

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**ARIADNE MISSONO BRONDI**

**APLICAÇÕES DE ANÁLISES TÉRMICAS EM FRAUDE DE ALIMENTOS E  
ESTUDO DE PRÉ-FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA**

**Alfenas/MG**

**2017**

**ARIADNE MISSONO BRONDI**

**APLICAÇÕES DE ANÁLISES TÉRMICAS EM FRAUDE DE ALIMENTOS E  
ESTUDO DE PRÉ-FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química como parte dos requisitos para obtenção do título de doutorado em química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de Concentração: Química Analítica.  
Orientador: Prof. Dr. Marcello Garcia Trevisan  
Coorientadora: Profa. Dra. Jerusa Simone Garcia Trevisan

**Alfenas/MG**

**2017**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Brondi, Ariadne Missono.

Aplicações de análises térmicas em fraude de alimentos e estudo de pré-formulação farmacêutica / Ariadne Missono Brondi. -- Alfenas/MG, 2017.  
155 f.

Orientador: Marcello Garcia Trevisan  
Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Alfenas,  
Alfenas, MG, 2017.  
Bibliografia.

1. Análise térmica. 2. Análise Multivariada. 3. Fraude. 4. Café. 5.  
Preparações Farmacêuticas. 6. Combinação Besilato de Anlodipino e  
Olmesartana Medoxomila. I. Trevisan, Marcello Garcia. II. Título.

CDD-543

## ARIADNE MISSONO BRONDI

“Aplicações de análises térmicas em fraude de alimentos e estudo de pré-formulação farmacêutica”

A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Analítica.

Aprovado em: 27/01/2017

Prof. Dr. Marcello Garcia Trevisan  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –  
UNIFAL-MG

Assinatura:  \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –  
UNIFAL-MG

Assinatura:  \_\_\_\_\_


Profa. Dra. Jaine Honorata Hortolan Luiz  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –  
UNIFAL-MG

Assinatura:  \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Marco Antônio Schiavon  
Instituição: Universidade Federal de São João  
del-Rei - UFSJ

Assinatura:  \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro  
Instituição: Universidade Federal de São Carlos -  
UFSCar

Assinatura:  \_\_\_\_\_

Dedico a Deus, minha família e amigos que comigo compartilharam os prazeres e dificuldades desta caminhada.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo sublime dom da vida e por me dar forças para superar todas as minhas dificuldades, me guiando em todos os momentos. A Nossa Senhora pela poderosa e sempre fiel intercessão.

Aos meus pais, Carlos e Vilma, pelo amor e amizade incondicionais, pela compreensão de todos os momentos em que não pude me fazer presente, e pelo incentivo, não medindo esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida, mostrando-me sempre a importância de lutar por aquilo que acredito.

Aos meus irmãos, Ariane e Junior, pelo carinho, paciência, apoio e incentivo em todos os momentos.

Ao meu namorado Fábio pelo carinho, apoio, compreensão, paciência, pelas palavras que me reergueram quando perdia as forças e incentivo em cada etapa do desenvolvimento deste doutorado.

Ao Prof. Dr. Marcello Garcia Trevisan pela orientação, atenção, apoio, conhecimentos construídos e confiança depositada na realização deste trabalho.

A Profa. Dra. Jerusa Simone Garcia pela coorientação.

A Profa. Dra. Claudia Torres pela colaboração e amizade, e pela parceria que possibilitou uma das aplicações apresentadas neste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Análise e Caracterização de Fármacos (LACFar): Josi, Fernanda, Amanda, Renata, Cleydson, Maria Fernanda, Carol e Ingrid. E também aqueles que passaram pelo grupo e hoje estão em outras jornadas: Alexandre, Aline, Larissa e Rafael. Obrigada pelo convívio, carinho, apoio e amizade.

Aos amigos do grupo de Pesquisa em Química Analítica Instrumental e do Laboratório Interdisciplinar de Química (LabIQ), professores e funcionários que de certa forma me auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Ao Laboratório de Cristalografia (UNIFAL-MG) pelas medidas de difração de raios X por pó, FINEP (PROINFRA-O1/2007 – Conv.: 01.08.0562.00).

A todos aqueles que torceram por mim e de alguma forma tornaram possível a realização deste trabalho.

Obrigada!

*"O primeiro gole do copo das ciências naturais o torna ateu; mas no fundo do copo Deus o aguarda."*

Werner Heisenberg

(TALLI, 2009)

## RESUMO

As técnicas de análise térmica, como a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA) são técnicas bem conhecidas utilizadas na caracterização físico-química de diferentes materiais. O presente trabalho descreve duas diferentes aplicações das análises térmicas: fraudes de alimentos e estudo de pré-formulação farmacêutica. Na primeira aplicação, em fraude de alimentos, foi realizado o estudo da detecção de adulteração do café por milho. As fraudes em café moído têm a finalidade de gerar mais lucro, mas também afeta a sua qualidade e altera suas propriedades nutricionais. Neste caso a adulteração do café por milho foi detectada e quantificada utilizando DSC e Espectroscopia no Infravermelho juntamente com modelos PCA (*Análise de Componentes Principais*) e PLS (Quadrados Mínimos Parciais). O nível de adulteração utilizada foi de 0,5 a 40% (m/m). Os modelos PCA foram capazes de diferenciar amostras adulteradas de não adulteradas, inclusive em níveis inferiores a 1% (m/m) de adulterante. Os modelos PLS apresentaram boa correlação entre os valores previstos e de referência, com RMSECV (Erro quadrático médio de validação cruzada) inferior a 3,5% para o modelo construído com os dados de DSC, e 2,7% para o modelo com dados de Espectroscopia no Infravermelho. A segunda aplicação envolve estudos de pré-formulação farmacêutica, tendo como alvos os fármacos besilato de anlodipino e olmesartana medoxomila. Ambos são medicamentos anti-hipertensivos que podem ser administrados isoladamente, em monoterapia, ou em associação farmacêutica. No desenvolvimento de um novo medicamento é necessário o conhecimento de propriedades físico-químicas do fármaco e dos excipientes envolvidos, e a estabilidade da formulação, a fim de que o novo medicamento não tenha suas propriedades e características alteradas ao longo do tempo, garantindo a segurança, eficácia e qualidade do produto. Primeiramente, os dados obtidos por DSC foram utilizados para determinar os parâmetros termocinéticos e termodinâmicos dos fármacos, e realizar o estudo de compatibilidade fármaco-excipiente, pela análise de misturas binárias 1:1 (m/m) dos fármacos e excipientes. Por FTIR com aquecimento foram analisadas misturas binárias 1:1 (m/m) dos fármacos e excipientes, e misturas ternárias 1:1:1 (m/m) contendo os fármacos anlodipino e olmesartana, e excipientes. Misturas binárias de cada fármaco com os excipientes na proporção 1:1 (m/m), e



misturas ternárias, contendo os fármacos: besilato de anlodipino e olmesartana medoxomila, e excipientes na proporção 1:4:5 (m/m/m), foram analisadas por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) logo após o seu preparo e após serem armazenadas em câmara de estabilidade a  $40\pm 1$  °C e  $75\pm 5\%$  de umidade relativa (UR) por 3 e 6 meses, e a  $40\pm 1$  °C a seco por 3 e 6 meses, com a finalidade de confrontar os resultados obtidos por DSC e FTIR. Os excipientes testados foram amido pré-gelatinizado, celulose, croscarmelose sódica, estearato de magnésio, álcool polivinílico, dióxido de titânio, talco, polivinilpirrolidona, lactose e polietilenoglicol. De acordo com os resultados obtidos por DSC, FTIR com aquecimento e HPLC foi possível observar que as condições de armazenamento são cruciais para a estabilidade da formulação. Sendo que em todos os casos o anlodipino se mostrou incompatível com o amido, a olmesartana com o PVP e lactose, e a associação farmacêutica com amido, celulose, croscarmelose, estearato de magnésio, álcool polivinílico, PVP, lactose e PEG.

**PALAVRAS-CHAVE:** Análise térmica. Análise Multivariada. Fraude. Café. Preparações Farmacêuticas. Besilato de Anlodipino e Olmesartana Medoxomila.

## ABSTRACT

The thermal analysis techniques such as Differential Scanning Calorimetry (DSC), Thermogravimetry (TG) and Differential Thermal Analysis (DTA) are well-known techniques used in the physical-chemical characterization of different materials. The present work describes two different applications of thermal analysis: fraud in food and pharmaceutical pre-formulation study. In the first application, in food fraud, the study of the detection of coffee adulteration by corn was carried out. The adulteration of ground coffee has the purpose of generate higher profits, but also affects tis quality and changes its nutritional properties. In this case the adulteration of coffee by corn was detected and quantified using DSC and Infrared Spectroscopy coupled to PCA (Principal Component Analysis) and PLS (Partial Least Squares) models. The level of adulteration used was between 0.5 to 40% (w/w). The PCA models were able to differentiate adulterated samples from unadulterated ones, even at levels lower than 1% (w/w) of adulterant. PLS models showed a good correlation between predicted and reference values, with RMSECV (Root Mean Square Error of Cross-Validation) lower than 3.5% for the model constructed with DSC data, and 2.7% for the model with infrared spectroscopy data. The second application involves pharmaceutical pre-formulation studies with the drugs amlodipine besylate and olmesartan medoxomil. Both of drugs are antihypertensives that can be administrated alone, in monotherapy, or in pharmaceutical association. In the development of a new drug is required knowledge of the physicochemical properties of the drug and excipients involved, and the formulation stability, so that the new product does not have properties and characteristics change over time, guaranteeing the safety, efficiency and product quality. At first, DSC data were used to determine the thermokinetic and thermodynamic parameters of the drugs and to perform the drug-excipient compatibility study by analyzing binary mixtures of the drugs and excipients 1:1 (w/w). Binary mixtures of drugs and excipients 1:1 (w/w), and ternary mixtures containing the drugs amlodipine and olmesartan, and excipients 1:1:1 (w/w/w) were analyzed by FTIR with heating. Binary mixtures of each drug with excipient in a proportion of 1:1 (w/w), and ternary mixtures, containing drugs: amlodipine besylate and olmesartan medoxomil, and excipients in a proportion of 1:4:5 (w/w/w), were analyzed by HPLC (High Performance Liquid Chromatography) immediately after preparation and after

being stored in stability chamber at  $40\pm 1$  °C and  $75\pm 5\%$  of relative humidity (RH) for 3 and 6 months, and at  $40\pm 1$  °C and dry conditions for 3 and 6 months, in order to compare the results obtained by DSC and FTIR. The excipients tested were pregelatinized starch, cellulose, croscarmellose sodium, magnesium stearate, polyvinyl alcohol, titanium dioxide, talc, polyvinylpyrrolidone, lactose and polyethylene glycol. According to the results obtained by DSC, FTIR with heating and HPLC it was possible to observe that the storage conditions are crucial for the stability of the formulation. In all cases, amlodipine proved to be incompatible with starch, olmesartan with PVP and lactose, and the pharmaceutical association with starch, cellulose, croscarmellose sodium, magnesium stearate, polyvinyl alcohol, PVP, lactose and PEG.

**KEYWORDS:** Thermal analysis. Multivariate Analysis. Fraud. Coffee. Pharmaceutical Preparations. Amlodipine Besylate and Olmesartan Medoxomil.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

$\Delta G^\#$	- Energia livre de Gibbs de ativação
$\Delta H^\#$	- Entalpia de ativação
$\Delta H_f$	- Entalpia de fusão
$\Delta H_f'$	- Entalpia de fusão calculada
$\Delta S^\#$	- Entropia de ativação
ABRATEC	- Associação Brasileira de Análise Térmica e Calorimetria
Anlo	- Besilato de anlodipino
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAD	- Detector de Aerossol Carregado - <i>Charged Aerosol Detection</i>
CECAFÉ	- Conselho dos Exportadores de Café do Brasil
DRIFTS	- Espectroscopia no Infravermelho por Refletância Difusa com Transformada de Fourier - <i>Diffuse-reflectance infrared Fourier transform spectroscopy</i>
DSC	- Calorimetria Exploratória Diferencial - <i>Differential Scanning Calorimetry</i>
DTA	- Análise Térmica Diferencial - <i>Differential Thermo Analyses</i>
DTG	- Termogravimetria Diferencial - <i>Differential Thermogravimetry</i>
$E_a$	- Energia de ativação
ECA	- Enzima conversora da angiotensina
FIR	- Infravermelho distante - <i>Far Infrared</i>
FTIR	- Espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier – <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
FTIR-ATR	- Espectroscopia no Infravermelho por Refletância Total Atenuada - <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy with Attenuated Total Reflectance</i>
GC	- Cromatografia gasosa - <i>Gas Chromatography</i>
$h$	- Constante de Plank
HPLC	- Cromatografia líquida de alta eficiência - <i>High-Pressure Liquid Chromatography</i>
IC	- Intervalo de confiança

ICH	- Conferência Internacional de Harmonização - <i>International Conference on Harmonisation</i>
ICO	- Organização Internacional do Café - <i>International Coffee Organization</i>
ICTAC	- Confederação Internacional de Análise Térmica e Calorimetria - <i>International Confederation of Thermal Analysis and Calorimetry</i>
k	- Constante de velocidade de reação
$K_B$	- Constante de Boltzmann
LC	- Cromatografia Líquida - <i>Liquid Chromatography</i>
LD	- Limite de detecção
LOF	- Falta de ajuste – <i>Lack of fit</i>
LQ	- Limite de quantificação
LV	- Variáveis Latentes - <i>Latent Variables</i>
$m_a$	- Massa de amostra
MAPA	- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MCR	- Resolução de Curvas Multivariadas - <i>Multivariate Curve Resolution</i>
MCR-ALS	- Resolução de Curvas Multivariadas com Mínimos Quadrados Alternantes - <i>Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares</i>
$m_f$	- Massa de fármaco
MIR	- Infravermelho médio - <i>Mid Infrared</i>
n	- Número de réplicas
NIR	- Infravermelho próximo - <i>Near Infrared</i>
Olme	- Olmesartana medoxomila
PC	- Componentes Principais - <i>Principal Components</i>
PCA	- Análise das Componentes Principais - <i>Principal Component Analysis</i>
PEG	- Polietilenoglicos
PLS	- Quadrados Mínimos Parciais - <i>Partial Least Squares</i>
PVP	- Polivinilpirrolidona
PXRD	- Difração de raios X por pó – <i>Powder X-ray Diffraction</i>
R	- Constante universal dos gases
$R^2$	- Coeficiente de determinação
RMN	- Ressonância Magnética Nuclear
RMSEC	- Erro quadrático médio de calibração - <i>Root Mean Square Error of Calibration</i>

RMSECV	- Erro quadrático médio de validação cruzada - <i>Root Mean Square Error of Cross-validation</i>
RMSEP	- Erro quadrático médio de previsão - <i>Root Mean Square Errors of Prediction</i>
s	- Desvio padrão
SNV	- Variável Normal Padronizada - <i>Standard Normal Variate</i>
TG	- Termogravimetria - <i>Thermogravimetry</i>
T <sub>m</sub>	- Pico de maior temperatura presente nas curvas DSC
T <sub>onset</sub>	- Extrapolação do pico no início da fusão
USP	- Farmacopéia dos Estados Unidos - <i>United States Pharmacopeia</i>
UV	- Ultravioleta
XRD	- Difração de raios X - <i>X-ray Diffraction</i>
Z	- Fator pré-exponencial de Arrhenius
β	- Razão de aquecimento
v	- Estiramento

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema de uma termobalança utilizada em equipamentos de análise termogravimétrica .....	25
Figura 2 - Curvas TG e DTG para o oxalato de cálcio.....	26
Figura 3 - Diagrama esquemático do DSC por compensação de potência .....	27
Figura 4 - Diagrama esquemático do DSC por fluxo de calor.....	28
Figura 5 - Curva genérica de DSC .....	28
Figura 6 - Diagrama esquemático de equipamento de DTA.....	29
Figura 7 - Vibrações de deformação angulares.....	30
Figura 8 - Vibrações de deformação axiais .....	31
Figura 9 - Esquema dos tipos de medida em FTIR .....	32
Figura 10 - Diagrama esquemático do detector CAD .....	34
Figura 11 - Representação esquemática da decomposição em componentes principais por PCA .....	36
Figura 12 - Representação esquemática da decomposição em variáveis latentes das matrizes X e Y para o modelo PLS .....	38
Figura 13 - Efeito da primeira e segunda derivada em espectros .....	42
Figura 14 - Curvas DSC e TG das amostras de café puro, milho puro e misturas binárias de café e milho .....	51
Figura 15 - Gráfico de escores e dendrograma das amostras de café puro e café adulterado por milho empregando DSC .....	53
Figura 16 - Regressão PLS para determinação de milho em amostras de café torrado e moído empregando DSC.....	54
Figura 17 - Espectros FTIR-ATR das amostras de café puro, milho puro e misturas binárias de café e milho .....	58
Figura 18 - Gráfico de escores e dendrograma das amostras de café puro e café adulterado por milho empregando FTIR-ATR .....	60
Figura 19 - Regressão PLS para determinação de milho em amostras de café torrado e moído empregando FTIR-ATR.....	61
Figura 20 - Estrutura química do besilato de anlodipino.....	65
Figura 21 - Estrutura química da olmesartana medoxomila e seu produto metabólico ativo, olmesartana.....	66

Figura 22 - Curvas TG/DTA do besilato de anlodipino .....	72
Figura 23 - Curvas TG/DTA da olmesartana medoxomila .....	73
Figura 24 - Espectros infravermelho do besilato de anlodipino de 30 a 300 °C .....	74
Figura 25 - Espectros infravermelho da olmesartana medoxomila de 30 a 300 °C .....	74
Figura 26 - Efeito da razão de aquecimento nas temperaturas de fusão e decomposição do besilato de anlodipino e olmesartana medoxomila em curvas DSC .....	76
Figura 27 - Gráficos de $\ln(\beta \cdot T_m^{-2})$ versus $1000/T_m$ e $\log(\beta)$ versus $1000/T_m$ para besilato de anlodipino e olmesartana medoxomila .....	78
Figura 28 - Difratoograma de raios X por pó do besilato de anlodipino .....	80
Figura 29 - Difratoograma de raios X por pó da olmesartana medoxomila .....	81
Figura 30 - Curvas DSC do anlodipino, olmesartana e de cada excipiente isolado .....	84
Figura 31 - Curvas DSC do anlodipino em comparação com as misturas binárias .....	87
Figura 32 - Curvas DSC do olmesartana em comparação com as misturas binárias .....	89
Figura 33 - Curvas DSC do anlodipino puro, olmesartana pura, e da mistura de anlodipino e olmesartana 1:1 (m/m) .....	90
Figura 34 - Primeira derivada dos espectros puros e espectros recuperados pelo MCR-ALS do anlodipino e olmesartana .....	93
Figura 35 - Gráfico da variação da concentração em função da temperatura para o anlodipino .....	94
Figura 36 - Gráfico da variação da concentração em função da temperatura para misturas binárias contendo anlodipino .....	95
Figura 37 - Gráfico da variação da concentração em função da temperatura para a olmesartana .....	96
Figura 38 - Gráfico da variação da concentração em função da temperatura para misturas binárias contendo olmesartana .....	97
Figura 39 - Gráfico da variação da concentração em função da temperatura para a associação farmacêutica .....	98
Figura 40 - Gráfico da variação da concentração em função da temperatura para misturas ternárias contendo a associação farmacêutica .....	99



Figura 41 - Cromatogramas da olmesartana, anlodipino e da mistura de olmesartana e anlodipino no comprimento de onda 239 nm .....	104
Figura 42 - Cromatogramas da olmesartana, anlodipino e da mistura de olmesartana e anlosipino no comprimento de onda 250 nm .....	104
Figura 43 - Cromatogramas da olmesartana, anlodipino e da mistura de olmesartana e anlosipino utilizando detector CAD .....	105
Figura 44 - Varredura espectral do cromatograma do besilato de anlodipino .....	106
Figura 45 - Curva de calibração para anlodipino no comprimento de onda de 239 nm .....	107
Figura 46 - Curva de calibração para anlodipino utilizando detector CAD.....	107
Figura 47 - Curva de calibração para olmesartana no comprimento de onda de 250 nm .....	108
Figura 48 - Curva de calibração para olmesartana utilizando detector CAD .....	108
Figura 49 - Cromatogramas por UV em 239 nm no tempo inicial do anlodipino, olmesartana e de todos os excipientes puros .....	114
Figura 50 - Cromatogramas por CAD no tempo inicial do anlodipino, olmesartana e de todos os excipientes puros .....	115
Figura 51 - Cromatogramas por UV em 239 nm no tempo inicial das misturas binárias de anlodipino e excipientes .....	116
Figura 52 - Cromatogramas por CAD no tempo inicial das misturas bináriasde anlodipino e excipientes.....	117
Figura 53 - Cromatogramas por UV em 250 nm no tempo inicial das misturas binárias da olmesartana e excipientes.....	118
Figura 54 - Cromatogramas por CAD no tempo inicial das misturas binárias da olmesartana e excipientes .....	119
Figura 55 - Cromatogramas por UV em 239 nm no tempo inicial das misturas ternárias da olmesartana, anlodipino e excipientes .....	120
Figura 56 - Cromatogramas por CAD no tempo inicial das misturas ternárias da olmesartana, anlodipino e excipientes.....	121
Figura 57 - Cromatogramas das amostras após 3 meses a 40°C±1°C à seco do anlodipino puro e das suas misturas binárias com os excipientes .....	125

Figura 58 - Cromatogramas das amostras após 6 meses a 40°C±1°C à seco do anlodipino puro e das suas misturas binárias com os excipientes .....	126
Figura 59 - Cromatogramas das amostras após 3 meses a 40°C±1°C à seco da olmesartana pura e das suas misturas binárias com os excipientes .....	127
Figura 60 - Cromatogramas das amostras após 6 meses a 40°C±1°C à seco da olmesartana pura e das suas misturas binárias com os excipientes .....	128
Figura 61 - Cromatogramas das amostras após 3 meses a 40°C±1°C à seco de mistura de olmesartana e anlodipino e das suas misturas ternárias com os excipientes .....	129
Figura 62 - Cromatogramas das amostras após 6 meses a 40°C±1°C à seco de mistura de olmesartana e anlodipino e das suas misturas ternárias com os excipientes .....	130
Figura 63 - Cromatogramas das amostras após 3 meses a 40°C±1°C e 75%±5% de umidade relativa do anlodipino puro e das suas misturas binárias com os excipientes .....	133
Figura 64 - Cromatogramas das amostras após 6 meses a 40°C±1°C e 75%±5% de umidade relativa do anlodipino puro e das suas misturas binárias com os excipientes .....	134
Figura 65 - Cromatogramas das amostras após 3 meses a 40°C±1°C e 75%±5% de umidade relativa da olmesartana pura e das suas misturas binárias com os excipientes .....	135
Figura 66 - Cromatogramas das amostras após 6 meses a 40°C±1°C e 75%±5% de umidade relativa da olmesartana pura e das suas misturas binárias com os excipientes .....	136
Figura 67 - Cromatogramas das amostras após 3 meses a 40°C±1°C e 75%±5% de umidade relativa de mistura de olmesartana e anlodipino e das suas misturas ternárias com os excipientes .....	137
Figura 68 - Cromatogramas das amostras após 6 meses a 40°C±1°C e 75%±5% de umidade relativa de mistura de olmesartana e anlodipino e das suas misturas ternárias com os excipientes .....	138

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Técnicas termoanalíticas e suas respectivas propriedades físicas .....	24
Tabela 2 - Composição das amostras utilizadas para determinação de milho em café por DSC .....	48
Tabela 3 - Parâmetros de desempenho do modelo PLS para estimar a concentração de milho em café torrado e moído por DSC.....	54
Tabela 4 - Composição das amostras utilizadas para determinação de milho em café por FTIR-ATR.....	56
Tabela 5 - Parâmetros de desempenho do modelo PLS para estimar a concentração de milho em café torrado e moído por FTIR-ATR.....	61
Tabela 6 - Parâmetros de desempenho dos modelos PLS para estimar a concentração de milho em café torrado e moído por DSC e FTIR-ATR.....	63
Tabela 7 - Dosagens comerciais da associação farmacêutica: olmesartana e anlodipino .....	66
Tabela 8 - Resultados do TG/DTA das amostras de fármaco .....	73
Tabela 9 - Temperaturas de fusão de decomposição do besilato de anlodipino e olmesartana medoxomila obtidos por DSC em diferentes razões de aquecimento .....	75
Tabela 10 - Parâmetros cinéticos obtidos para besilato de anlodipino e olmesartana medoxomila .....	79
Tabela 11 - Valores de entalpia e temperatura de fusão do anlodipino em comparação com as misturas binárias (média ± intervalo de confiança).....	86
Tabela 12 - Valores de entalpia e temperatura de fusão do olmesartana em comparação com as misturas binárias (média ± intervalo de confiança).....	88
Tabela 13 - Condições do método de HPLC alteradas .....	101
Tabela 14 - Áreas referentes aos picos de anlodipino e olmesartana nos comprimentos de onda 329 nm e 250 nm .....	106
Tabela 15 - Resultados do teste de exatidão para anlodipino .....	109
Tabela 16 - Resultados do teste de exatidão para a olmesartana .....	109

Tabela 17 - Resultados da avaliação da robustez.....	111
Tabela 18 - Dosagens de olmesartana e anlodipino encontradas com relação ao teor inicial em misturas binárias após 3 e 6 meses a 40°C±1°C à seco.....	123
Tabela 19 - Dosagens de olmesartana e anlodipino encontradas com relação ao teor inicial em misturas ternárias após 3 e 6 meses a 40°C±1°C à seco.....	124
Tabela 20 - Dosagens de olmesartana e anlodipino encontradas com relação ao teor inicial em misturas binárias após 3 e 6 meses a 40°C±1°C sob 75%±5% de umidade relativa .....	132
Tabela 21 - Dosagens de olmesartana e anlodipino encontradas com relação ao teor inicial em misturas ternárias após 3 e 6 meses a 40°C±1°C sob 75%±5% de umidade relativa .....	132
Tabela 22 - Resultados dos testes de compatibilidade fármaco-excipiente utilizando DSC, FTIR-ATR e HPLC.....	141

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	22
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	24
2.1	ANÁLISE TÉRMICA .....	24
2.1.1	<b>Termogravimetria (TG) e Termogravimetria Derivada (DTG)</b> .....	25
2.1.2	<b>Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Análise Térmica Diferencial (DTA)</b> .....	26
2.2	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO .....	29
2.3	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA .....	33
2.4	ANÁLISE MULTIVARIADA .....	35
2.4.1	<b>Análise de Componentes Principais (PCA)</b> .....	36
2.4.2	<b>Regressão por Quadrados Mínimos Parciais (PLS)</b> .....	37
2.4.3	<b>Resolução de Curvas Multivariadas (MCR)</b> .....	39
2.4.4	<b>Métodos de pré-processamento</b> .....	41
<b>3</b>	<b>APLICAÇÃO 1: DETERMINAÇÃO DA ADULTERAÇÃO DE CAFÉ POR MILHO</b> .....	44
3.1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	44
3.2	OBJETIVO .....	46
3.2.1	<b>Objetivos Específicos</b> .....	46
3.3	DETERMINAÇÃO DA ADULTERAÇÃO DE CAFÉ POR MILHO EMPREGANDO DSC .....	47
3.3.1	<b>Materiais e métodos</b> .....	47
3.3.1.1	Preparo das amostras .....	47
3.3.1.2	Calorimetria exploratória diferencial .....	48
3.3.1.3	Análise termogravimétrica .....	49
3.3.1.4	Análise quimiométrica .....	49
3.3.2	<b>Resultados e discussão</b> .....	50
3.3.3	<b>Conclusão Parcial</b> .....	55
3.4	DETERMINAÇÃO DA ADULTERAÇÃO DE CAFÉ POR MILHO EMPREGANDO ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO .....	55
3.4.1	<b>Materiais e métodos</b> .....	55
3.4.1.1	Preparo das amostras .....	56

3.4.1.2	Espectroscopia no infravermelho .....	56
3.4.1.3	Análise quimiométrica .....	57
<b>3.4.2</b>	<b>Resultados e discussão</b> .....	<b>57</b>
<b>3.4.3</b>	<b>Conclusão Parcial</b> .....	<b>62</b>
3.5	CONCLUSÃO.....	62
<b>4</b>	<b>APLICAÇÃO 2: ESTUDO DE ESTABILIDADE E COMPATIBILIDADE DA ASSOCIAÇÃO FARMACÊUTICA ANLODIPINO E OLMESARTANA</b> ...	<b>64</b>
4.1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	64
4.2	OBJETIVO.....	69
<b>4.2.1</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	<b>69</b>
4.3	CARACTERIZAÇÃO DOS FÁRMACOS BESILATO DE ANLODIPINO E OLMESARTANA MEDOXOMILA.....	70
<b>4.3.1</b>	<b>Materiais e métodos</b> .....	<b>70</b>
4.3.1.1	Análise termogravimétrica .....	70
4.3.1.2	Calorimetria exploratória diferencial .....	70
4.3.1.3	Espectroscopia no infravermelho .....	71
4.3.1.4	Difratometria de raios X por pó.....	71
<b>4.3.2</b>	<b>Resultados e discussão</b> .....	<b>71</b>
<b>4.3.3</b>	<b>Conclusão Parcial</b> .....	<b>81</b>
4.4	ESTUDO DE COMPATIBILIDADE FÁRMACO-EXCIPIENTE EMPREGANDO DSC .....	82
<b>4.4.1</b>	<b>Materiais e métodos</b> .....	<b>82</b>
4.4.1.1	Preparo das amostras .....	82
4.4.1.2	Calorimetria exploratória diferencial .....	83
<b>4.4.2</b>	<b>Resultados e discussão</b> .....	<b>83</b>
<b>4.4.3</b>	<b>Conclusão Parcial</b> .....	<b>90</b>
4.5	ESTUDO DE COMPATIBILIDADE FÁRMACO-EXCIPIENTE EMPREGANDO FTIR-ATR .....	91
<b>4.5.1</b>	<b>Materiais e métodos</b> .....	<b>91</b>
<b>4.5.2</b>	<b>Resultados e discussão</b> .....	<b>92</b>
<b>4.5.3</b>	<b>Conclusão Parcial</b> .....	<b>100</b>
4.6	QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE ANLODIPINO E OLMESARTANA POR HPLC .....	100
<b>4.6.1</b>	<b>Materiais e métodos</b> .....	<b>101</b>

<b>4.6.2</b>	<b>Resultados e discussão</b> .....	103
<b>4.6.3</b>	<b>Conclusão Parcial</b> .....	111
4.7	ESTUDO DE ESTABILIDADE E COMPATIBILIDADE UTILIZANDO HPLC.....	111
<b>4.7.1</b>	<b> Materiais e métodos</b> .....	112
<b>4.7.2</b>	<b> Resultados e discussão</b> .....	113
4.7.2.1	Análise das amostras em tempo inicial .....	113
4.7.2.2	Análise das amostras de 3 e 6 meses.....	122
<b>4.7.3</b>	<b> Conclusão Parcial</b> .....	138
4.8	CONCLUSÃO.....	139
<b>5</b>	<b> CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	142
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	143

## 1 INTRODUÇÃO

Cada substancia possui propriedades termodinâmicas particulares, como capacidade calorífica, entalpia e entropia. Portanto, aquecer e resfriar uma amostra observando o seu comportamento é uma maneira simples de se estudar um material. Métodos de análise térmica foram desenvolvidos para o estudo do comportamento termodinâmico de uma amostra, em que uma propriedade física é mensurada em função da temperatura ou do tempo, quando submetida a um programa de aquecimento/resfriamento (HAINES, 2002).

