de nitrato de prata. Os danos ao DNA foram classificados de acordo com o índice de dano, avaliado a partir da migração das proteínas do DNA, que pode variar de 0 (sem dano) até 4 (máximo de dano). O dano ao DNA foi calculado a partir das células com diferentes classificações de danos (Figura 4); o índice de dano varia de 0 (100 células x 0 quando não houve dano) a 400 (100 células x 4, quando ocorreu o máximo de dano).

**Figura 4: Interpretação do teste cometa (400X). Observamos, da esquerda para a direita, danos progressivos de zero até três.**



(Fonte: autor)

#### 4.8.5 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em software estatístico específico. As análises foram avaliadas por ANOVA de duas vias seguida de teste Post-Hoc de Dunnett's. Foram considerados significativos os resultados com valor de  $p < 0,05$ . Para os controles negativos (PBS pH 7,4) e positivos ( $H_2O_2$  100  $\mu M$ ) foram considerados significativos os resultados com valor de  $p < 0,0001$ .

#### 4.9 Controle de qualidade de comprimidos de Sildenafil apreendidos

Testes para controle de qualidade de formas farmacêuticas sólidas em dose unitária (determinação de peso, determinação de resistência mecânica, teste de desintegração e teste de dissolução) foram aplicados a amostra (comprimidos de SLD da marca Pramil<sup>®</sup> 50 mg) de acordo com os critérios estabelecidos pela Farmacopeia Americana (USP, 2014). As dimensões dos comprimidos (altura e diâmetro) foram determinadas utilizando paquímetro digital. A determinação do teor foi realizada de acordo com a metodologia por UFLC desenvolvida neste trabalho. As amostras de SLD foram disponibilizadas em cartelas individuais contendo 20 comprimidos (Figura 5) sem indicação da procedência (origem) das mesmas. Desta forma, considerando que os comprimidos da mesma cartela representariam um mesmo processo de produção, independente da procedência, cada cartela foi considerada um lote e submetida aos

procedimentos a seguir, utilizando um  $n = 3$  comprimidos para todos os testes de qualidade.

Figura 5. Amostra apreendida de Pramil® 50 mg.



(Fonte: autor)

#### 4.9.1 Determinação de resistência mecânica

##### 4.9.1.1 Teste de dureza

Para determinar a resistência dos comprimidos, estes foram submetidos à ruptura sob pressão radial através de aparelhagem específica. O teste foi realizado com três comprimidos, eliminando qualquer resíduo superficial antes de cada determinação. Os comprimidos foram testados, individualmente, obedecendo sempre à mesma orientação espacial. Nenhuma unidade testada deve apresentar dureza inferior a 30 Newtons ao final do teste (BRASIL, 2010; USP, 2014).

#### 4.9.3.1. Teste de friabilidade

Para a determinação da friabilidade, foram pesados três comprimidos e transferidos para o friabilômetro. A velocidade foi ajustada para 25 rotações por minuto e o tempo de teste para 4 minutos. Decorrido o intervalo, foi removido qualquer resíduo de pó da superfície dos comprimidos e os mesmos foram novamente pesados. Foram considerados aceitáveis os comprimidos com perda igual ou inferior a 1,5% do seu peso (BRASIL, 2010; USP, 2014).

#### 4.9.2 Teste de desintegração

Para avaliar a desintegração, foi adicionado um comprimido em cada cesta (n=3) e coberto com um disco. Como líquido de imersão, foi utilizando água na temperatura de 37 °C. O teste teve a duração de 30 minutos, conforme estabelecido como critério geral para comprimidos na farmacopeia (USP, 2014). Ao final do intervalo de tempo foi cessado o movimento da cesta e observado se o material foi completamente desintegrado (BRASIL, 2010; FDA, 2008; USP, 2014).

#### 4.9.3 Teste de dissolução

Devido à ausência de monografias oficiais para comprimidos de SLD, o teste de dissolução foi realizado conforme “*The Guidance for industry – Dissolution Testing and Specification*”, que estabelece os critérios e especificações do teste de dissolução para novas formas farmacêuticas sólidas orais que pertencem a Classe 1 ou Classe 3 pelo SCB (FDA, 2015a). Segundo ODRIOZOLA e colaboradores (2007), a SLD é um fármaco de Classe 1, com alta solubilidade e alta permeabilidade. Para esta classe, o guia estabelece as seguintes condições para o teste de dissolução: meio HCl 0,01 M (500 mL) à 37°C, 100 rotações por minuto, aparato cesta por 30 minutos. Desta forma, três comprimidos foram submetidos ao teste de dissolução nas condições estabelecidas pelo guia. Após o teste, 4 mL do meio foram transferidos para um balão volumétrico de

10 mL e o volume completado com água, obtendo-se a solução de trabalho na concentração de  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$  de SLD. Uma solução utilizando a SQR de SLD na mesma concentração foi preparada. As amostras foram devidamente filtradas e analisadas em UFLC, utilizando as condições estabelecidas no desenvolvimento do método para a determinação de SLD.

Como critério de aceitação, o produto deve cumprir as exigências descritas na Tabela 4. O termo Q corresponde à quantidade dissolvida de fármaco, expressa como porcentagem da quantidade declarada. Os valores 5%, 15% e 25% também representam porcentagens da quantidade declarada (USP, 2014).

**Tabela 4. Critérios de aceitação para o teste de dissolução de formas farmacêuticas de liberação imediata (USP, 2014 - adaptado).**

Estágios	Critérios de aceitação
$E_1$	Cada unidade apresenta resultado maior ou igual a $Q + 5\%$ .
$E_2$	Média ( $E_1 + E_2$ ) é igual ou maior que Q e nenhuma unidade apresenta resultado inferior a $Q - 15\%$ .
$E_3$	Média ( $E_1 + E_2 + E_3$ ) é igual ou maior do que Q, não mais que duas unidades apresentam resultados inferiores a $Q - 15\%$ e nenhuma unidade apresenta resultado inferior a $Q - 25\%$ .

#### 4.9.4 Determinação do teor

Para a determinação do teor da SLD na amostra apreendida, foi levado em consideração o valor do peso médio dos comprimidos ( $n=3$ ). Cerca de 2,25 mg de SLD foi pesada e transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 50 mL com o auxílio de 30 mL de metanol. Após a solução ser submetida a banho ultrassônico por 20 minutos, o volume foi completado com metanol, obtendo-se a solução de trabalho na concentração de  $45 \mu\text{g mL}^{-1}$  de SLD. Uma solução utilizando SQR foi preparada na mesma concentração. As amostras foram devidamente filtradas e analisadas em UFLC, utilizando as condições estabelecidas no desenvolvimento do método para a determinação de SLD. A partir da determinação do teor médio para cada lote ( $n=3$ ), foi

determinado o teor individual de cada comprimido (para fins de construção dos limites da carta controle).

#### **4.9.5 Avaliação do perfil físico de comprimidos**

##### **4.9.5.1 Altura e diâmetro dos comprimidos**

A medição das dimensões da altura e diâmetro do comprimido foi realizada a fim de se obter o perfil físico de cada amostra. Para a obtenção dos dados foi utilizado um paquímetro digital (CUSTERS et al, 2015). Três comprimidos de cada cartela foram analisados, obtendo-se valores médios e o DPR para diâmetro e altura.

##### **4.9.5.2 Determinação de peso de comprimidos**

Para verificar o peso médio dos comprimidos, foi determinada a massa de três comprimidos individuais utilizando uma balança analítica. Após determinar o peso médio, foram observados os critérios de avaliação para determinar o limite de variação permitido de acordo com a tabela 5 (BRASIL, 2010; USP, 2014).

**Tabela 5. Critérios de avaliação da determinação de peso para formas farmacêuticas sólidas em dose unitária (BRASIL, 2010).**

<b>Formas farmacêuticas em dose unitária</b>	<b>Peso médio</b>	<b>Limites de variação</b>
Comprimidos não revestidos ou revestidos com filme, comprimidos efervescentes, comprimidos sublinguais, comprimidos vaginais e pastilhas.	80 mg ou menos	± 10,0 %
	Mais que 80 mg e menos que 250 mg	± 7,5 %
	250 mg ou mais	± 5,0
Comprimidos com revestimento açucarado (drágeas)	25 mg ou menos	± 15,0 %
	Mais que 25 mg e até 150 mg	± 10,0 %
	Mais que 150 mg e menos que 300 mg	± 7,5 %
Cápsulas duras e moles, cápsulas vaginais	300 mg ou mais	± 5,0 %
	Menos que 300 mg	± 10,0 %
Supositórios e óvulos	300 mg ou mais	± 7,5 %
Independente do peso médio		± 5,0 %
Pós estéreis, pós liofilizados e pós para injetáveis	Mais que 40 mg	±10,0 %
Pós para reconstituição (uso oral)	Menos que 300 mg	± 10,0 %
	300 mg ou mais	± 7,5 %

#### **4.9.6 Avaliação de comprimidos de Sildenafil através do Controle Estatístico de Processo**

O CEP foi aplicado com o objetivo de verificar se existe variação nas características físicas (altura, diâmetro e peso), no percentual dissolvido e no teor dos comprimidos de SLD apreendidos, já que não havia informação sobre a procedência da amostra. Visto que as cartas controle são úteis para verificar a variação entre as amostras de um lote ou a variação entre lotes, as cartas controle clássicas de Shewhart foram interpretadas em função do LSC, LM e LIC, sendo os valores obtidos através das equações 3, 4 e 5 respectivamente.

$$LSC = X + 3 \cdot \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

$$LM = X \quad (4)$$

$$LIC = X - 3 \cdot \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \quad (5)$$

Onde: X é a média das amostras,  $\sigma$  o desvio padrão entre as amostras e n é o tamanho da amostra (este definido pelo número de amostra do lote em estudo) (WARHOLAK & NAU, 2010).

O processo é considerado estatisticamente estável se a distribuição dos pontos na carta controle for aleatória em torno da linha média, sem que haja tendências crescentes ou decrescentes, ciclos ou pontos fora dos limites de controle (RAMOS, 2000).

#### **4.9.7 Análise multivariada aplicada ao perfil físico de comprimidos de Sildenafil**

A avaliação dos dados referentes ao perfil físico dos comprimidos foi realizada com o intuito de verificar se estas características poderiam indicar alguma similaridade entre os lotes de procedência desconhecida. Para isto, a análise multivariada de dados foi aplicada devido a sua capacidade de avaliar mais de uma variável simultaneamente, podendo indicar uma correlação entre elas através de métodos de classificação, como o HCA (RIBEIRO et al., 2007).

O pré-processamento utilizado foi autoescalamento de dados, que consiste em centrar os dados na média e dividir pelo respectivo desvio padrão (GELADI & KOWALSKI, 1986). A análise multivariada foi realizada através do software The Unscrambler® X (CAMO, USA). Para o método de HCA, foi avaliada a formação de *clusters* no dendrograma (considerando peso, altura e diâmetro como variáveis) e o percentual de similaridade entre as amostras. O índice de similaridade  $\geq 70\%$  foi considerado satisfatório na avaliação da formação dos grupos.

#### **4.9.8 Análise multivariada aplicada ao perfil químico de comprimidos de Sildenafil**

A avaliação dos dados referentes ao perfil químico dos comprimidos foi realizada com o intuito de verificar se estas características poderiam indicar alguma similaridade entre os lotes de procedência desconhecida. A partir de um mistura obtida através de três comprimidos triturados de uma mesma cartela, uma pequena quantidade da amostra foi transferida para o espectrofotômetro de IV médio. A aquisição do espectro foi realizada através do método ATR. Para cada lote, foi realizada uma análise em triplicata, obtendo-se um espectro médio. As condições de análise utilizadas foram: região entre  $1800 - 650 \text{ cm}^{-1}$ , resolução  $1 \text{ cm}^{-1}$  e média de 16 varreduras. A análise dos dados obtidos foi realizada através do software The Unscrambler® X (CAMO, USA), utilizando o método de HCA. Os dados espectrais foram pré-processados através da centralização na média. A formação de *clusters* no dendrograma foi avaliada através do percentual de similaridade entre as amostras

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

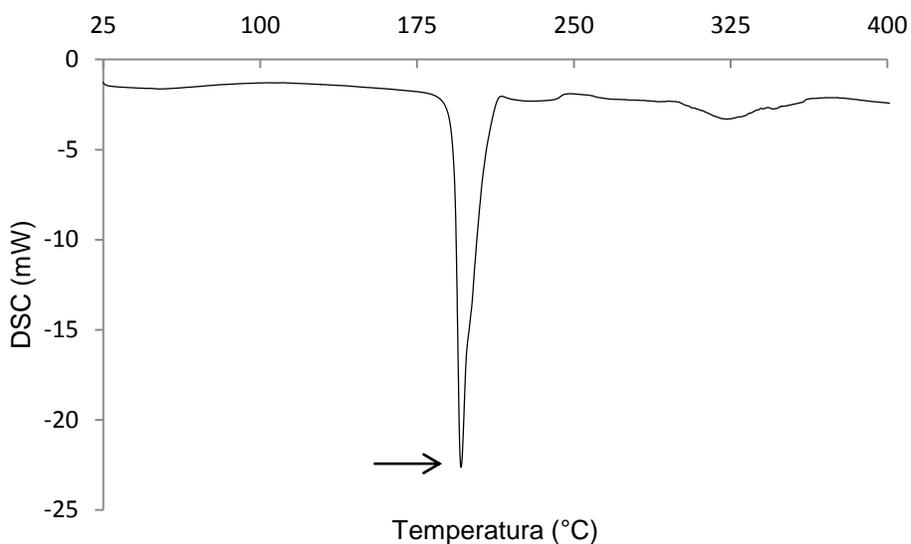
### 5.1 Caracterização da substância química de referência

A matéria-prima SLD, adquirida da empresa Pharmanostra (São Paulo, SP), foi submetida aos testes descritos abaixo com o objetivo, a partir da sua caracterização físico-química, utilizá-la como SQR.

#### 5.1.1 Análise térmica calorimetria exploratória de varredura

A Figura 6 mostra a curva DSC obtida na análise de SLD. Observa-se o pico endotérmico na temperatura de 196 °C, estando próximo dos valores obtidos experimentalmente pelo método de capilar (faixa de 192,3°C a 193,2°C) e de acordo com os valores do ponto de fusão para SLD descritos na literatura (BARROS, 2014).

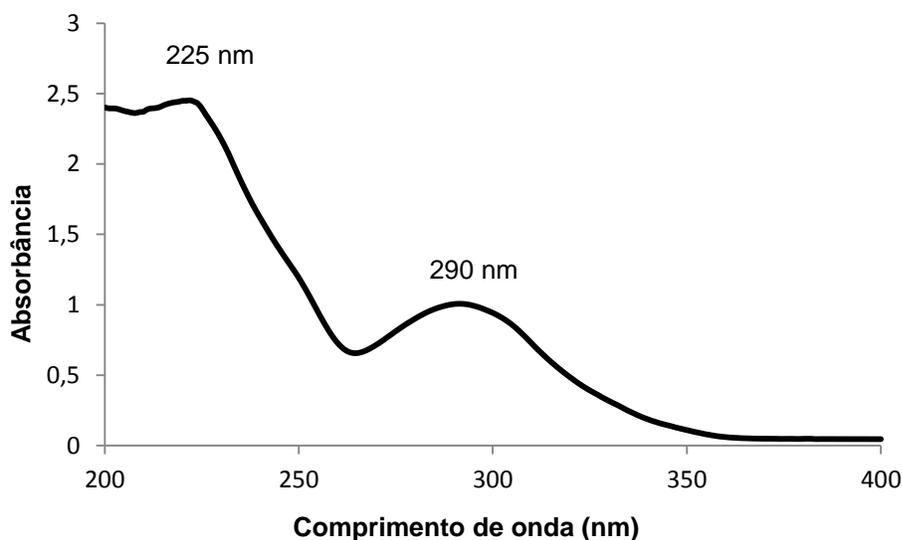
Figura 6. Curva obtida através da análise por calorimetria exploratoria de varredura.



### 5.1.3 Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta

O espectro de absorção na região do UV está representado na Figura 7. Foram observados os máximos de absorção em 225 nm e 290 nm, de acordo com o descrito em trabalho realizado por Ortiz e colaboradores (2010).

Figura 7. Espectro de absorção na região do UV da SQR de SLD.