As técnicas de análises térmicas, como a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria (TG) são técnicas bem conhecidas utilizadas na caracterização físico-química de materiais. Poucos são os estudos que descrevem a aplicação destas técnicas na detecção e quantificação de analitos.

As análises térmicas podem ser empregadas em detecção de diferentes tipos de fraudes, desde a identificação de falsificação, por exemplo na diferenciação de pelos naturais e sintéticos, segundo Tonetti et al. (2015), até a quantificação de adulterantes adicionados em produtos de diferentes naturezas, como mel, óleos vegetais e diesel (CORDELLA et al., 2003; DAHIMI et al., 2014; MANSOR; MAN; SHUHAIMI, 2012; MARIKKAR et al., 2002; MOHAMMED; MARIKKAR; RANA, 2014; TOMASZEWSKA-GRAS, 2012; TORRECILLA et al., 2011; WETTEN et al., 2014, 2015).

A aplicação das análises térmicas em estudos de estabilidade de fármacos e medicamentos está fundamentada no fato de que a análise de um sólido puro (fármaco ou excipiente) fornece curvas termoanalíticas características das quais podemos extrair informações como a temperatura de fusão, entalpia de mudança de fase e temperatura de decomposição. No caso da análise de uma mistura de sólidos (medicamento) pode ocorrer interação entre as substancias que causam alterações nas propriedades físico-químicas do fármaco, as quais são reveladas nas curvas termoanalíticas. O estudo destas interações são importantes por elas interferirem na qualidade, segurança e eficácia do produto final (BROWN, 2001; GIRON, 1998; PANI et al., 2012).



O presente trabalho teve como objetivo central aplicar as análises térmicas na detecção da adulteração do café por adição de milho e no estudo de pré-formulação farmacêutica do besilato de anlodipino e olmesartana medoxomila.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A seguir será apresentada uma revisão bibliográfica a respeito dos principais conceitos e técnicas abordados neste trabalho.

### 2.1 ANÁLISE TÉRMICA

De acordo com a ICTAC (Confederação Internacional de Análise Térmica e Calorimetria - *International Confederation of Thermal Analysis and Calorimetry*), "Análise Térmica é o estudo das relações entre uma propriedade da amostra e sua temperatura, enquanto a amostra é aquecida ou resfriada de maneira controlada" (BROWN; GALLAGHER, 2007; IONASHIRO, 2005). Definição esta que é adotada pela ABRATEC (Associação Brasileira de Análise Térmica e Calorimetria).

Assim, a Análise Térmica é "um grupo de técnicas nas quais uma propriedade física de uma substância e/ou seus produtos de reação é medida como função da temperatura, enquanto a substância é submetida a um programa controlado de temperatura" (IONASHIRO, 2005). A Tabela 1 resume as técnicas termoanalíticas mais conhecidas e as respectivas propriedades físicas associadas.

Tabela 1 - Técnicas termoanalíticas e suas respectivas propriedades físicas

Técnica	Propriedade	Uso
Termogravimetria (TG)		Mudanças de massa devido à
Termogravimetria Derivada (DTG)	Massa	interação com a atmosfera, vaporização e decomposição
Análise Térmica Diferencial (DTA)	Temperatura	Processos físicos e químicos envolvendo variação de energia
Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	Entalpia	Processos físicos e químicos envolvendo variação de energia

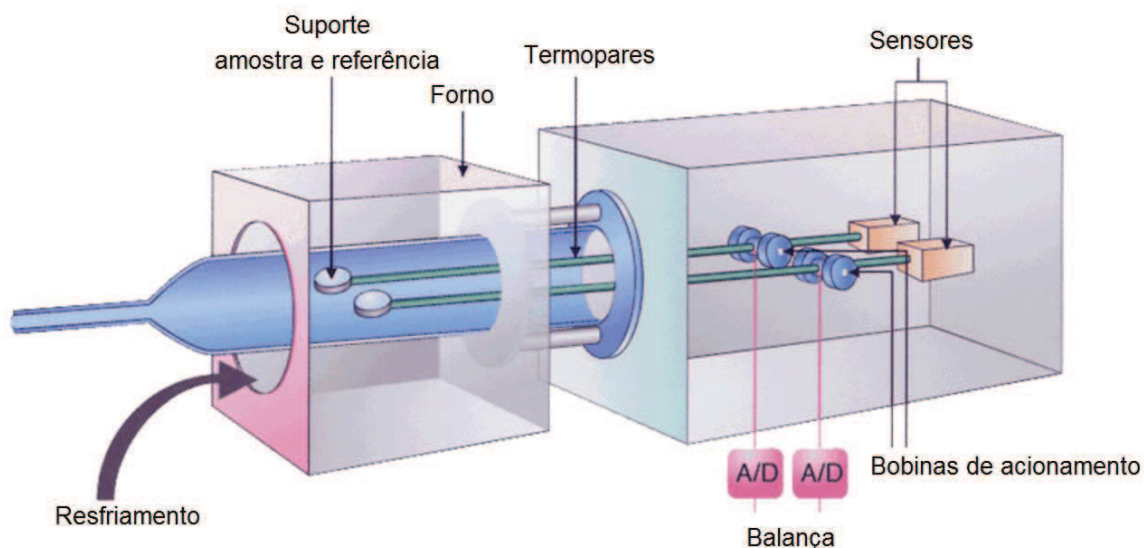
Fonte: (BERNAL et al., 2002; CRAIG; READING, 2007; GIRON, 1998; IONASHIRO, 2005).

### 2.1.1 Termogravimetria (TG) e Termogravimetria Derivada (DTG)

Na TG a perda e/ou ganho de massa da amostra é monitorada em função da temperatura. Já a DTG, nada mais é do que um arranjo matemático, onde a derivada primeira da variação de massa em relação ao tempo ( $dm/dt$ ) é registrada em função do tempo ou temperatura com a finalidade de melhorar a resolução da curva TG (GIRON, 1998).

O equipamento utilizado na análise termogravimétrica, a termobalança, é basicamente constituído por uma microbalança, um forno, termopares e um sistema de fluxo de gás. A termobalança permite a pesagem contínua da amostra em função da temperatura. A Figura 1 apresenta um desenho detalhado deste instrumento. Normalmente se utiliza aproximadamente 10 mg de amostra em cadinho de material inerte à amostra, como alumina ou alumínio, e é indicado o uso de cadinhos com paredes mais altas (GIRON, 1998).

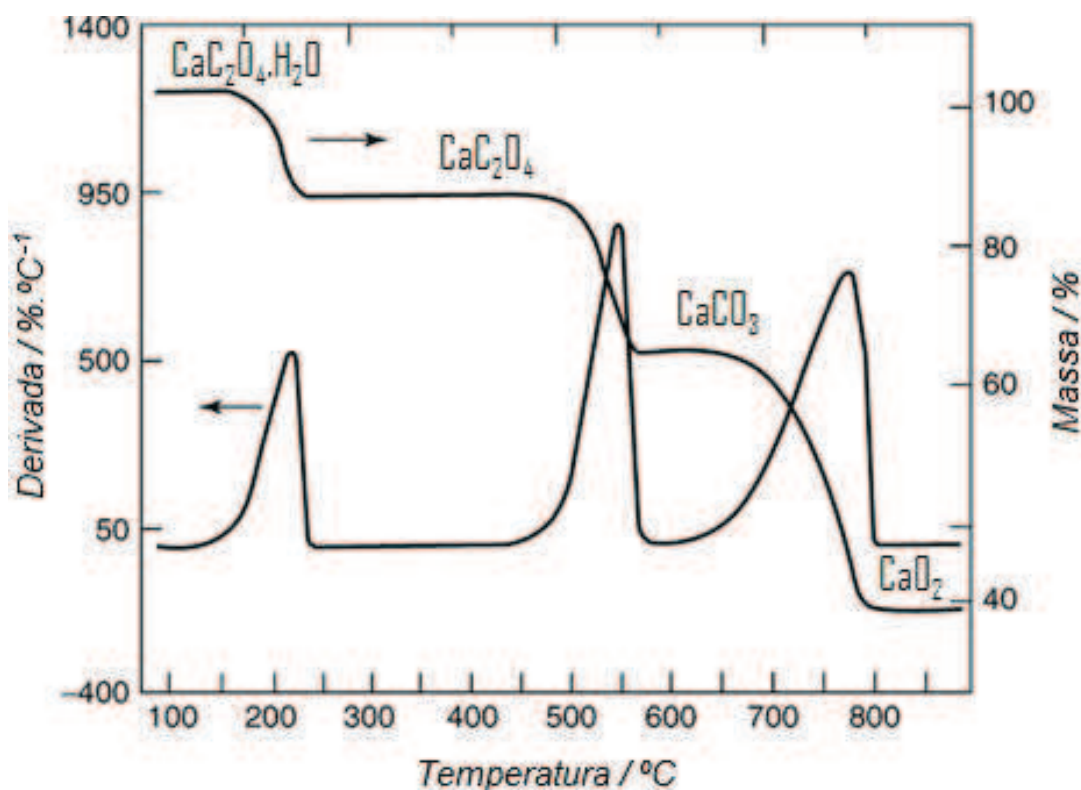
Figura 1 - Esquema de uma termobalança utilizada em equipamentos de análise termogravimétrica



Fonte: Adaptado de (SCANSCI, 2015).

A Figura 2 mostra a curva TG e DTG obtida do  $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , onde é possível observar o processo de desidratação e decomposição em função da temperatura (CHARTOFF; SIRCAR, 2004).

Figura 2 - Curvas TG e DTG para o oxalato de cálcio



Fonte: Adaptado de (CHARTOFF; SIRCAR, 2004).

Por meio da variação da massa em função da temperatura é possível obter informações como processos de evaporação de solvente, desidratação, reações de oxidação, decomposição, combustão, vaporização/sublimação da amostra, entre outros (BROWN, 2001).

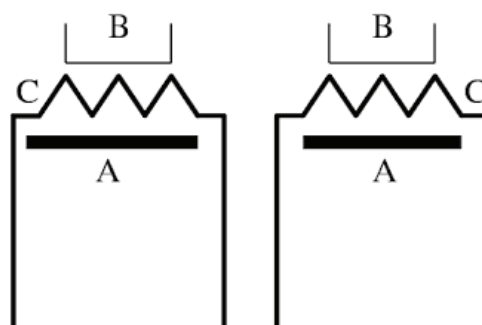
### 2.1.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Análise Térmica Diferencial (DTA)

As técnicas de DSC e DTA são frequentemente confundidas devido à semelhança dos resultados obtidos, porém são técnicas distintas. O DSC monitora as variações da entalpia de uma amostra em relação a um material de referência termicamente inerte, em função da variação da temperatura. A DTA determina continuamente a diferença entre temperaturas da amostra e um material de referência

termicamente inerte, à medida que ambos são aquecidos (BERNAL et al., 2002; HAINES, 2002).

Existem dois tipos de equipamento de DSC o primeiro é denominado de DSC de compensação de potência e o segundo de DSC de fluxo de calor. No DSC por compensação de potência, o cadinho contendo a amostra e o cadinho de referência são posicionados em fornos separados, com fontes de aquecimento individuais. Ao serem submetidos a um programa controlado de temperatura, uma potência elétrica é fornecida a cada forno a fim de manter a amostra e a referência à mesma temperatura. Dessa forma, ao ocorrer um evento térmico na amostra, que libere ou absorva calor, a potência do forno é alterada a fim de compensar a alteração causada por esse evento. A diferença entre as potências dos fornos é mensurada e registrada, e um gráfico da energia fornecida pelos aquecedores é formado, possibilitando quantificar as transformações uma vez que a compensação de calor é proporcional à energia envolvida na reação (BERNAL et al., 2002; CRAIG; READING, 2007; HAINES, 2002). Um esquema desse tipo de DSC está representado na Figura 3.

Figura 3 - Diagrama esquemático do DSC por compensação de potência



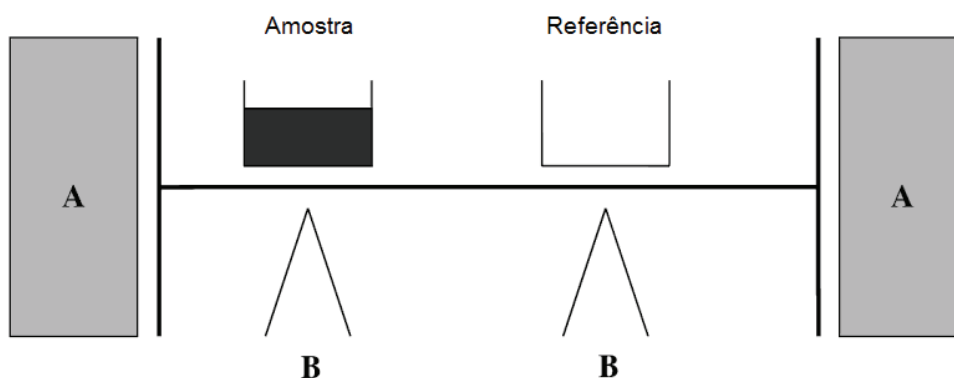
Fonte: (CRAIG; READING, 2007).

Legenda: A – Fornos;  
B – Cadinhos de amostra e referência;  
C – Sensores de platina.

No DSC por fluxo de calor, tanto o cadinho contendo a amostra, quanto o cadinho de referência são acondicionados no mesmo forno, de modo que a amostra e a referência são então aquecidas pelo mesmo sistema de fornecimento de energia, porém em contato com sensores de temperatura individuais. O forno é submetido a um programa controlado de temperatura, e os sensores registram a diferença de temperatura entre a amostra e a referência, obtendo assim um sinal proporcional à

diferença de capacidade térmica entre a amostra e a referência. Dessa forma, a ocorrência de um evento térmico na amostra que libere ou absorva calor, leva a uma alteração na diferença de fluxo, que é mensurada e registrada (BERNAL et al., 2002; CRAIG; READING, 2007). A Figura 4 apresenta um esquema de DSC por fluxo de calor.

Figura 4 - Diagrama esquemático do DSC por fluxo de calor

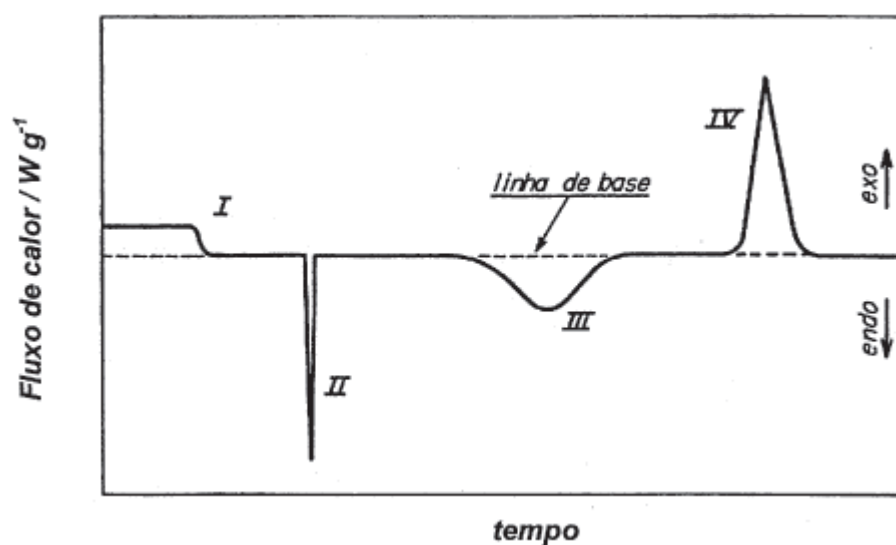


Fonte: (CRAIG; READING, 2007).

Legenda: A – Forno;  
B – Termopares.

Apesar de fazerem medidas diferentes, os dois tipos de DSC geram resultados semelhantes. A Figura 5 exemplifica o resultado obtido por DSC.

Figura 5 - Curva genérica de DSC

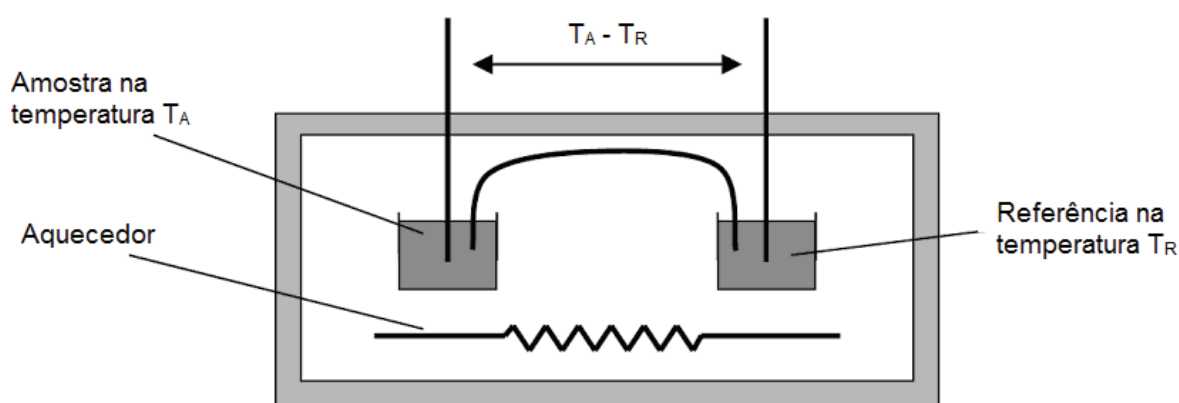


Fonte: (BERNAL et al., 2002).

Legenda: I – mudança de linha base;  
II e III – picos endotérmicos;  
IV – pico exotérmico.

Na curva DSC representada na Figura 5, o evento I, que é uma mudança de linha base, indica uma mudança na capacidade calorífica da amostra ou transição vítrea. Os eventos II e III são picos endotérmicos, que podem estar relacionados à fusão da amostra, desidratação, decomposição ou reações. Já o evento IV é um pico exotérmico, o qual pode estar relacionado à cristalização, combustão, polimerização ou reações.

Figura 6 - Diagrama esquemático de equipamento de DTA



Fonte: (CRAIG; READING, 2007).

No equipamento de DTA tanto o cadinho contendo a amostra, quanto o cadinho de referência são acondicionados no mesmo forno, de modo que a amostra e a referência são então aquecidas pelo mesmo sistema de fornecimento de energia, porém em contato com sensores de temperatura individuais. O forno é submetido a um programa controlado de temperatura, e os sensores registram a diferença de temperatura entre a amostra e a referência. A Figura 6 apresenta um esquema de equipamento de DTA (BERNAL et al., 2002; CRAIG; READING, 2007). Alguns equipamentos de TG fazem o registro simultâneo da curva DTA (BERNAL et al., 2002).

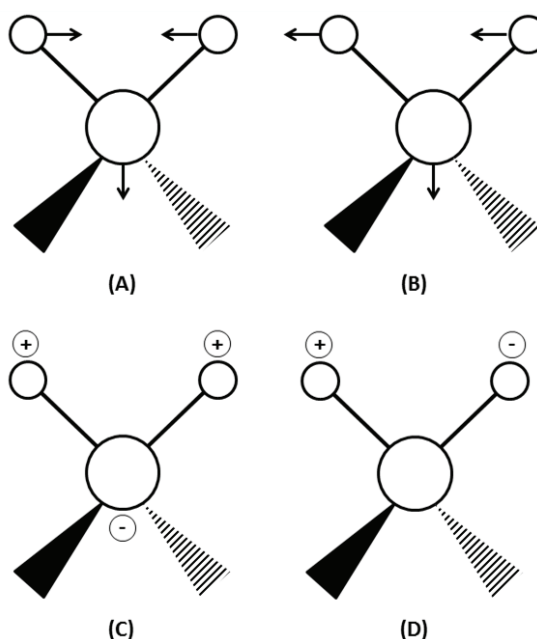
## 2.2 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

A radiação infravermelha corresponde à parte do espectro eletromagnético situada entre a região do visível e das micro-ondas e é dividida em três regiões:

infravermelho próximo (NIR, do inglês, *Near Infrared*) de 12820 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , infravermelho médio (MIR, do inglês, *Mid Infrared*) de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  e infravermelho distante (FIR, do inglês, *Far Infrared*) de 400 a 33  $\text{cm}^{-1}$  (REICH, 2005; SILVERSTEIN; BASSLER; MORRIL, 2007).

Os átomos de uma molécula nunca estão imóveis. Existem dois tipos de vibrações moleculares: as deformações angulares (FIGURA 7) e as deformações axiais (FIGURA 8). A vibração de deformação angular corresponde a variações de ângulo de ligação, a qual pode ser internamente em um conjunto de átomos ou de um grupo de átomos em relação à molécula como um todo. A vibração de deformação axial é um movimento rítmico ao longo do eixo da ligação, de forma que a distância interatômica aumente e diminua alternativamente. As vibrações fundamentais não alteram a posição do centro de gravidade da molécula (REICH, 2005; SILVERSTEIN; BASSLER; MORRIL, 2007).

Figura 7 - Vibrações de deformação angulares

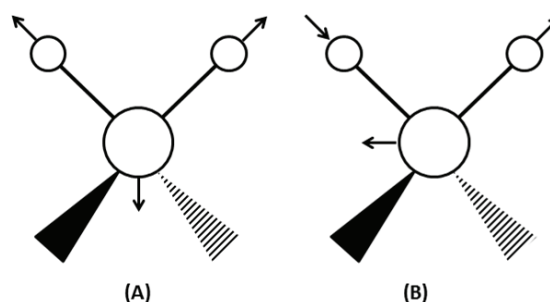


Fonte: Adaptado de (SILVERSTEIN et al., 2007).

Legenda: (A) Deformação angular simétrica no plano;  
 (B) deformação angular assimétrica no plano;  
 (C) deformação angular simétrica fora do plano;  
 (D) deformação angular assimétrica fora do plano.



Figura 8 - Vibrações de deformação axiais



Fonte: Adaptado de (SILVERSTEIN et al., 2007).

Legenda: (A) Deformação axial simétrica;  
(B) deformação axial assimétrica.

A espectroscopia no infravermelho e Raman são técnicas fundamentadas na interação da energia eletromagnética com os movimentos vibracionais dos núcleos de uma molécula. Para absorver radiação infravermelha, a molécula precisa sofrer alteração do momento de dipolo decorrente dos movimentos vibracionais e rotacionais. A vibração dos átomos no interior de uma molécula apresenta energia coerente com a região do espectro eletromagnético correspondente à radiação infravermelha (LARKIN, 2011; REICH, 2005; SILVERSTEIN; BASSLER; MORRIL, 2007).

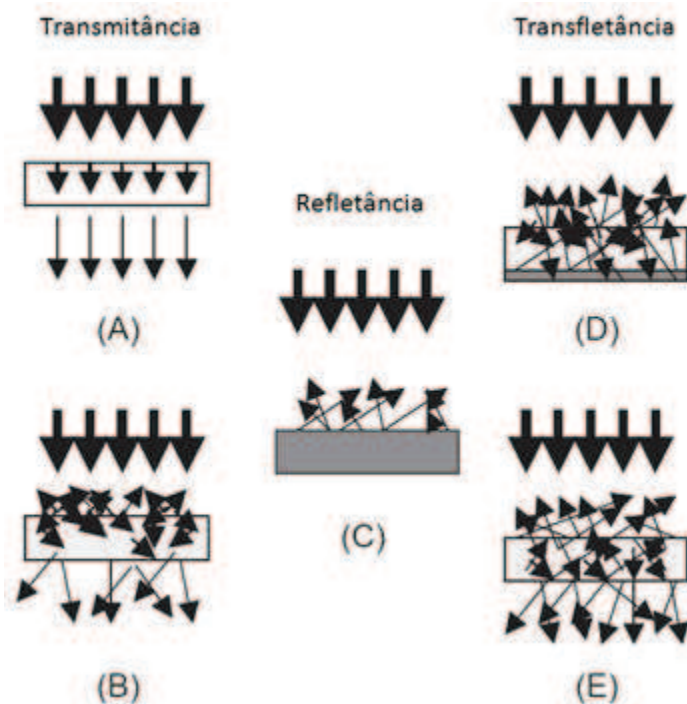
Uma vez que cada frequência vibracional está relacionada a um grupo funcional específico, os espectros no infravermelho oferecem informações sobre a estrutura de um determinado composto, como uma impressão digital. Modificações no perfil do espectro pode significar uma transição polimórfica, causando modificações das bandas referentes às interações intermoleculares, ou uma degradação química, causando modificações espectrais devido às alterações dos grupos funcionais. Essas técnicas também apresentam as vantagens de serem não destrutivas de rápida execução (AYALA et al., 2006).

A FTIR (Espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier – *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) possui como principal vantagem a velocidade de aquisição de dados, pois permite que todo o espectro seja detectado e obtido simultaneamente empregando-se um interferômetro de Michelson. O registro do sinal produzido pelo interferômetro de Michelson é chamado interferograma. A transformada de Fourier é um procedimento em que uma curva é decomposta na soma dos termos seno e cosseno, chamada série de Fourier, no caso a transformada de Fourier decompõe uma curva nos comprimentos de onda que a compõe. O

espectro obtido é a transformada de Fourier do interferograma (HARRIS, 2015; SILVERSTEIN; BASSLER; MORRIL, 2007; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

As análises por FTIR podem ser realizadas mensurando-se a transmitância, refletância ou transfletância, como indicado na Figura 9 (REICH, 2005).

Figura 9 - Esquema dos tipos de medida em FTIR



Fonte: Adaptado de (REICH, 2005).

Legenda: (A/B) Transmitância;  
(C) Refletância;  
(D/E) Transfletância.

A FTIR-ATR (Espectroscopia no Infravermelho por Refletância Total Atenuada - *Fourier Transform Infrared Spectroscopy with Attenuated Total Reflectance*) tem como vantagem a não necessidade de preparo prévio da amostra, podendo posicioná-la diretamente sobre o cristal de reflexão (LARKIN, 2011; REICH, 2005; SILVERSTEIN; BASSLER; MORRIL, 2007).

## 2.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, a qual acontece pela distribuição dos componentes em duas fases, fase móvel e fase estacionária, que estão em contato. A fase móvel é um líquido que permeia a fase estacionária a um fluxo definido e transporta a amostra ao longo do sistema. Os componentes da amostra se distribuem entre a fase estacionária e móvel de acordo com suas propriedades físico-químicas, resultando em migrações diferenciadas destes, o que possibilita a separação de componentes muito semelhantes de misturas complexas (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

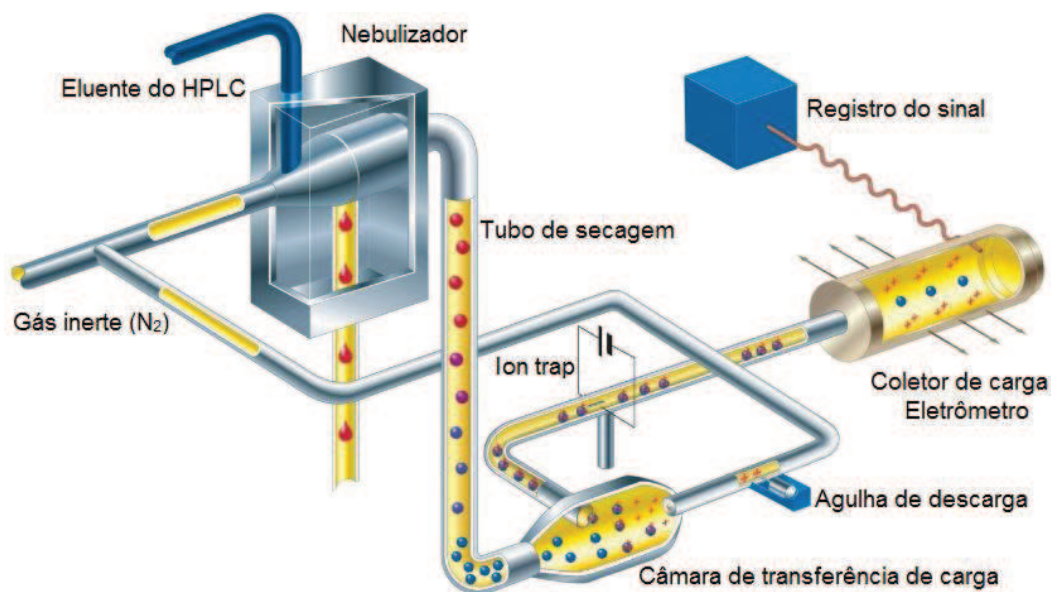
A HPLC (Cromatografia líquida de alta eficiência - *High-Pressure Liquid Chromatography*) é capaz de separar misturas que contém um grande número de compostos similares. É uma técnica cromatográfica que utiliza como fase estacionária uma coluna fechada de alta resolução e uma bomba de alta pressão para forçar a passagem da fase móvel pela coluna (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A UHPLC (cromatografia líquida de ultra performance – *Ultra High-Pressure Liquid Chromatography*) possui um sistema semelhante ao do HPLC, com bombas que são capazes de exercer maior pressão, permitindo o uso de colunas com menor tamanho de partícula, aumentando a resolução e diminuindo tempo de análise (GUILLARME; VEUTHEY., 2012).