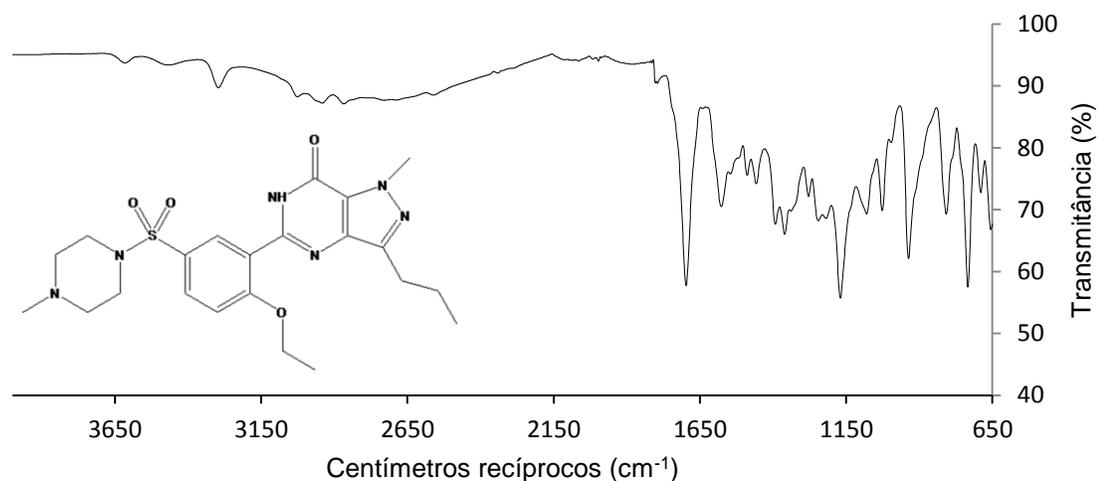


### 5.1.4 Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho

O espectro de absorção na região do IV da SQR da SLD está representado na Figura 8, onde é possível identificar bandas características referentes ao anel lactama da estrutura química, sendo uma banda forte referente às vibrações de estiramento da ligação C=O entre  $1690\text{ cm}^{-1}$  e  $1630\text{ cm}^{-1}$ , e outra banda referente à amida monossubstituída, ligação R-CO-NH-R, em aproximadamente em  $3300\text{ cm}^{-1}$ . Pode-se também observar a presença de duas bandas referentes ao grupo sulfonamida, uma de estiramento assimétrico e outra de estiramento simétrico da ligação S=O próximo a  $1325\text{ cm}^{-1}$  e  $1140\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Também está presente a absorção do estiramento da ligação N-H para aminas alifáticas entre  $1250\text{ cm}^{-1}$  e  $1000\text{ cm}^{-1}$  e aminas

aromáticas entre  $1350\text{ cm}^{-1}$  e  $1250\text{ cm}^{-1}$ . O grupo éter arílico (Ar-O-R) da estrutura da SLD geram duas bandas de estiramento assimétrico próximo em  $1250\text{ cm}^{-1}$  (BARROS, 2014; PAVIA et al, 2012).

**Figura 8. Espectro obtido na região do IV médio da SQR de SLD.**



## 5.2 Desenvolvimento do método analítico por UFLC

Para a definição da condição cromatográfica mais adequada para a quantificação de SLD, foram levados em consideração os parâmetros de adequabilidade do sistema para as diferentes condições testadas. Estes parâmetros são aplicados com a finalidade de verificar se a resolução e a reprodutibilidade do sistema cromatográfico estão adequadas para as análises a serem realizadas (BRASIL, 2010).

Os principais parâmetros necessários para a verificação da adequabilidade do sistema são tempo de retenção ( $T_R$ ) da substância, o número de pratos teóricos (N), o fator de cauda (T) e o fator de capacidade (K). O valor de N indica a eficiência da coluna na separação, e o resultado deve apresentar valores maiores que 2000. O valor de T indica a simetria do pico, que apresenta valor igual a 1,0 quando o pico é perfeitamente simétrico, sendo considerados aceitáveis valores até 2,0. O K representa

a razão entre a quantidade da substância com afinidade pela fase estacionária e a quantidade com afinidade pela fase móvel. Quanto maior a afinidade da substância pela fase estacionária, maior será a sua retenção. Os valores ideais de K devem ser superiores a 2,0 (BRASIL, 2010).

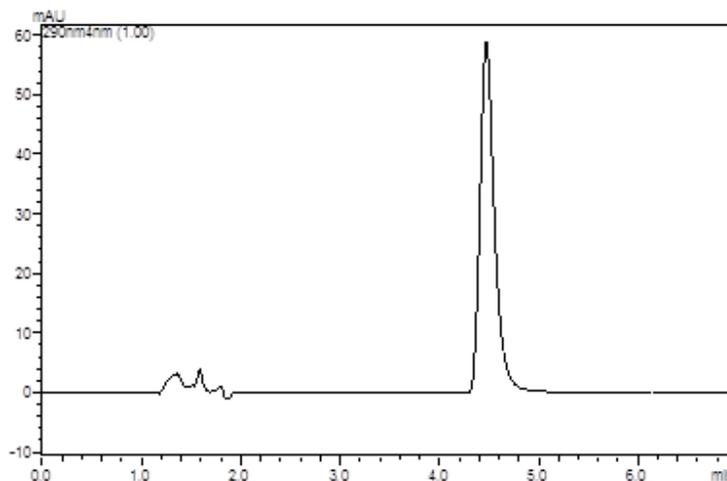
A Tabela 6 apresenta os valores da adequabilidade do sistema para as condições testadas utilizando para a detecção do sinal o comprimento de onda de 290 nm.

**Tabela 6. Parâmetros de adequabilidade do sistema para as condições testadas para no desenvolvimento do método.**

	Condição	T <sub>R</sub>	T	N	K
1	50% ACN - 50% TEA - Fluxo 0,7 - pH 3,0	2,82	1,52	3544,10	1,12
2	50% ACN - 50% TEA - Fluxo 0,7 - pH 4,0	2,92	1,34	4781,98	1,14
3	50% ACN - 50% TEA - Fluxo 0,8 - pH 3,0	2,48	1,53	3512,22	1,13
4	50% ACN - 50% TEA - Fluxo 0,8 - pH 4,0	2,56	1,35	4667,12	1,18
5	50% ACN - 50% TEA - Fluxo 0,9 - pH 3,0	2,21	1,55	3476,57	1,11
6	50% ACN - 50% TEA - Fluxo 0,9 - pH 4,0	2,77	1,54	3683,29	1,67
7	40% ACN - 60% TEA - Fluxo 0,7 - pH 3,0	3,78	1,56	3780,00	1,97
<b>8</b>	<b>40% ACN - 60% TEA - Fluxo 0,7 - pH 4,0</b>	<b>4,47</b>	<b>1,33</b>	<b>5232,94</b>	<b>2,86</b>
9	40% ACN - 60% TEA - Fluxo 0,8 - pH 3,0	3,31	1,57	3660,25	2,43
10	40% ACN - 60% TEA - Fluxo 0,8 - pH 4,0	4,30	1,44	3617,26	2,99
11	40% ACN - 60% TEA - Fluxo 0,9 - pH 3,0	2,95	1,59	3679,04	1,93
12	40% ACN - 60% TEA - Fluxo 0,9 - pH 4,0	3,82	1,64	3627,52	2,55
13	60% ACN - 40% TEA - Fluxo 0,7 - pH 3,0	2,65	1,52	3428,91	1,13
14	60% ACN - 40% TEA - Fluxo 0,7 - pH 4,0	2,48	1,28	4556,03	0,88
15	60% ACN - 40% TEA - Fluxo 0,8 - pH 3,0	2,32	1,54	3352,30	1,12
16	60% ACN - 40% TEA - Fluxo 0,8 - pH 4,0	2,17	1,30	4431,70	0,48
17	60% ACN - 40% TEA - Fluxo 0,9 - pH 3,0	2,06	1,55	3323,26	1,06
18	60% ACN - 40% TEA - Fluxo 0,9 - pH 4,0	1,93	1,31	4392,89	0,90

O cromatograma referente à condição 8 está demonstrado na Figura 9.

**Figura 9. Cromatograma da SLD SQR na condição estabelecida: ACN:TEA 0,3% pH 4,0 (ajustado com ácido fórmico) na proporção 40:60 (v/v).**



A condição 8 foi definida como a mais adequada para realizar a validação do método, pois apresentou os melhores resultados nos parâmetros de adequabilidade do sistema.

### 5.3 Validação do método analítico por UFLC

A validação de método analítico tem por finalidade assegurar a confiabilidade dos resultados gerados a partir do método, fornecendo evidências que este é adequado para finalidade pretendida. Com o objetivo de garantir a confiabilidade do método analítico desenvolvido neste trabalho foram avaliados os parâmetros de especificidade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez.

#### 5.3.1 Especificidade

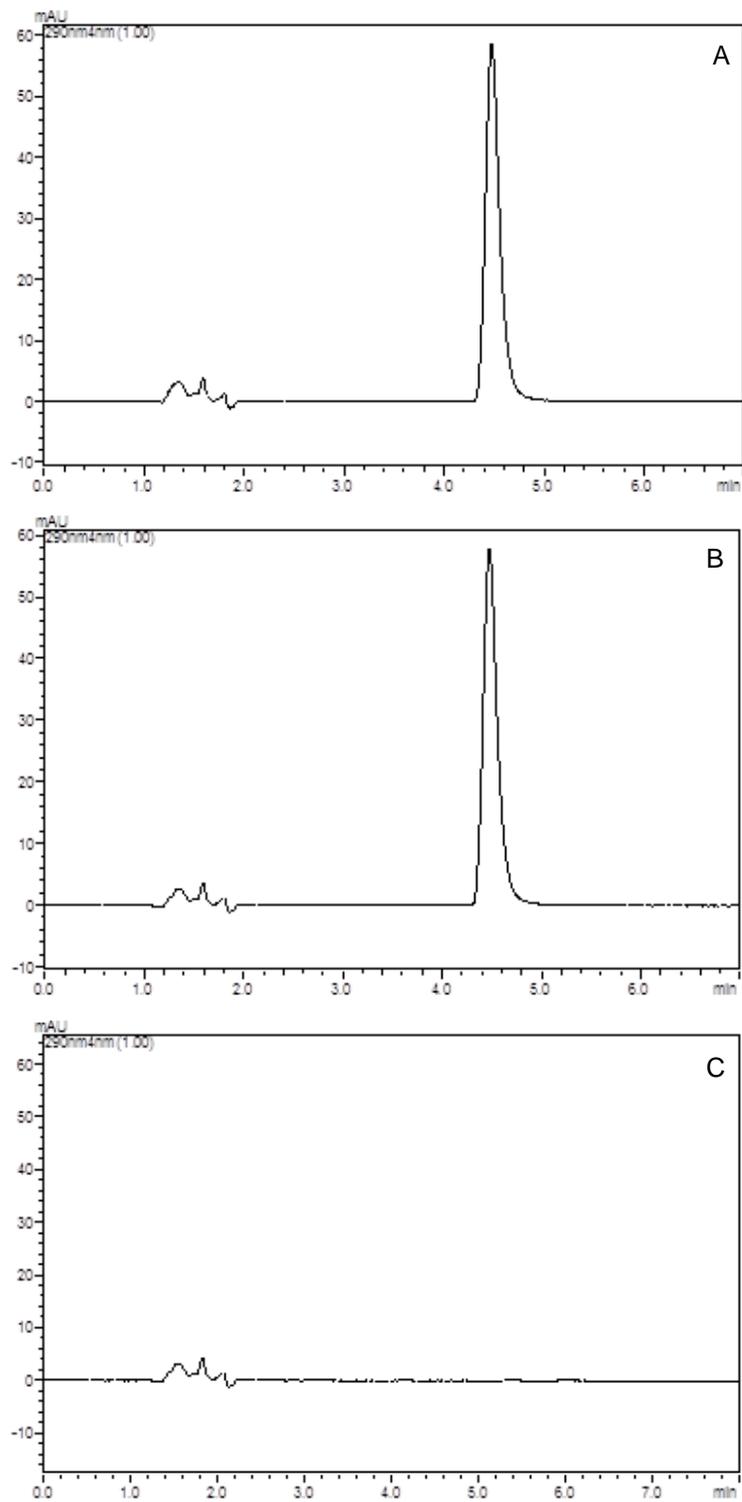
A especificidade do método para a quantificação de SLD em comprimidos por UFLC foi avaliada frente aos excipientes presentes na formulação e aos potenciais produtos de degradação do fármaco.

### **5.3.1.1 Avaliação da interferência dos excipientes da formulação**

A interferência dos excipientes da formulação na quantificação de SLD foi avaliada através da análise das soluções de SLD SQR, SLD produto farmacêutico e amostra simulada de excipientes. Os cromatogramas das respectivas soluções estão apresentados na Figura 10.

Observando os cromatogramas, verifica-se a ausência de picos interferentes referentes aos excipientes, no mesmo tempo de retenção da SLD. A pureza do pico foi de 99,99%, utilizando detector DAD e referente a uma solução de SLD obtida a partir do produto farmacêutico. Desta forma, sugere-se a ausência de impurezas co-eluídas no mesmo tempo de retenção da SLD, indicando que o método é específico para a quantificação do fármaco na presença dos excipientes da formulação.

Figura 10. Cromatogramas das soluções (a) SLD SQR, (b) SLD produto farmacêutico e (c) amostra simulada de excipientes.



### 5.3.1.2 Avaliação da interferência dos produtos de degradação

O fármaco foi submetido às seguintes condições de estresse: degradação fotolítica, térmica, oxidativa, ácida e básica. A degradação teve como finalidade induzir a formação de possíveis produtos de degradação e avaliar a interferência desses sobre a quantificação da SLD. As condições envolvendo a degradação ácida, básica e oxidativa foram mais drásticas que o usual devido a não degradação do fármaco em condições mais brandas. Na Tabela 7 é possível observar os percentuais de degradação do fármaco nas diferentes condições testadas.

**Tabela 7. Percentual degradação nas diferentes condições de degradação.**

Degradação	Condição	% degradado
Fotolítica	UVC-254 nm por 5 horas (Solvente Água)	63,0
Fotolítica	UVC-254 nm por 2 horas (Solvente Metanol)	76,3
Térmica	Estufa a 55 °C por 72 horas	-
Oxidativa	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10% por 72 horas	8,3
Ácida	Refluxo HCL 1 mol L <sup>-1</sup> por 6 horas	-
Básica	Refluxo NaOH 1 mol L <sup>-1</sup> por 6 horas	-

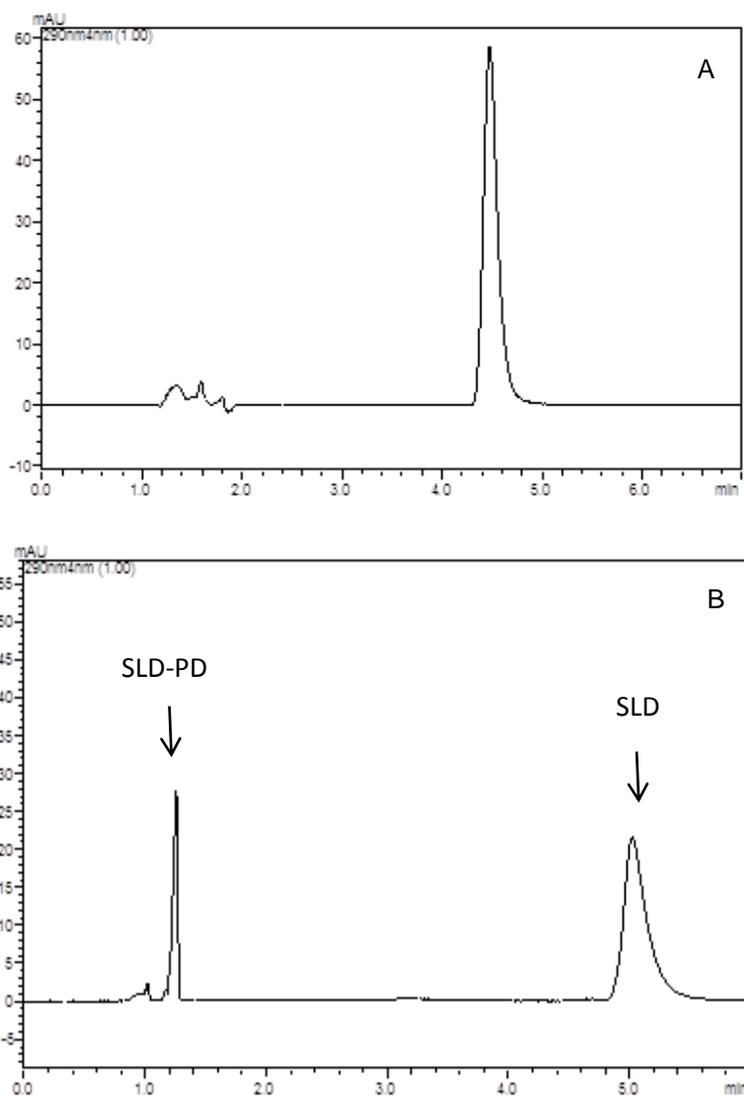
#### 5.3.1.2.1 Degradação fotolítica

Com o objetivo de avaliar a utilização de diferentes solventes e verificar a sua respectiva influência na formação de possíveis produtos de degradação da SLD frente a exposição fotolítica, amostras de SLD SQR foram preparadas utilizando água e metanol e expostas separadamente na câmara de UVC-254 nm e posteriormente analisadas por UFLC.