Em geral os equipamentos de HPLC e UHPLC são constituídos por reservatório da fase móvel, sistema de bombeamento, injetor de amostra, coluna e detector. Existem vários tipos de detector, dentre eles podemos citar o UV (ultravioleta), fluorescência, índice de refração, eletroquímico, espectrometria de massas e corona CAD (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

O detector UV é, em geral, equipado com fonte de filamento de tungstênio com monocromadores capazes de selecionar comprimentos de onda, possibilitando detectar várias espécies, à medida que são eluídas na coluna. A maioria dos fármacos são moléculas cromóforas, e por isso apresentam absorvância na região do UV. A análise utilizando detector UV é simples, porém não é capaz de diferenciar espécies co-eluentes (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

Figura 10 - Diagrama esquemático do detector CAD



Fonte: Adaptado de (THERMO SCIENTIFIC, 2012).

O detector CAD é considerado uma nova tecnologia que possui como principal característica ser um detector universal para todos os tipos de analitos não voláteis. A resposta pode variar de acordo com a composição da fase móvel, sendo que há restrições no uso de solução tampão, estas não podem ser salinas e o solvente deve ser volátil. O CAD é um detector independente da estrutura química, propriedades óticas e da capacidade de ionização dos analitos, produzindo resposta semelhante para diferentes compostos, o que possibilita a quantificação mesmo quando não há a disponibilidade de padrão, pois o detector mede a quantidade de carga que é proporcional a quantidade de analito. O sistema CAD, mostrado na Figura 10, é composto por nebulizador, que tem a finalidade de remover gotículas de grande dimensão; tubo de secagem; câmara de transferência de carga, também chamada de câmara de reação, onde ocorre a colisão das partículas com o gás  $N_2$  ionizado; agulha de descarga, responsável por ionizar o gás  $N_2$ ; e célula de detecção (ALMELING; ILKO; HOLZGRABE, 2012; VEHOVEC; OBREZA, 2010).

## 2.4 ANÁLISE MULTIVARIADA

O principal objetivo da química analítica quantitativa é determinar a concentração de uma ou mais espécies presentes no meio. Quando se utilizam técnicas instrumentais de análise, a concentração é determinada indiretamente por meio de uma relação com os valores de determinadas propriedades físico-químicas do sistema de interesse, essa prática é conhecida como calibração. A calibração pode ser definida como uma série de operações matemáticas que estabelecem, sob determinadas condições, uma relação entre as medidas instrumentais e valores da propriedade de interesse (concentração de determinada espécie) (BRERETON, 2003).

Com o avanço da instrumentação e automação dos métodos analíticos, uma grande quantidade de dados começou a ser gerada muito rapidamente. Com a possibilidade de adquirir uma vasta quantidade de dados de forma rápida e com o mínimo esforço, surge o obstáculo de como analisar todos os dados adquiridos e extrair o máximo de informações relevantes, para isso os químicos começaram a fazer uso de métodos matemáticos e estatísticos (SENA; TREVISAN; POPPI, 2005). Assim foi criada uma nova área da química analítica, a quimiometria. A quimiometria pode ser definida como a aplicação de métodos matemáticos e estatísticos para a análise de dados químicos de forma a extrair uma maior quantidade de informações e melhores resultados analíticos (OTTO, 2007; SENA; TREVISAN; POPPI, 2005).

Entre os métodos de calibração existentes, com certeza, os mais conhecidos são os métodos univariados, também chamados de calibração de ordem zero. Neste caso, tem-se apenas uma medida instrumental por amostra, ou seja, apenas um escalar para cada amostra. Os modelos univariados são de fácil aplicação e validação, porém são de restrita aplicação, pois não são livres de interferentes que possam provocar desvios entre resposta analítica e a concentração (FERREIRA et al., 1999; SENA; TREVISAN; POPPI, 2005).

Nos métodos de calibração multivariada, duas ou mais medidas instrumentais são relacionadas com a propriedade de interesse. Métodos de calibração de primeira ordem utilizam um vetor de dados para cada amostra, enquanto os de segunda ordem utilizam uma matriz de dados por amostra. Em situações onde a determinação de um analito é dificultada ou impedida devido à presença de interferentes, o uso de

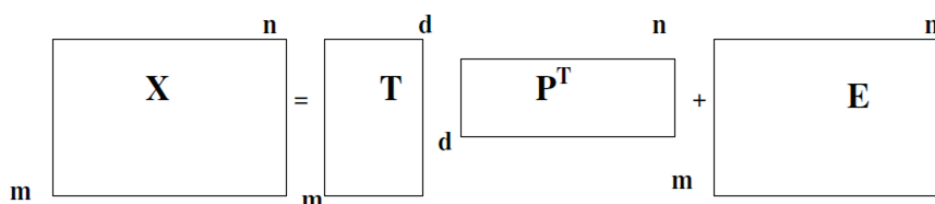
calibração multivariada permite a modelagem desses interferentes junto com o analito de interesse. As vantagens potenciais da determinação direta são rapidez, redução de uso de reagentes, baixo custo e simplificação no preparo da amostra, diminuindo as possibilidades de erro causadas pela manipulação. Tornaram-se possíveis a determinação simultânea direta de vários princípios ativos em um mesmo produto farmacêutico e a determinação de fármacos em amostras complexas, tais como plasma, soro e urina, sem necessidade de separação prévia dos constituintes (FERREIRA et al., 1999; RAVN, C.; SKIBSTED, E.; BRO, 2008; SENA; TREVISAN; POPPI, 2005).

#### 2.4.1 Análise de Componentes Principais (PCA)

A PCA (Análise das Componentes Principais - *Principal Component Analysis*) tem como objetivo reduzir o número original de variáveis de um conjunto de dados sem ocasionar em perda de informações relevantes. A PCA agrupa os indivíduos segundo suas variâncias, ou seja, segundo seu comportamento dentro da população, representado pela variação do conjunto de características que define o indivíduo (BRERETON, 2003; OTTO, 2007).

Na PCA uma matriz  $\mathbf{X}$  é decomposta em duas matrizes: a matriz de escores  $\mathbf{T}_{(m \times A)}$  e matriz transposta de pesos  $\mathbf{P}_{(n \times A)}$ , onde  $A$  é o número de componentes principais (PCs), como mostrado no esquema da Figura 11. Uma importante característica é que as PCs são ortogonais entre si (BRAGA, 2004; SENA; TREVISAN; POPPI, 2005).

Figura 11 - Representação esquemática da decomposição em componentes principais por PCA



Fonte: Adaptado de (BRAGA, 2004).

Nesse processo, é necessário achar o número correto de componentes principais, o que normalmente é feito usando um procedimento chamado validação cruzada (*Cross Validation*), no qual o erro mínimo de previsão é determinado (BRERETON, 2003; SENA; TREVISAN; POPPI, 2005).

#### 2.4.2 Regressão por Quadrados Mínimos Parciais (PLS)

O método de regressão PLS (Quadrados Mínimos Parciais - *Partial Least Squares*) é o método mais robusto e utilizado em regressões de dados multivariados. Os modelos PLS não requerem o conhecimento exato de todos os componentes presentes nas amostras, porém esta informação pode ajudar na construção e interpretação do modelo. Os dados para a construção do modelo PLS são organizados em dois blocos: a matriz **X**, com os vetores de respostas instrumentais, e a matriz **Y**, com os vetores referentes às propriedades de interesse. As matrizes **X** e **Y** são decompostas simultaneamente (FIGURA 12) em uma soma de *h* variáveis latentes, como nas Equações de 1 a 4 (BRAGA, J. W. B.; POPPI, 2004; ROCHA et al., 2011; SENA; TREVISAN; POPPI, 2005):

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}' + \mathbf{E} \quad (1)$$

$$\mathbf{X} = \sum t_h \mathbf{p}'_h + \mathbf{E} \quad (2)$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{UQ}' + \mathbf{F} \quad (3)$$

$$\mathbf{Y} = \sum u_h \mathbf{q}'_h + \mathbf{F} \quad (4)$$

onde **T** e **U** são as matrizes de escores das matrizes **X** e **Y**, respectivamente; **P** e **Q** são as matrizes dos pesos das matrizes **X** e **Y**, respectivamente; e **E** e **F** são os resíduos dos conjuntos **X** e **Y**, respectivamente, que correspondem aos dados que não puderam ser modelados.

Figura 12 - Representação esquemática da decomposição em variáveis latentes das matrizes X e Y para o modelo PLS

$$\begin{array}{c}
 \begin{array}{c} m \\ \boxed{X} \\ n \end{array} = \begin{array}{c} d \\ \boxed{t_1} \\ n \end{array} \begin{array}{c} m \\ \boxed{p'_1} \\ d \end{array} + \dots + \begin{array}{c} d \\ \boxed{t_h} \\ n \end{array} \begin{array}{c} m \\ \boxed{p'_h} \\ d \end{array} + \begin{array}{c} m \\ \boxed{E} \\ n \end{array} \\
 \\
 \begin{array}{c} z \\ \boxed{Y} \\ n \end{array} = \begin{array}{c} d \\ \boxed{u_1} \\ n \end{array} \begin{array}{c} z \\ \boxed{q'_1} \\ d \end{array} + \dots + \begin{array}{c} d \\ \boxed{u_h} \\ n \end{array} \begin{array}{c} z \\ \boxed{q'_h} \\ d \end{array} + \begin{array}{c} z \\ \boxed{F} \\ n \end{array}
 \end{array}$$

Fonte: Adaptado de (BRAGA, 2004).

A correlação entre os dois blocos **X** e **Y** é simplesmente uma relação linear obtida pelo coeficiente de regressão linear, tal como descrito na Equação 5:

$$u_h = b_h t_h \quad (5)$$

para  $h$  variáveis latentes, sendo que os valores de  $b_h$  são agrupados na matriz diagonal **B**, que contém os coeficientes de regressão entre a matriz de escores **U** de **Y** e a matriz de escores **T** de **X**.

A melhor relação linear possível entre os escores desses dois blocos é obtida através de pequenas rotações das variáveis latentes dos blocos de **X** e **Y**.

A matriz Y pode ser calculada de  $u_h$ ,

$$Y = TBQ' + F \quad (6)$$

e a concentração de novas amostras prevista a partir dos novos escores, **T\***, substituídos na Equação 7:

$$Y = T^*BQ' \quad (7)$$

Nesse processo, é necessário achar o melhor número de variáveis latentes, o que normalmente é feito usando um procedimento chamado validação cruzada (Cross



*Validation*), no qual o erro mínimo de previsão é determinado (SENA; TREVISAN; POPPI, 2005).

A decomposição das Equações 2 e 4 pode ser feita por diversas formas, tais como pelos algoritmos *NIPALS* (*Nonlinear Interactive Partial Least Squares*) ou *SIMPLS* (*Straightforward Implementation of a Statistically Inspired Modification of the PLS*) (DE JONG, 1993; GELADI, P.; KOWALSKI, 1986). Geralmente, o algoritmo SIMPLS é utilizado em conjunto com o PLS. Desta forma, o método PLS é o mais empregado método para regressão multivariada, mostrando-se eficiente em conjuntos de dados onde há muitas variáveis e estas com alta correlação acrescida de ruído aleatório. O método tem sido empregado em diversas áreas de pesquisa e tecnológicas, como química analítica, ecologia, agricultura, ciência dos alimentos, medicina e industrial (RAVN, C.; SKIBSTED, E.; BRO, 2008).

O desempenho dos modelos construídos é avaliado pelos valores do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e do erro quadrático médio (RMSE) dos resíduos, definido como:

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad (8)$$

onde  $y_i$  é o valor de referência,  $\hat{y}_i$  é o valor previsto e  $n$  é o número de amostras. RMSE (*Root Mean Square Error*) pode ser denominado erro quadrático médio de calibração (RMSEC), erro quadrático médio de validação cruzada (RMSECV) e erro quadrático médio de previsão (RMSEP).

#### **2.4.3 Resolução de Curvas Multivariadas (MCR)**

O MCR (Resolução de Curvas Multivariadas - *Multivariate Curve Resolution*) pode ser definido como um modelo que tem como objetivo descrever a evolução de medidas experimentais de amostras multicomponentes através da contribuição de seus componentes puros. O principal objetivo da resolução de curvas é a determinação de informações qualitativas. Porém, um modelo ideal deve ser capaz

de fornecer informações qualitativas e quantitativas (DE JUAN, A.; TAULER, 2006; TAULER, R.; SMILDE, A.; KOWALSKI, 1995).

Diferente de outros métodos, o MCR não depende de uma curva de calibração, relacionando o espectro (X) com as concentrações (Y) dos componentes de interesse. No MCR apenas são fornecidos os espectros puros dos componentes da amostra e, com a imposição de algumas restrições, pode-se obter as concentrações dos constituintes cujos espectros puros forem fornecidos (DE JUAN, A.; TAULER, 2006).

Matematicamente o método MCR é baseado na Equação 9 (JAUMOT et al., 2005):

$$\mathbf{D} = \mathbf{C}\mathbf{S}^T + \mathbf{E} \quad (9)$$

onde, em medidas espectroscópicas,  $\mathbf{D}$  contém os espectros medidos das amostras,  $\mathbf{C}$  as concentrações relativas e  $\mathbf{S}^T$  os espectros puros recuperados de cada constituinte, sendo estes baseados nos espectros puros previamente fornecidos na construção do modelo, o  $T$  sobrescrito significa a transposta da matriz  $\mathbf{S}$ .  $\mathbf{E}$  é a matriz de resíduos não explicados pelo modelo e, idealmente, deve ser próximo ao erro experimental (JAUMOT et al., 2005).

O MCR-ALS (*Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares*) resolve a Equação 9 utilizando o algoritmo de Quadrados Mínimos Alternados (ALS), calculando a concentração  $\mathbf{C}$  e recuperando os espectros puros  $\mathbf{S}^T$ , de forma a se ajustarem à matriz  $\mathbf{D}$  de dados experimentais da amostra. Durante a otimização por ALS algumas restrições podem ser impostas, como a não negatividade, unimodalidade e balanço de massa. A convergência é alcançada quando pelo menos dois ciclos de interação consecutivos não apresentam diferença significativa de desvio padrão dos resíduos entre os dados experimentais e os calculados pelo ALS (DE JUAN, A.; TAULER, 2006; JAUMOT et al., 2005).

As figuras de mérito do procedimento de otimização são porcentagem da falta de ajuste (LOF – *Lack of Fit* – Equação 10), porcentagem da variância explicada ( $R^2$  – coeficiente de determinação entre os espectros puros e espectros recuperados – Equação 11) e o desvio padrão dos resíduos em relação aos dados experimentais (Equação 12) (JAUMOT et al., 2005).

$$LOF(\%) = 100 \sqrt{\frac{\sum_{ij} e_{ij}^2}{\sum_{ij} d_{ij}^2}} \quad (10)$$

$$R^2 = \frac{\sum_{ij} d_{ij}^2 - \sum_{ij} e_{ij}^2}{\sum_{ij} d_{ij}^2} \quad (11)$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{ij} e_{ij}^2}{n_{linhas} - n_{colunas}}} \quad (12)$$

onde  $d_{ij}$  são os elementos da matriz  $\mathbf{D}$  e  $e_{ij}$  são os resíduos da diferença entre os valores experimentais e os recuperados pelo MCR-ALS,  $n_{linhas}$  e  $n_{colunas}$  número de linhas e colunas da matriz  $\mathbf{D}$  (JAUMOT et al., 2005).

O MCR-ALS permite a análise simultânea de várias amostras. A Equação 9 pode ser expandida permitindo que várias amostras sejam analisadas simultaneamente, como mostra a Equação 13 (JAUMOT et al., 2005):

$$\begin{bmatrix} D^1 \\ D^2 \\ \vdots \\ D^n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} C^1 \\ C^2 \\ \vdots \\ C^n \end{bmatrix} S^T + \begin{bmatrix} E^1 \\ E^2 \\ \vdots \\ E^n \end{bmatrix} \quad (13)$$

#### 2.4.4 Métodos de pré-processamento

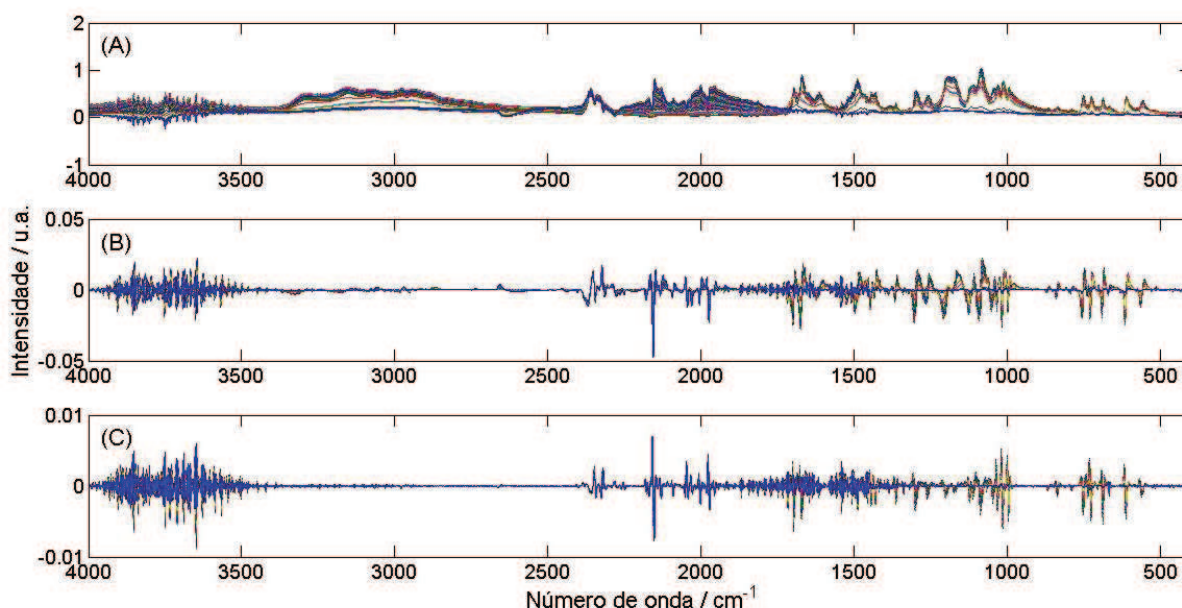
Antes de construir os modelos de regressão, faz-se necessário a utilização de métodos de pré-processamento para muitos conjuntos de dados. Os métodos de pré-processamento têm como objetivo linearizar as respostas das variáveis e remover fontes de variância que não são de interesse na análise. A linearização dos conjuntos de dados é importante, pois os modelos, em geral, requerem que os dados sejam lineares, além das respostas lineares serem mais fáceis de modelar que as não lineares. Ao realizar uma calibração, quanto maior a relação sinal-ruído melhor, pois isto permite extrair as menores características do conjunto de dados, assim os métodos de pré-processamento também têm o objetivo de intensificar os sinais de

interesse e minimizar os ruídos. Logo, pré-processamento é, em geral, a modificação de dados feita antes de construir um modelo ou de outra forma de analisar esses dados (HANSEN, 2001; WISE, B. M., 2006).

Neste trabalho foram utilizados os métodos de pré-processamento derivada e SNV (Variável Normal Padronizada - *Standard Normal Variate*), combinados com autoescalamento e centragem na média ou sem nenhum tipo de dimensionamento.

As derivadas são comumente utilizadas para remover sinais e alterações da linha base sem importância química. Como podemos ver na Figura 13 a primeira derivada removeu a variação da linha de base. A segunda derivada acentua as características de maior frequência. As variações restantes são devido às diferenças químicas entre as amostras. Um importante aspecto das derivadas é que elas não afetam as relações lineares entre os dados, isso porque as derivadas são operadores lineares (WISE, B. M., 2006).

Figura 13 - Efeito da primeira e segunda derivada em espectros



Fonte: Do autor.

Legenda: (A) Espectros FTIR-ATR do besilato de anlodipino;  
(B) primeira derivada dos espectros;  
(C) segunda derivada dos espectros.

O SNV é uma normalização ponderada. O SNV calcula o desvio padrão de todas as variáveis para uma dada amostra, e todos os dados desta amostra são normalizados por este valor, de modo que o desvio padrão dessa amostra seja unitário

( $s = 1$ ). Essa normalização é ponderada considerando os valores de cada amostra individualmente (WISE, B. M., 2006).

Na centragem na média, a média de cada variável é calculada e então subtraída de todos os valores do conjunto de dados da variável em questão. No autoescalamamento, a centragem na média é seguida pela divisão dos conjuntos de dados de cada variável pelo seu respectivo desvio padrão (WISE, B. M., 2006).

### 3 APLICAÇÃO 1: DETERMINAÇÃO DA ADULTERAÇÃO DE CAFÉ POR MILHO

O café torrado e moído tem sido alvo de adição fraudulenta de produtos. Dessa forma a determinação de adulterantes possui importância em níveis econômicos e nutricionais. Nesta primeira aplicação, o DSC foi empregado na detecção e na quantificação da adulteração de café por milho, juntamente com análises quimiométricas (PCA e PLS). A espectroscopia no infravermelho associada a análise PCA e PLS também foi empregada.

#### 3.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A bebida do café é consumida por todo o mundo por ser considerada um símbolo de hospitalidade, além de possuir sabor agradável e propriedades estimulantes, o que o torna um produto internacional (GARCIA et al., 2009). De acordo com a ICO (Organização Internacional do Café - *International Coffee Organization*), o consumo mundial de café foi de aproximadamente 150 milhões de sacas, o que equivale a 9 milhões de toneladas, em 2014, e a estimativa era de um aumento anual de 2,3 % (ABIC, 2014). O Brasil é o líder mundial em exportação de café. Em 2015 o Brasil exportou 36,32 milhões de sacas, de 60 kg cada, um aumento de 2,7% em relação a 2014, com uma receita de US\$ 6,15 bilhões apenas em exportações, de acordo com o CECAFÉ (Conselho dos Exportadores de Café do Brasil) (CECAFÉ, 2016). A estimativa da produção mundial em 2016 foi de 155,7 milhões de sacas (USDA, 2016).

Devido à importância econômica do café, o café torrado e moído tornou-se alvo de adulterações através da mistura de produtos de menor valor agregado e que possuem características físicas semelhantes após serem torrados e moídos, como cascas e galhos de café, milho, arroz, cevada, centeio e açúcar caramelizado. No entanto, as adulterações não apenas geram maiores lucros pra os comerciantes, mas também a perda de qualidade (odor e sabor) e alterações no valor nutricional do produto, sendo, inclusive, perigoso em casos de doenças alimentares (BOSQUE-SENDRA et al., 2012; MAPA, 2010; REIS; FRANCA; OLIVEIRA, 2013a).

A Instrução Normativa Nº16, de 24 de maio de 2010 do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) tem como objetivo garantir a qualidade do café torrado e moído, e preconiza que o nível máximo de impurezas (casca, paus, sedimento, resíduos do cafeeiro, detritos vegetais não oriundos do cafeeiro, sementes de outras espécies, etc.) é de 1% (m/m) (MAPA, 2010).

Algumas técnicas analíticas utilizadas na análise de adulterações em café são a cromatografia gasosa (GC) (JHAM et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009) e cromatografia líquida (LC) (GARCIA et al., 2009; JHAM et al., 2007), eletroforese (NOGUEIRA; DO LAGO, 2009), microscopia (AMBONI; FRANCISCO; TEIXEIRA, 1999) e espectroscopia no infravermelho (BRIANDET; KEMSLEY; WILSON, 1996; PIZARRO; ESTEBAN-DÍEZ; GONZÁLEZ-SÁIZ, 2007; REIS; FRANCA; OLIVEIRA, 2013a, 2013b; TAVARES et al., 2012). Estes métodos requerem processamento das amostras para a análise, a qual é uma etapa crítica.

As análises térmicas, como o DSC, apresentam potencial para detectar adulterantes pois é uma técnica que permite determinar a pureza e pode fornecer informações quantitativas sem a necessidade de um preparo elaborado da amostra (DAHIMI et al., 2014). A DSC foi empregada com sucesso pra detectar e/ou quantificar adulterantes em azeite de oliva extra virgem (TORRECILLA et al., 2011; WETTEN et al., 2015), óleo de canola (MARIKKAR et al., 2002; MOHAMMED; MARIKKAR; RANA, 2014), óleo de coco (MANSOR; MAN; SHUHAIMI, 2012), óleo de semente de girassol (WETTEN et al., 2014), mel (CORDELLA et al., 2002, 2003), manteiga (TOMASZEWSKA-GRAS, 2012), fibras de pelo animal (TONETTI et al., 2015) e gordura animal (DAHIMI et al., 2014). Por exemplo, o estudo conduzido por Jafari M., Kadivar M. e Keramat J. comparando os métodos GC, RMN (Ressonância Magnética Nuclear) e DSC para detectar adulteração de azeites de oliva iranianos, mostrou que a tradicional análise por GC pode ser complementada, ou até substituída por técnicas como RMN ou DSC (JAFARI; KADIVAR; KERAMAT, 2009).

A espectroscopia no infravermelho é uma técnica comumente utilizada para detectar e quantificar adulterantes em diferentes tipos de produtos, como alimentos (ANJOS et al., 2015; BOTELHO et al., 2015; DE LA MATA et al., 2012; GALLARDO-VELÁZQUEZ et al., 2009; JAISWAL et al., 2015; JAWAID et al., 2013; QUINONES-ISLAS et al., 2013; XU et al., 2015; ZHAO; DOWNEY; O'DONNELL, 2014), drogas farmacéuticas (FENG; LEI; HU, 2014; ROONEY et al., 2015) e drogas de abuso (GROBÉRIO et al., 2015). Há um grande número de trabalhos na literatura sobre

análise de café com espectroscopia no infravermelho, em especial DRIFTS (Espectroscopia no Infravermelho por Refletância Difusa com Transformada de Fourier) (BRIANDET; KEMSLEY; WILSON, 1996; PIZARRO; ESTEBAN-DÍEZ; GONZÁLEZ-SÁIZ, 2007; REIS; FRANCA; OLIVEIRA, 2013a, 2013b; TAVARES et al., 2012). De acordo com estes autores, em general DRIFTS fornece espectros com maiores intensidades de absorção que FTIR-ATR, e por isso DRIFTS podem apresentar resultados melhores, permitindo a completa discriminação entre amostras de café adulteradas e não adulteradas (REIS; FRANCA; OLIVEIRA, 2013a, 2013b). As bandas de absorção na região do infravermelho são referentes a vibrações intramoleculares e específicas da composição e estrutura molecular, gerando dados de alta seletividade e com potencial para detecção e quantificação de adulterantes em amostras de café (MAUER et al., 2009).

### 3.2 OBJETIVO

O principal objetivo desta aplicação foi avaliar as técnicas de DSC e FTIR-ATR associadas à análise quimiométrica (PCA e PLS) para detectar e quantificar as adulterações de *Coffea arabica L.* torrado e moído por milho.

Para este estudo, a adulteração por milho foi escolhida, devido ao milho ser muito comum na região sul de Minas Gerais e possuir baixo custo, em relação ao café.

#### 3.2.1 Objetivos Específicos

- a) Caracterizar as amostras de café, milho e misturas binárias de café e milho utilizando TG, DSC e FTIR-ATR;
- b) Distinguir as amostras de café puro de amostras adulteradas utilizando DSC juntamente com PCA;
- c) Quantificar a adulteração do café por milho utilizando DSC juntamente com PLS;



- d) Distinguir as amostras de café puro de amostras adulteradas utilizando FTIR-ATR juntamente com PCA;
- e) Quantificar a adulteração do café por milho utilizando FTIR-ATR juntamente com PLS.

### 3.3 DETERMINAÇÃO DA ADULTERAÇÃO DE CAFÉ POR MILHO EMPREGANDO DSC

Esta etapa teve como objetivo avaliar a técnica de DSC associada à análise quimiométrica (PCA e PLS) para detectar e quantificar as adulterações de *Coffea arabica* L. torrado e moído por milho.

#### 3.3.1 Materiais e métodos

A seguir serão descritos todos os materiais, equipamentos e metodologias empregadas nesta etapa do trabalho.

##### 3.3.1.1 Preparo das amostras

Os grãos de café utilizados no desenvolvimento deste trabalho são de *Coffea arabica* L. oriundos da região de Lavras/MG. Os grãos de café foram torrados em três diferentes níveis: claro (235 °C por 15 minutos), médio (240 °C por 20 minutos) e escuro (250 °C por 25 minutos), utilizando torrador de café convencional. O milho utilizado para adulterar o café foi adquirido em mercado local e torrado a 240 °C em mufla durante 10 minutos (até adquirir a mesma coloração do café torrado). A torrefação do milho ocorreu em mufla a fim de evitar a contaminação do torrador. Após a torrefação, café e milho, foram moídos separadamente utilizando moedor de café tradicional e peneirados (35 - 65 mesh).

Trinta e três misturas binárias contendo café (nos diferentes níveis de torrefação) e milho foram preparadas com níveis de adulteração em um intervalo de 0,5 a 40 % (m/m), como mostra a Tabela 2 utilizando balança analítica (Sartorius CP2P). A massa total de cada mistura foi de 100 mg. Cada amostra foi armazenada em um frasco de polietileno com tampa e homogeneizadas utilizando um agitador do tipo vortex por 5 minutos.

Tabela 2 - Composição das amostras utilizadas para determinação de milho em café por DSC

Amostras*	Café (% (m/m))	Milho (% (m/m))
1 a 9	100	0
10, 21 e 32	60	40
11, 22 e 33	65	35
12, 23 e 34	70	30
13, 24 e 35	75	25
14, 25 e 36	80	20
15, 26 e 37	85	15
16, 27 e 38	90	10
17, 28 e 39	95	5
18, 29 e 40	97	3
19, 30 e 41	99	1
20, 31 e 42	99,5	0,5

Fonte: Do autor.

Nota: \*Amostras 1 a 3 e 10-20: torrefação clara; 4 a 6 e 21-31: torrefação média; e 7 a 9 e 32-42: torrefação escura.

### 3.3.1.2 Calorimetria exploratória diferencial

A análise por DSC foi realizada em Calorímetro DSC-7020 EXSTAR (SII NanoTechnology Inc.), previamente calibrado com padrão de índio. Aproximadamente 3,0 mg de cada amostra foram colocadas em cadinhos de alumínio hermeticamente fechados e analisado sob atmosfera de N<sub>2</sub>, com fluxo de 100 mL.min<sup>-1</sup> e razão de aquecimento de 10 °C.min<sup>-1</sup>, na faixa de temperatura entre 50 e 600 °C.

### 3.3.1.3 Análise termogravimétrica

As análises termogravimétricas foram conduzidas utilizando termobalança TG/DTA7300 EXSTAR (SII NanoTechnology Inc.), previamente calibrada com oxalato de cálcio, empregando os seguintes parâmetros: intervalo de temperatura de 25–600 °C; atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL.min<sup>-1</sup>); razão de aquecimento de 10 °C.min<sup>-1</sup>; cadinhos de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; e aproximadamente 10 mg de amostra.

### 3.3.1.4 Análise quimiométrica

A análise multivariada dos dados foi conduzida utilizando o software MATLAB versão 7.1 (MathWorks) com o pacote PLS\_toolbox version 5.8 (Eigenvector Co.). A fim de diferenciar e classificar café puro de café adulterado com milho foi construído o modelo PCA, e para quantificar a adulteração foi construído o modelo PLS.

Primeiramente, as curvas DSC foram normalizadas pela massa de amostra utilizada em cada análise, com a finalidade de eliminar a interferência devido a variação da quantidade de amostra. As técnicas de pré-processamento de dados utilizadas foram primeira derivada (Savitzky-Golay, largura da janela: 15, ordem polinomial: 2), SNV e centragem na média. O número ótimo de componentes principais (PCs) foi determinado utilizando validação cruzada “*leave-one-out*”.

Para análise PCA, a matriz de dados foi construída de modo que cada linha correspondesse a uma amostra. A matriz contém 42 amostras (9 de café puro e 33 de misturas binárias) e 20749 variáveis (correspondendo ao fluxo de calor (uW/mg) de 50 a 600 °C). Um teste de classificação de amostras foi realizado utilizando distância de Mahalanobis com método de Ward. Para estimar a porcentagem de milho presente nas amostras o modelo PLS foi construído utilizando 22 amostras para calibração e 11 para validação. O número de variáveis latentes foi escolhido por validação cruzada “*leave-one-out*”.

### 3.3.2 Resultados e discussão

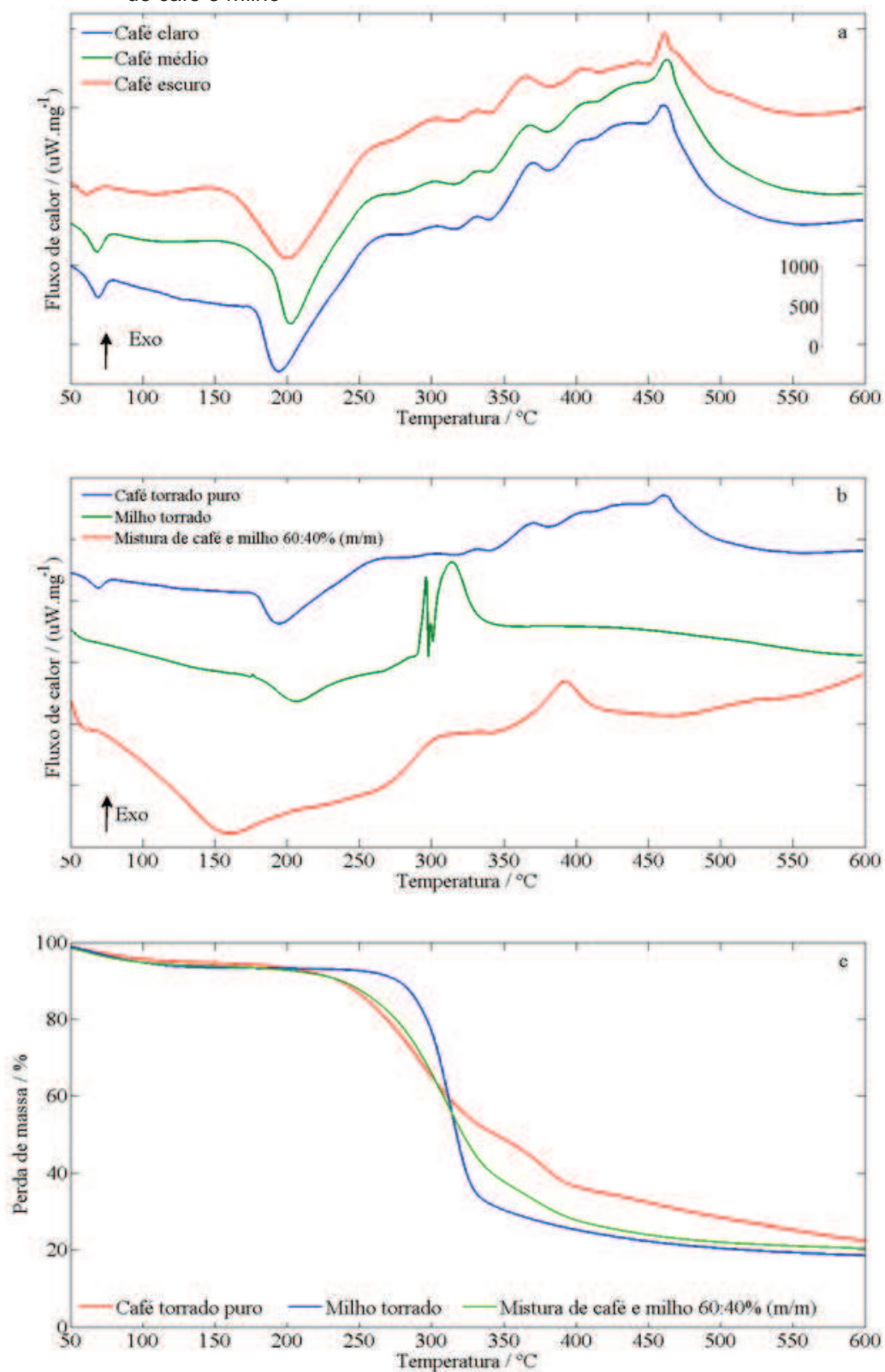
Amostras de café puro, milho puro (ambos torrados e moídos) e misturas binárias de café e milho foram analisadas por DSC e suas curvas são apresentadas na Figura 14. Há poucas diferenças entre as curvas DSC das amostras de café puro nos três níveis de torrefação (FIGURA 14a), portanto é esperado que o nível de torrefação não interfira na identificação do café adulterado com milho. Porém, há diferenças visualmente nítidas entre curvas DSC de café puro e milho puro (FIGURA 14b), as quais são importantes na identificação deste tipo de adulteração.

Na Figura 14b é possível observar um pico endotérmico na região de 65 a 80 °C (C1) presente nas curvas DSC dos três níveis de torrefação. Na curva TG (FIGURA 14c) há uma perda de massa de 1-2 % nesta região. A temperatura e a baixa porcentagem de perda de massa sugere que possa estar relacionado a um processo de desidratação.

Os picos endotérmicos de 175 a 250 °C presentes nas curvas DSC da Figura 14b (C2, A1 e M1) são referentes à fusão de alguns componentes como aminoácidos, lipídeos e açúcares (sacarose, glucose, frutose, arabinose, galactose, maltose e polissacarídeos presentes em todas as amostras (café, milho e misturas) (LI; STREZOV; KAN, 2014; LIU et al., 2014).

Em temperaturas acima de 250 °C nas curvas DSC da Figura 14b há picos exotérmicos (C3, A2, M2 e M3), e perda de massa de aproximadamente 80%, que geralmente envolve a ruptura de ligações e a liberação de compostos voláteis. O pico A2, na curva DSC do milho, pode ser atribuído à degradação do amido de milho (PINEDA-GOÍMEZ; ROSALES-RIVERA; RODRÍGUEZ-GARCÍA, 2012).

Figura 14 - Curvas DSC e TG das amostras de café puro, milho puro e misturas binárias de café e milho

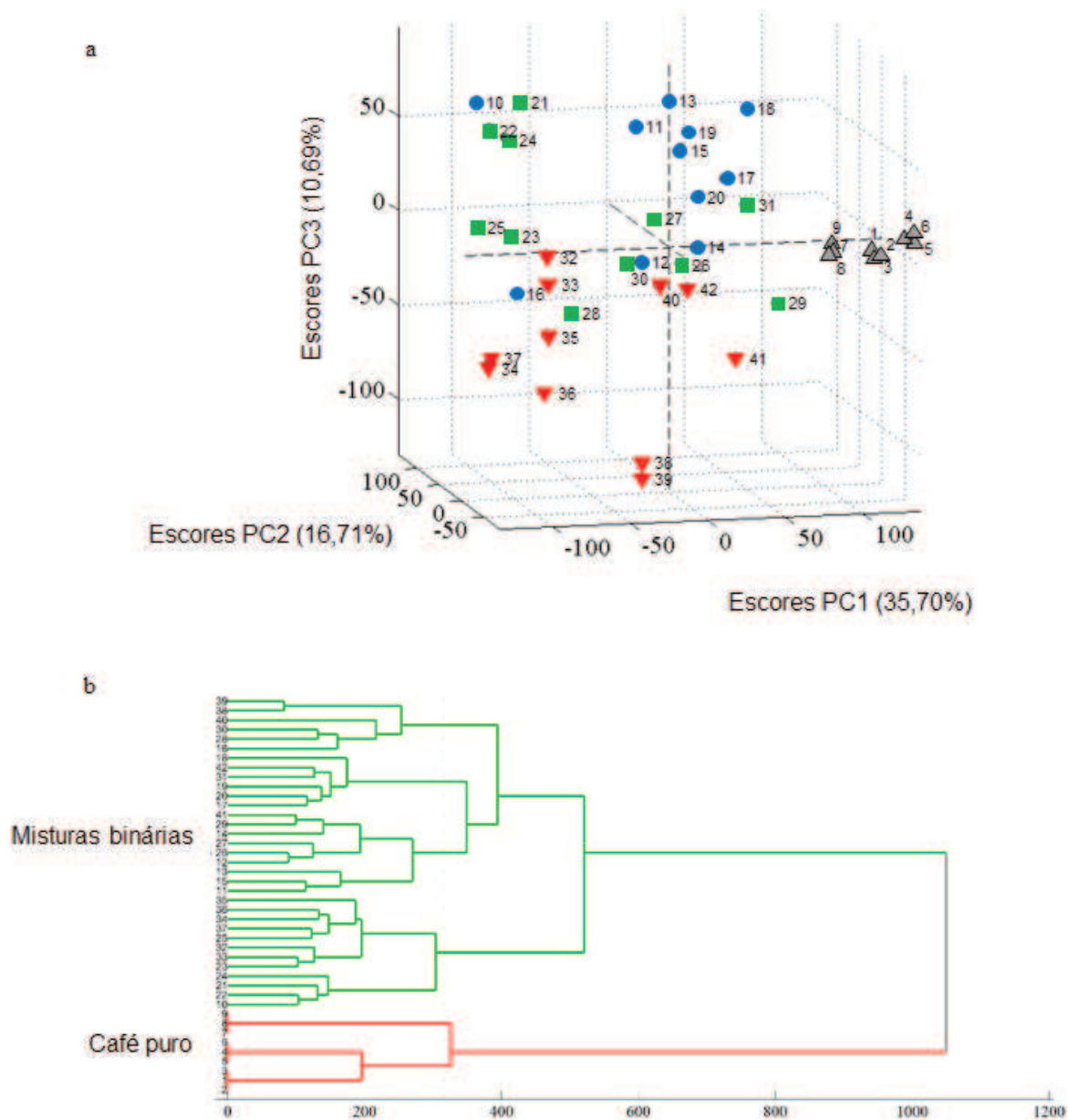


Fonte: Do autor.

Legenda: (a) Curvas DSC dos três níveis de torrefação (claro, médio e escuro) nas amostras de café puro (médias de n=3);  
 (b) curvas DSC do café puro, milho puro e mistura de café e milho 60:40 % (m/m);  
 (c) curvas TG do café puro, milho puro e uma mistura de café e milho.

As matrizes de escores e *loading* do modelo PCA foram geradas utilizando 4 componentes principais (PCs), descrevendo no total 63,00% da variância. No gráfico de escores das três primeiras PCs (FIGURA 15a) é possível observar que a primeira componente principal (PC1) é capaz de diferenciar as amostras de café puro (amostras 1 a 9) das de café adulterado (amostras 10 a 42), e que há uma tendência relativa ao nível de adulteração. Quanto maior o nível de adulteração, mais distante as amostras estão da região das amostras de café puro, e quanto menor o nível de adulteração, mais próximas estas amostras estão da região das amostras de café puro. Na Figura 15a é possível observar que a Terceira componente principal (PC3) é capaz de diferenciar o nível de torrefação das misturas. Torrefação clara (amostras 10 a 20) estão na região superior do gráfico, torrefação média (amostras 21 a 31) na região do meio do gráfico e torrefação escura (amostras 32 a 42) na região inferior do gráfico. A análise de agrupamento foi realizada e o dendrograma obtido utilizando distância de Mahalanobis com método de Ward (FIGURA 15b) mostra a separação dos grupos de amostras de café puro e de amostras de misturas binárias.

Figura 15 - Gráfico de escores e dendrograma das amostras de café puro e café adulterado por milho empregando DSC



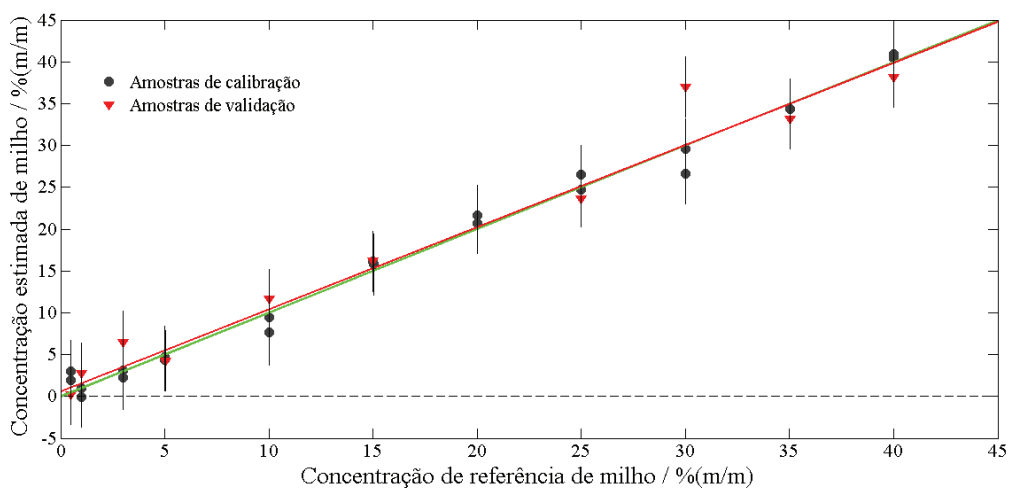
Fonte: Do autor.

Legenda: (a) Gráfico de escores do modelo PCA (PC1 x PC2 x PC3) dos dados obtidos por DSC. Amostras 1-3: ( $\triangle$ ) café puro claro; 4-6: ( $\triangle$ ) café puro médio; 7-9: ( $\triangle$ ) café puro escuro; 10-20: ( $\bullet$ ) misturas de café claro e milho; 21-31: ( $\blacksquare$ ) misturas de café médio e milho; e 32-42: ( $\blacktriangledown$ ) misturas de café escuro e milho; (b) Dendrograma da análise de agrupamento de distância de Mahalanobis usando método de Ward para 9 amostras de café puro (vermelho) e 33 amostras de café adulterado por milho (verde).

A matriz de calibração do modelo PLS foi composta por 22 amostras, e a matriz de validação, por 11 amostras, nos três níveis de torrefação (claro, médio e escuro). O modelo foi construído com 4 variáveis latentes (LVs), representando os três diferentes níveis de torrefação e o milho. A correlação entre os valores previstos e os

de referência é apresentada na Figura 16, na qual é observada concordância satisfatória. Os parâmetros de desempenho do modelo PLS estão na Tabela 3.

Figura 16 - Regressão PLS para determinação de milho em amostras de café torrado e moído empregando DSC



Fonte: Do autor.

Legenda: (●) amostras de calibração;  
(▼) amostras de validação;  
(barras de erro) incerteza com 95 % de confiança.

Tabela 3 - Parâmetros de desempenho do modelo PLS para estimar a concentração de milho em café torrado e moído por DSC

Parâmetro	
Variáveis latentes	4
RMSEC <sup>(a)</sup>	1,15
RMSECV <sup>(b)</sup>	3,45
RMSEP <sup>(c)</sup>	3,94
R <sup>2</sup> calibração	0,9927
R <sup>2</sup> validação cruzada	0,9351
R <sup>2</sup> previsão	0,9152

Fonte: Do autor.

Nota: (a) RMSEC: erro quadrático médio de calibração (% m/m);  
(b) RMSECV: validação cruzada (% m/m);  
(c) RMSECP: previsão (% m/m).



### 3.3.3 Conclusão Parcial

A análise por DSC juntamente com análises quimiométricas (PCA e PLS) foram capazes de detectar a adulteração do café por milho mesmo em concentrações menores que 1% (m/m). A metodologia atende a Instrução Normativa nº16, de 24/05/2010 do MAPA, que preconiza que o nível máximo de materiais estranhos no café deve ser de no máximo 1% (m/m) para garantir a qualidade do produto. O modelo PLS construído com os dados de DSC mostrou boa concordância entre os valores previstos e os valores de referência, com erros quadráticos médios inferiores a 4 %.

As análises térmicas, como o DSC, são mais aplicadas em caracterização do que em análises quantitativas. Os resultados mostraram que a curva DSC é uma boa alternativa na detecção de fraudes e no controle de qualidade do café.

## 3.4 DETERMINAÇÃO DA ADULTERAÇÃO DE CAFÉ POR MILHO EMPREGANDO ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

Esta etapa teve como objetivo avaliar a técnica FTIR-ATR associada à análise quimiométrica (PCA e PLS) para detectar e quantificar as adulterações de *Coffea arabica* L. torrado e moído por milho.

### 3.4.1 Materiais e métodos

A seguir serão descritos todos os materiais, equipamentos e metodologias empregadas nesta etapa do trabalho.

### 3.4.1.1 Preparo das amostras

As amostras foram preparadas da mesma forma como descrito no item 3.3.1.1. A Tabela 4 descreve a composição das amostras.

Tabela 4 - Composição das amostras utilizadas para determinação de milho em café por FTIR-ATR

Amostras*	Café (% (m/m))	Milho (% (m/m))
1 a 9	100	0
10 a 12, 43 a 45 e 76 a 78	60	40
13 a 15, 46 a 48 e 79 a 81	65	35
16 a 18, 49 a 51 e 82 a 84	70	30
19 a 21, 52 a 54 e 85 a 87	75	25
22 a 24, 55 a 57 e 88 a 90	80	20
25 a 27, 58 a 60 e 91 a 93	85	15
28 a 30, 61 a 62 e 94 a 96	90	10
31 a 33, 64 a 66 e 97 a 99	95	5
34 a 36, 67 a 69 e 100 a 102	97	3
37 a 39, 70 a 72 e 103 a 105	99	1
40 a 42, 73 a 75 e 106 a 108	99,5	0,5

Fonte: Do autor.

Nota: \*amostras 1 a 3 e 10 a 42: torrefação clara; 4 a 6 e 43 a 75: torrefação média; e 7 a 9 e 76 a 108: torrefação escura.

### 3.4.1.2 Espectroscopia no infravermelho

Os espectros de infravermelho foram obtidos utilizando espectrofotometro Nicolet iS50 FT-IR (Thermo Scientific) acoplado com o acessório GladiATR (Pike Technologies), o qual possui um diamante de reflexão e dispositivo de alta pressão. Cada espectro foi obtido à temperatura ambiente (25 °C), de 525 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , 64 varreduras e resolução de 0,4  $\text{cm}^{-1}$ . As medidas foram registradas em absorbância.

### 3.4.1.3 Análise quimiométrica

A análise multivariada dos dados foi conduzida utilizando o software MATLAB versão 7.1 (MathWorks) com o pacote PLS\_toolbox version 5.8 (Eigenvector Co.). A fim de diferenciar e classificar café puro de café adulterado com milho foi construído o modelo PCA, e para quantificar a adulteração foi construído o modelo PLS.

As técnicas de pré-processamento dos dados utilizadas foram primeira derivada e autoescalonamento. Para a análise PCA, a matriz de dados foi construída de modo que cada linha correspondesse a uma amostra e cada coluna representa a absorvância em um determinado número de onda. A matriz contém 108 amostras (9 de café puro e 99 de misturas binárias) e 7209 variáveis (correspondendo às absorvâncias do espectro FTIR-ATR de 525 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ ). O número ótimo de componentes principais (PCs) foi determinado utilizando validação cruzada “*leave-one-out*”. Um teste de classificação de amostras foi realizado utilizando distância de Mahalanobis com método de Ward.

O modelo PLS foi construído utilizando 66 amostras de calibração e 33 amostras de validação a fim de quantificar a porcentagem de milho presente nas amostras. O número de variáveis latentes foi escolhido por validação cruzada “*leave-one-out*”.

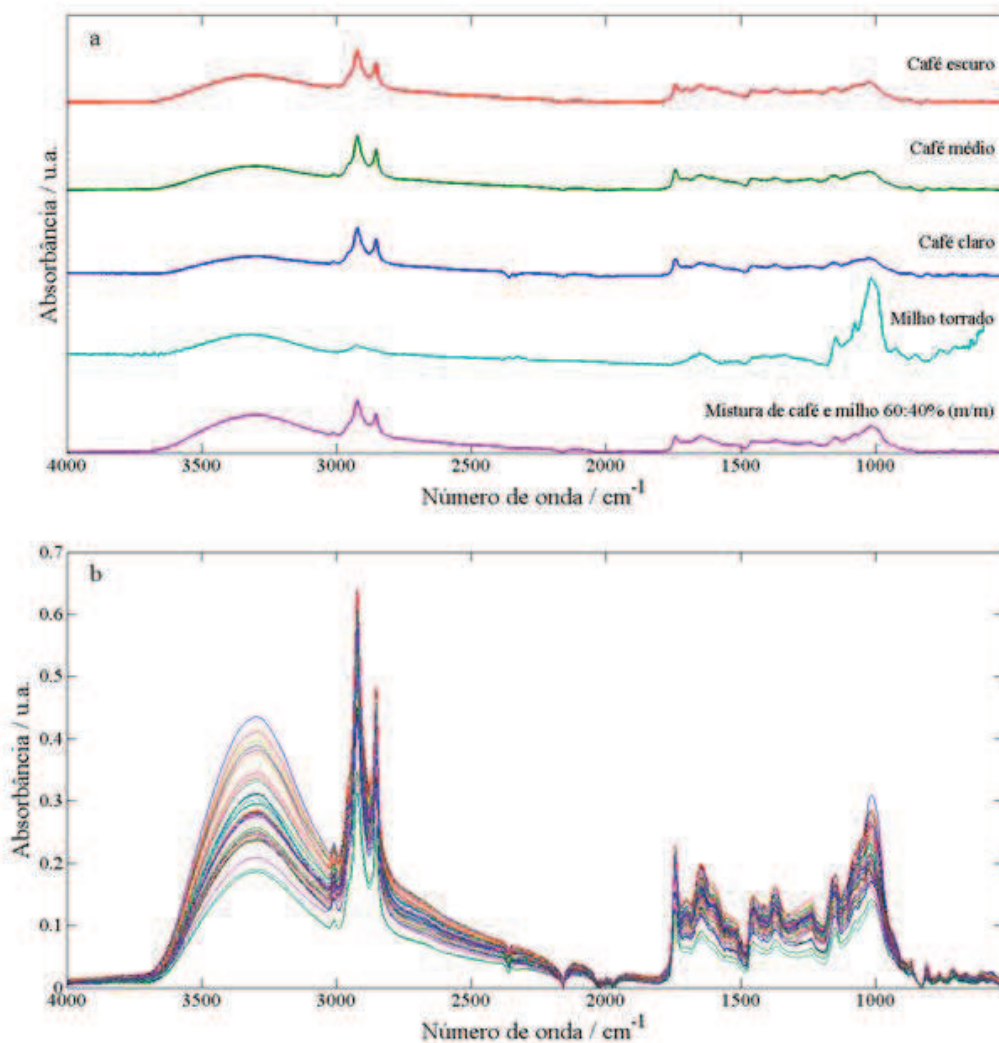
### 3.4.2 Resultados e discussão

Amostras de café puro, milho puro (ambos torrados e moídos) e misturas binárias de café e milho foram analisadas por FTIR-ATR e seus espectros são apresentados na Figura 17. Não há diferenças visuais entre os espectros das amostras de café puro nos três níveis de torrefação, portanto é esperado que o nível de torrefação não interfira na identificação do café adulterado com milho. Porém, há diferenças visualmente nítidas entre os espectros de café puro e milho puro, as quais são importantes na identificação e quantificação deste tipo de adulteração.

A análise visual dos espectros de infravermelho obtidos das misturas binárias de café e milho (FIGURA 17b) não permite detectar nitidamente as diferenças entre

eles, portanto a análise PCA foi realizada para diferenciar amostras de café puro das amostras de café adulterado.

Figura 17 - Espectros FTIR-ATR das amostras de café puro, milho puro e misturas binárias de café e milho



Fonte: Do autor.

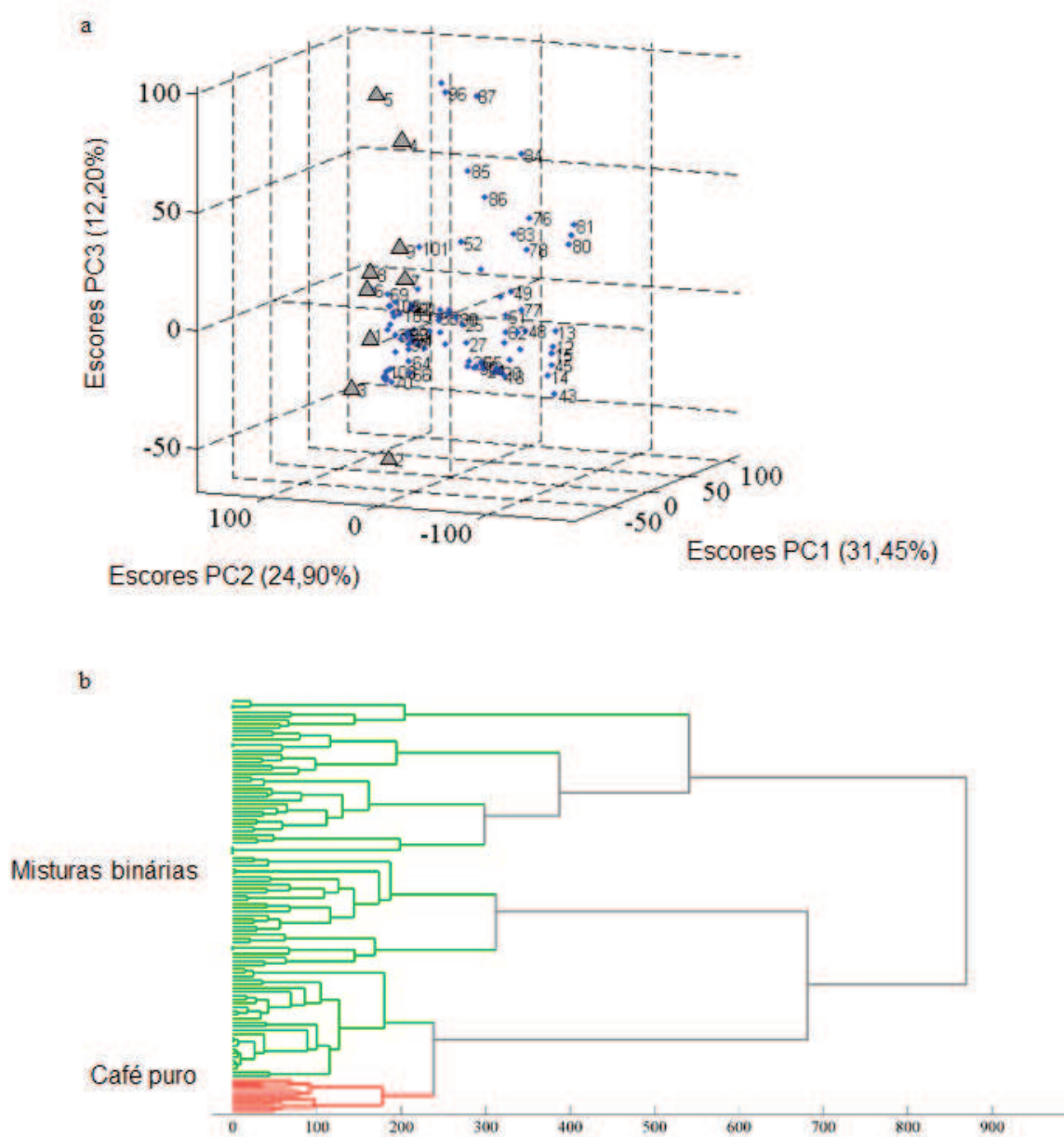
- Legenda: (a) Espectros FTIR-ATR (médias de  $n=3$ ) dos três níveis de torrefação (claro, médio e escuro) nas amostras de café puro, milho puro e uma mistura de café e milho 60:40 % (m/m);  
(b) Espectros FTIR-ATR de amostras de misturas binárias de café e milho.