Os cromatogramas obtidos para a solução de SLD SQR no tempo zero e após ser submetido à radiação UVC-254 nm durante 2 horas utilizando água como solvente, estão representados na Figura 11. A incidência de radiação produziu o aparecimento de

um pico adicional no tempo de retenção de 1,25 minutos. Ocorreu uma diminuição de teor do fármaco para 53,54%, com pureza de pico 99,99%.

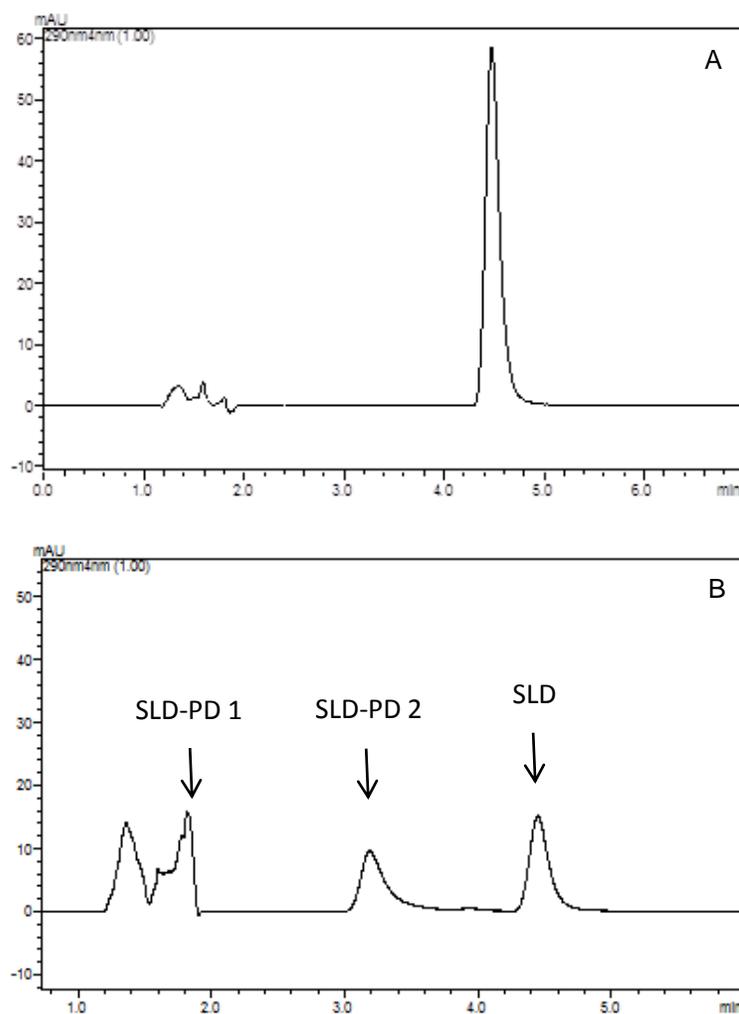
**Figura 11. Cromatogramas da degradação forçada da SLD SQR após ser submetido à exposição de radiação UV a 254 nm; (a) Tempo zero e (b) após 2 horas de exposição utilizando água como solvente.**



Já para a solução de SLD SQR utilizando solvente metanólico, os cromatogramas no tempo zero e após ser submetido à radiação UVC-254 nm durante 2 horas estão representados na Figura 12. A incidência de radiação produziu o

aparecimento de dois picos adicionais nos tempos de retenção de 1,92 minutos e 3,18 minutos. Ocorreu uma diminuição de teor do fármaco para 23,68%, com pureza de pico 99,99%.

**Figura 12. Cromatogramas da degradação forçada da SLD SQR após ser submetido à exposição de radiação UV a 254 nm; (a) Tempo zero e (b) após 2 horas de exposição utilizando metanol como solvente.**



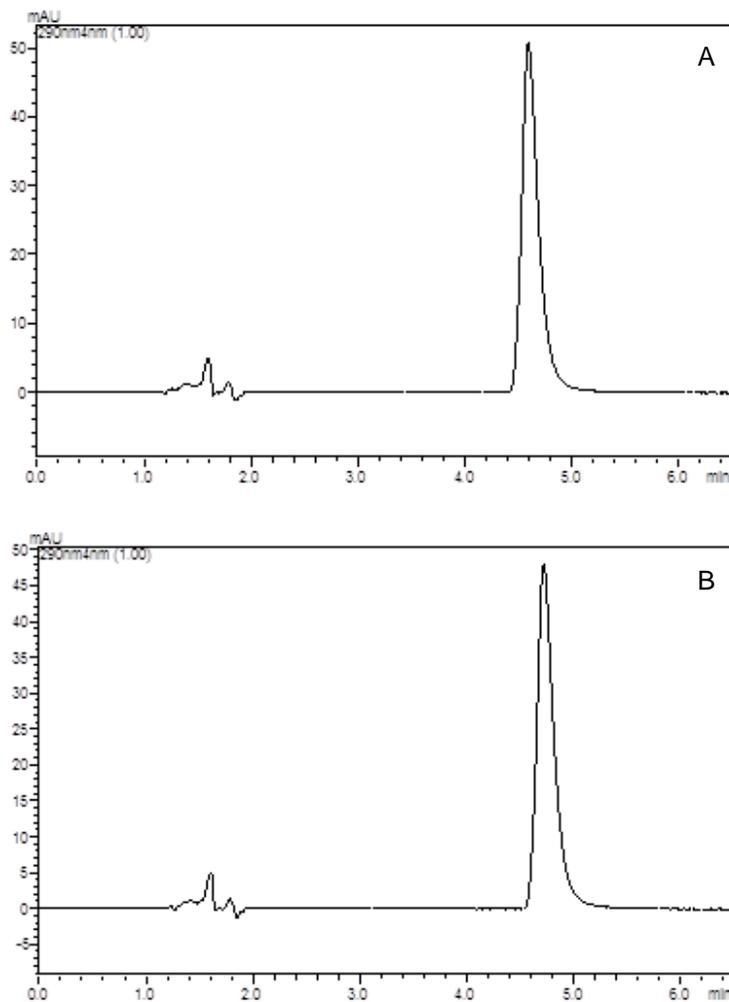
Observa-se que as condições utilizadas na degradação fotolítica formaram diferentes produtos de degradação, estes identificados em tempos de retenção e com

espectros no UV distintos. Sugere-se que o solvente influencia na velocidade de degradação e na formação de produtos frente à exposição fotolítica, sendo estes formados através de mecanismos de degradação diferentes. Apesar de ambas as condições formarem produtos de degradação com tempos de retenção semelhantes (1,25 minutos para o solvente água e 1,92 para o solvente metanol), estes se diferem no espectro UV obtido através do detector DAD, o que sugere que são produtos de degradação diferentes. Independente do solvente utilizado, o método se mostrou específico e apropriado para a quantificação da SLD frente aos fotoprodutos formados.

#### **5.3.1.2.2 Degradação térmica**

A degradação térmica da SLD SQR a 55°C por 72 horas não produziu o aparecimento de picos referentes a potenciais produtos de degradação, conforme demonstrado na Figura 13. O teor obtido do fármaco foi de 102,07% e pureza de pico de 99,99%.

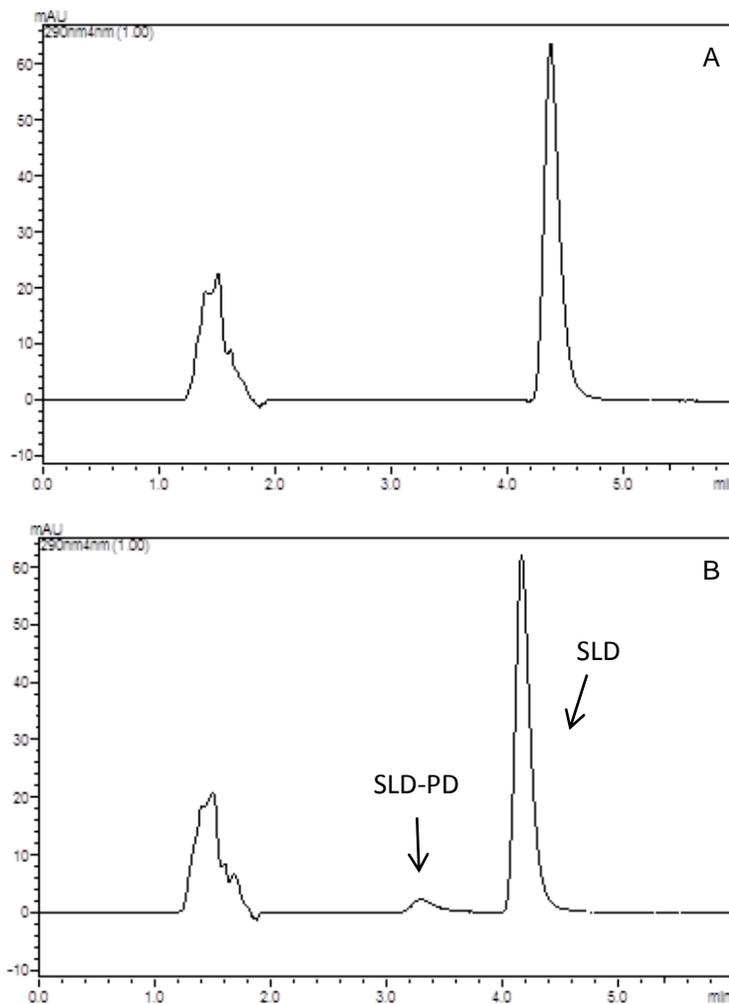
Figura 13. Cromatogramas da degradação forçada da SLD SQR após ser submetido à degradação térmica por a 55°C por 72 horas (a) Tempo zero e (b) após 72 horas.



### 5.3.1.2.3 Degradação oxidativa

A Figura 14 apresenta os cromatogramas obtidos para a SLD SQR no tempo zero e após ser submetido à oxidação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% por 72 horas. Observou-se a formação de um pico no tempo de retenção de 3,30 minutos. O fármaco teve seu teor reduzido para 92,73%, e a pureza do pico determinada foi em 99,99%.

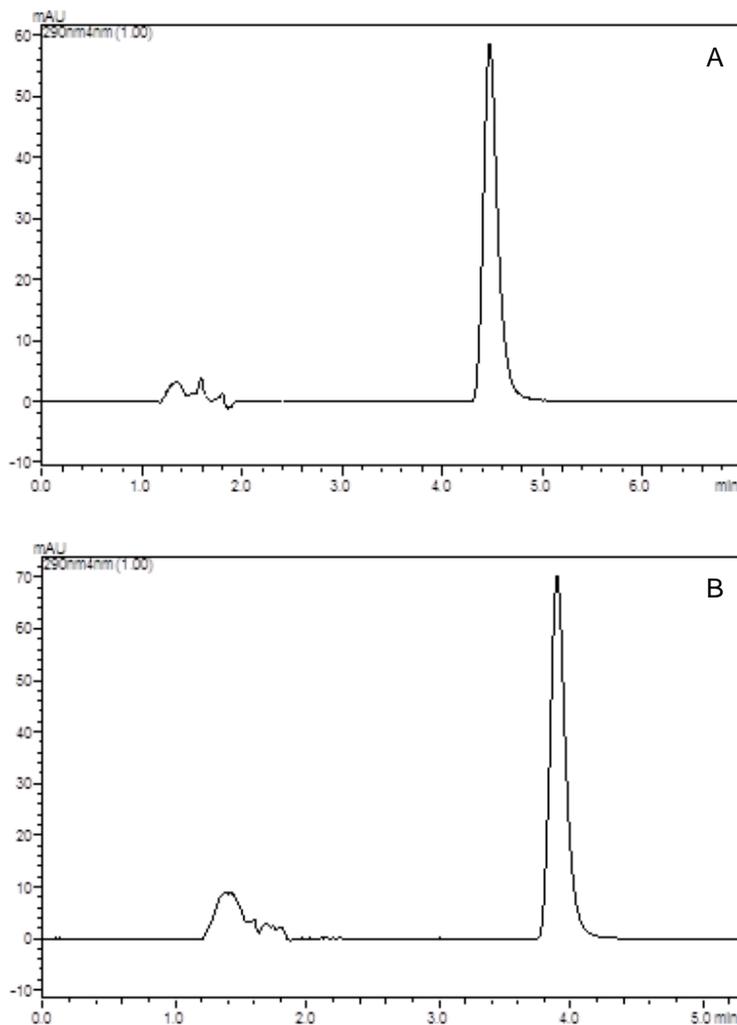
Figura 14. Cromatogramas da degradação forçada da SLD SQR após ser submetido à hidrólise com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10%; (a) Tempo zero e (b) após 72 horas.



#### 5.3.1.2.4 Degradação ácida

A Figura 15 mostra o cromatograma obtido para a solução de SLD SQR no tempo zero e após ser submetido à hidrólise ácida (HCl 1 mol L<sup>-1</sup>) em refluxo a 80°C, durante 6 horas. Não houve a formação de picos referentes a potenciais produtos de degradação. O teor obtido do fármaco foi de 100,85%. A pureza do pico obtida foi de 99,99%.

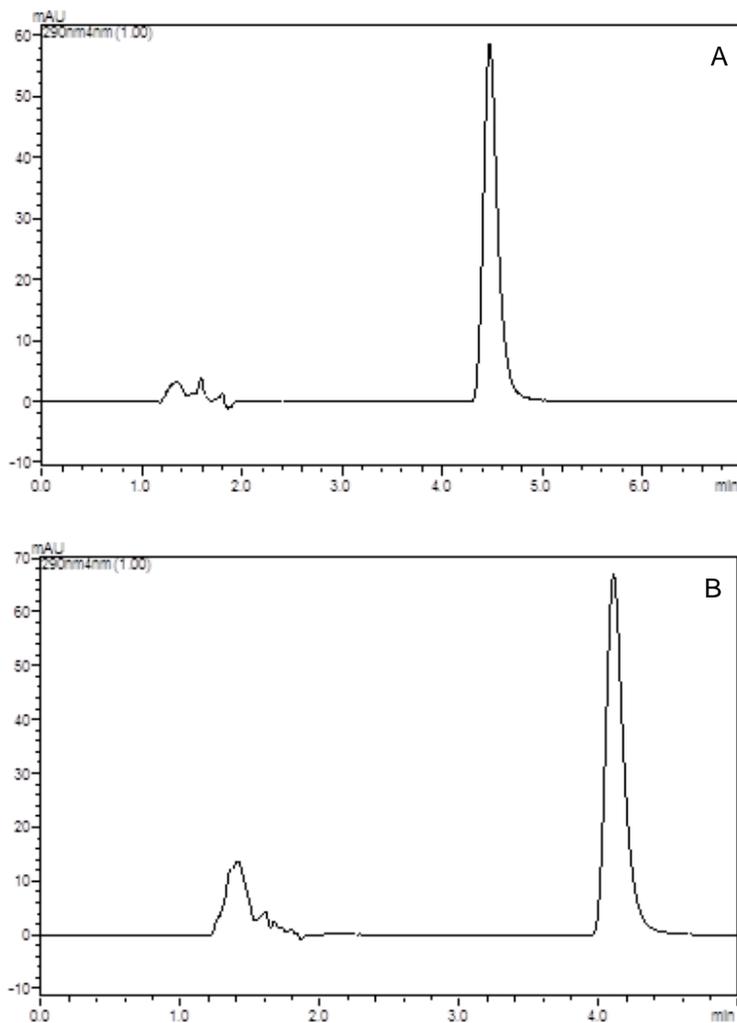
Figura 15. Cromatogramas da degradação forçada da SLD SQR após ser submetido à hidrólise ácida em HCl 1 mol L<sup>-1</sup> em refluxo a 80°C; (a) Tempo zero e (b) após 6 horas.



#### 5.3.1.2.5 Degradação básica

Os cromatogramas obtido para a solução de SLD SQR no tempo zero e após ser submetido à hidrólise básica (NaOH 1 mol L<sup>-1</sup>) em refluxo a 80°C, durante 6 horas estão representados na Figura 16. Não houve a formação de picos referentes a potenciais produtos de degradação. O teor obtido do fármaco foi de 101,88%. A pureza do pico obtida foi de 99,99%.

Figura 16. Cromatogramas da degradação forçada da SLD SQR após ser submetido à hidrólise básica em NaOH 1 mol L<sup>-1</sup> em refluxo a 80°C; (a) Tempo zero e (b) após 6 horas.

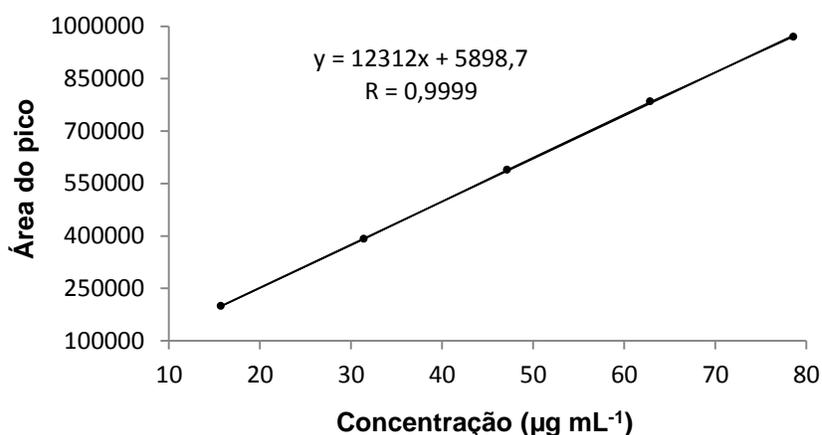


Após avaliar as diferentes condições de estresse (degradação fotolítica, térmica, oxidativa, ácida e básica), o método foi considerado específico frente aos produtos de degradação formados, pois estes não interferiram na quantificação do fármaco. A pureza do pico obtido para a SLD através do detector DAD em todas as condições propostas foi superior a 0,9999, sugerindo a ausência de impurezas co-eluídas no mesmo tempo de retenção da SLD.

### 5.3.2 Linearidade

A linearidade do método foi determinada por meio da construção de uma curva de calibração com a SQR de SLD. O método demonstrou ser linear na faixa entre 15,0 a 75,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A curva média, a equação da reta e o coeficiente de correlação estão representados na Figura 17.

Figura 17. Curva de calibração média de SLD.



O valor de  $r$  obtido foi de 0,9999, o que demonstra alta correlação, indicando que os resultados obtidos estão diretamente proporcionais à concentração do fármaco. Para comprovar a linearidade do método, foi realizada análise estatística da regressão linear através da ANOVA, conforme demonstrado na Tabela 8. Os resultados obtidos apresentam valor para  $F$  calculado superior ao valor do  $F$  tabelado para a regressão linear. Para o desvio da linearidade o valor de  $F$  calculado foi menor que o valor tabelado, o que comprova com 95% de confiança que houve regressão linear sem haver desvio da linearidade, o que comprova a linearidade do método.

**Tabela 8. Análise de Variância para a avaliação da linearidade do método proposto.**

Fontes de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	F calculado	F tabelado
Entre concentrações	4	1123195264781,35	187199210796,89	608,84	3,22
Regressão linear	1	1123193540379,22	1123193540379,22	3653,03	4,96
Desvio de linearidade	3	1724402,13	574800,71	0,143	3,33
Resíduo	10	3074686727,89	307468672,79	0,011	
Total	14	1126269951509,24	80447853679,23		

\* Significativo para  $p < 0,05$ .

### 5.3.3 Limites de detecção e quantificação

Os LD e LQ calculados a partir das curvas de calibração obtidas foram estimados em  $1,36 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $4,14 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, demonstrando a sensibilidade do método proposto.

### 5.3.4 Precisão

A precisão foi determinada em termos de repetibilidade (precisão intradia) e precisão intermediária (precisão interdia) pela análise de seis soluções do produto farmacêutico de SLD na concentração de  $45,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  no mesmo dia e em dias diferentes, respectivamente. Os resultados encontram-se na Tabela 9 e demonstram que o método foi preciso, com valores de DPR máximo de 1,80%.

**Tabela 9. Valores de repetibilidade e precisão intermediária.**

Amostras	Repetibilidade			Precisão intermediária
	Dia 1 (%)*	Dia 2 (%)*	Dia 3 (%)*	
1	101,77	98,02	97,66	
2	99,85	97,72	100,14	
3	104,72	101,88	97,59	-
4	103,33	99,77	101,95	
5	103,14	97,68	99,29	
6	100,79	98,38	101,19	
Média	102,46	98,20	97,66	100,13
DPR (%)	1,79	1,64	1,80	1,74

\*Analistas diferentes.

### 5.3.5 Exatidão

A exatidão do método analítico foi comprovada por meio da determinação da porcentagem de recuperação avaliada através da adição de quantidades conhecidas da solução de SLD SQR na solução amostra simulada de excipientes. Os resultados podem ser observados na Tabela 10, com porcentagem de recuperação média das quantidades adicionadas, entre 99,50% e 101,07%, o que demonstra a exatidão do método.

Tabela 10. Resultados da porcentagem de recuperação para a determinação da exatidão.

Concentração teórica ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Concentração real ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Recuperação (%)
30,71	30,81	100,32
30,71	31,03	101,04
30,71	30,69	99,93
46,07	46,56	101,07
46,07	46,43	100,79
46,07	46,20	100,28
61,42	61,45	100,06
61,42	61,32	99,84
61,42	61,11	99,50
Recuperação <sub>m</sub> (%)		100,31
DPR <sub>m</sub> (%)		0,55

m = média

### 5.3.6 Robustez

A robustez do método analítico determinada utilizando o desenho experimental de Plackett–Burman permitiu a avaliação do efeito de diversos fatores na análise cromatográfica. O efeito de cada um dos fatores analisados no experimento e o valor de  $t$  calculado estão dispostos na Tabela 11.

**Tabela 11. Resultados dos efeitos e valores de  $t$  calculado para cada fator analisado no teste de robustez.**

Fator	Efeito (%)	$t$ calculado
pH	-0,12	0,56
Temperatura	0,16	0,71
Detecção	0,00	0,02
% de ACN	-0,03	0,11
Coluna	0,37	1,68
Fluxo	-0,43	1,92

$t$  tabelado (0,05; 5) = 2,57 ; Erro Experimental ( $E_e$ ) = 0,223

Os teores obtidos para cada experimento indicado na Tabela 3 estão apresentados na Tabela 12.

**Tabela 12. Teores obtidos no ensaio de robustez através do desenho experimental de Plackett-Burman para a Sildenafil.**

Experimento	Teor da SLD (%)
1	98,96
2	99,54
3	99,50
4	99,36
5	99,74
6	99,36
7	98,50
8	99,55
9	98,88
10	98,57
11	99,53
12	99,09

Após calcular o efeito para cada fator estudado, foi aplicado o Teste *t de student*, através da comparação entre o valor de  $t$  calculado para cada fator e o valor de  $t_{(0,05; 5)}$

bicaudal tabelado (2,57). O Teste *t de student* demonstrou que os efeitos oriundos de cada fator avaliado não ocasionaram em diferenças significativas na quantificação da SLD. O método apresentou um erro experimental no valor de 0,223. A partir dos resultados obtidos no teste de robustez, pode-se afirmar que o método proposto é robusto frente aos fatores avaliados.

Após a validação do método, os comprimidos de SLD (Viagra<sup>®</sup>) foram avaliados e apresentaram um teor de 97,37%.

#### 5.4 Cinética de fotodegradação da sildenafil

A exposição à radiação UVC-254 nm produziu os maiores percentuais de degradação no fármaco em estudo. Por este motivo, esta condição foi escolhida para estudos sobre cinética química e avaliação de segurança biológica. Na avaliação da cinética de fotodegradação foi possível observar que a degradação da SLD é diretamente influenciada pelo solvente utilizado. Os coeficientes de correlação obtidos para cada solvente estão demonstrados na Tabela 13, sendo que de acordo com a condição utilizada, a cinética de degradação obedece a uma diferente ordem de reação. Para o solvente água, a degradação obedeceu a uma cinética de primeira ordem. Já para o solvente metanol, a degradação obedeceu a uma cinética de zero ordem.

Tabela 13. Coeficientes de correlação (r) obtidos na determinação da ordem de reação.

Ordem de reação	Solvente Água	Solvente Metanol
	R	R
Zero ordem	0,9665	<b>0,9978</b>
Primeira ordem	<b>0,9920</b>	0,9527
Segunda ordem	0,9395	0,9299

Na tabela 14 estão dispostos os valores dos parâmetros cinéticos para a degradação da SLD, sendo estes calculados de acordo com a ordem de reação (SINKO, 2008).

Tabela 14. Parâmetros cinéticos para degradação da Sildenafil em diferentes solventes.

Parâmetro	Solvente água	Parâmetro calculado	Solvente metanol	Parâmetro calculado
$t_{50}$	$5,1140 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$	$t_{50} = \frac{0,693}{k}$	$4,7146 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$	$t_{50} = \frac{Co}{2k}$
$t_{90}$	$7,8223 \cdot 10^2 \text{ s}^{-1}$	$t_{90} = \frac{0,106}{k}$	$9,4292 \cdot 10^2 \text{ s}^{-1}$	$t_{90} = \frac{0,1 \cdot Co}{k}$
K	$1,3551 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	$k = \frac{2,303}{t} \cdot \log \frac{Co}{C}$	$4,8330 \cdot 10^{-3} \mu\text{g mL}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$k = \frac{dC}{dt}$

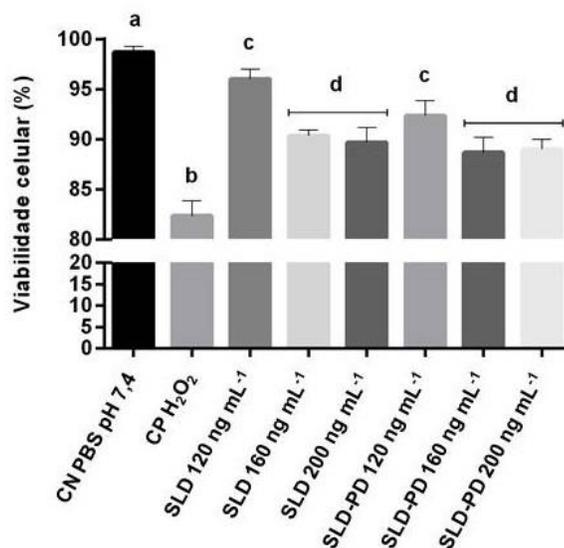
Observa-se que a velocidade de degradação da SLD obtida no solvente metanol foi maior do que no solvente água, sugerindo-se que a fotodegradação é facilitada em meio menos polar. Segundo Ahmad e colaboradores (2013), a polaridade, a constante dielétrica e a viscosidade dos solventes são fatores que podem influenciar na fotodegradação dos fármacos. Entretanto, são necessários mais estudos em solventes com diferentes polaridades para avaliar a cinética de degradação da SLD, a fim de averiguar se existe a relação entre a constante de velocidade de fotodegradação do fármaco, associada à constante dielétrica e a viscosidade dos solventes.

### 5.5 Segurança biológica de sildenafil

A segurança biológica da SLD bem como dos fotoprodutos de degradação (SLD-PD) foram avaliados a partir dos testes de citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade. Os fotoprodutos obtidos a partir da degradação utilizando o solvente água foram utilizados devido a toxicidade do solvente metanol frente a cultura celular. As concentrações de estudo foram definidas a partir da concentração plasmática da SLD. O efeito da SLD e da SLD-PD sobre a viabilidade celular está demonstrado na Figura 18. A viabilidade celular apresentou diminuição em relação ao controle negativo na concentração de  $120 \text{ ng mL}^{-1}$  para ambos os grupos testados. Para as concentrações de  $160 \text{ ng mL}^{-1}$  e  $200 \text{ ng mL}^{-1}$  (em ambos os grupos), os percentuais de viabilidade celular atingiram valores menores que aqueles obtidos para a menor concentração testada, entretanto sem diferença significativa entre eles e acima do

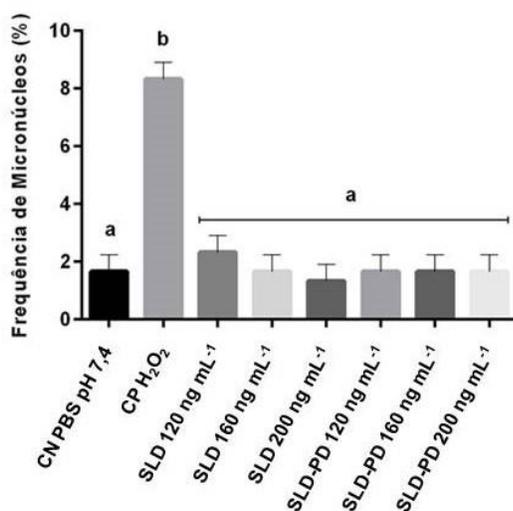
percentual atingido pelo controle positivo. Desta forma, tanto a SLD quanto a SLD-PD não apresentaram potencial citotóxico, porém uma diminuição da viabilidade celular. Nesta condição, pode-se sugerir uma investigação mais detalhada sobre a causa da diminuição da viabilidade celular por outras técnicas e a identificação da citotoxicidade bem como o mecanismo envolvido.

**Figura 18. Avaliação da viabilidade celular de leucócitos medido pelo corante azul de Tripán**



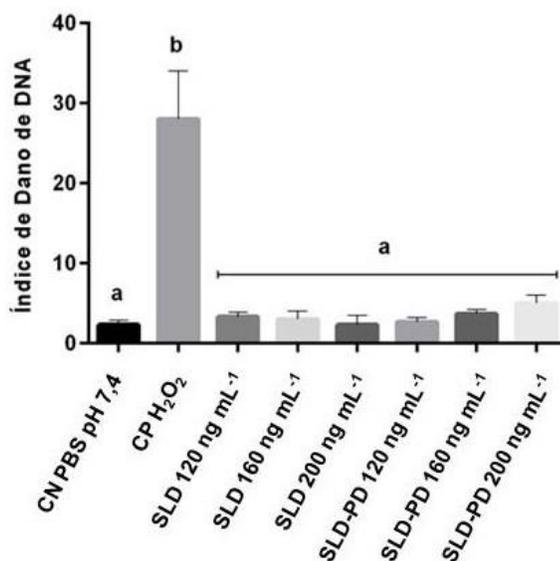
A presença de micronúcleos em linfócitos sanguíneos foi avaliada através do teste de micronúcleo, e o resultado está representado na Figura 19. Observa-se que para ambos os grupos, todas as concentrações testadas foram estatisticamente iguais ao grupo controle negativo. Sendo assim, as concentrações testadas não causaram mutações significativas na divisão celular. Sugere-se que o fármaco e os fotoprodutos não apresentam efeito mutagênico nas concentrações testadas.

**Figura 19. Efeitos da Sildenafil e Sildenafil na presença de produtos de degradação na produção de micronúcleos em culturas de células.**



O índice de dano ao DNA avaliado através do ensaio cometa está representado na Figura 20. Através do gráfico podemos verificar que todas as concentrações referentes a SLD e a SLD-PD não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle. Portanto, nenhuma concentração apresentou atividade genotóxica.

**Figura 20. Ensaio Cometa: Índice de Dano ao DNA de células expostas a diferentes concentrações de Sildenafil**



O estudo referente à segurança biológica da SLD nas concentrações plasmáticas é de extrema importância para verificar se estes apresentam alguma ação que possa causar dano à célula. Ainda, a qualificação dos produtos de degradação para a avaliação do seu potencial toxicológico se torna necessário para estabelecer a segurança do medicamento, conforme estabelecido na resolução RDC nº 58, de 20 de Dezembro de 2013 (BRASIL, 2013).