A análise PCA dos dados espectrais obtidos das amostras de café puro e café adulterado foi realizada utilizando 6 PCs descrevendo no total 75,61% da variância. A Figura 18a apresenta o gráfico de escores das três primeiras PCs. Quando a concentração de adulterante é baixa, a análise PCA com FTIR-ATR não é capaz de distinguir o café adulterado do café puro com incerteza de 95% de confiança. Da

mesma forma como foi observado na análise PCA com curvas DSC, há uma tendência de quanto maior o nível de adulteração, mais distante as amostras estão da região das amostras de café puro, e quanto menor o nível de adulteração, mais próximas estas amostras estão da região das amostras de café puro. Porém, o modelo PCA com FTIR-ATR não foi capaz de diferenciar o nível de torrefação. A análise de agrupamento foi realizada e o dendrograma obtido utilizando distância de Mahalanobis com método de Ward (FIGURA 18b) mostra a pobre separação dos grupos de amostras de café puro e de amostras de misturas binárias.

A matriz de calibração do modelo PLS foi composta por 66 amostras, e a matriz de validação, por 33 amostras, nos três níveis de torrefação (claro, médio e escuro). O modelo foi construído com 6 variáveis latentes (LVs). A correlação entre os valores previstos e os de referência é apresentada na Figura 19, na qual é observada concordância satisfatória. Os parâmetros de desempenho do modelo PLS estão na Tabela 5.

Figura 18 - Gráfico de escores e dendrograma das amostras de café puro e café adulterado por milho empregando FTIR-ATR

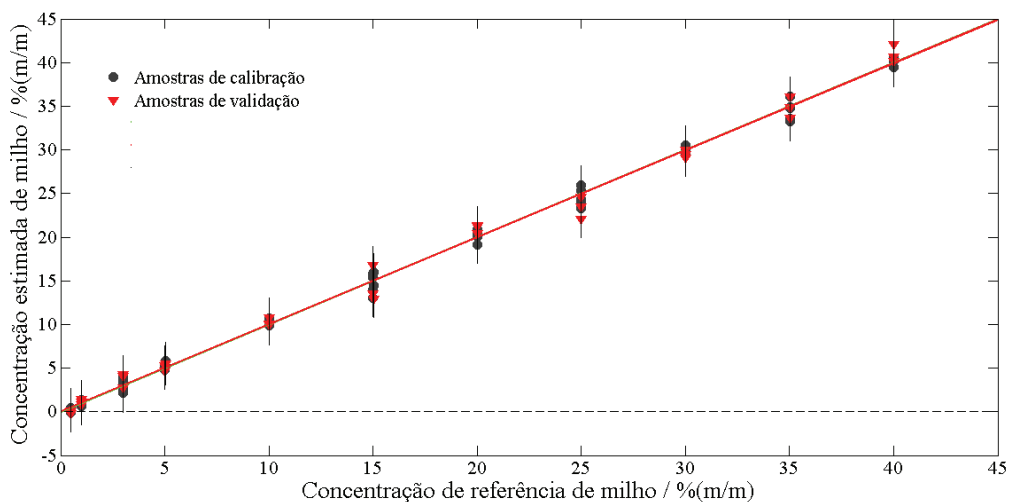


Fonte: Do autor.

Legenda: (a) Gráfico de escores do modelo PCA (PC1 x PC2 x PC3) dos dados obtidos por DSC. Amostras 1-3: ( $\blacktriangle$ ) café puro claro; 4-6: ( $\blacktriangle$ ) café puro médio; 7-9: ( $\blacktriangle$ ) café puro escuro; 10-42: misturas de café claro e milho; 43-75: misturas de café médio e milho; e 76-108: misturas de café escuro e milho;

(b) Dendrograma da análise de agrupamento de distância de Mahalanobis usando método de Ward para 9 amostras de café puro (vermelho) e 99 amostras de café adulterado por milho (verde).

Figura 19 - Regressão PLS para determinação de milho em amostras de café torrado e moído empregando FTIR-ATR



Fonte: Do autor.

Legenda: (●) amostras de calibração;  
 (▼) amostras de validação;  
 (barras de erro) incerteza com 95 % de confiança.

Tabela 5 - Parâmetros de desempenho do modelo PLS para estimar a concentração de milho em café torrado e moído por FTIR-ATR

Parâmetro	
Variáveis latentes	6
RMSEC <sup>(a)</sup>	1,25
RMSECV <sup>(b)</sup>	2,63
RMSEP <sup>(c)</sup>	1,53
R <sup>2</sup> calibração	0,9915
R <sup>2</sup> validação cruzada	0,9623
R <sup>2</sup> previsão	0,9876

Fonte: Do autor.

Nota: (a) RMSEC: erro quadrático médio de calibração (% m/m);  
 (b) RMSECV: validação cruzada (% m/m);  
 (c) RMSECP: previsão (% m/m).

### 3.4.3 Conclusão Parcial

A análise por FTIR-ATR juntamente com análises quimiométricas (PCA e PLS) foram capazes de detectar a adulteração do café por milho mesmo em concentrações menores que 1% (m/m). A metodologia atende a Instrução Normativa nº16, de 24/05/2010 do MAPA, que preconiza que o nível máximo de materiais estranhos no café deve ser de no máximo 1% (m/m) para garantir a qualidade do produto. O modelo PLS construído com os dados de FTIR-ATR mostrou boa concordância entre os valores previstos e os valores de referência, com erros quadráticos médios inferiores a 2,1 %.

É comum encontrar na literatura a combinação de espectroscopia no infravermelho com PLS para a quantificação de adulterantes em café, porém alguns autores afirmam que DRIFTS fornece dados espectrais com maiores intensidades de absorção que o FTIR-ATR, e por isso pode não fornecer completa discriminação entre amostras adulteradas de não adulteradas. Os resultados apresentados mostram a potencialidade do FTIR-ATR em detectar e quantificar a adulteração de café por milho, mesmo em baixas concentrações (menor que 1% (m/m)) (REIS; FRANCA; OLIVEIRA, 2013a, 2013b).

## 3.5 CONCLUSÃO

As análises DSC e FTIR-ATR juntamente com as análises quimiométricas (PCA e PLS) foram capazes de detectar a adulteração do café por milho mesmo em concentrações menores que 1% (m/m). As metodologias atenderam a Instrução Normativa nº16, de 24/05/2010 do MAPA, que preconiza que o nível máximo de materiais estranhos no café deve ser de no máximo 1% (m/m) para garantir a qualidade do produto. Os modelos PLS construídos com as curvas DSC e espectros FTIR-ATR, com erros quadráticos médios inferiores a 4 e 2,1 %, respectivamente.

Comparando os valores dos parâmetros de desempenho (TABELA 6) dos modelos PLS construídos com as curvas DSC e espectros FTIR-ATR, ambos os



métodos mostraram boa concordância entre os valores previstos e os valores de referência.

Tabela 6 - Parâmetros de desempenho dos modelos PLS para estimar a concentração de milho em café torrado e moído por DSC e FTIR-ATR

Parâmetro	DSC	FTIR-ATR
Variáveis latentes	4	6
RMSEC <sup>(a)</sup>	1,15	1,25
RMSECV <sup>(b)</sup>	3,45	2,63
RMSEP <sup>(c)</sup>	3,94	1,53
R <sup>2</sup> calibração	0,9927	0,9915
R <sup>2</sup> validação cruzada	0,9351	0,9623
R <sup>2</sup> previsão	0,9152	0,9876

Fonte: Do autor.

Nota: <sup>(a)</sup> RMSEC: erro quadrático médio de calibração (% m/m);

<sup>(b)</sup> RMSECV: validação cruzada (% m/m);

<sup>(c)</sup> RMSECP: previsão (% m/m).

DSC e FTIR-ATR são técnicas complementares que podem oferecer impressões digitais reprodutíveis para fins de detecção e quantificação de adulteração.

## 4 APLICAÇÃO 2: ESTUDO DE ESTABILIDADE E COMPATIBILIDADE DA ASSOCIAÇÃO FARMACÊUTICA ANLÓDIPINO E OLMESARTANA

Um aspecto importante a ser verificado no desenvolvimento de uma nova formulação, é a estabilidade desta, ou seja, a extensão em que um produto é capaz de manter suas propriedades e características que possuía no momento em que foi fabricado. Dessa forma é importante, para obter a aprovação de um medicamento, o estudo de estabilidade para o novo produto. O estudo de estabilidade também permite conhecer o tipo de embalagem mais adequada, estabelecer condições adequadas de armazenamento e estipular o prazo de validade adequado (ANVISA, 2005; ICH, 2012; WHO, 2002).

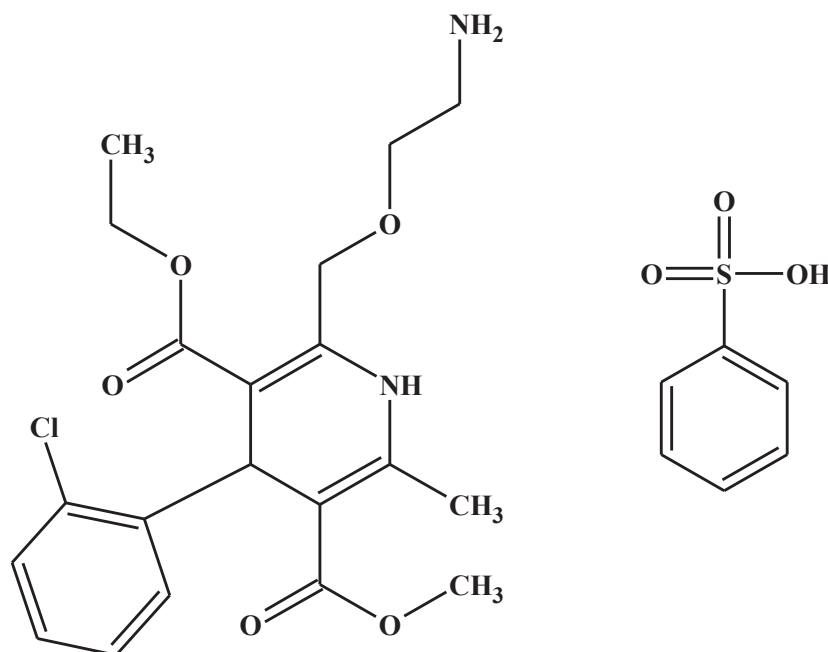
Objetivo principal desta segunda aplicação é a avaliação da estabilidade dos fármacos olmesartana medoxomila e besilato de anlodipino puros, em associação e em formulações farmacêuticas, pelo estudo de estabilidade química utilizando diferentes técnicas analíticas. Para atingir o objetivo foram empregadas as condições e técnicas analíticas recomendadas pelo ICH (Conferência Internacional de Harmonização - *International Conference on Harmonisation*) e por compêndios oficiais: TG, DSC, LC, PXRD e FTIR-ATR.

### 4.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Atualmente há uma grande variedade de medicamentos destinados ao controle da hipertensão arterial. Os medicamentos estão classificados como diuréticos, betabloqueadores, inibidores da ECA (enzima conversora da angiotensina), bloqueadores dos canais de cálcio, bloqueadores dos receptores AT1 e vasodilatadores diretos. Em alguns casos a monoterapia (quando apenas um anti-hipertensivo é utilizado) possui resposta terapêutica adequada, porém pelo menos 70% dos pacientes necessitam de duas ou mais medicações para o controle adequado da pressão arterial. Para esses casos a associação farmacêutica surge como uma forma mais prática para administração adequada dos fármacos (GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO - SECRETARIA DA SAÚDE, 2015).

O besilato de anlodipino é bloqueador do canal de cálcio utilizado no tratamento da hipertensão, por reduzir a pressão arterial pela vasodilatação e diminuição da resistência vascular, e da isquemia miocárdica. Comercialmente o medicamento é conhecido como Norvasc<sup>®</sup> (Pfizer), apresentado na forma de comprimidos revestidos nas dosagens de 5 e 10 mg, e possui em sua formulação os excipientes: celulose microcristalina, fosfato de cálcio dibásico anidro, amidoglicolato de sódio e estearato de magnésio. (ANVISA, 2015a; PFIZER CANADA INC., 2013). A estrutura molecular do besilato de anlodipino, (RS)-3-etil 5-metil-2-[(2-aminoetoxi)metil]-4-(2-clorofenil)-6-metil-1,4-dihidropiridina-3,5-dicarboxilato, CAS = 111470-99-6 está representada na Figura 20 (PFIZER CANADA INC., 2013).

Figura 20 - Estrutura química do besilato de anlodipino



Fonte: Adaptado de (PFIZER CANADA INC., 2013).

O besilato de anlodipino é uma substância branca cristalina, moderadamente solúvel em água e em etanol. Possui  $pK_a$  9,02. A temperatura de fusão é de 196 a 206 °C. Recomenda-se que seja armazenado em temperatura entre 15-30°C, protegido da luz (PFIZER CANADA INC., 2013).

A olmesartana medoxomila é um pró-fármaco que, durante a absorção pelo trato gastrointestinal, é completamente convertido, por hidrólise, no composto biologicamente ativo, a olmesartana, o qual é um anti-hipertensivo da classe dos bloqueadores seletivos dos receptores AT1 da angiotensina (MURAKAMI et al., 2008). No mercado o

medicamento é denominado Benicar® (Sankyo Pharma), apresentados na forma de comprimidos revestidos nas dosagens de 20 e 40 mg, e possui em sua formulação os excipientes: celulose microcristalina, lactose monohidratada, hiprolose, estearato de magnésio, dióxido de titânio e talco (ANVISA, 2015a; MERCK CANADA INC., 2013). A estrutura da olmesartana medoxomila, CAS = 144689-63-4, 4-(1-Hidroxi-1-metiletil)-2-propil-1-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)[1,1'-bifenil]-4-il]metil]-1H-imidazol-5-ácido carboxílico (5-Metil-2-oxo-1,3-dioxol-4-il)metílico, e metabólito ativo olmesartana, são apresentadas na Figura 21 (MERCK CANADA INC., 2013; MURAKAMI et al., 2008).

A olmesartana medoxomila é um pó branco-amarelado, praticamente insolúvel em água e moderadamente solúvel em álcool. Possui  $pK_a$  4,3. A temperatura de fusão é de 185 °C. Recomenda-se a estocagem em temperatura 15-30 °C (MERCK CANADA INC., 2013).

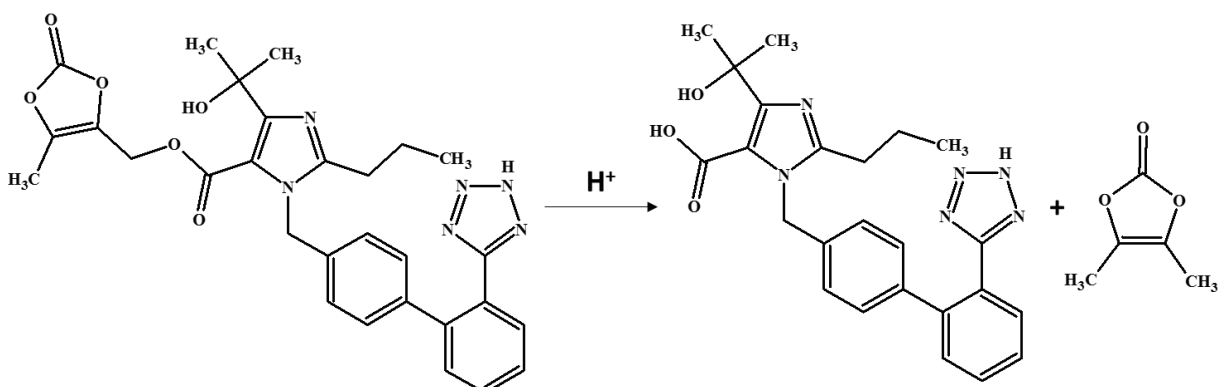
A associação de olmesartana medoxomila e besilato de anlodipino é utilizada no tratamento de casos mais severos de hipertensão. Comercialmente é denominado BenicarAnlo® (Sankyo Pharma), apresentado na forma de comprimidos revestidos nas dosagens indicadas na Tabela 7, e possui em sua formulação os excipientes: celulose microcristalina, lactose monohidratada, hiprolose, estearato de magnésio, dióxido de titânio e talco (ANVISA, 2015b; PFIZER INC., 2012).

Tabela 7 - Dosagens comerciais da associação farmacêutica: olmesartana e anlodipino

	Dosagens		
Olmesartana medoxomila	20 mg	40 mg	40 mg
Besilato de anlodipino	5 mg	5 mg	10 mg

Fonte: (ANVISA, 2015b).

Figura 21 - Estrutura química da olmesartana medoxomila e seu produto metabólico ativo, olmesartana



Fonte: Adaptado de (MURAKAMI et al., 2008).

Ao desenvolver um novo medicamento é fundamental o conhecimento de características físico-químicas do fármaco e dos excipientes envolvidos no preparo da nova formulação, pois alterações nas propriedades físico-químicas podem comprometer a segurança, eficácia e qualidade do fármaco (ANVISA, 2005; BERNARDI et al., 2009; SOARES et al., 2011). Portanto, no estágio inicial do desenvolvimento de novas formulações é necessária a obtenção de informações físico-químicas sobre o fármaco e os excipientes que podem vir a serem empregados na nova formulação. Para isso devem ser empregadas técnicas analíticas apropriadas.

Fármaco (ou princípio ativo) é uma substância química, de estrutura definida, que possui atividade estimulando, deprimindo ou modulando uma atividade fisiológica ou um efeito bioquímico no organismo humano, de maneira reprodutível, a fim de gerar alívio de sintomas e/ou alterar total ou parcialmente a evolução da doença em curso. O fármaco não é administrado ao paciente isoladamente. O medicamento é a formulação farmacêutica, que corresponde a um ou mais fármacos na presença de excipientes farmacêuticos. Os excipientes farmacêuticos são substâncias que não possuem atividade farmacológica e têm a função de auxiliar na obtenção de formulações mais eficientes, podendo agir na biodisponibilidade do(s) fármaco(s), eles podem ser classificados como diluentes, conservantes, corantes, flavorizantes, entre outros (ANSEL; POPOVICH; ALLEN JUNIOR, 2000; LARINI, 2008).

Além de não possuir atividade farmacológica o excipiente também deve apresentar compatibilidade com o fármaco presente na formulação, para que haja uma maior eficiência do medicamento e que não haja formação de produtos de degradação, de forma que não haja alteração da dosagem do princípio ativo na formulação e nem a formação de produtos potencialmente tóxicos. Diante disto é necessária a realização de estudos de estabilidade do fármaco isolado e na presença de excipientes (AHUJA; DONG., 2005; ANSEL; POPOVICH; ALLEN JUNIOR, 2000; WHO, 2002).

Antes de um novo medicamento ser produzido e entrar no mercado ele deve ser aprovado pela autoridade sanitária responsável. No Brasil o órgão responsável por tal aprovação é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Nos últimos anos o comércio mundial de medicamentos tem aumentado significativamente, sendo comum a produção e comercialização em países diferentes. Este fato despertou a preocupação internacional com relação a qualidade dos medicamentos produzidos

em cada país e motivou a padronização de regulamentos técnicos relacionados ao desenvolvimento e produção de produtos farmacêuticos. Assim foi criada, em 1990, a ICH, composto por autoridades reguladoras e representantes da indústria farmacêutica da Europa, Japão e Estados Unidos. Estes se reúnem a cada 2 anos para discutir aspectos científicos e técnicos do registro de medicamentos, com o objetivo de alcançar uma maior harmonização, que garanta o desenvolvimento e registro de medicamentos seguros, eficazes e de alta qualidade. A ANVISA considera as diretrizes da ICH como requisitos para o desenvolvimento e produção de medicamentos no país (ANSEL; POPOVICH; ALLEN JUNIOR, 2000; LARINI, 2008).

O estudo de estabilidade recomendado pelo ICH envolve a análise da estabilidade intrínseca do fármaco pela sua submissão a reações de degradação forçada (degradação ácida, degradação básica, degradação oxidativa e fotólise), a fim de identificar seus produtos e vias de degradação; a submissão do fármaco e de misturas contendo fármacos e excipientes a determinadas condições de armazenamento e posterior análise das amostras para detectar possíveis produtos de degradação; e o estudo de estabilidade polimórfica, além dos aspectos físicos, microbiológicos, terapêuticos e toxicológicos (FDA, 2012).

Diversos métodos analíticos têm sido desenvolvidos com o objetivo de avaliar a estabilidade de formulações farmacêuticas que envolvem técnicas analíticas, sejam elas oficiais ou complementares, como TG, DSC, cromatografia, difração de raios X (XRD, do inglês, *X-ray Diffraction*), espectroscopia na região do infravermelho, espectroscopia Raman e espectrometria de massa (GIRON, 1998; KARABAS; ORKOULA; KONTOYANNIS, 2007; KUMAR et al., 2009; SINGH et al., 2007; TIȚA et al., 2011).

A partir dos métodos cromatográficos é possível avaliar a variação da dosagem do fármaco na mistura, além de obter informações sobre possíveis produtos de degradação (JÚLIO et al., 2013; KUMAR et al., 2009; LILTORP et al., 2011); a difração de raios X é a técnica mais difundida de caracterização de polimorfos, empregada na avaliação do perfil cristalino (DATTA; GRANT, 2004); espectroscopia Raman e na região do infravermelho são empregadas na avaliação de alterações em bandas características da estrutura do fármaco (AYALA et al., 2006, 2010; BERNARDI et al., 2009; CESUR; GOKBEL, 2008; MURAKAMI et al., 2009; TIȚA et al., 2011); análise térmica, por TG e/ou DSC, para avaliar a estabilidade térmica do fármaco, alterações no perfil das curvas TG e DSC podem indicar alterações polimórficas, presença de

produtos de degradação e variação na dosagem do fármaco na mistura (GIRON, 1998; JÚLIO et al., 2013; KARABAS; ORKOULA; KONTOYANNIS, 2007; LAVOR et al., 2012; SINGH et al., 2007; SOARES et al., 2011; TIȚA et al., 2011; YOSHIDA et al., 2011).

## 4.2 OBJETIVO

Avaliar a estabilidade e compatibilidade dos fármacos olmesartana medoxomila e besilato de anlodipino na presença de excipientes comumente utilizados nas formulações a partir do estudo de compatibilidade com excipientes utilizando diferentes técnicas analíticas.

### 4.2.1 Objetivos Específicos

- a) Caracterizar os fármacos olmesartana medoxomila e besilato de anlodipino utilizando TG, DSC, FTIR e PXRD (Difração de raios X por pó – *Powder X-ray Diffraction*);
- b) Desenvolver e otimizar metodologia para determinação dos fármacos olmesartana medoxomila e besilato de anlodipino, e seus produtos de degradação por HPLC-CAD;
- c) Estudo da compatibilidade da olmesartana com excipientes farmacêuticos utilizando DSC, HPLC e FTIR;
- d) Estudo da compatibilidade da anlodipino com excipientes farmacêuticos utilizando DSC, HPLC e FTIR;
- e) Estudo de compatibilidade da associação farmacêutica olmesartana e anlodipino com excipientes utilizando HPLC e FTIR.

### 4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS FÁRMACOS BESILATO DE ANLÓDIPINO E OLMESARTANA MEDOXOMILA

Antes do início dos estudos de compatibilidade, os fármacos besilato de anlodipino e olmesartana medoxomila foram caracterizados físico-quimicamente.

#### 4.3.1 Materiais e métodos

As técnicas, os equipamentos e as condições de análise foram as mesmas para ambos os fármacos.

##### 4.3.1.1 Análise termogravimétrica

As análises termogravimétricas foram conduzidas utilizando termobalança SDT Q600 (TA Instruments), previamente calibrada com oxalato de cálcio, empregando os seguintes parâmetros: intervalo de temperatura de 30 a 600 °C; atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL.min<sup>-1</sup>); razão de aquecimento de 10 °C.min<sup>-1</sup>; cadinhos de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; e aproximadamente 10 mg de amostra.

##### 4.3.1.2 Calorimetria exploratória diferencial

A análise por DSC foi realizada em Calorímetro DSC Q20 (TA Instruments), previamente calibrado com padrão de índio. Aproximadamente 3,0 mg de cada amostra foram colocadas em cadinhos de alumínio hermeticamente fechados e analisado sob atmosfera de N<sub>2</sub>, com fluxo de 50 mL.min<sup>-1</sup>, na faixa de temperatura entre 30 e 600 °C, e diferentes razões de aquecimento (5, 10, 15 e 20 °C.min<sup>-1</sup>).



#### 4.3.1.3 Espectroscopia no infravermelho

Os espectros FTIR-ATR foram obtidos em espectroscópio Nicolet iS50 FT-IR (Thermo Scientific) e acessório GladiATR (Pike Technologies), o qual possui um diamante de reflexão e dispositivo de alta pressão. Os espectros foram coletados a cada 5 °C, de 30 a 300 °C, com razão de aquecimento de 2 °C.min<sup>-1</sup>. Foram realizadas 64 varreduras de 400 a 4000 cm<sup>-1</sup>, com resolução de 4 cm<sup>-1</sup>. O acessório GladiATR permite que os espectros sejam obtidos concomitantemente ao processo de aquecimento, sendo a temperatura máxima de 300 °C.

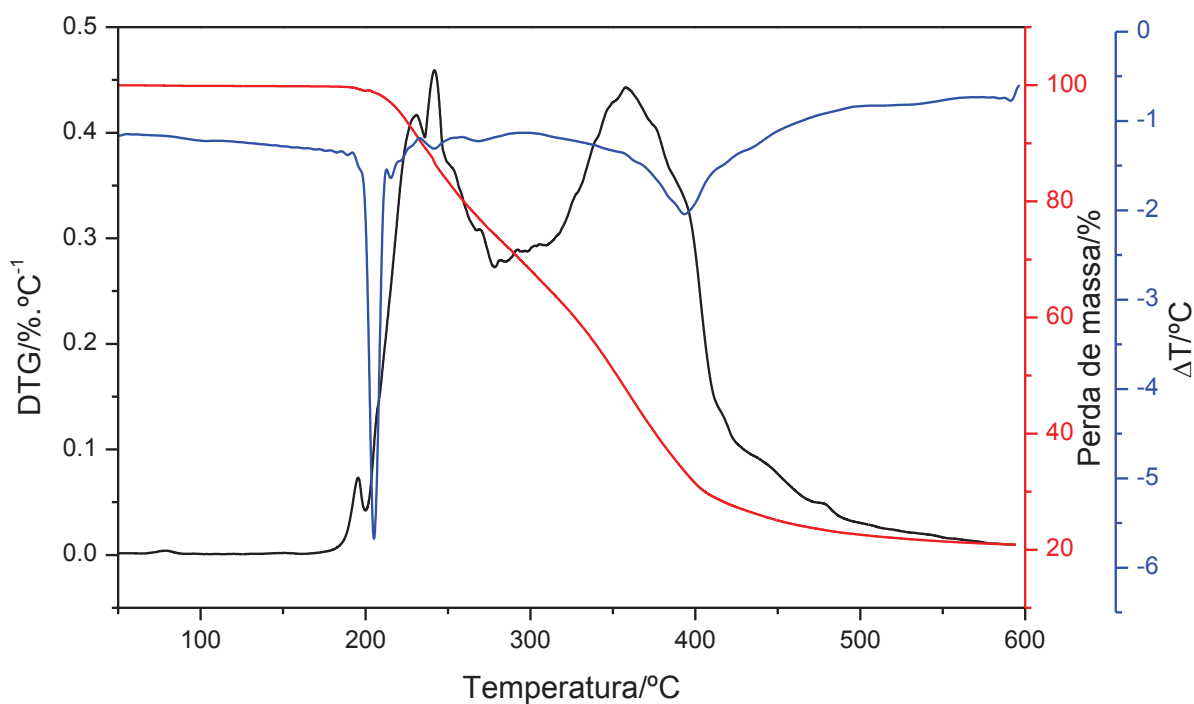
#### 4.3.1.4 Difratometria de raios X por pó

A caracterização por PXRD foi conduzida com fonte de Cu K $\alpha$  ( $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$ ), em um difratômetro de raios X Ultima IV - Rigaku, de 5 a 55 °2 $\theta$  utilizando uma voltagem de 40 Kv, corrente de 30 mA, velocidade de varredura de 1 °2 $\theta$ .min<sup>-1</sup> e fenda de 10 mm.

### 4.3.2 Resultados e discussão

As curvas TG/DTA (FIGURA 22) do besilato de anlodipino possui um pico endotérmico no intervalo de 188,0 a 209,0 °C, com temperatura de pico em 204,1 °C, correspondendo ao pico de fusão, como descrito na literatura (PFIZER CANADA INC., 2013; SILVA et al., 2015). Outro evento endotérmico ocorre em 393,9 °C, relativo ao processo de decomposição. Duas etapas de perda de massa são observadas, a primeira entre 192 – 277 °C de  $\Delta m_1 = 28\%$ , e a segunda entre 277 – 550 °C de  $\Delta m_2 = 50.6\%$ . A primeira etapa de perda de massa ocorre na mesma temperatura de fusão, indicando que a fusão ocorre juntamente com um processo de decomposição. A perda total de massa do besilato de anlodipino é de 78.6% entre 192 – 550 °C.