## **5.6 Avaliação de comprimidos de Sildenafil apreendidos**

### **5.6.1 Determinação de resistência mecânica**

#### **5.6.1.1 Teste de dureza**

A dureza de um comprimido é proporcional à força de compressão e inversamente proporcional à sua porosidade. De acordo com a Farmacopeia, para que o teste seja cumprido, nenhuma amostra pode apresentar comprimidos com dureza inferior a 30 Newtons (USP, 2014). Todas as amostras apresentaram dureza superior ao especificado na literatura. Por ser um teste informativo, não foi construída a carta controle utilizando o CEP.

#### **5.6.1.2. Teste de friabilidade**

Apesar do teste de friabilidade ser utilizado unicamente a comprimidos não revestidos, o teste foi aplicado aos comprimidos de SLD devido à ausência de informações sobre seu processo de fabricação. De acordo com a USP (2014), nenhum comprimido pode apresentar-se ao final do teste, quebrado, lascado, rachado ou partido. Ainda, são considerados aceitáveis os comprimidos com perda de pó igual ou inferior a 1,5%. Os resultados do teste demonstraram que nenhuma amostra teve variação superior a 1,5%. Ainda, nenhum comprimido apresentou-se quebrado, lascado, rachado ou partido após o teste. Apesar da procedência desconhecida dos

comprimidos, de acordo com a baixa perda de pó, sugere-se que estes possuíam revestimento. Por ser um teste informativo, não foi construída a carta controle utilizando o CEP.

#### **5.6.4 Teste de desintegração**

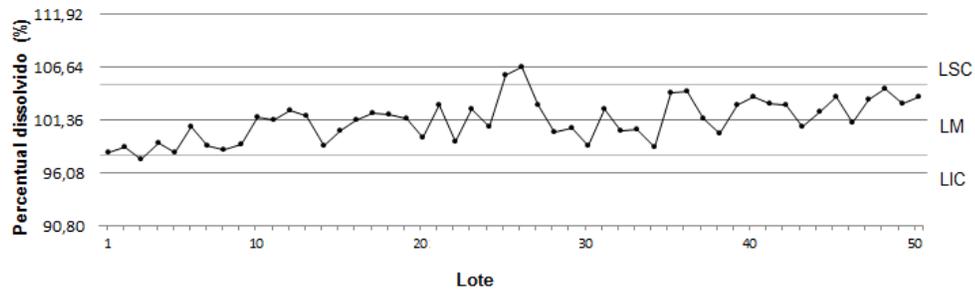
A desintegração é definida como o estado no qual nenhum resíduo das unidades testadas permanece na tela metálica do aparelho de desintegração, salvo fragmentos insolúveis de revestimento de comprimidos ou invólucros de cápsulas. Segundo a literatura, o limite de tempo estabelecido como critério geral para a desintegração de comprimidos revestidos com filme é de 30 minutos em água (USP, 2014). Todas as amostras de SLD analisadas se desintegraram dentro do limite especificado. Por ser um teste informativo, não foi construída a carta controle utilizando o CEP.

#### **5.6.5 Teste de dissolução**

O teste de dissolução tem por objetivo determinar a quantidade de substância ativa dissolvida no meio quando o produto é submetido à ação de aparelhagem específica, em condições experimentais determinadas. Segundo o “*Guidance for Industry – Dissolution Testing and Specification*”, o qual estabelece que os critérios e especificações do teste de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais que pertencem a Classe 1 do SCB, o valor de Q deve ser 80% em 30 minutos (FDA, 2015). Todas as amostras cumpriram com o critério de aceitação descrito no guia, sendo aprovadas no Estágio 1 (que determina que todas as amostras devem apresentar resultados maiores que  $Q + 5\%$ ). O percentual de dissolução entre as amostras variou entre 97,47% e 106,68%.

A Figura 21 demonstra a carta controle obtida a partir dos valores de percentual dissolvido para as amostras testadas. A amostra 26 apresentou percentual de dissolução fora dos limites de controle.

**Figura 21. Carta controle para o teste de dissolução de comprimidos de sildenafil.**

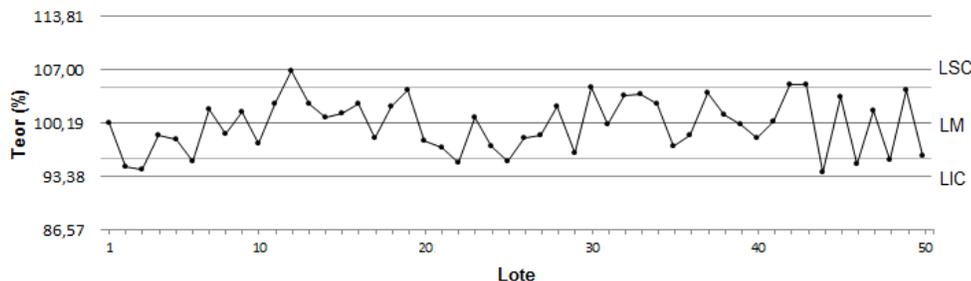


### 5.6.6 Determinação do teor

A determinação do teor em medicamentos visa garantir que o produto final tenha a quantidade declarada de princípio ativo. Para verificar a quantidade de SLD presente nos comprimidos com procedência desconhecida, estes foram submetidos à determinação do teor utilizando o método desenvolvido neste trabalho por UFLC. A variação entre a quantidade declarada para as amostras dos comprimidos da marca Pramil<sup>®</sup> 50 mg foi entre 94,00 e 106,95% (47,00 e 53,47 mg), com DPR de 3,39%. Devido à ausência de monografias oficiais para a determinação de SLD em comprimidos, não é possível definir se os mesmos encontravam-se dentro de variação aceitável.

A Figura 22 representa a carta controle para a determinação do teor de comprimidos de SLD. A distribuição dos pontos na carta controle foi aleatória em torno da linha média, não havendo pontos fora dos limites estabelecidos.

**Figura 22. Carta controle para a determinação do teor de comprimidos de Sildenafil.**



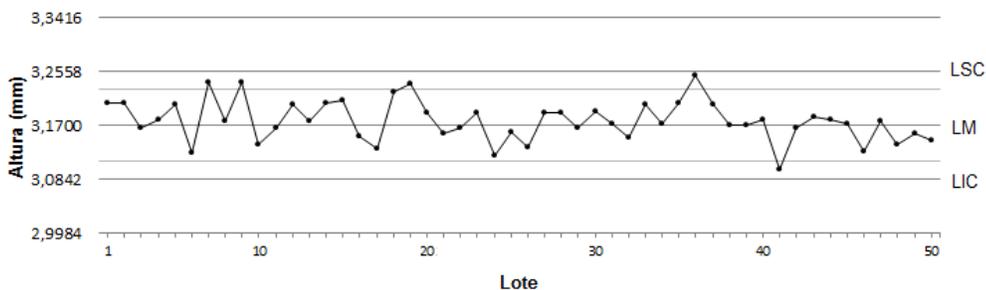
### 5.6.7 Perfil físico de comprimidos de Sildenafil apreendidos

#### 5.6.7.1 Altura e diâmetro

A avaliação da altura e diâmetro de comprimidos gera informações que caracterizam o seu perfil físico. A análise destes fatores pode ser útil no controle estatístico de processos de produção, além de auxiliar (em conjunto com ferramentas de análise multivariada) a identificar a origem de amostras apreendidas e/ou falsificadas (ORTIZ et al., 2012; MARQUIS et al, 2008; MILLIET et al, 2009).

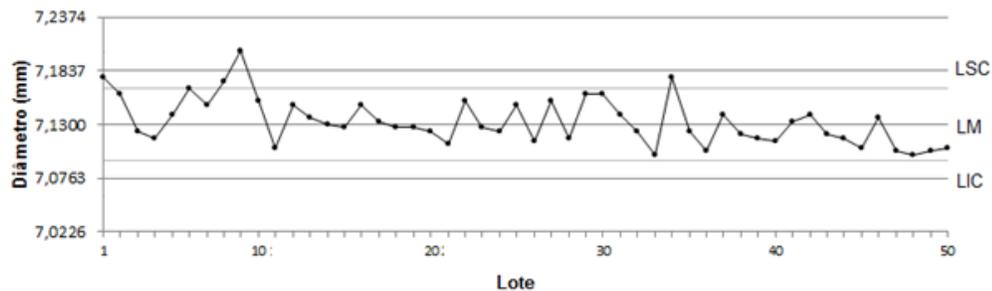
Os valores obtidos para a altura dos comprimidos variaram entre 3,10 mm e 3,25 mm, apresentando DPR de 1,01%. A carta controle para a verificação da altura está demonstrada na Figura 23, sendo que nenhuma amostra permaneceu fora dos limites estabelecidos.

**Figura 23. Carta controle para a altura de comprimidos de Sildenafil.**



Os valores de diâmetro dos comprimidos de SLD variaram entre 7,10 e 7,20 mm. O valor do DPR foi de 0,32%. Segundo a carta controle (Figura 24), apenas a amostra 9 apresentou valores fora dos limites de controle, apresentando diâmetro de 7,20 mm.

**Figura 24. Carta controle para o diâmetro de comprimidos de Sildenafil.**

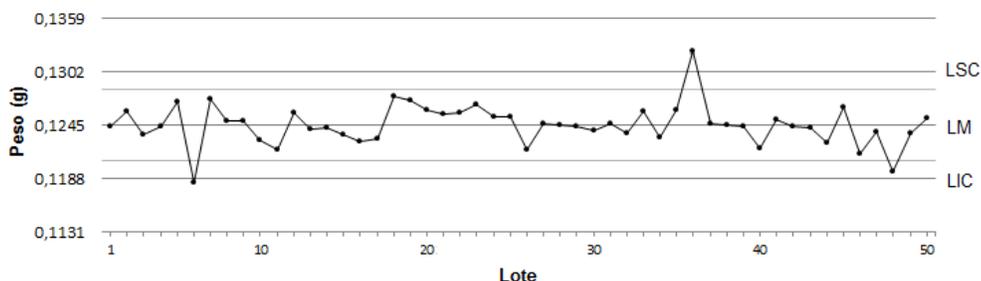


### 5.6.7.2 Determinação de peso em comprimidos

Segundo a USP (2014), para que um lote seja aprovado na determinação de peso, deve-se avaliar o percentual de variação de cada comprimido individualmente e o peso médio do lote. Para comprimidos revestidos com filme que possuem peso médio entre 80 e 250 mg, o limite de variação aceito é de 7,5%, podendo tolerar não mais que duas unidades fora deste limite. Porém, nenhuma poderá estar acima ou abaixo do dobro deste valor. A determinação de peso entre os comprimidos para as amostras de SLD avaliadas mostrou que nenhuma unidade apresentou uma variação fora do limite aceitável.

Segundo a carta controle para a avaliação do peso dos comprimidos (demonstrada na Figura 25), as amostras 6 (0,1185 mg) e 36 (0,1325 mg) ficaram fora dos limites estabelecidos.

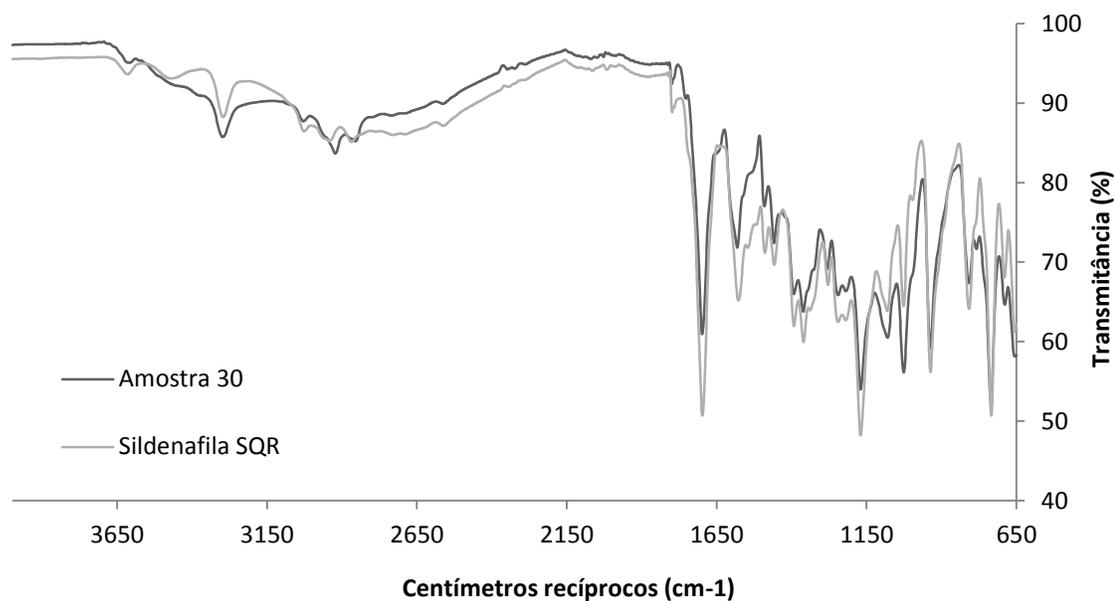
**Figura 25. Carta controle para a determinação de peso de comprimidos de Sildenafil.**



### 5.6.8 Perfil químico dos comprimidos de Sildenafil apreendidos

O perfil químico das amostras apreendidas de SLD foi analisado de acordo com o espectro de IV obtido na região entre 4000 a 650  $\text{cm}^{-1}$ . Não foram observadas diferenças entre os espectros das amostras analisadas e o espectro da SLD SQR. A Figura 26 apresenta o espectro da SLD SQR (em preto) e a amostra número 30 (em cinza). Observa-se que o espectro da amostra suspeita de falsificação (escolhida aleatoriamente) apresenta bandas de absorção semelhantes às bandas da SLD SQR. Sendo assim, a espectrofotometria de IV foi capaz de identificar a presença dos principais grupamentos químicos referentes ao fármaco SLD nos comprimidos suspeitos de falsificação.

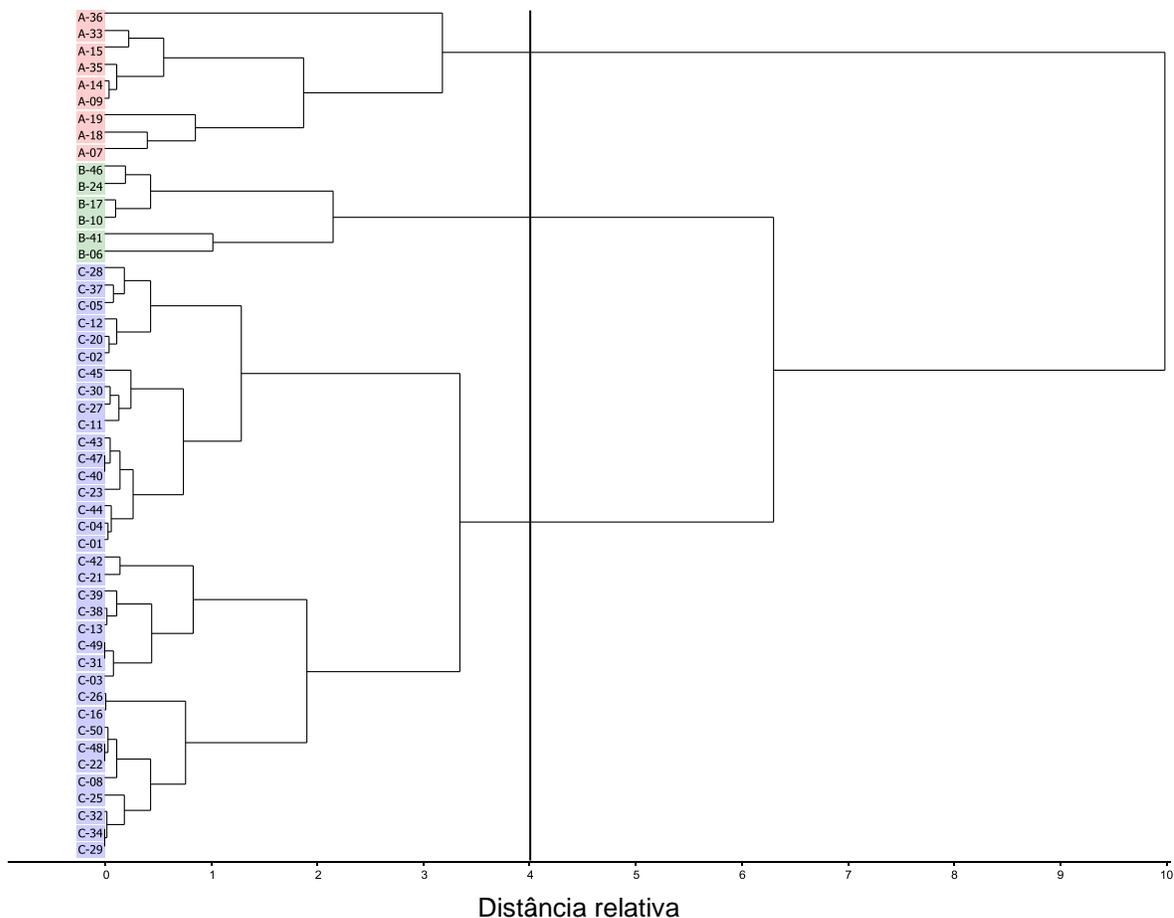
**Figura 26. Perfil químico de comprimidos de Sildenafil.**



### 5.6.9 Análise multivariada do perfil físico e químico dos comprimidos apreendidos de Sildenafil

O perfil físico das amostras de SLD apreendidas foi analisado por HCA considerando os dados referentes ao peso, diâmetro e altura dos comprimidos. A Figura 27 representa um dendrograma obtido após o pré-processamento de autoescalamento dos dados. Considerando uma distância relativa de 4, houve formação de três grupos (1-A, 1-B e 1-C).