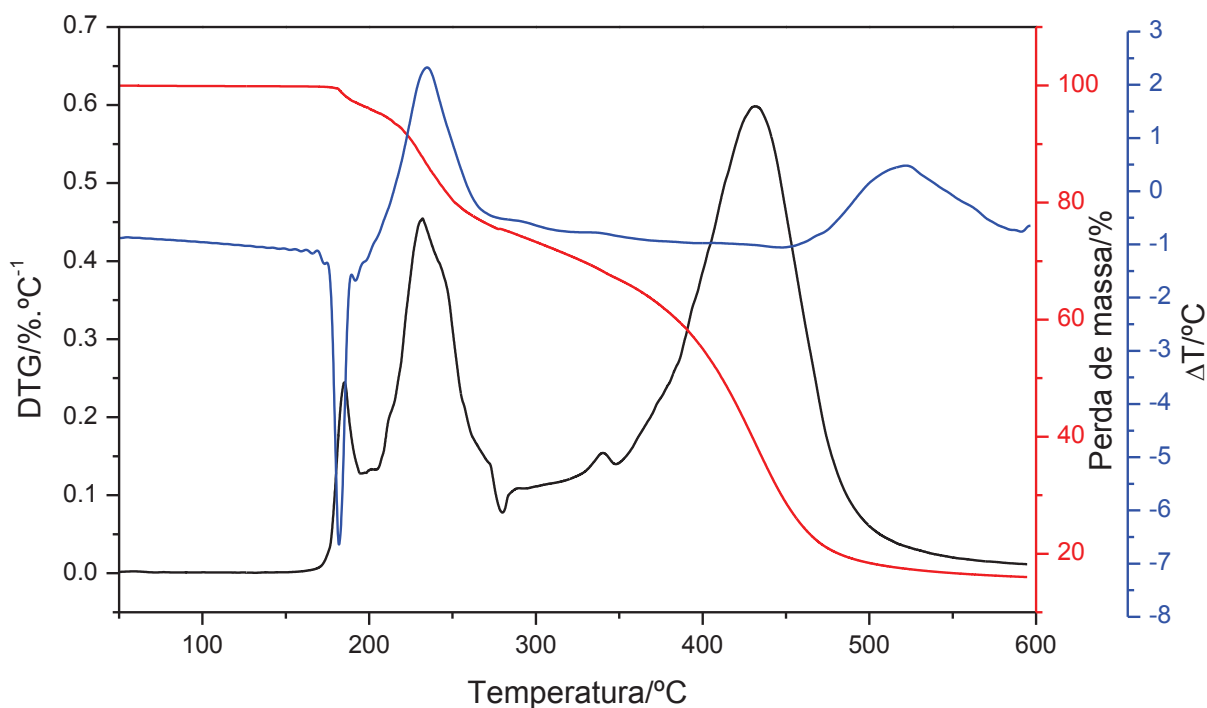
Figura 22 - Curvas TG/DTA do besilato de anlodipino



Fonte: Do autor.

As curvas TG/DTA obtidas da olmesartana medoxomila são apresentadas na Figura 23. De 172,0 a 206,0 °C ocorre um evento endotérmico, com temperatura de pico em 184,4 °C, que corresponde à fusão, como descrito na literatura (MERCK CANADA INC., 2013). O pico de fusão é seguido de um evento exotérmico entre 206,0 – 275,8 °C, relativo ao processo de decomposição. São observados três etapas de perda de massa, o primeiro entre 180,6 – 195,8 °C de  $\Delta m_1 = 3,4\%$ , este evento ocorre concomitantemente ao processo de fusão; o segundo entre 195,8 – 278,6 °C de  $\Delta m_2 = 21,1\%$ , e o terceiro entre 278,6 – 526,0 °C com  $\Delta m_3 = 58,2\%$ . A perda total de massa da olmesartana medoxomila é de 82,7% entre 180,6 – 526,0 °C. A Tabela 8 resume os resultados experimentais obtidos por TG/DTA para o anlodipino e olmesartana.

Figura 23 - Curvas TG/DTA da olmesartana medoxomila



Fonte: Do autor.

Tabela 8 - Resultados do TG/DTA das amostras de fármaco

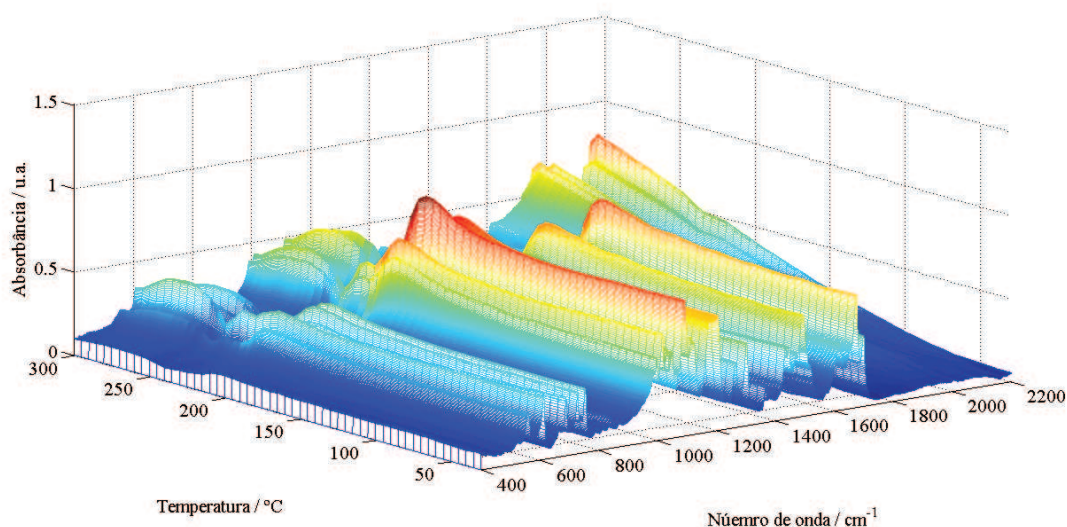
Fármaco	Temperatura de transição/°C			Perda de massa/%
	Fusão	Decomposição	$\Delta T^{(a)}$	
Besilato de anlodipino	204,1	393,9	192,0-550,0	78,6
Olmesartana medoxomila	184,4	237,3	180,6-526,0	82,7

Fonte: Do autor.

Nota: <sup>(a)</sup>  $\Delta T$  é o intervalo de temperatura associado à variação de massa da amostra.

Comparando os espectros no infravermelho do besilato de anlodipino obtidos em 30 °C e em 200 °C (FIGURA 24) pode-se observar que as bandas relativas a  $\nu$  (SO<sub>3</sub>) em 1032 cm<sup>-1</sup> e  $\nu$  (C-S) em 727 cm<sup>-1</sup>, desapareceram. Logo, a primeira perda de massa (192 – 277 °C,  $\Delta m_1 = 28\%$ ) observada na curva TG corresponde à degradação do besilato.

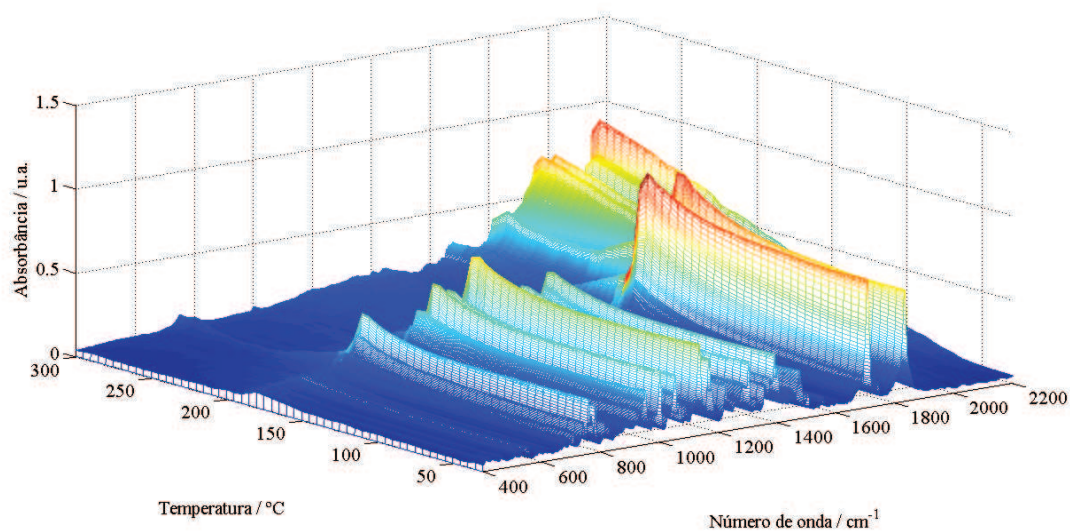
Figura 24 - Espectros infravermelho do besilato de anlodipino de 30 a 300 °C



Fonte: Do autor.

Comparando os espectros no infravermelho da olmesartana medoxomila de 30°C e 190 °C (FIGURA 25) pode-se observar que a banda do  $\nu$  (O-H) em 3360 cm<sup>-1</sup>, desaparece. Logo, a primeira perda de massa (180,6 – 195,8 °C,  $\Delta m_1 = 3,4\%$ ), observado na curva TG, corresponde à desidratação da molécula. Durante a segunda perda de massa (195,8 – 278,6 °C,  $\Delta m_2 = 21,1\%$ ), comparando os espectros obtidos a 30 °C e 275 °C, as bandas relacionadas a  $\nu$  (C=O) em 1830 e 1704 cm<sup>-1</sup>, e  $\nu$  (C-O) em 1135 cm<sup>-1</sup>, diminuem, indicando a decomposição da medoxomila.

Figura 25 - Espectros infravermelho da olmesartana medoxomila de 30 a 300 °C



Fonte: Do autor.

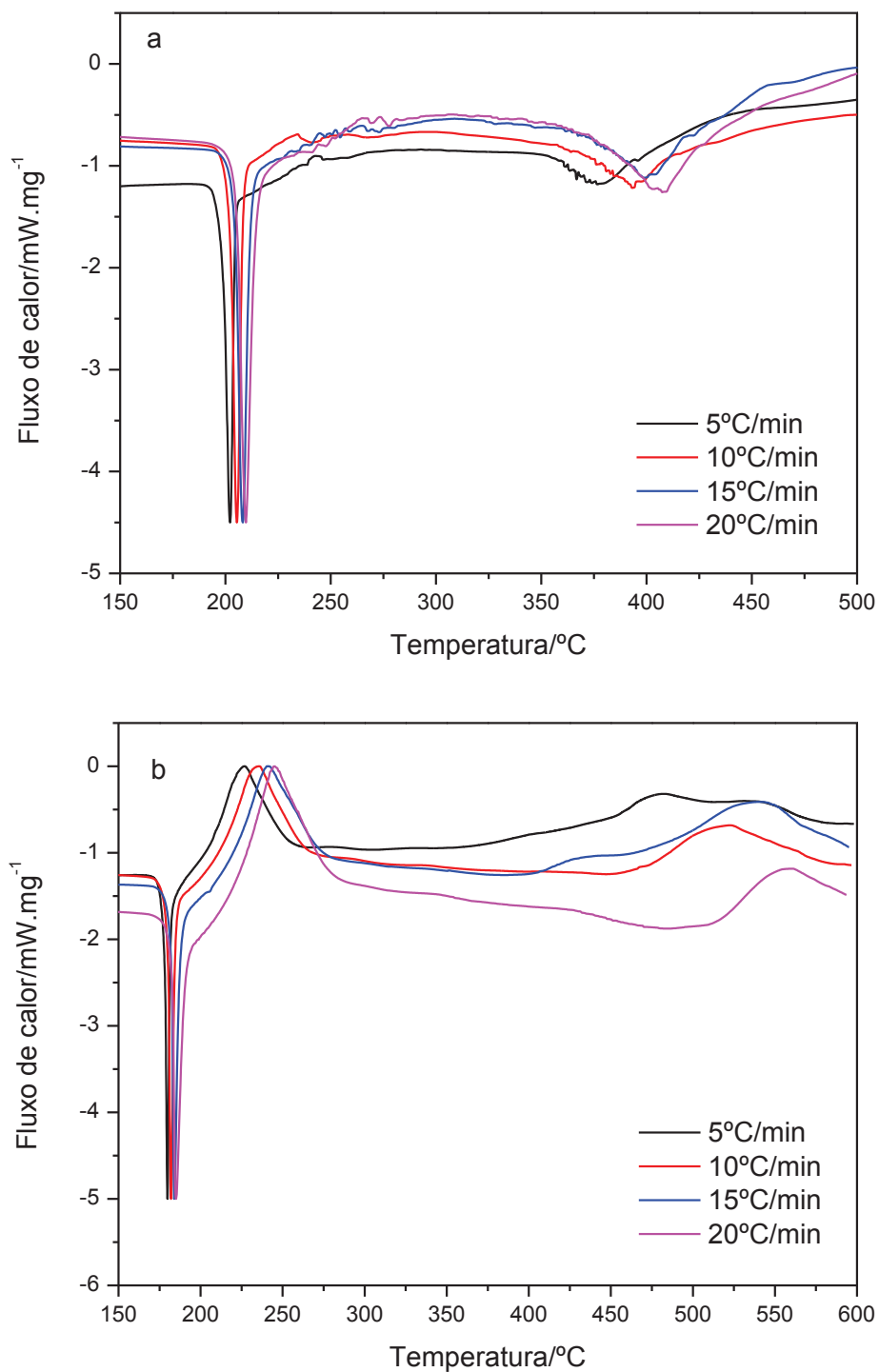
A Figura 26 e Tabela 9 apresentam as curvas DSC do besilato de anlodipino e da olmesartana medoxomila, as temperaturas de fusão e decomposição, em diferentes razões de aquecimento. Observa-se que quanto maior a razão de aquecimento utilizada na obtenção da curva DSC, os picos de fusão e decomposição se deslocam para temperaturas maiores. Essa variação nas temperaturas dos picos é utilizada na determinação de parâmetros termocinéticos das amostras, como energia de ativação ( $E_a$ ), fator pré-exponencial de Arrhenius ( $Z$ ), energia livre de Gibbs ( $\Delta G^\#$ ), entalpia ( $\Delta H^\#$ ) e entropia ( $\Delta S^\#$ ). Neste estudo, dois métodos bem estabelecidos foram aplicados para calcular os parâmetros cinéticos das reações de decomposição dos fármacos: Método ASTM E698 e método de Ozawa (OZAWA, 1965; SHAMSIPUR et al., 2013; SOVIZI; HOSSEINI, 2013).

Tabela 9 - Temperaturas de fusão e decomposição do besilato de anlodipino e olmesartana medoxomila obtidos por DSC em diferentes razões de aquecimento

Razão de aquecimento / °C min <sup>-1</sup>	Besilato de anlodipino		Olmesartana medoxomila	
	Ponto de fusão / °C	Temperatura de decomposição / °C	Ponto de fusão / °C	Temperatura de decomposição / °C
5	202,2	376,7	179,8	226,5
10	205,4	393,1	181,9	235,3
15	208,2	398,9	183,9	240,9
20	209,7	407,6	185,1	244,5

Fonte: Do autor.

Figura 26 - Efeito da razão de aquecimento nas temperaturas de fusão e decomposição do besilato de anlodipino e olmesartana medoxomila em curvas DSC



Fonte: Do autor.

Legenda: (a) besilato de anlodipino;  
(b) olmesartana medoxomila.

No método ASTM E698,  $\ln(\beta \cdot T_m^{-2})$  foi plotado versus  $1000/T_m$ , onde  $T_m$  (K) é o pico de maior temperatura presente nas curvas DSC e  $\beta$  (K.min<sup>-1</sup>) é a razão de

aquecimento utilizada na obtenção das curvas DSC. A energia de ativação é determinada pelo coeficiente angular da regressão linear de  $\ln(\beta \cdot T_m^{-2})$  versus  $1000/T_m$  (coeficiente angular igual a  $-E_a/R$ ). O fator pré-exponencial de Arrhenius pode ser calculado pela Equação 14:

$$Z = \beta E_a \exp[E_a/RT_m]/RT_m^2 \quad (14)$$

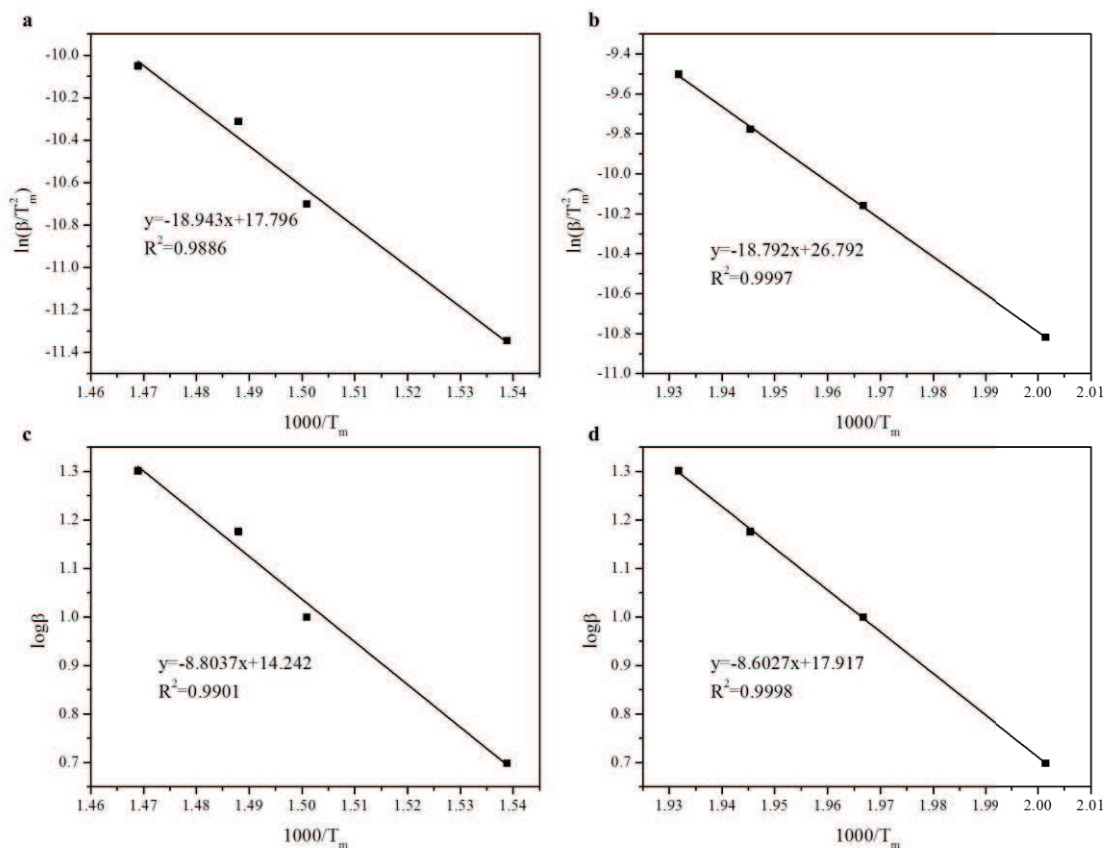
No método de Ozawa a energia de ativação pode ser determinada sem prévio conhecimento sobre o mecanismo de reação, plotando  $\log \beta$  versus  $1000/T_m$ . A energia de ativação pode ser calculada utilizando a Equação 15 (OZAWA, 1965; SOVIZI; HOSSEINI, 2013):

$$\log \beta + 0.4567 \frac{E_a}{RT_m} = C \quad (15)$$

onde C é o coeficiente linear da curva de  $\log \beta$  versus  $1000/T_m$ . O fator pré-exponencial de Arrhenius pode ser calculado pela equação 14.

A Figura 27 apresenta os gráficos de  $\ln(\beta \cdot T_m^{-2})$  versus  $1000/T_m$  e  $\log \beta$  versus  $1000/T_m$  para besilato de anlodipino e olmesartana medoxomila. A linearidade, com coeficientes de determinação próximos a 0,99, indicam que o mecanismo de decomposição não se altera sob diferentes razões de aquecimento (CRIADO; PÉREZ-MAQUEDA; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, 2005; SHAMSIPUR et al., 2013; SOVIZI; HOSSEINI, 2013).

Figura 27 - Gráficos de  $\ln(\beta \cdot T_m^{-2})$  versus  $1000/T_m$  e  $\log(\beta)$  versus  $1000/T_m$  para besilato de anlodipino e olmesartana medoxomila



Fonte: Do autor.

Legenda: (a) Gráfico de  $\ln(\beta \cdot T_m^{-2})$  versus  $1000/T_m$  para besilato de anlodipino;  
 (b) gráfico de  $\ln(\beta \cdot T_m^{-2})$  versus  $1000/T_m$  para olmesartana medoxomila;  
 (c) gráfico de  $\log(\beta)$  versus  $1000/T_m$  para besilato de anlodipino;  
 (d) gráfico de  $\log(\beta)$  versus  $1000/T_m$  para olmesartana medoxomila.

O fator pré-exponencial de Arrhenius ( $Z$ ) é a medida da frequência de colisões intermoleculares. Quanto maior o valor de  $Z$ , menor é a estabilidade da amostra (CRIADO; PÉREZ-MAQUEDA; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, 2005; SHAMSIPUR et al., 2013; SOVIZI; HOSSEINI, 2013). Os valores de  $Z$  obtidos indicam que a olmesartana possui menor estabilidade que o anlodipino.

Os parâmetros termodinâmicos, incluindo energia livre de Gibbs ( $\Delta G^\ddagger$ ), entalpia ( $\Delta H^\ddagger$ ) e entropia ( $\Delta S^\ddagger$ ) podem ser calculados pelas equações 16 a 18, onde  $v = K_B T/h$  (onde  $K_B$  e  $h$  são as constantes de Boltzmann e Planck, respectivamente) (SHAMSIPUR et al., 2013; SOVIZI; HOSSEINI, 2013).

$$Z \exp \frac{-E_a}{RT} = v \exp \frac{-\Delta G^\ddagger}{RT} \quad (16)$$



$$\Delta H^{\#} = E_a - RT \quad (17)$$

$$\Delta G^{\#} = \Delta H^{\#} - T\Delta S^{\#} \quad (18)$$

Todos os valores dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos obtidos estão apresentados na Tabela 10. Comparando os resultados obtidos pelos dois métodos, observa-se que os valores calculados são estatisticamente iguais entre si, pelo teste t, e isso ocorre para ambos os fármacos.

Tabela 10 - Parâmetros cinéticos médios obtidos para besilato de anlodipino e olmesartana medoxomila

Fármaco	Método cinético	$E_a$ kJ.mol <sup>-1</sup>	log Z s <sup>-1</sup>	r	$\Delta G^{\#}$ kJ.mol <sup>-1</sup>	$\Delta H^{\#}$ kJ.mol <sup>-1</sup>	$\Delta S^{\#}$ kJ.mol <sup>-1</sup>	log k s <sup>-1</sup>
Anlodipino	ASTM	157,49 <sup>a</sup>	12,0 <sup>a</sup>	0,9943	305,9 <sup>a</sup>	151,95 <sup>a</sup>	-228,07 <sup>a</sup>	-15,65 <sup>a</sup>
	Ozawa	160,37 <sup>a</sup>	12,2 <sup>a</sup>	0,9950	309,7 <sup>a</sup>	154,83 <sup>a</sup>	-232,40 <sup>a</sup>	-15,92 <sup>a</sup>
Olmesartana	ASTM	156,24 <sup>a</sup>	15,9 <sup>b</sup>	0,9998	304,0 <sup>a</sup>	152,01 <sup>a</sup>	-298,97 <sup>b</sup>	-11,49 <sup>b</sup>
	Ozawa	156,58 <sup>a</sup>	16,3 <sup>b</sup>	0,9999	304,7 <sup>a</sup>	152,35 <sup>a</sup>	-299,64 <sup>b</sup>	-11,52 <sup>b</sup>

Fonte: Do autor.

Nota: \*teste t; p<0.05; n=3.

Os valores das constantes de velocidade de reação ( $k$ ) para decomposição térmica do anlodipino e da olmesartana foram calculados considerando que a reação de decomposição é de primeira ordem utilizando a Equação 19:

$$\log k = \log Z - E_a/2.3RT \quad (19)$$

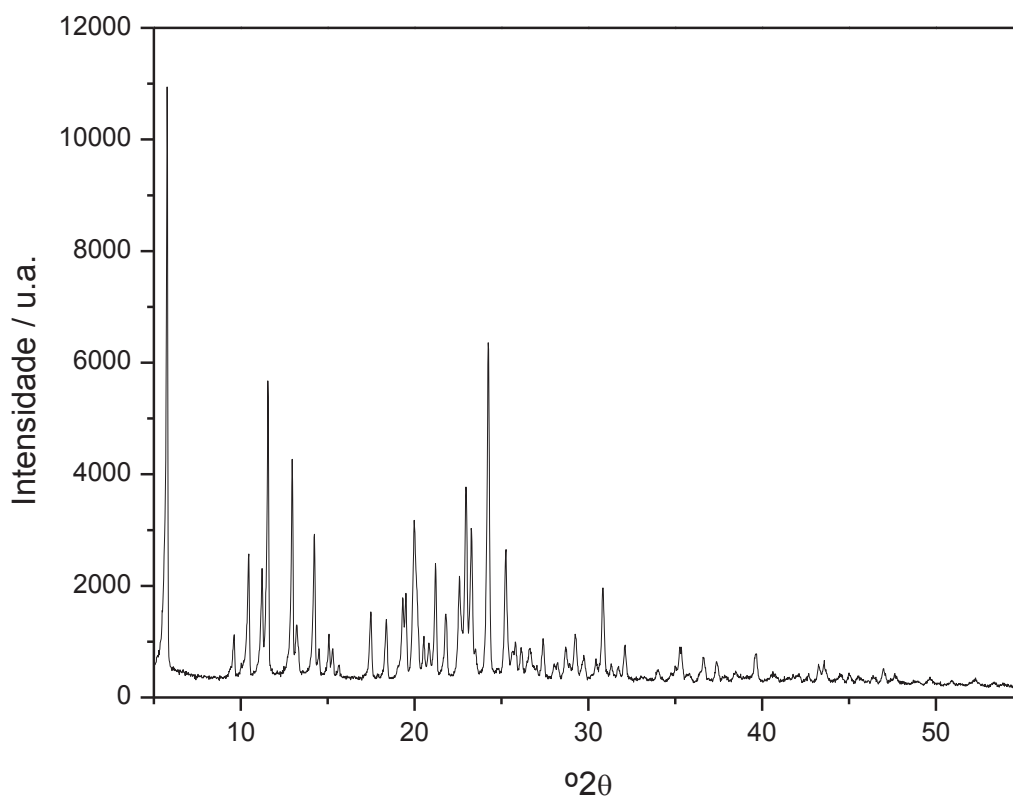
na temperatura de 25 °C (298.15 K); e a equação foi resolvida utilizando  $E_a$  e Z obtidos anteriormente. Numa reação de primeira ordem a velocidade depende da concentração de reagente (fármaco) e produto (produto de degradação) presente no meio (OZAWA, 1965; SHAMSIPUR et al., 2013; SOVIZI; HOSSEINI, 2013).

Os valores de  $\log k$  para anlodipino e olmesartana estão apresentados na Tabela 10. O valor da constante de velocidade de reação encontrado para a olmesartana é maior, na ordem de  $10^4$ , que o calculado para o anlodipino, indicando que a olmesartana é menos estável que o anlodipino.

Comparando os valores dos parâmetros termodinâmicos obtidos para o anlodipino e a olmesartana, temos que  $\Delta S^\ddagger$  da olmesartana é menor que o do anlodipino. O valor mais elevado de  $\Delta S^\ddagger$  do anlodipino indica que a reação de decomposição é mais lenta, e que a olmesartana se decompõe mais rapidamente. Os valores positivos ( $>0$ ) de  $\Delta H^\ddagger$  e  $\Delta G^\ddagger$  para ambos os fármacos mostram que as reações de decomposição não são espontâneas, sendo dependentes de uma fonte de aquecimento, indicando a possibilidade de possuírem longos prazos de prateleira.

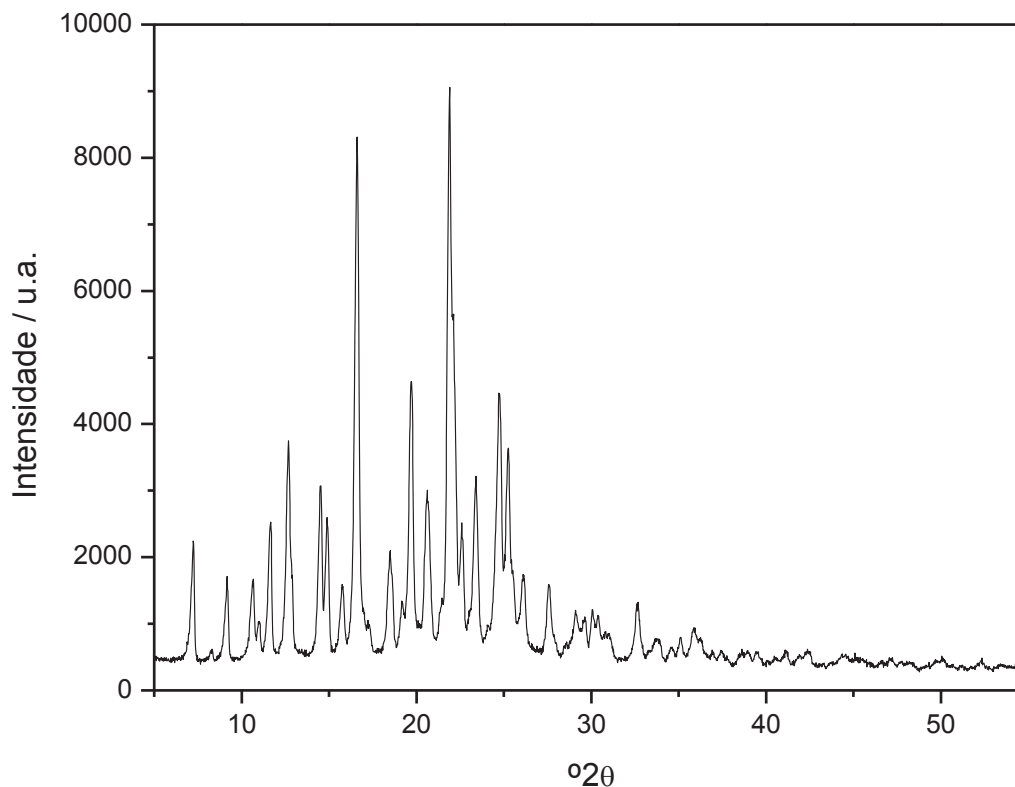
A Figura 28 apresenta o difratograma de raios X por pó do besilato de anlodipino, que apresenta picos em 5,8, 9,6, 10,5, 11,2, 11,6, 12,9, 14,2, 17,5, 18,4, 19,5, 20,0, 21,2, 22,6, 22,9, 23,2, 24,2, 25,3, 30,8  $^\circ 2\theta$ , que corresponde à forma cristalina 1 (DANDU et al., 2012).

Figura 28 - Difratograma de raios X por pó do besilato de anlodipino



Fonte: Do autor.

Figura 29 - Difratoograma de raios X por pó da olmesartana medoxomila



Fonte: Do autor.