**Figura 27. Análise hierárquica de agrupamentos aplicado aos dados obtidos no perfil físico.**



Em comparação aos resultados obtidos nas cartas controle, as amostras 09 (fora dos limites definidos para o diâmetro), 06 e 36 (fora dos limites estabelecidos para o peso) foram agrupadas na mesma região do dendrograma (região esquerda, subgrupos 1-A e 1-B). A partir do espectro de IV da amostra 36 e sua vizinha mais próxima 33 (Figura 28), da amostra 09 e sua vizinha mais próxima 14 (Figura 29), e da amostra 06 e sua vizinha mais próxima 41 (Figura 30), é possível afirmar que as amostras possuem semelhança no espectro IV, o que sugere composição química similar (formulação semelhante).

Figura 28. Espectro de Infravermelho da amostra 33 e amostra 36 na região entre 1800 a 650  $\text{cm}^{-1}$ .

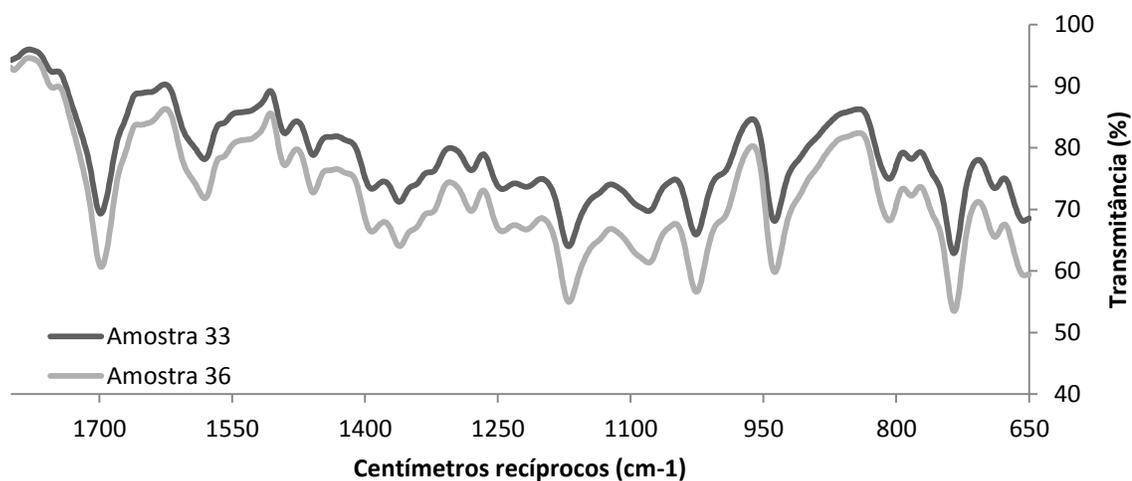
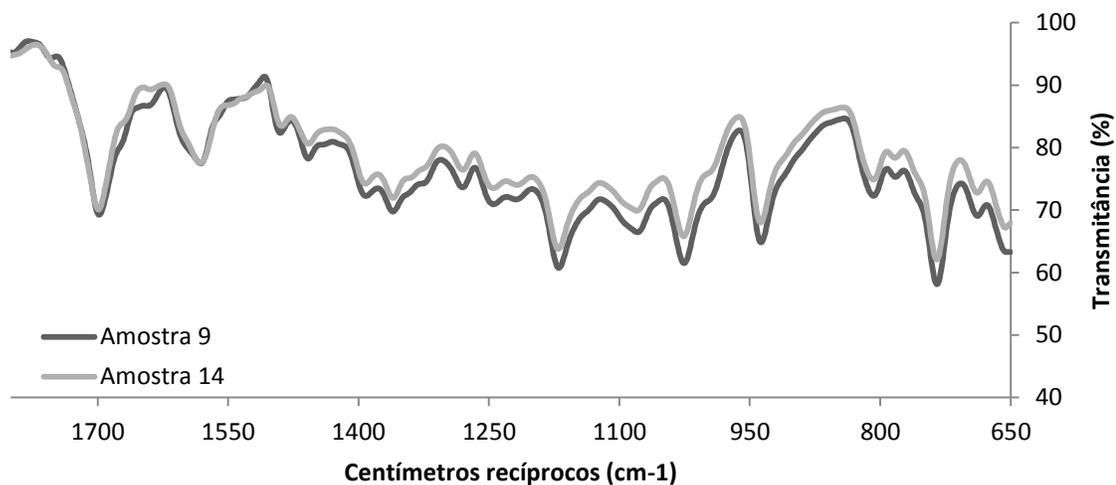
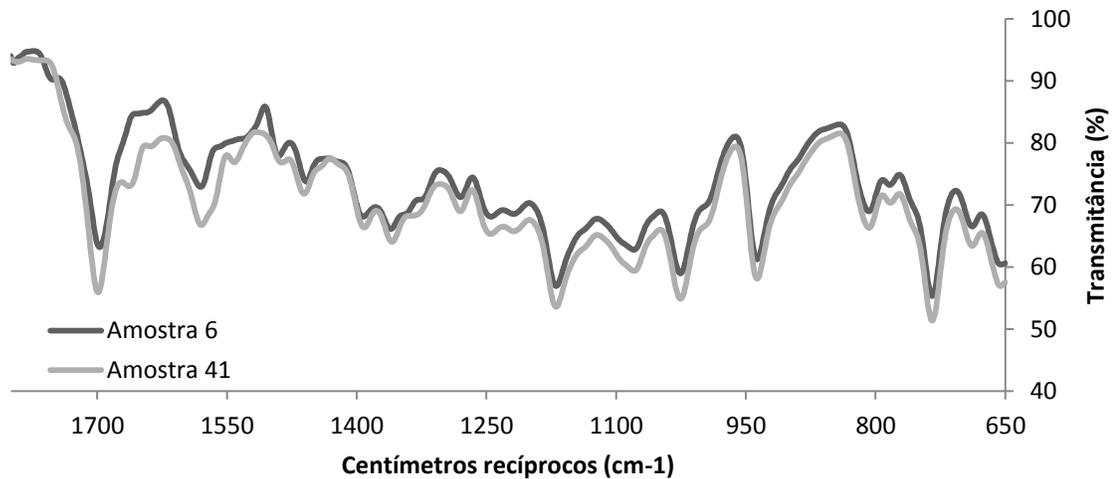


Figura 29. Espectro de Infravermelho da amostra 9 e amostra 14 na região entre 1800 a 650  $\text{cm}^{-1}$ .



**Figura 30. Espectro de Infravermelho da amostra 6 e amostra 41 na região entre 1800 a 650  $\text{cm}^{-1}$ .**



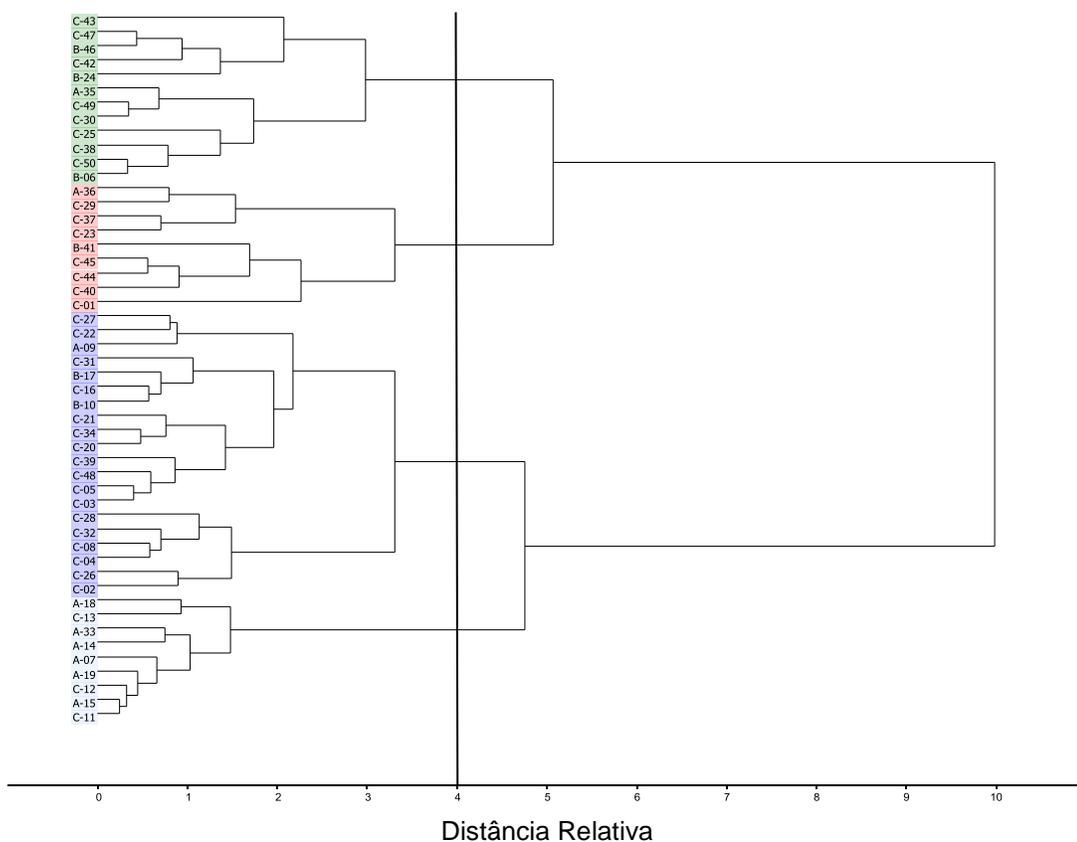
Considerando a natureza não supervisionada da técnica HCA, este resultado pode ser considerado satisfatório e demonstra a habilidade desta técnica em analisar simultaneamente e de maneira multivariada dados de origem física (DECONINCK et al, 2012). De acordo com o resultado, não é possível afirmar que o agrupamento das amostras esteja vinculado a diferentes origens (diferentes processos de fabricação), entretanto cabe ressaltar que, de acordo com o observado, as diferenças físicas ocasionaram o agrupamento das amostras. Para amostras forenses, a falta de controle no processo de fabricação pode ocasionar perfis físicos bastante diferenciados, o que torna a técnica apropriada para este tipo de análise (CUSTERS et al, 2015).

O uso de técnicas de análise multivariada com agrupamento de amostras a partir de dados físicos e/ou químicos pode também contribuir para o estabelecimento do conceito de “lote” em laboratórios de análise forense, já que, devido à natureza desconhecida da amostra e a inviabilidade de se analisar cada amostra individualmente, não é possível estabelecer um critério para a “tomada de amostra” do ensaio. Neste caso, a formação dos grupos pode ser utilizada como critério para separação e, na sequência, proceder à análise química apropriada e representativa de cada grupo.

A procedência química, ou seja, mesma origem das matérias-primas, incluindo a substância ativa, também pode ser estabelecida a partir da análise multivariada dos dados. Segundo Ortiz e colaboradores (2013b), a formação de grupos utilizando técnicas de análise multivariada como PCA ou HCA, a partir de dados químicos podem indicar produtores/fornecedores em comum e identificar a origem da amostra analisada. Desta forma, para a amostra em estudo, foram avaliados os grupos formados por HCA a partir de dados do IV médio e os mesmos foram comparados com aqueles formados a partir dos dados físicos (os quais indicariam a mesma procedência física).

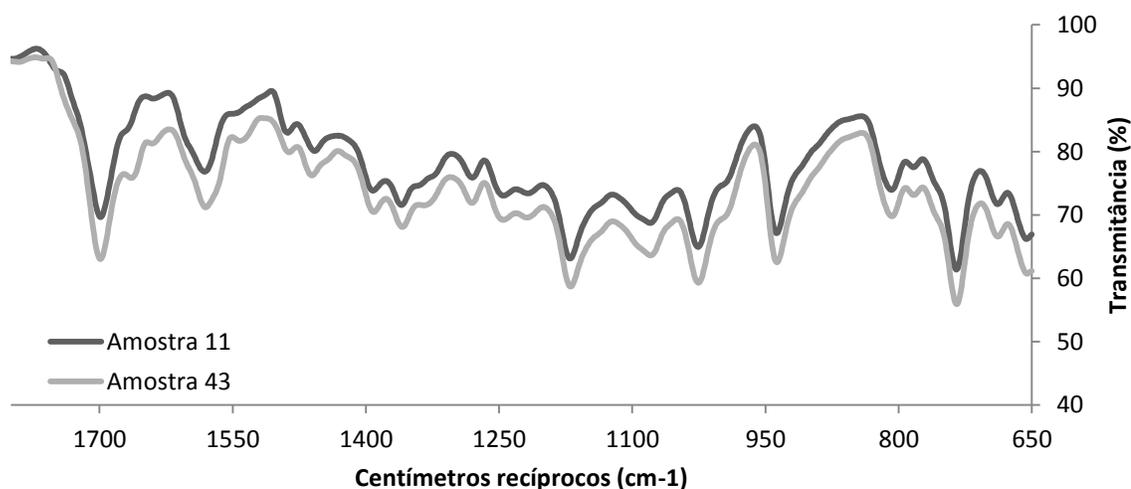
Para tanto, foi traçado um dendrograma da região do IV entre 1800 a 650  $\text{cm}^{-1}$  (dados centralizados na média) (Figura 31). Esta região foi selecionada por ser considerada a de impressão digital da molécula (SACRE et al, 2010).

**Figura 31. Análise hierárquica de agrupamentos aplicada aos dados obtidos por espectrofotometria de infravermelho.**



Considerando a distância relativa de 4, houve a formação de 4 grupos (2-A, 2-B e 2-C e 2-D). Não foi possível estabelecer uma relação entre as amostras com desvios na carta controle relativos ao perfil físico (06, 09 e 36) e os agrupamentos obtidos a partir de dados químicos, já que as mesmas se distribuíram aleatoriamente em cada grupo. O espectro IV das amostras mais distantes (43 e 11) está representado na figura 32. Considerando: (a) a semelhança entre os espectros de IV para as amostras mais distantes, (b) que as amostras possuíam quantidade de SLD acima de 95% em relação ao teor e (c) uma relação fármaco:excipiente de 62,25:37,75 (m:m), sugere-se que todas as amostras possuem composição química semelhante e que os grupos formados (pela análise do espectro parcial na região de 1800 a 650  $\text{cm}^{-1}$ ) ocorram devido a pequenas variações na proporção fármaco/excipiente (oriundas da variação no teor). Para fins de inteligência forense, estas informações de perfil químico podem ser úteis no sentido de identificar a origem de amostras apreendidas, bem como traçar um perfil de regiões geográficas de apreensão. Além disso, associadas ao perfil de compostos inorgânicos ou impurezas, pode-se auxiliar no estudo de rotas de distribuição de medicamentos falsificados.