A Figura 29 apresenta o difratoograma de raios X por pó da olmesartana medoxomila, que apresenta picos em 8,9, 10,5, 10,9, 11,8, 12,9, 13,9, 14,4, 15,3, 15,9, 17,1, 17,6, 17,9, 18,7, 19,5, 20,5, 21,9, 23,5, 26,1, 26,5, 27,5 e 29,1 °2θ, os quais correspondem à forma cristalina R (KAPOOR et al., 2010).

#### 4.3.3 Conclusão Parcial

Os fármacos besilato de anlodipino e olmesartana medoxomila foram devidamente caracterizados e os resultados encontrados para temperatura de fusão, difratometria de raios X e espectroscopia no infravermelho estão de acordo com a literatura.

O comportamento térmico do besilato de anlodipino e olmesartana medoxomila foram investigados por meio de técnicas termo analíticas. Os resultados da TG/DTA mostraram que, para ambos os fármacos, a decomposição térmica inicia no ponto de

fusão, 204,1 °C para o besilato de anlodipino e 184,4 °C para a olmesartana medoxomila. Os parâmetros termocinéticos e termodinâmicos correspondente as reações de decomposição foram calculados a partir das curvas DSC obtidas com o emprego de diferentes razões de aquecimento. Dois métodos, ASTM e Ozawa, foram aplicados para calcular a energia de ativação e fator pré-exponencial de Arrhenius, e os resultados apresentaram boa correlação entre si.

O besilato de anlodipino possui maior estabilidade térmica quando comparado com a olmesartana medoxomila. Porém o tempo de prateleira de ambos os fármacos é dependente da temperatura de estocagem, podendo apresentar longos prazos de validade em temperatura ambiente (25 °C).

#### 4.4 ESTUDO DE COMPATIBILIDADE FÁRMACO-EXCIPIENTE EMPREGANDO DSC

Esta etapa teve como objetivo avaliar a compatibilidade dos fármacos besilato de anlodipino e olmesartana medoxomila com excipientes utilizando a técnica DSC. Avaliou-se também a possibilidade de utilizar o DSC no estudo de compatibilidade da associação farmacêutica entre anlodipino e olmesartana.

##### 4.4.1 Materiais e métodos

A seguir serão descritos todos os materiais, equipamentos e metodologias empregadas nesta etapa do trabalho.

###### 4.4.1.1 Preparo das amostras

Para os estudos de compatibilidade foram utilizados os excipientes: amido pré-gelatinizado, celulose, croscarmelose sódica, estearato de magnésio, álcool

polivinílico, dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ), talco, polivinilpirrolidona (PVP), lactose e polietilenoglicol (PEG), presentes na formulação comercial de referência.

As amostras analisadas foram os fármacos isolados, besilato de anlodipino e olmesartana medoxomila, e os dez excipientes, em triplicata; 60 (sessenta) misturas binárias fármaco excipiente na proporção 1:1 (m/m), sendo 30 (trinta) misturas contendo anlodipino e 30 (trinta) contendo olmesartana, e 3 misturas contendo anlodipino e olmesartana na proporção 1:1 (m/m). As misturas binárias foram preparadas a partir da pesagem precisa de cada componente, utilizando balança analítica (Sartorius CP2P), os quais foram adicionados a um frasco de polietileno com tampa e homogeneizadas utilizando um agitador do tipo vortex por 5 minutos.

As amostras de anlodipino, olmesartana, dos excipientes envolvidos no seu estudo e das suas misturas binárias foram analisadas por DSC imediatamente após seu preparo.

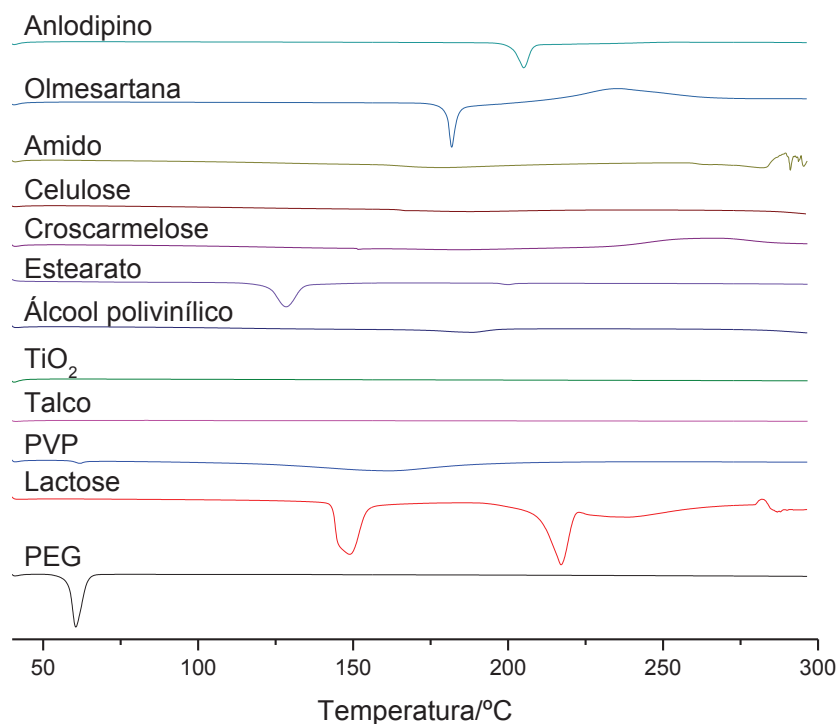
#### 4.4.1.2 Calorimetria exploratória diferencial

A análise por DSC foi realizada em Calorímetro DSC Q20 – TA Instruments, previamente calibrado com índio. Foram utilizados aproximadamente 3 mg de amostra, colocadas em cadinho de alumínio hermeticamente fechado e analisado sob atmosfera de  $\text{N}_2$ , com fluxo de  $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e razão de aquecimento de  $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , na faixa de temperatura entre 30 e  $300 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 4.4.2 Resultados e discussão

A Figura 30 apresenta as curvas DSC obtidas na análise do anlodipino e olmesartana e de cada excipiente.

Figura 30 - Curvas DSC do anlodipino, olmesartana e de cada excipiente isolado



Fonte: Do autor.

Nota: Faixa de temperatura de 30°C a 300°C; razão de aquecimento 10°C.min<sup>-1</sup> e atmosfera de N<sub>2</sub> com fluxo de 50 mL.min<sup>-1</sup>.

Os resultados mostram que a faixa de fusão do anlodipino (188 a 209 °C) e da olmesartana (172 a 206 °C) não sobrepõem a eventos térmicos de qualquer dos excipientes. Apenas a lactose possui faixa de fusão entre 209 e 223 °C, muito próxima à temperatura de fusão do anlodipino, o que pode não permitir que a entalpia seja corretamente calculada. Portanto na análise das misturas, qualquer alteração no pico de fusão do fármaco, seja no valor da temperatura de extrapolação do pico no início da fusão ( $T_{\text{onset}}$ ) ou de entalpia de fusão ( $\Delta H_f$ ), poderá ser atribuída a uma interação entre os componentes da mistura, o que pode, ou não, caracterizar uma incompatibilidade.

Considerando que a entalpia obtida pelas curvas DSC para as amostras binárias é relativa à massa total da amostra, e não apenas à massa do fármaco presente, o valor da entalpia relativa ao fármaco foi calculada de acordo com a Equação 20, onde:  $\Delta H'_f$  é a entalpia de fusão calculada;  $m_a$  é a massa de amostra e  $m_f$  é a massa de fármaco.

$$\Delta H'_f = \frac{\Delta H_f * m_a}{m_f} \quad (20)$$

Para o anlodipino, os valores para  $T_{\text{onset}}$  e  $\Delta H_f$  do fármaco nas misturas é são de 188 °C e 84,7 J.g<sup>-1</sup>, respectivamente, e para a olmesartana, os valores para  $T_{\text{onset}}$  e  $\Delta H_f$  são 172 °C e 108,2 J.g<sup>-1</sup>.

As curvas de DSC das misturas binárias de anlodipino e excipientes estão apresentadas na Figura 31 em comparação com a curva DSC do anlodipino puro. Os valores de  $T_{\text{onset}}$  e  $\Delta H_f$  do anlodipino e das misturas estão apresentados na Tabela 11 como média ± intervalo de confiança (IC) a partir das triplicatas de análise. Diferenças entre as amostras foram determinadas utilizando teste *t* de Student, com significância  $p < 0,05$ .

Apenas a mistura de anlodipino com amido pré-gelatinizado apresentou valor de  $\Delta H_f$  estatisticamente diferente do esperado, o que indica uma possível incompatibilidade farmacêutica. A mistura contendo anlodipino e celulose não apresentou diferença no valor de  $\Delta H_f$ , porém a  $T_{\text{onset}}$  aumentou em aproximadamente 55 °C, indicando que a celulose interagiu com o anlodipino de forma a dificultar a ocorrência do evento de fusão do fármaco, mas não necessariamente corresponde à incompatibilidade. A celulose apresentou esse mesmo efeito com o cloridrato de venlafaxina (BERNARDI et al., 2009). A mistura contendo anlodipino e lactose apresentou sobreposição dos picos de fusão, e por isso não foi possível avaliar a sua compatibilidade.

As misturas de anlodipino com croscarmelose sódica, estearato de magnésio, álcool polivinílico, dióxido de titânio, talco, PVP, lactose e PEG apresentaram valores de  $T_{\text{onset}}$  e  $\Delta H_f$  característicos sem alterações significativas, indicando que não ocorreu nenhuma interação.

Tabela 11 - Valores de entalpia e temperatura de fusão do anlodipino em comparação com as misturas binárias (média  $\pm$  intervalo de confiança)

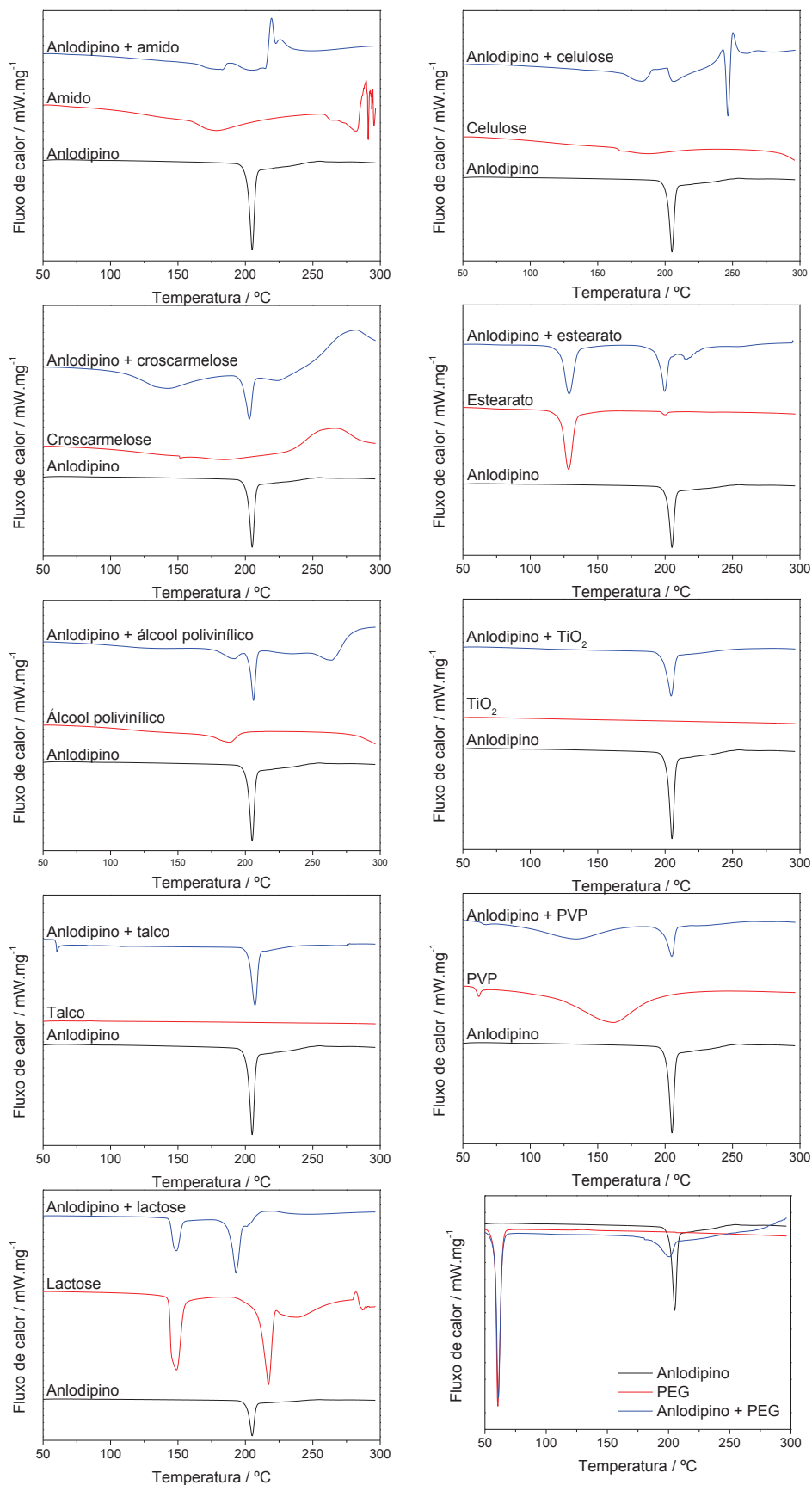
Amostra	$\Delta H_f$ (J.g <sup>-1</sup> )	T <sub>onset</sub> (°C)
Anlodipino (Anlo)	84,7 $\pm$ 6,1 (a)	188,0 $\pm$ 0,5 (a)
Anlo + amido	10,4 $\pm$ 5,3 (b)	188,6 $\pm$ 0,6 (a)
Anlo + celulose	83,2 $\pm$ 7,4 (a)	243,7 $\pm$ 0,5 (b)
Anlo + croscarmelose sódica	91,2 $\pm$ 9,1 (a)	187,9 $\pm$ 0,7 (a)
Anlo + estearato de magnésio	76,7 $\pm$ 8,5 (a)	189,2 $\pm$ 0,6 (a)
Anlo + álcool polivinílico	68,5 $\pm$ 10,1 (a)	189,5 $\pm$ 0,8 (a)
Anlo + TiO <sub>2</sub>	92,3 $\pm$ 9,3 (a)	189,7 $\pm$ 0,7 (a)
Anlo + talco	92,2 $\pm$ 8,7 (a)	190,1 $\pm$ 1,6 (a)
Anlo + PVP	73,1 $\pm$ 9,6 (a)	190,4 $\pm$ 2,9 (a)
Anlo + lactose	-	181,5 $\pm$ 5,6 (b)
Anlo + PEG	78,8 $\pm$ 11,6 (a)	194,1 $\pm$ 4,2 (a)

Fonte: Do autor.

Nota: Valores na mesma coluna, seguidos da mesma letra não apresentam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste *t*.



Figura 31 - Curvas DSC do anlodipino em comparação com as misturas binárias



Fonte: Do autor.

As curvas de DSC das misturas binárias de olmesartana e excipientes estão apresentadas na Figura 32 em comparação com a curva DSC do olmesartana puro. Os valores de  $T_{\text{onset}}$  e  $\Delta H_f$  do olmesartana e das misturas estão apresentados na Tabela 12 como média  $\pm$  intervalo de confiança (IC) a partir das triplicatas de análise. Diferenças entre as amostras foram determinadas utilizando teste  $t$  de Student, com significância  $p < 0,05$ .

Apenas as misturas contendo olmesartana e PVP, e olmesartana e lactose apresentaram valor de  $\Delta H_f$  estatisticamente diferente do esperado, o que indica uma possível incompatibilidade farmacêutica.

As misturas de olmesartana com amido pré-gelatinizado, celulose, croscarmelose sódica, estearato de magnésio, álcool polivinílico, dióxido de titânio, talco e PEG apresentaram valores de  $T_{\text{onset}}$  e  $\Delta H_f$  característicos sem alterações significativas, indicando que não ocorreu nenhuma interação.

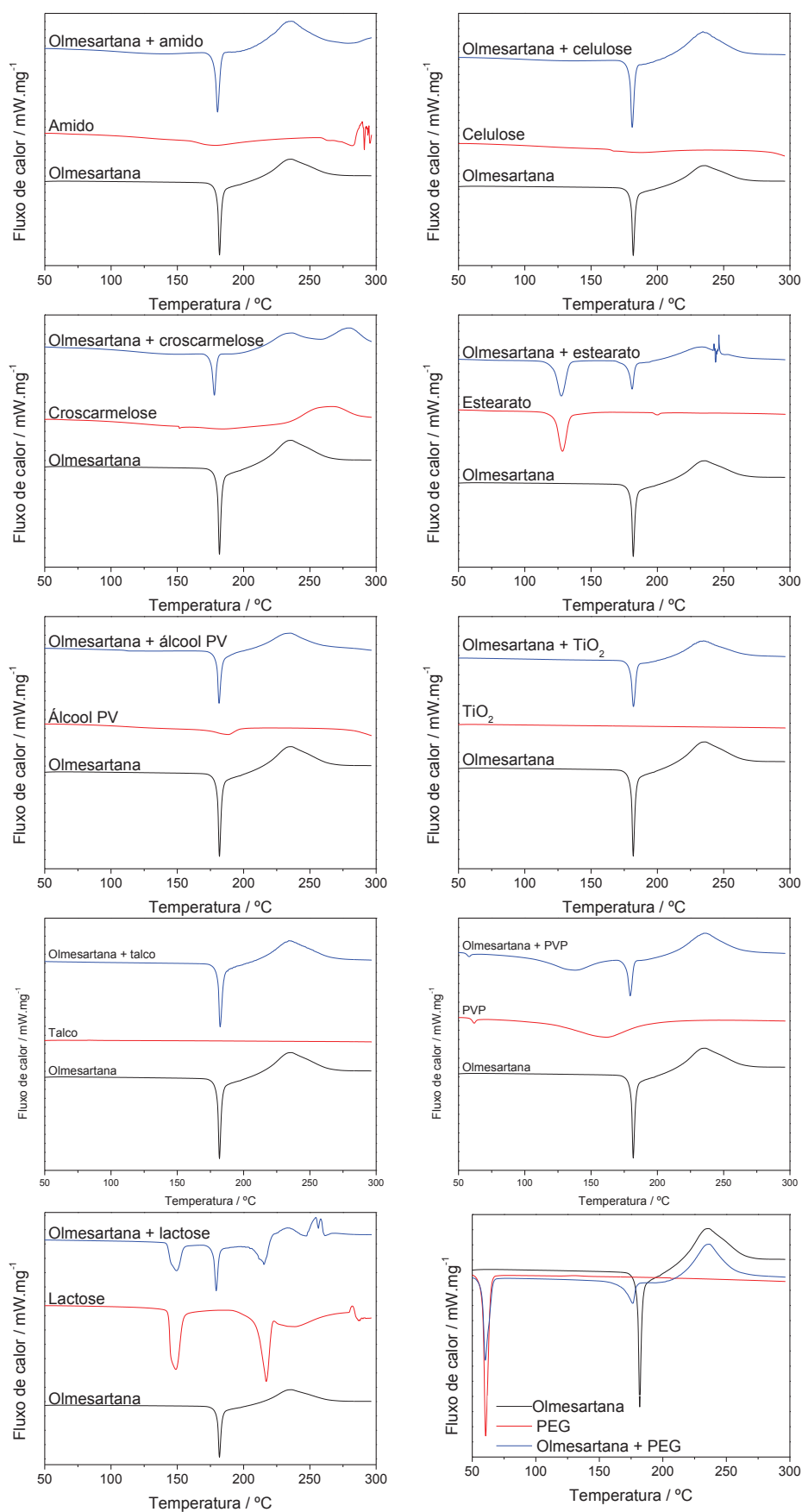
Tabela 12 - Valores de entalpia e temperatura de fusão do olmesartana em comparação com as misturas binárias (média  $\pm$  intervalo de confiança)

Amostra	$\Delta H_f$ (J.g <sup>-1</sup> )	$T_{\text{onset}}$ (°C)
Olmesartana (Olme)	108,2 $\pm$ 7,9 (a)	172,0 $\pm$ 2,6 (a)
Olme + amido	120,1 $\pm$ 13,5 (a)	173,1 $\pm$ 1,2 (a)
Olme + celulose	100,2 $\pm$ 9,2 (a)	176,4 $\pm$ 4,5 (a)
Olme + croscarmelose sódica	96,5 $\pm$ 6,9 (a)	169,2 $\pm$ 3,4 (a)
Olme + estearato de magnésio	122,4 $\pm$ 9,8 (a)	176,9 $\pm$ 3,9 (a)
Olme + álcool polivinílico	93,6 $\pm$ 10,2 (a)	177,6 $\pm$ 5,9 (a)
Olme + TiO <sub>2</sub>	90,9 $\pm$ 11,3 (a)	179,5 $\pm$ 3,7 (a)
Olme + talco	93,1 $\pm$ 8,7 (a)	175,1 $\pm$ 4,4 (a)
Olme + PVP	70,2 $\pm$ 2,6 (b)	176,6 $\pm$ 5,2 (a)
Olme + lactose	88,4 $\pm$ 9,3 (b)	177,1 $\pm$ 4,1 (a)
Olme + PEG	101,8 $\pm$ 9,1 (a)	167,9 $\pm$ 5,3 (b)

Fonte: Do autor.

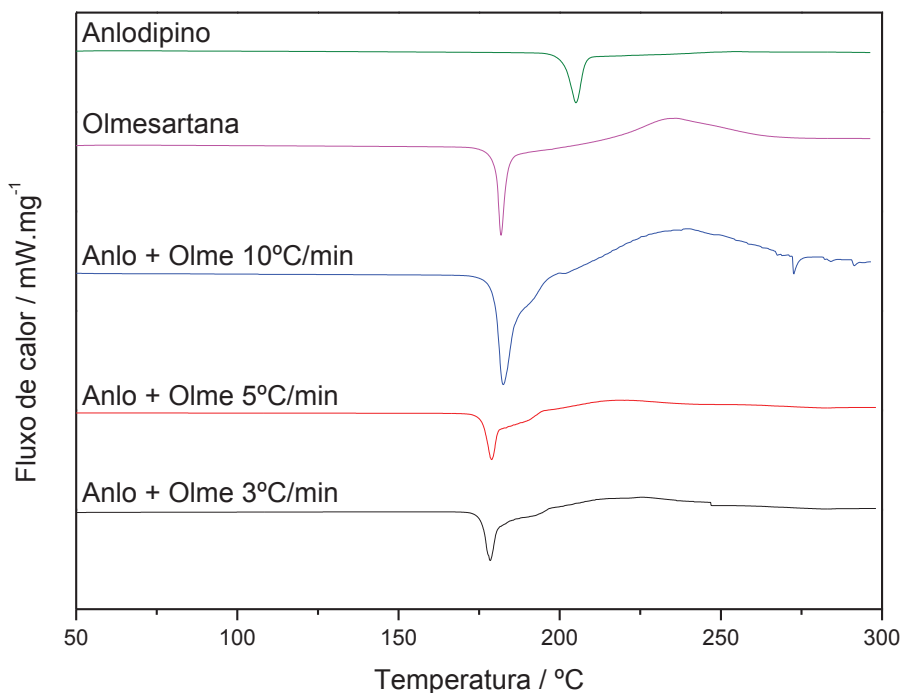
Nota: Valores na mesma coluna, seguidos da mesma letra não apresentam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste  $t$ .

Figura 32 - Curvas DSC do olmesartana em comparação com as misturas binárias



Fonte: Do autor.

Figura 33 - Curvas DSC do anlodipino puro, olmesartana pura, e da mistura de anlodipino e olmesartana 1:1 (m/m)



Fonte: Do autor.

O estudo de compatibilidade envolvendo a associação farmacêutica de anlodipino e olmesartana não pôde ser realizado por DSC, pois, como mostra a Figura 33, ocorre sobreposição dos picos de fusão, de modo que não é possível afirmar sobre a compatibilidade desses fármacos com base apenas em dados de TG e DSC. Foram avaliadas diferentes razões de aquecimento para tentar separar os picos de fusão, porém não houve sucesso.

#### 4.4.3 Conclusão Parcial

De acordo com os dados de DSC o besilato de anlodipino apresenta incompatibilidade com amido, e a olmesartana medoxomila apresenta incompatibilidade com PVP e lactose.

Não foi possível avaliar a compatibilidade entre anlodipino e lactose devido a sobreposição de picos.

Na curva DSC da mistura contendo anlodipino e olmesartana na proporção 1:1 (m/m) observa-se a sobreposição dos picos de fusão da olmesartana com o do anlodipino, o que torna a técnica inapropriada para o estudo de estabilidade e compatibilidade para esta associação farmacêutica.

#### 4.5 ESTUDO DE COMPATIBILIDADE FÁRMACO-EXCIPIENTE EMPREGANDO FTIR-ATR

Esta etapa teve como objetivo avaliar a compatibilidade dos fármacos besilato de anlodipino e olmesartana medoxomila, e da associação farmacêutica entre os fármacos citados, com excipientes utilizando a técnica FTIR-ATR com aquecimento.

##### 4.5.1 Materiais e métodos

As amostras analisadas foram os fármacos isolados – besilato de anlodipino e olmesartana medoxomila; os dez excipientes isolados, 60 (sessenta) misturas binárias fármaco-excipiente na proporção 1:1 (m/m) (trinta misturas contendo olmesartana e trinta misturas contendo anlodipino); 3 (três) mistura binária 1:1 (m/m) de olmesartana e anlodipino e 30 (trinta) misturas ternárias 1:1:1 (m/m/m) contendo olmesartana, anlodipino e excipiente. Para os estudos de compatibilidade foram utilizados os excipientes: amido pré-gelatinizado, celulose, croscarmelose sódica, estearato de magnésio, álcool polivinílico, dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>), talco, polivinilpirrolidona (PVP), lactose e polietilenoglicol (PEG), presentes na formulação comercial de referência. Cada amostra foi analisada em triplicata.

As misturas foram preparadas a partir da pesagem precisa de cada componente, utilizando balança analítica (Shimadzu AUW220D), as quais foram adicionadas em frascos de polietileno com tampa e homogeneizadas utilizando um agitador do tipo vortex por 5 minutos.

Os espectros FTIR-ATR foram obtidos em espectroscópio Nicolet iS50 FT-IR (Thermo Scientific) e acessório GladiATR (Pike Technologies), o qual possui um

diamante de reflexão e dispositivo de alta pressão. Os espectros foram coletados a cada 5 °C, de 30 a 300 °C, com razão de aquecimento de 2 °C.min<sup>-1</sup>. Foram realizadas 64 varreduras de 400 a 4000 cm<sup>-1</sup>, com resolução de 4 cm<sup>-1</sup>. As amostras foram analisadas em triplicata.

A análise dos dados foi conduzida utilizando o software MATLAB versão 7.1(MathWorks) com o pacote PLS\_toolbox version 5.8 (Eigenvector Co.) e MCR-ALS toolbox. O pré-processamento empregado foi primeira derivada.

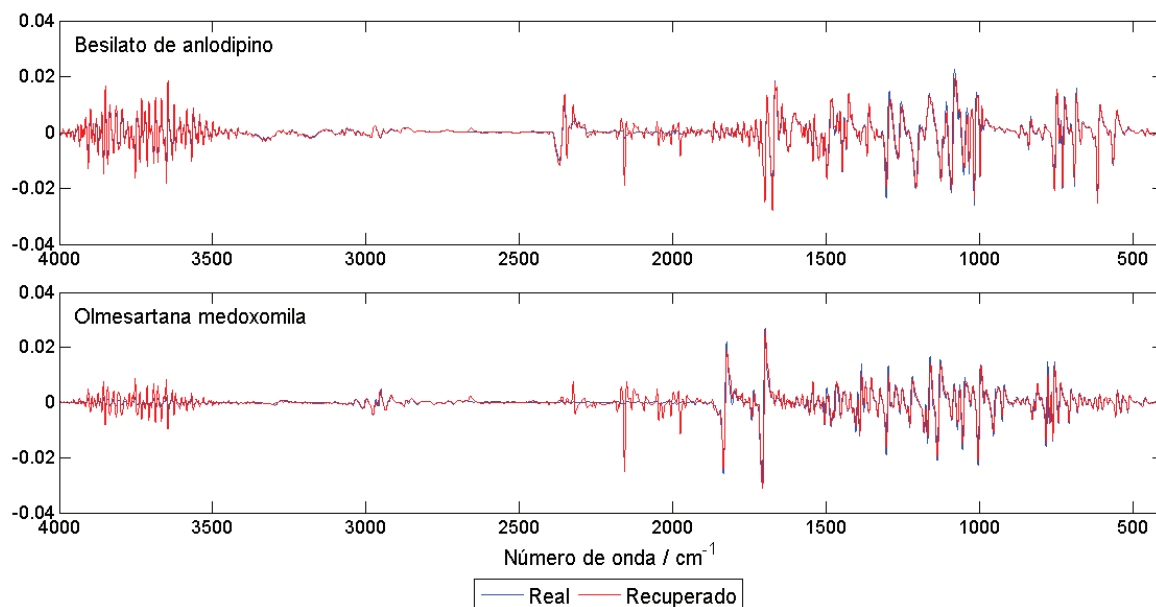
O modelo MCR-ALS teve como estimativas iniciais os espectros dos fármacos puros e de cada excipiente na temperatura inicial. As restrições para decomposição da matriz foram a não-negatividade das concentrações, impondo que o perfil das concentrações seja sempre positivo, e balanço de massa menor ou igual a 1, visto que ao longo do aquecimento pode ocorrer decomposição dos componentes monitorados de modo que a totalidade da concentração pode ser menor que 1. Foram utilizadas as médias das réplicas (n=3). Foi construído um modelo para cada excipiente estudado.

#### 4.5.2 Resultados e discussão

Ao obter os espectros de infravermelho de uma amostra em aquecimento simultâneo, é possível observar alterações nos dados obtidos referentes a transição de fase, processos de decomposição da amostra ou reação entre os componentes da amostra. As figuras 24 e 25 (item 4.3.2) mostram os espectros obtidos ao longo do aquecimento das amostras de anlodipino e besilato.