**Figura 32. Espectro de Infravermelho da amostra 11 e amostra 43 na região entre 1800 a 650  $\text{cm}^{-1}$ .**



## 6 CONCLUSÕES

- Para a caracterização da SQR, os resultados obtidos contribuíram para garantir a qualidade da matéria-prima em questão, sendo esta utilizada como SQR.
- A condição estabelecida no desenvolvimento do método por UFLC permitiu uma análise adequada do fármaco.
- O método proposto por UFLC demonstrou ser linear, preciso, exato, específico e robusto, estando de acordo com os parâmetros estabelecidos no guia Q2 (R1) do ICH (ICH, 2005) e na Resolução RDC nº 899 de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003).
- A especificidade frente aos excipientes e aos produtos de degradação caracterizam o método desenvolvido como indicativo de estabilidade.
- Quanto à cinética de degradação fotolítica, o percentual de fotodegradação da SLD obtida no solvente metanol foi maior do que no solvente água, sugerindo-se que a reação é facilitada em meio menos polar.
- Em relação à segurança biológica, a SLD ocasionou uma diminuição na viabilidade celular, observada no teste de Azul de Tripan. Tanto a SLD quanto seus fotoprodutos de degradação (meio aquoso) não apresentaram atividade mutagênica e genotóxica.
- A avaliação tecnológica através dos testes de dureza, teste de friabilidade e teste de desintegração demonstraram que todas as amostras de comprimidos de SLD suspeitos de falsificação cumpriram os critérios de aceitação estabelecidos pela Farmacopeia (USP, 2014).
- Em relação ao teste de dissolução, todas as amostras de comprimidos de SLD suspeitos de falsificação cumpriram com o critério de aceitação descrito no “*Guidance for industry – Dissolution Testing and Specification*”. Entretanto, quando aplicado o CEP, a amostra 26 apresentou um percentual de dissolução fora dos limites estabelecidos.
- A variação de teor para comprimidos de SLD suspeitos de falsificação foi de 94,00 a 106,95% (47,00 e 53,47 mg), com DPR=3,39%. A carta controle

demonstrou que as amostras se comportaram de forma aleatória em torno da linha média, não havendo pontos fora dos limites estabelecidos.

- A carta controle de comprimidos de SLD suspeitos de falsificação para a verificação da altura demonstrou que nenhuma amostra permaneceu fora dos limites estabelecidos. Em relação ao diâmetro, a amostra 09 apresentou valores fora dos limites estabelecidos na carta controle.
- A variação de peso de comprimidos de SLD suspeitos de falsificação mostrou que nenhuma unidade apresentou uma variação fora do limite aceitáveis e estabelecidos pela USP. Na carta controle, as amostras 6 (0,1185 mg) e 36 (0,1325 mg) ficaram fora dos limites estabelecidos.
- De acordo com a avaliação da qualidade de comprimidos de SLD suspeitos de falsificação, sugere-se que os mesmos sejam amostras provenientes de contrabando, já que apresentaram percentual de SLD e demais testes de controle de qualidade adequados.
- Quando aplicado a HCA nos dados do perfil físico de comprimidos de SLD suspeitos de falsificação, houve a formação de 3 grupos. Não foi possível afirmar que o agrupamento das amostras esteja vinculado a diferentes origens (diferentes processos de fabricação), entretanto, de acordo com o observado, as diferenças físicas ocasionaram o agrupamento das amostras.
- Quando os dados do perfil químico foram submetidos ao HCA, não foi possível o estabelecimento de uma relação entre o perfil físico e o dendrograma obtido para o perfil químico das amostras.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOUL-ENEIN, H. Y.; HEFNAWY, M. M.; **Rapid determination of sildenafil citrate in pharmaceutical preparations using monolithic silica HPLC column.** J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol., v.26, p.2897, 2003.
- AHMAD, I.; BANO, R.; ALI SHERAZ, M.; AHMED, S.; MIRZA, T.; ANSARI, S. A.; **Photodegradation of levofloxacin in aqueous and organic solvents: a kinetic study.** Acta Pharm., v.63, p.223, 2013.
- AHMED, S. ; SHERAZ, M. Y. A.; REHMAN, C. I. U.; **Quantitative determination of tolfenamic acid and its pharmaceutical formulation using FTIR and UV spectrometry.** Cent. Eur. J. Chem., v.11, p.1533, 2013.
- ALENCAR, J. R. B.; SOUZA JR., M. B.; ROLIM NETO, P. J.; LOPES, C. E.; **Uso de controle estatístico de processo (CEP) para validação de processo de glibenclamida comprimidos.** Rev. Bras. Farm., v. 85, p.115, 2004.
- ALMEIDA, W. R. R.; SILVA, A. S.; PAULA, F. R.; SILVA, F. E. B.; FORESTI, G. R.; FERRÃO, M. F.; **Desenvolvimento de modelos de regressão multivariada para a quantificação de Benzoilmetronidazol na presença de seus produtos de degradação por espectroscopia de infravermelho próximo.** Orbital: The Electronic Journal of Chemistry, v.7, p.341, 2015.
- AMES, J.; SOUZA, D. Z.; **Counterfeiting of drugs in Brazil.** Rev. Saúde Pública v. 46, p. 1-6 , 2012.
- AMIN, A. S.; EL-BESHBESHY, A. M.; **Utility of certain  $\sigma$  and  $\pi$ -acceptors for the spectrophotometric determination of sildenafil citrate (Viagra).** Microchim. Acta, v.137, p.63, 2001.
- ANZANELLO, M. J.; ORTIZ, R. S.; LIMBERGER, R.; MARIOTTI, K.; **A framework for selecting analytical techniques in profiling authentic and counterfeit Viagra and Cialis.** Forensic Science International, v.235, p.1, 2014a.
- ANZANELLO, M. J.; ORTIZ, R. S.; LIMBERGER, R.; MARIOTTI, K.; **Performance of some supervised and unsupervised multivariate techniques for grouping authentic and unauthentic Viagra and Cialis.** Egyptian Journal of Forensic Sciences, v.4, p.83, 2014.
- BARROS, R. C. S. **Desenvolvimento e avaliação da eficácia de novos sistemas de liberação oral de Sildenafil.** Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

- BATISTA, E. F.; SARTORI, E. R.; MEDEIROS, R. A.; ROCHA-FILHO, R. C.; FATIBELLO-FILHO, O.; **Differential pulse voltametric determination of sildenafil citrate (Viagra®) in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode.** Anal. Lett., v.43, p.1046, 2010.
- BLESSY M.; PATEL R.; PRAJAPATI P. N.; AGRAWAL Y. K. **Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs – A review.** Journal of Pharmaceutical Analysis, v.4, p.159, 2014.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira 5ª edição.** Editora Atheneu, São Paulo, 2010.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº1, de 29 de junho de 2005. **Guia para Realização de Estudos de Estabilidade.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2005.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº45, de 9 de agosto de 2012. **Dispõe sobre a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2012.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº58 de 20 de dezembro de 2013. **Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2012.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Dispõe o guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2003.
- BRITISH PHARMACOPOEIA. London: Her Majesty's Stationary Office, 2009.
- BUROW, M.E, WELDON, C.B, TANG, Y, NAVAR, G.L., KRAJEWSKI, S., REED, J.C.; **Differences in Susceptibility to Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ -induced Apoptosis among MCF-7 Breast Cancer Cell Variants.** Cancer Research., v.58, p.4940, 1998,
- CANTARELLI, M. A.; PELLERANO, R. G.; MARCHEVSKY, E. J.; CAMIÑA, J. M.; **Simultaneous determination of amoxicillin and diclofenac in pharmaceutical formulations using UV spectral data and the PLS chemometric method.** Anal. Sci., v.27, p.73, 2011.
- CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; **The state of the art of chromatography associated with the tandem mass spectrometry for toxic compound analyses in food.** Quim. Nova, v.31, p.623, 2008.

- CORNEL, J.; LINDENBERG, C.; MAZZOTI, M.; **Quantitative application of in situ ART-FTIR and Raman Spectroscopy in crystallization processes.** Ind. Eng. Chem. Res., v.47, p.4870, 2008.
- CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C. **Non-supervised pattern recognition methods: exploring chemometrical procedures for evaluating analytical data.** Quim. Nova, v.30, p.481, 2007.
- CUSTERS, D.; CAUWENBERGH, T.; BOTHY, J. L.; COURSELLE, P.; DE BEER, J. O.; APERS, S.; DECONINCK, E. **ATR-FTIR spectroscopy and chemometrics: An interesting tool to discriminate and characterize counterfeit medicines.** J. Pharm. Biomed. Anal., v. 112, p. 181, 2015.
- CUSTERS, D.; SUZANNE, V.; BOTHY, J. L.; DE BEER, J. O.; COURSELLE, P.; APRES, S.; DECONINCK, E. **Physical profiling and IR spectroscopy: simple and effective methods to discriminate between genuine and counterfeit samples of Viagra® and Cialis®.** Drug Test. Analysis, 2015.
- DARAGHMEH, N.; AL-OMARI, M.; BADWAN, A. A.; JABER, A. M.; **Determination of sildenafil citrate and related substances in the commercial products and tablet dosage form using HPLC.** J. Pharm. Biomed. Anal., v.25, p.483, 2001.
- DE PAULA, S. H. B.; ALMEIDA, J. D.; BONFIM, J. R. A.; **Erectile dysfunction: from medicalization to the comprehensive care in Primary Attention.** Rev. de Saúde do Homem no SUS, v.14, p.101, 2012.
- DECONINCK, E.; ANDRIESENS, S.; BOTHY, J. L.; COURSELLE, P.; DE BEER, J. O.; **Comparative dissolution study on counterfeit medicines of PDE-5 inhibitors.** J. Pharm. Anal, v.4, p.250, 2014.
- DECONINCK, E.; SACRE, P. Y.; COURSELLE, P.; DE BEER, J. O.; **Chemometrics and chromatographic fingerprints to discriminate and classify counterfeit medicines containing PDE-5 inhibitors.** Talanta, v.100, p.123, 2012.
- DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C.; **Cromatografia: um breve ensaio.** Revista Química Nova na Escola, v.7, p.21, 1998.
- DINÇ, E.; ÖZDEMİR, A.; AKSOY, H.; ÜSTÜNDAG, Ö.; BALEANU, D.; **Chemometric determination of Naproxen Sodium and Pseudoephedrine Hydrochloride in Tablets by HPLC.** Chemical and Pharmaceutical Bulletin, v.54, p.415, 2006.

DINESH, N. D.; NAGARAJA, P.; GOWDA, N. M. M.; RANGAPPA, K. S.; **Extractive spectrophotometric methods for the assay of sildenafil citrate (Viagra) in pure form and in pharmaceutical formulations.** Talanta, v.57, p.757, 2002.

DINESH, N. D.; VISHUKUMAR, B. K.; NAGARAJA, P.; GOWDA, N. M. M.; RANGAPPA, K. S.; **Stability indicating RP-LC determination of sildenafil citrate (Viagra) in pure form and in pharmaceutical samples.** J. Pharm. Biomed. Anal., v.29, p.743, 2002.

EMA, 2012. European Medicines Agency. **Resumo destinado ao público – Revatio (Sildenafil).** Disponível em: [http://www.ema.europa.eu/docs/pt\\_PT/document\\_library/EPAR\\_-\\_Summary\\_for\\_the\\_public/human/000638/WC500055835.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000638/WC500055835.pdf) Acesso: 01/12/2015

ERGUN, B.; SARACOGLU, A.; ILGIN, S.; ATKOSAR, Z.; KIRCALI, K.; ALTIOKKA, G.; **Validation of a Reversed-Phase HPLC Method for the Analysis of Sildenafil Citrate in Pharmaceutical Preparations and in Spiked Human Plasma.** J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol., v.28, p.1539, 2005.

FDA. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. **Guidance for industry – Orally Disintegrating Tablets.** Center for Drug Evaluation and Research, 2008.

FDA. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. **Guidance for industry – Dissolution Testing and Specification – Release Solid Oral Dosage Forms Containing Biopharmaceutics Classification System Class 1 and 3 Drugs.** Center for Drug Evaluation and Research, 2015a.

FDA. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. **Size, shape and other physical attributes of generic tablets and capsules.** Center for Drug Evaluation and Research, 2015b.

FENECH, M. **The in vitro micronucleus technique.** Mutation Research, v.455, p.81, 2000.

FERRARO, M. C. F.; CASTELLANO, P. M.; KAUFMAN, T. S.; **Chemometric determination of amiloride hydrochloride, atenolol, hydrochlorothiazide and timolol maleate in synthetic mixtures and pharmaceutical formulations.** J. Pharmaceut. Biomed., v.34, p.305, 2004.

FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. **Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial.** Química Nova, n. 22, p.724, 1999.

FRANSSON, M.; JOHANSSON, J.; SPARÉN, A.; SVENSSON, O.; **Comparison of multivariate methods for quantitative determination with transmission raman spectroscopy in pharmaceutical formulations.** Journal of chemometrics, v.24, p.674, 2010.

GELADI, P.; KOWALSKI, B. R.; **Partial least-squares regression: a tutorial.** Analytica Chimica Acta, v.185, p.1, 1986.

- HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa 8° ed.** Editora LCT, Rio de Janeiro, 2012.
- HEYDEN, Y. V.; NIJHUIS, A.; SMEYERS-VERBEKE, J.; VANDEGINSTE, B. G. M.; MASSART, D. L.; **Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation.** J. Pharmaceut. Biomed., v.24, p. 723, 2001.
- HURTADO, R. L.; LASMAR, M. C.; **Counterfeit and contraband drugs in Brazil: overview and prospects for preventing their use.** Cad. Saúde Pública, v.30, p. 891, 2014
- ICH. International Conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1).** 2005.
- ICH. International Conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. **Stability testing of new drug substances and products Q1A (R2).** 2003.
- INTERNATIONAL PHARMACOPOEIA, 2015. Disponível em: <http://apps.who.int/phint/en/p/about/> . Acesso: 04/02/2016.
- JAPANESE PHARMACOPOEIA. **The Japanese Pharmacopoeia.** The Society of Japanese Pharmacopoeia, Tokyo, 2011.
- JULIO, T. A.; ZÂMARA, I. F.; GARCIA, J. S.; TREVISAN, M. G.; **Compatibility of sildenafil citrate and pharmaceutical excipients by thermal analysis and LC-UV.** J. therm. Anal. Calorim., v.111, p.2037, 2013.
- KAZARIN, K.C.C.; CORRÊA, C.L.; ZAMBRONE, F.A.D. **Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v.40, p.289, 2004.
- KHISHAYAND ET AL, 2010. M. R. KHOSHAYAND; H. ABDOLLAHI; A. GHAFFARI; M. SHARIATPANAH; H. FARZANEGAN; **Simultaneous spectrophotometric determination of paracetamol, phenylephrine and chlorpheniramine in pharmaceuticals using chemometric approaches.** Daru Journal of Pharmaceutical Sciences, v.18, p.292, 2010.
- KIBBE, A. H.; WADE, A.; WELLER, P. J. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**, 3. Ed, Washington London: American Pharmaceutical Association: Pharmaceutical Press, 2000.
- KUCHEKAR, B. S.; THAKKAR, S. V.; CHOTHE, P. P.; **HIREMATH, M. R.; SHINDE, D. B.; Spectrophotometric estimation of sildenafil citrate in tablets.** Indian J. Pharm. Sci., v.67, p.749, 2005.
- MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F.; **The state of art of ultra performance liquid chromatography.** Quím. nova, v.32, p.214, 2009.

MALESUIK, M. D.; CARDOSO, S.G.; LANZANOVA, F. A.; BAJERSKI, L.; DORIGONI, E. **Desenvolvimento de teste de dissolução e estudo comparativo de comprimidos e cápsulas magistrais contendo anlodipino.** Rev. Ciên. Farm. Básica Apl., v.27, p.37, 2006.

MANNUR, V. S.; RATHI, S. M.; MASTIHOLIMATH, V. S.; DENGALÉ, N. P.; SHINDE, T. A.; **Stability indicative RP-HPLC method development and validation of Sildenafil Citrate in pure form.** Int. J. Res. Pharm. Sci., v.2, p.187, 2011.

MARQUES JR, J. M.; MULLER, A. L. H.; FOLETTI, E. L.; DA COSTA, A. B.; BIZZI, C. A.; IRINEU MULLER, E.; **Determination of Propranolol Hydrochloride in Pharmaceutical Preparations Using Near Infrared Spectrometry with Fiber Optic Probe and Multivariate Calibration Methods.** Journal of Analytical Methods in Chemistry, v. 2015, p.1, 2015.

MARQUIS, R.; WEYERMANN, C.; DELAPORTE, C.; ESSEIVA, P.; AALBERG, L.; BESACIER, F.; BOZENKO JR, J. S.; DAHLENBURG, R.; KOPPER, C.; ZRECK, F.; **Drug intelligence based on MDMA tablets data: 2 Physical characteristics profiling.** Forensic Sci. Int., v.178, p. 34, 2008.

MELVEGER, A.J., HUYNH-BA, K. **Critical Regulatory Requirements for a Stability Program,** In: Huynh-Ba, K. **Handbook of stability testing in pharmaceutical development.** Editora Springer, New York, 2009.

MENDONÇA, R. X.; BUZZETI, P. H. M.; SILVA, A. L.; ARAUJO, A. S. PONZIO, E. A.; SEMAAN, F.S.; **Voltametric determination of sildenafil citrate and furosemida at composite electrodes of graphite-paraffin for use in samples of pharmaceutical and toxicological interests.** Rev. Virtual Quim., v.7, p. 1692, 2015.

MILLIET, Q.; WEYERMANN, C.; ESSEIVA, P.; **The profiling of MDMA tablets: A study of the combination of physical characteristics and organic impurities as sources of information.** Forensic Sci. Int., v.187, p.58, 2009.

MOT ET AL, 2010. A. C. MOT; F. SOPONAR; A. MEDVEDOVICI; C. SÂRBU; **Simultaneous spectrophotometric determination of aspirin, paracetamol, caffeine, and chlorphenamine from pharmaceutical formulations using multivariate regression methods.** Anal. Let., v.43, p.804, 2010.

MULLER, A. L. H. ; FLORES, E. M. M.; MÜLLER, E. I. ; SILVA, F. E.B. ; FERRÃO, M. F. **Attenuated total reflectance with Fourier transform infrared spectroscopy (ATR/FTIR) and PLS algorithms for determination of clavulanic acid and amoxicillin in powder pharmaceutical formulations.** Journal of the Brazilian Chemical Society, v.22, p.1903, 2011.

MURAKAMI, F.S., MENDES, C., PEREIRA, R.N., VALENTE, B.R., FRANCHI, S.M., SILVA, M.A.S. **Estudo de estabilidade de comprimidos gastro-resistentes contendo 20 mg de omeprazol.** Latin American Journal of Pharmacy, v.28, p.645, 2009.

NAGAVALLI ET AL, 2010. D. NAGAVALLI; V. VAIDHYALINGAM; A. SANTHA; A. S. K. SANKAR; O. DIVYA; **Simultaneous spectrophotometric determination of losartan potassium, amlodipine besilate and hydrochlorothiazide in pharmaceuticals by chemometric methods.** Acta Pharm., v.60, p.141, 2010.

NEVADO, J. J. B.; FLORES, J. R.; PENALVO, G. C.; FARINAS, N. R.; **Determination of sildenafil citrate and its main metabolite by sample stacking with polarity switching using micellar electrokinetic chromatography.** J. Chromatogr., A, v.953, p.279, 2002.

NOGUEIRA, E.; NETO, G. V.; **Counterfeit drugs and law n. 11.903/09: legal aspects and impacts.** Rev. de direito sanitário, v.12, p.112, 2011.

NOGUEIRA, E.; NETO, G. V.; **Counterfeit drugs and law n. 11.903/09: legal aspects and impacts.** Rev. de direito sanitário, v.12, p.112, 2011.

NULDEMAN, N.S. **Estabilidad de medicamentos 1ª ed.** Editora El Ateneo, Buenos Aires, 1975.

O'NEIL, M. J.; SMITH, A.; HECKELMAN, P. E.; OBENCHAIN JR., J. R.; GALLIPEAU, J. A. R.; D'ARECCA, M. A.; BUDAVARI, S.; **The Merck Index, an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals 13 th edition.** Merck & CO., Whitehouse Station, 2001.

ODRIOZOLA, A. A.; GONZÁLEZ, G. I.; ARIAS, J. G P.; SÁNCHEZ, J. A. G.; QUINTANILLA, M. G.; IBARGARAY, I. C.; **Pharmacokinetics/pharmacodynamics of phosphodiesterase type-5 (PDE-5) inhibitors. Are they clinically significant? The clinical pharmacokinetics of PDE-5 inhibitors in erectile dysfunction.** Rev. Int. Androl.; v.5, p.59, 2007.

OLIVEIRA, E. C.; AMARAL, C. F. S.; **Sildenafil no tratamento da hipertensão arterial pulmonar idiopática em crianças e adolescentes.** *J. Pediatr.*, vol.81, p. 390, 2005.

OLIVEIRA, M. A.; YOSHIDA, M. I.; GOMES, E. C. L.; **Thermal analysis applied to drugs and pharmaceutical formulations in pharmaceutical industry.** Quim. Nova, v.34, p.1224, 2011.

ORTIZ, R. S.; ANTUNES, M. V.; LINDEN, R.; **Determination of sildenafil citrate and tadalafil by ultra performance liquid chromatography with diode-array detection (UPLC-DAD).** Quím. Nova, v.33, p.389, 2010.

ORTIZ, R. S.; MARIOTTI, K. C.; FANK, B.; LIMBERGER, R. P.; ANZANELLO, P. M.; MAYORGA, P.; **Couterfeit Cialis and Viagra fingerprinting by ATR-FTIR spectroscopy with**

**chemometry: Can the same pharmaceutical powder mixture be used to falsify medicines?**

Forensic Sci. Inter., v.226, p.282, 2013b.

ORTIZ, R. S.; MARIOTTI, K. C.; HOLZSCHUC, M. H.; ROMÃO, W.; LIMBERGER, R. P.; MAYORGA, P.; **Profiling counterfeit Cialis, Viagra and analogs by UPLC-MS.** Forensic Sci. Int., v.229, p. 13, 2013a.

ORTIZ, R. S.; MARIOTTI, K. C.; LIMBERGER, R. P.; MAYORGA, P.; **Physical profile of counterfeit tablets Viagra® and Cialis®.** Braz. J. Pharm. Sci., v.48, p.487, 2012.

OTSUKA, M.; MOURI, Y.; MATSUDA, Y. **Chemometric evaluation of pharmaceutical properties of antipyrine granules by near-infrared spectroscopy.** AAPS Pharm. Sci. Tech., v.4,, p.142, 2003.

OZKAN, S. A.; USLU, B.; ZUMAN, P.; **Electrochemical oxidation of sildenafil citrate (Viagra) on carbon electrodes.** Anal. Chim. Acta, v.501, p.227, 2004.

PADMA-NATHAN, H.; GIULIANO, F.; **Oral drug therapy for erectile dysfunction.** Urologic clinics of North America, v. 28, p. 321, 2001.

PARISOTTO, G.; MARQUES, M.; HERMES, A. L.; FLORES, E. M. M.; FERRÃO, M. F. **Desenvolvimento de metodologias no infravermelho aplicadas para a quantificação de cloridrato de metformina em formulações farmacêuticas.** Orbital The Electronic Journal of Chemistry, v.1, p.38, 2009.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia 4º ed.** Editora Cengage Learning, São Paulo, 2012.

QIN, W.; LI, S. F. Y.; **An ionic liquid coating for determination of sildenafil and UK-103,320 in human serum by capillary zone electrophoresis-ion trap mass spectrometry.** Electrophoresis, v.23, p.4110, 2002.

RAMOS, A. W.; **Controle estatístico de processos contínuos e em bateladas.** Editora Edgard Blucher Ltda, Rio de Janeiro, 2000.

RANTANEN, J.; WIKSTRÖM, H.; TURNER, R.; TAYLOR, L. S.; **Use of In-line near-infrared spectroscopy in combination with chemometrics for improved understanding of pharmaceutical processes.** Anal. Chem., v.77, p.556, 2005.

RAVIPATI, G.; McCLUNG, J. A.; ARONOW, W. S.; PETERSON, S. J.; FRISHMAN, W. H.; **Type 5 phosphodiesterase inhibitors in the treatment of erectile dysfunction and cardiovascular disease.** Cardiology in Reviw, v. 15, p.76, 2007.

RIBEIRO, F. A.; BARBOZA, F. D.; BREITKREITZ, M. C.; MARTINS, J. A. **Quimiometria: inovação no desenvolvimento e validação de métodos analíticos para controle de**

**qualidade na indústria química.** Jornal do conselho regional de química IV região, v.85, p.14, 2007.

RODRIGUES, P. O.; CARDOSO, T. M.; SILVA, M. A. S.; MATOS, J. R.; **Application of Thermal Analytical Techniques on Characterization, Purity Determination and Degradation Kinetic of Zidovudine (AZT).** Acta Farm. Bonaerense, v.24, p.383, 2005.

RODRIGUEZ F. J.; BERZAS, N. J. J.; CASTENADA, P. G.; MORA, D. N.; **Development of a micellar electrokinetic capillary chromatography method for the determination of three drugs employed in the erectile dysfunction therapy.** J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. V.811, P.231, 2004.

RODRIGUEZ, J.; BERZAS, J. J.; CASTANEDA, G.; RODRIGUEZ, N.; **Determination of sildenafil citrate (viagra) and its metabolite (UK-103,320) by square-wave and adsorptive stripping square-wave voltammetry: Total determination in biological samples.** Talanta, v.62, p.427, 2004.

ROGGO, Y.; CHALUS, P.; MAURER, L.; MARTINEZ, C. L.; EDMOND, A.; JENT, N. **A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies.** J. Pharm. Biom. Anal., v.44, p.683, 2007.

ROGGO, Y.; DEGARDIN, K.; MARGOT, P.; **Identification of pharmaceutical tablets by raman spectroscopy and chemometrics.** Talanta, v.81, p.988, 2010.

SABIN, G. P.; LOZANO, V. A.; ROCHA, W. F. C.; ROMÃO, W.; ORTIZ, R. S.; POPPI, R. J.; **Characterization of sildenafil citrate tablets of different sources by near infrared chemical imaging and chemometric tools.** J. Pharm. Biomed. Anal., v. 85, p. 207, 2013.

SACRE, P. Y.; DECONINCK, E.; DE BEER, T.; COURSELLE, P.; VANCAUWENBERGHE, R.; CHIAP, P.; CROMMEN, J.; DE BEER, J. O.; **Comparison and combination of spectroscopic techniques for the detection of counterfeit medicines.** J. Pharm. Biomed. Anal., v.53, p.445, 2010.

SANTOS MONTAGNER, G. F. F.; SAGRILLO, M.; MACHADO, M. M.; ALMEIDA, R. C.; MASTARDEIRO, C. P.; DUARTE, M. M. M. F.; CRUZ, I. B. M. **Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotype.** Toxicology in Vitro, v.24, p.1410, 2010.

SARRAGUÇA, M. F.; SOARES, S. O.; LOPES, J. A. **A near-infrared spectroscopy method to determine aminoglycosides in pharmaceutical formulations.** Vibrational Spectroscopy, v.56, p.184, 2011

- ŠAŠIĆ, S. **Raman mapping of low-contend API pharmaceutical formulations. I. Mapping of Alprazolam in Alprazolam/Xanax tablets.** Pharmaceutical Research, v.24, p. 58, 2007.
- SAWATDEE, S.; SRICHANA, T.; **Analytical validation of sildenafil citrate inhaler preparation.** Chiang Mai J. Sci., v.40, . 669, 2013.
- SCHMID, W.; **The Micronucleus Test.** Mutation. Research., v.31, p.09, 1975.
- SENA, M. M.; CHAUDHRY, Z. F.; COLLINS, C. H.; POPPI, R. J. **Direct determination of diclofenac in pharmaceutical formulations containing B vitamins by using UV spectrophotometry and partial least squares regression.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.36, p.743, 2004
- SHAH, R. B.; TAWAKKUL, M. A.; KHAN, M. A.; **Process analytical technology: Chemometric analysis of Raman and near infra-red spectroscopic data for predicting physical properties of extended release matrix tablets.** J. Pharm. Sci., v.96, p.1356, 2007.
- SHAMLOUL, R.; GHANEM, H.; **Erectile dysfunction.** Lancet, v. 12, p. 153, 2013.
- SILVA, F. E. B.; FERRÃO, M. F.; PARISOTTO, G.; MÜLLER, E. I.; FLORES, E. M. M. **Simultaneous determination of sulphamethoxazole and trimethoprim in poder mixtures by attenuated total reflection-Fourier transform infrared and multivariate calibration.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.49, p.8000, 2009B.
- SILVA, F. E. B.; ZIECH, C.; DIAS, Y. P.; MOREIRA, E. C.; FLORES, E. M. M.; FERRÃO, M. F.; **Quantitative determination of sulphamethoxazole and trimethoprim in powder mixtures using raman spectroscopy and PLS.** Acta Farmaceutica Bonaerense, v.30, p.1216, 2011.
- SILVA, K. E. R.; ALVEZ, L. D. S.; SOARES, M. F. R.; PASSOS, R. C. S.; FARIA, A. R.; ROLIM NETO, P. J.; **Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica.** Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl., v.30, p.129, 2009a.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.** 7. Ed., Rio de Janeiro: LTC, 2012.
- SIMONE, E.; SALEEMI, A. N.; NAGY, Z. K.; **Application of quantitative raman spectroscopy for the monitoring of polymorphic transformation in crystallization processes using a good calibration practice procedure.** Chemical Engineering Research and Design, v.92, p.594, 2014.
- SINGH, N., MCCOY, M., TICE, R., SCHNEIDER, E.; **A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individuals cells.** Exp. Cell Res., v.175, p.84, 1995.
- SINKO, P.J. **Martin- físico-farmácia e ciências farmacêuticas.** 5ª edição. Artmed, 2008.

- SIVAKUMAR, T.; MANAVALAN, R.; MURALIDHARAN, C.; VALLIAPPAN, K.; **An improved HPLC method with the of a chemometric protocol: Simultaneous analysis of amlodipine and atorvastatin in pharmaceutical formulations.** Journal of separation science, v.30, p.3143, 2007.
- SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F.J. **Fundamentos de química analítica. 8. Ed.** São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2006.
- SOUZA, J. A. L.; ALBUQUERQUE, M. M.; GRANJEIRO JR, S.; PIMENTEL, M. F.; SANTANA, D. P.; SIMÕES, S. S. **Quantification of captopril disulphide as a degradation product in captopril tablets using near infrared spectrometry and chemometrics.** Vibrational Spectroscopy, v.62, p.35, 2012.
- TOGKALIDOU, T.; TUNG, H. H.; SUN, Y.; ANDREWS, A.; BRAATZ, R. D.; **Solution concentration prediction for pharmaceutical crystallization processes using robust chemometrics and ATR FTIR Spectrometry.** Org. Proc. Res. Dev., v.6, p.317, 2002.
- TYSZCZUK, K; KOROLCZUK, M; **Voltammetric method for the determination of sildenafil citrate (Viagra) in pure form and in pharmaceutical formulations.** Bioelectrochemistry, v.78, p.113, 2010.
- USP. **The United States Pharmacopoeia, 37 ed.** Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2014.
- VERJ, M.; DENECKERE, A.; VANDENABEELE, P.; KASTE, D.; MOENS, L.; **Detection of counterfeit Viagra® with Raman spectrometry.** J. Pharm. Biomed. Anal., v.46, p.303, 2008.
- VOGEL, A. I. **Análise Química Quantitativa 6º ed.** Editora LTC, Rio de Janeiro, 2008.
- WARHOLAK, T. L.; NAU, D. P.; **Quality & Safety in Pharmacy Practice – Part II: Quality Improvement concepts.** Editora MC Graw-Hill, 2010.
- WAWER, I.; PISKLAK, M.; CHILMONCZYK, Z.; **1 H, 13 C, 15 N NMR analysis of sildenafil base and citrate (Viagra) in solution, solid state and pharmaceutical dosage forms.** J. Pharm. Biomed. Anal., v.38, p.865, 2005.
- WEINERT, P. L.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R.; **Spectrophotometric determination of sildenafil in pharmaceutical formulations.** Quim. Nova, v.31, p.1112, 2008.
- WEYERMANN, C.; MARQUIS, R.; DELAPORTE, C.; ESSEIVA, P.; LOCK, E.; AALBERG, L.; BOZENKO JR, J. S.; DIECKMANN, S.; DUJOURDY, L.; ZRCEK, F.; **Drug intelligence based on MDMA tablets data. I. Organic impurities profiling.** Forensic Science International, v.177, p.11, 2008.

WRIGHT, P. J.; **Comparision of phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibitors.** Inter. J. Clinical Practice, v.60, p.967, 2006.