O MCR-ALS permite uma estimativa da concentração sem a necessidade de amostras de calibração. A decomposição dos modelos MCR-ALS foram satisfatórias, com 15,59% de LOF (Falta de ajuste - *Lack of Fit*) e R<sup>2</sup> (coeficiente de determinação entre os espectros puros e espectros recuperados) de 0,9897. Os perfis dos espectros puros e dos espectros recuperados por MCR-ALS dos fármacos são apresentados na Figura 34, e estão de acordo com entre si.

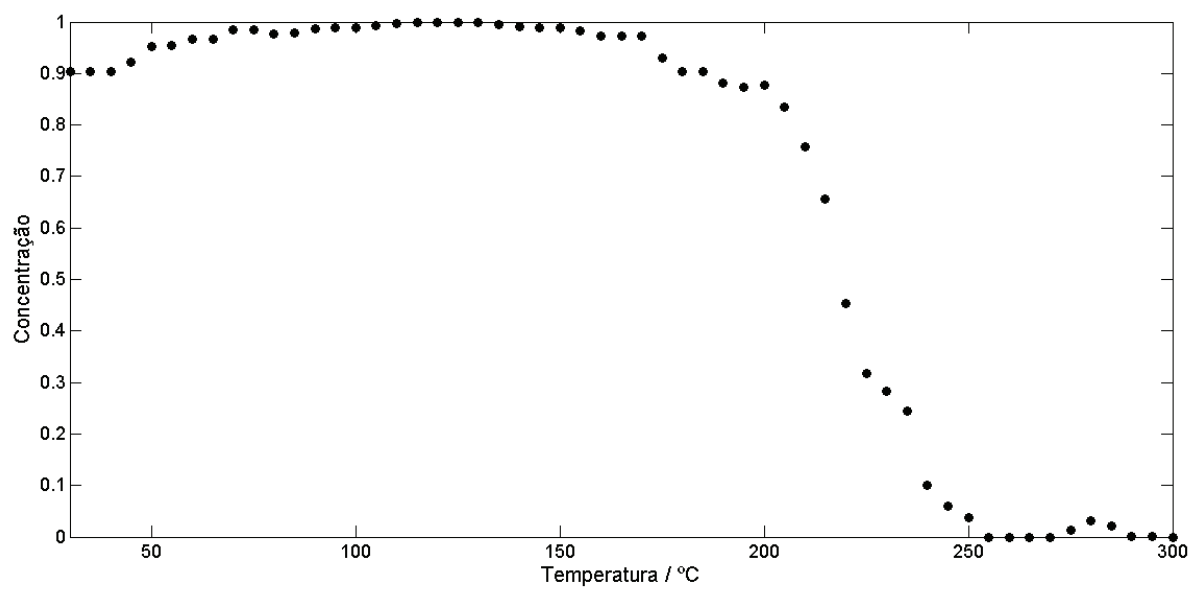
Figura 34 - Primeira derivada dos espectros puros e espectros recuperados pelo MCR-ALS do anlodipino e olmesartana



Fonte: Do autor.

De acordo com o gráfico da Figura 35, a quantidade de anlodipino sofre alteração a partir de 195 °C, indicando que a partir desta temperatura ocorre decomposição do anlodipino. Alterações bruscas na concentração de anlodipino em temperatura inferior a esta é indicativo de incompatibilidade. O anlodipino apresentou incompatibilidade com os excipientes: amido, croscarmelose, estearato de magnésio, álcool polivinílico, TiO<sub>2</sub>, PVP, lactose e PEG, como mostra a Figura 36.

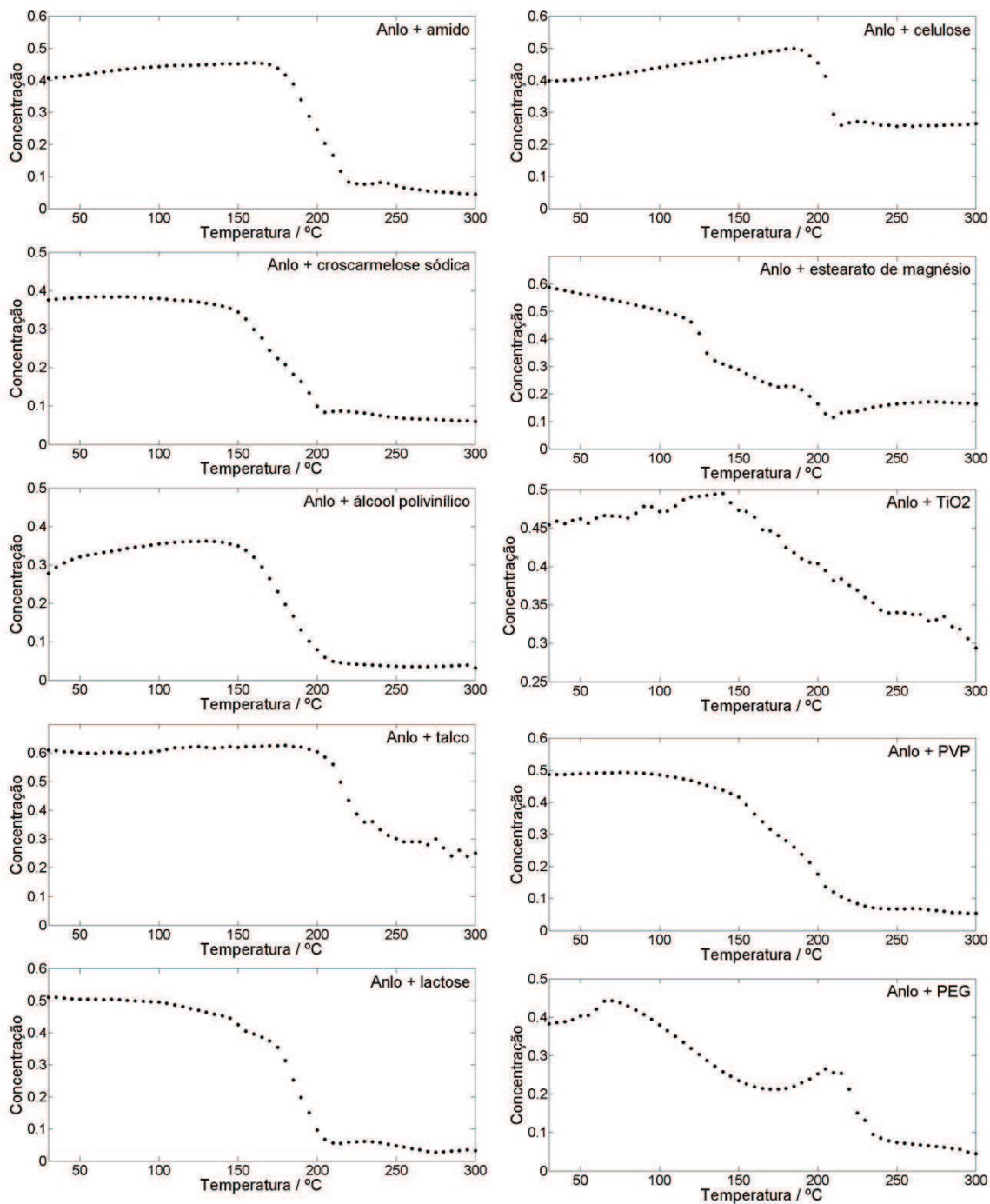
Figura 35 - Gráfico da variação da concentração em função da temperatura para o anlodipino



Fonte: Do autor.



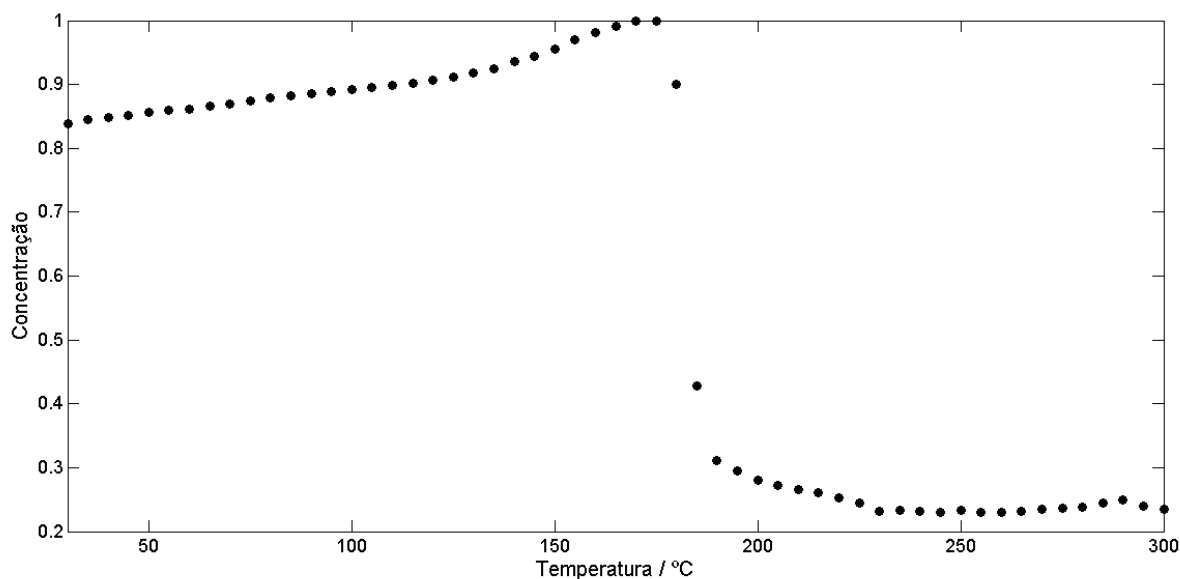
Figura 36 - Gráfico da variação da concentração em função da temperatura para misturas binárias contendo anlodipino



Fonte: Do autor.

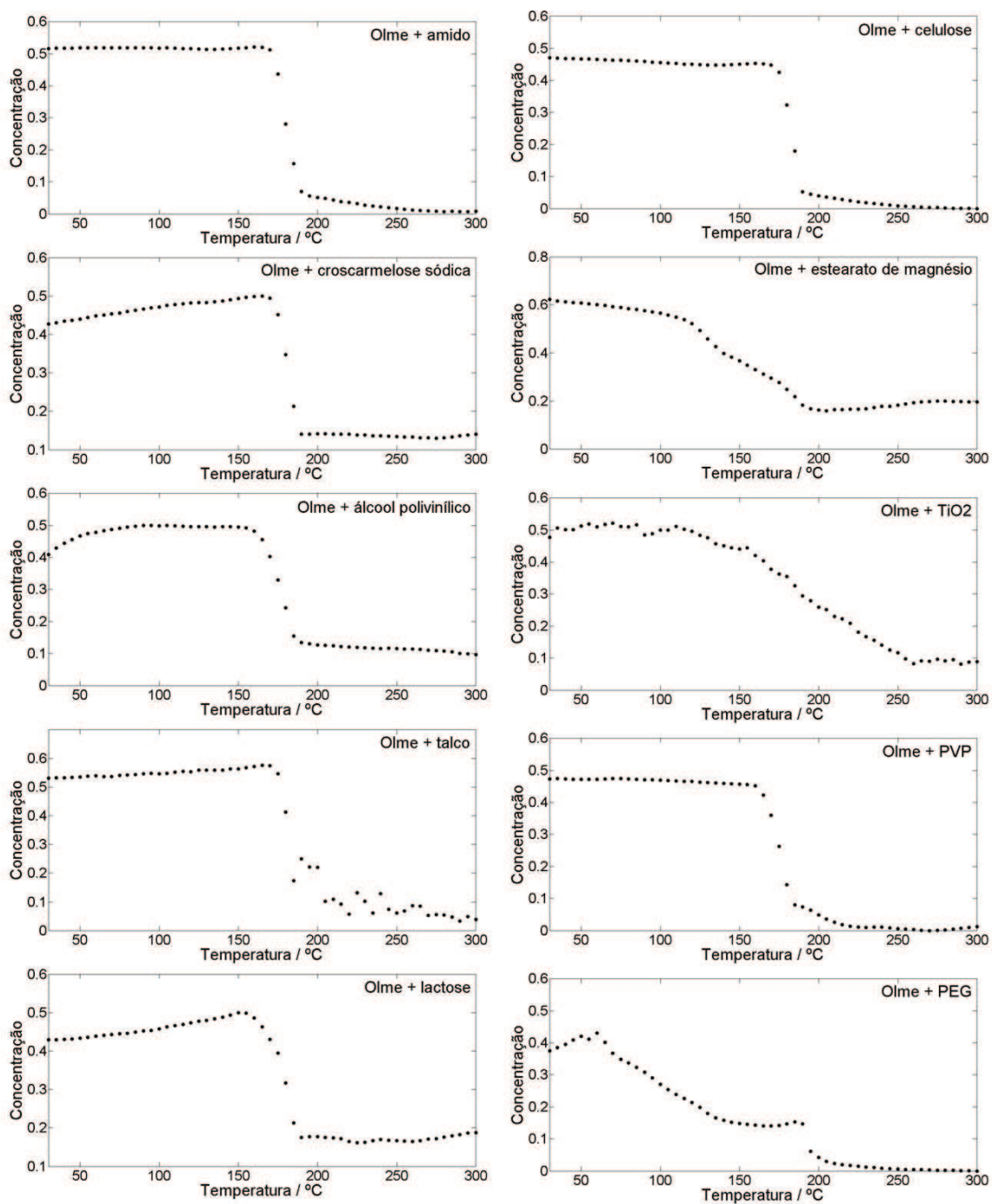
De acordo com o gráfico da Figura 37, a quantidade de olmesartana sofre alteração a partir de 180 °C, indicando que a partir desta temperatura ocorre decomposição do olmesartana. Alterações bruscas na concentração de olmesartana em temperatura inferior a esta é indicativo de incompatibilidade. O olmesartana apresentou incompatibilidade com os excipientes: estearato de magnésio, álcool polivinílico, TiO<sub>2</sub>, PVP lactose e PEG, como mostra a Figura 38.

Figura 37 - Gráfico da variação da concentração em função da temperatura para a olmesartana



Fonte: Do autor.

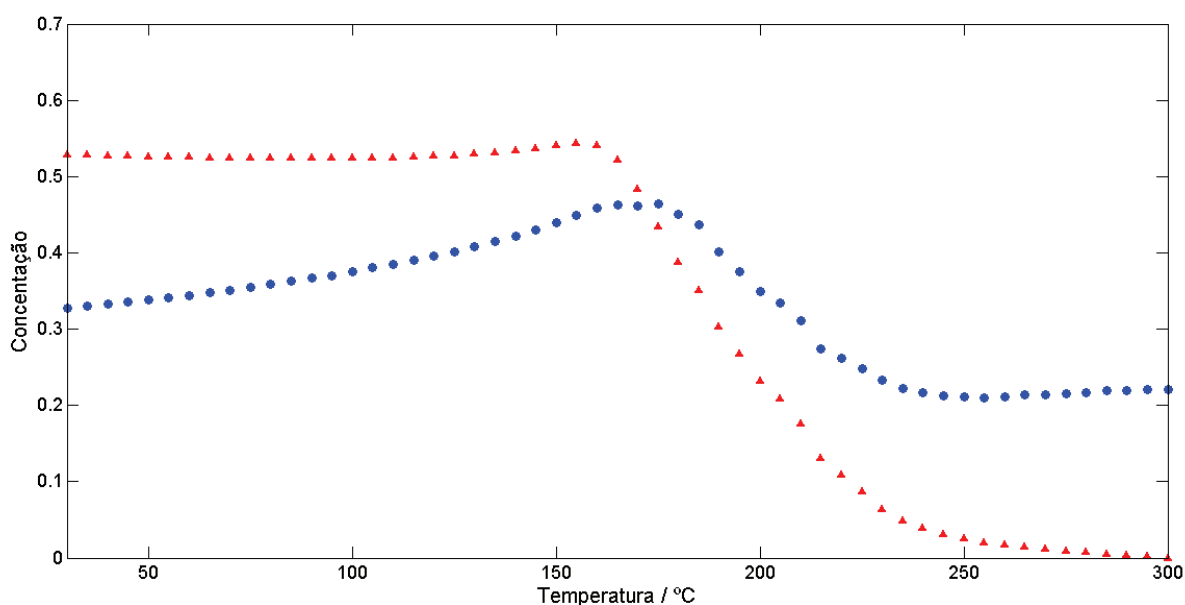
Figura 38 - Gráfico da variação da concentração em função da temperatura para misturas binárias contendo olmesartana



Fonte: Do autor.

Para a associação farmacêutica entre anlodipino e olmesartana, observa-se que a concentração de anlodipino sofre alteração a partir de 175 °C, e de olmesartana a partir de 160 °C, como mostra a Figura 39. Alterações bruscas na concentração de anlodipino e olmesartana em temperaturas inferiores a estas é indicativo de incompatibilidade. A associação farmacêutica apresentou incompatibilidade com os excipientes: amido, celulose, croscarmelose sódica, estearato de magnésio, álcool polivinílico, TiO<sub>2</sub>, PVP, lactose e PEG, como mostra a Figura 40.

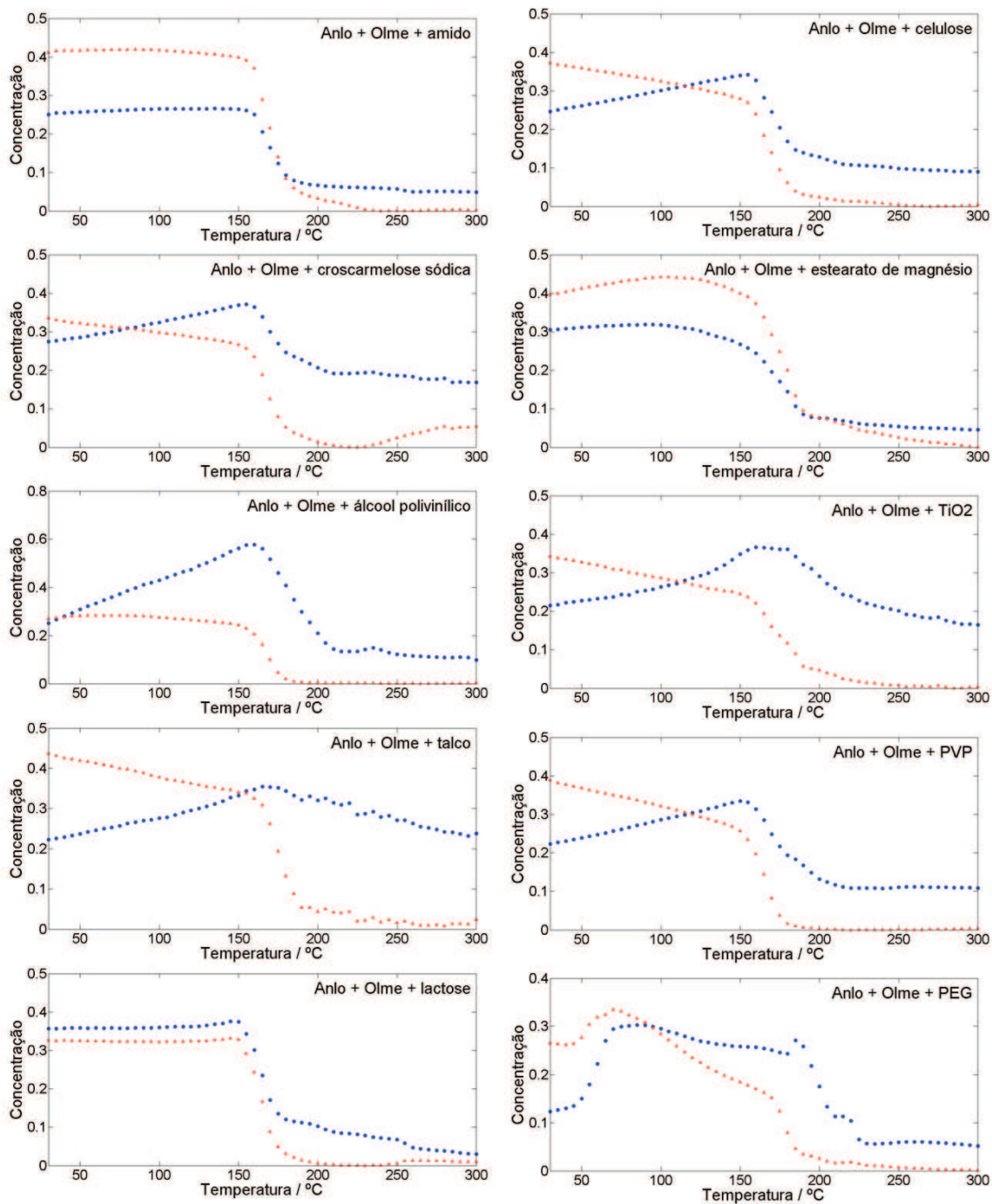
Figura 39 - Gráfico da variação da concentração em função da temperatura para a associação farmacêutica



Fonte: Do autor.

Legenda: (●) besilato de anlodipino;  
(▲) olmesartana medoxomila.

Figura 40 - Gráfico da variação da concentração em função da temperatura para misturas ternárias contendo a associação farmacêutica



Fonte: Do autor.

Legenda: (●) besilato de anlodipino;  
(▲) olmesartana medoxomila.

Um fator que pode ter influenciado neste estudo, e que diferencia os resultados obtidos por DSC e FTIR com aquecimento é a atmosfera em que o processo ocorre. As curvas DSC foram obtidas em atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub>, e os espectros de infravermelho foram obtidos sem um ambiente controlado, sofrendo influência do oxigênio e umidade do ar.

#### 4.5.3 Conclusão Parcial

De acordo com os dados de FTIR-ATR o besilato de anlodipino apresenta incompatibilidade com amido, croscarmelose, estearato de magnésio, álcool polivinílico, PVP, lactose e PEG, e a olmesartana medoxomila apresenta incompatibilidade com estearato de magnésio, álcool polivinílico, TiO<sub>2</sub>, PVP, lactose e PEG.

A associação farmacêutica entre anlodipino e olmesartana se mostrou compatível, possibilitando que estes fármacos estejam presentes concomitantemente em uma mesma formulação.

A associação farmacêutica entre anlodipino e olmesartana se mostrou compatível apenas com o talco.

#### 4.6 QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE ANLODIPINO E OLMESARTANA POR HPLC

Antes de avaliar a estabilidade e compatibilidade fármaco-excipiente utilizando HPLC, foi necessário realizar a validação da metodologia.

Para a análise do besilato de anlodipino, a Farmacopeia dos Estados Unidos – USP (The United States Pharmacopeial Convention), recomenda o uso de fase móvel formada por metanol, acetonitrila e solução tampão na proporção 35:15:50 (v/v/v), sendo a solução tampão de trietilamina e ácido fosfórico pH 3,0. E para análise da olmesartana medoxomila, a fase móvel é formada por solução tampão fosfato pH 3,4 e acetonitrila na proporção 33:77 (v/v) (USP, 2011).

Para a análise simultânea de anlodipino e olmesartana, ideal para este estudo, a literatura relata métodos de LC para determinação em plasma (QI et al., 2013; SHAH et al., 2012), urina (QI et al., 2013) e comprimidos (JAIN et al., 2012; PATIL et al., 2010; QUTAB et al., 2009).

#### 4.6.1 Materiais e métodos

Como estudo visa utilizar o detector CAD, que limita a fase móvel a ser utilizada, sendo que esta deve ser volátil e não conter sais, escolhemos a metodologia descrita por Qutab *et al.* (QUTAB et al., 2009), que utiliza tampão acetato de amônio (0,05 mol L<sup>-1</sup>, pH 6,8) e acetonitrila na proporção 40:60 (v/v). Porém, como a faixa de concentração a ser analisada não era a mesma e nos testes iniciais não houve resolução cromatográfica adequada, algumas alterações foram necessárias para melhor atender as necessidades da análise. As alterações estão listadas na Tabela 13.

Tabela 13 - Condições do método de HPLC alteradas

	QUTAB et al., 2009	Neste trabalho
Fluxo da fase móvel	1,0 mL.min <sup>-1</sup>	0,5 mL.min <sup>-1</sup>
Coluna	Tecknokroma C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	Eclipse KDB-C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) – Agilent®
Volume de injeção	20 µL	10 µL
Faixa de calibração - olmesartana	16-112 µg.mL <sup>-1</sup>	25-500 µg.mL <sup>-1</sup>
Faixa de calibração – anlodipino	4-28 µg.mL <sup>-1</sup>	15-250 µg.mL <sup>-1</sup>

Fonte: (QUTAB et al., 2009) e do autor.

As análises foram conduzidas no cromatógrafo líquido UHPLC modelo Ultimate 3000 (Thermo Scientific), utilizando a coluna cromatográfica Eclipse XDB-C18 (Agilent), 4,6 x 250 mm, 5 µm de partícula a 25 °C.

A metodologia para determinação simultânea de anlodipino e olmesartana por HPLC foi validada, tendo sido avaliadas a faixa linear, linearidade, limites de detecção e quantificação, exatidão, precisão e robustez.

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, dentro de uma faixa de aplicação. Para conhecer a faixa linear foram preparadas várias soluções contendo concentrações conhecidas de anlodipino e olmesartana, e foram realizadas as corridas cromatográficas de cada uma destas soluções, em triplicata. Em seguida foram plotados gráficos da área do pico versus a concentração, e observou-se a região que apresentou resposta linear (RIBANI et al., 2004; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

Conhecendo a região linear foi calculada a equação da curva e o coeficiente de correlação, o qual fornece uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais.

O limite de detecção (LD) é a menor concentração que pode ser detectada, porém não quantificada, e o limite de quantificação (LQ) é a menor concentração capaz de ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis. Para determinar o LD e LQ foram realizadas comparações entre medições de amostras em baixas concentrações conhecidas dos analitos e do branco (RIBANI et al., 2004).

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados encontrados e os valores de referência aceitos como verdadeiros. Para avaliar a exatidão foi utilizado o método de adição e recuperação. Três amostras foram analisadas antes e após sofrerem adição de padrão em concentração conhecida, e os resultados obtidos comparados com as quantidades adicionadas.

A precisão indica a capacidade da metodologia fornecer resultados reprodutíveis. Para avaliar a precisão foram feitas cinco corridas de uma mesma solução, para avaliar a repetibilidade (precisão intra-corrída) do método, e soluções de mesma concentração foram preparadas e analisadas em dias diferentes para avaliar a precisão intermediária (precisão inter-corrída).

A robustez mede a sensibilidade de um método frente a pequenas variações, como alterações na composição da fase móvel, temperatura da coluna e variações no fluxo da fase móvel. Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros (RIBANI et al., 2004). Estas condições também podem resultar em alterações nos tempos de retenção dos



analitos, e por isso merecem atenção. Neste trabalho foram realizadas alterações na proporção de solução tampão e acetonitrila da fase móvel, variando a porcentagem de acetonitrila em  $60\pm 2\%$ ; a temperatura da coluna oscilou em  $25\pm 5\text{ }^\circ\text{C}$ ; e o fluxo da fase móvel em  $0,5\pm 0,1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

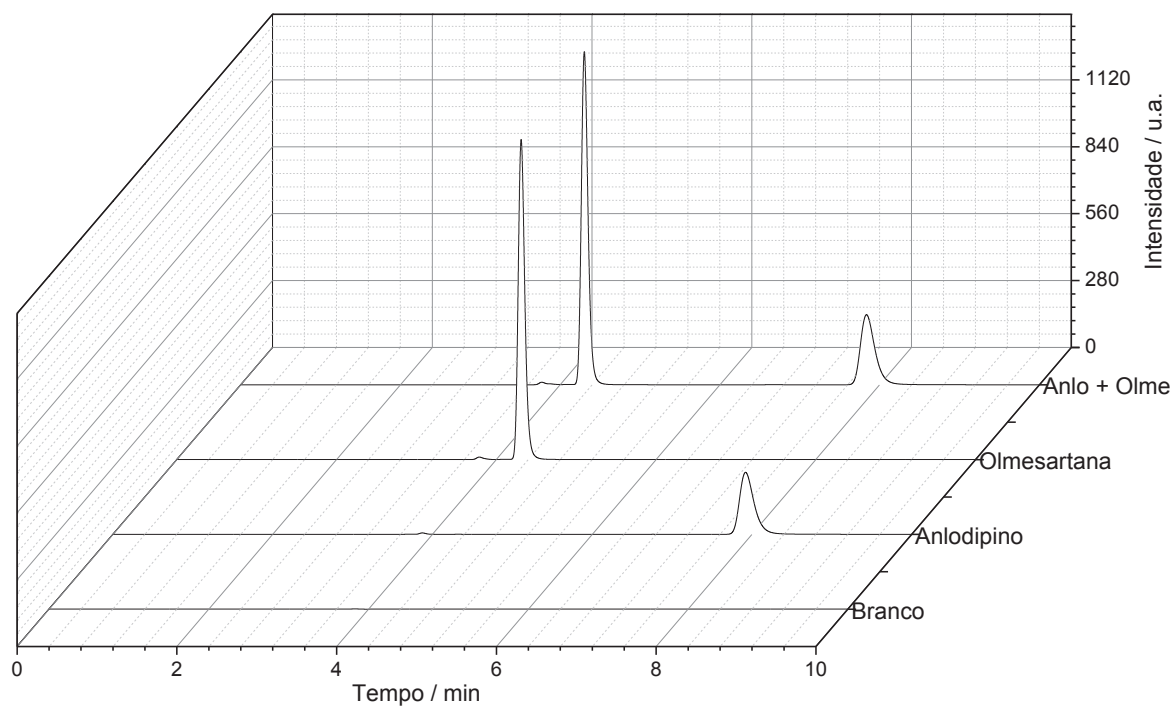
Foram utilizadas soluções estoque de anlodipino ( $400\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e de olmesartana ( $1000\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), preparadas utilizando como diluente solução tampão acetato de amônio ( $0,05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 6,8) e acetonitrila na proporção 40:60 (v/v).

As soluções estoque foram preparadas a partir de padrão de referência de besilato de anlodipino (Sigma-Aldrich) e de olmesartana medoxomila (Sigma-Aldrich).

#### **4.6.2 Resultados e discussão**

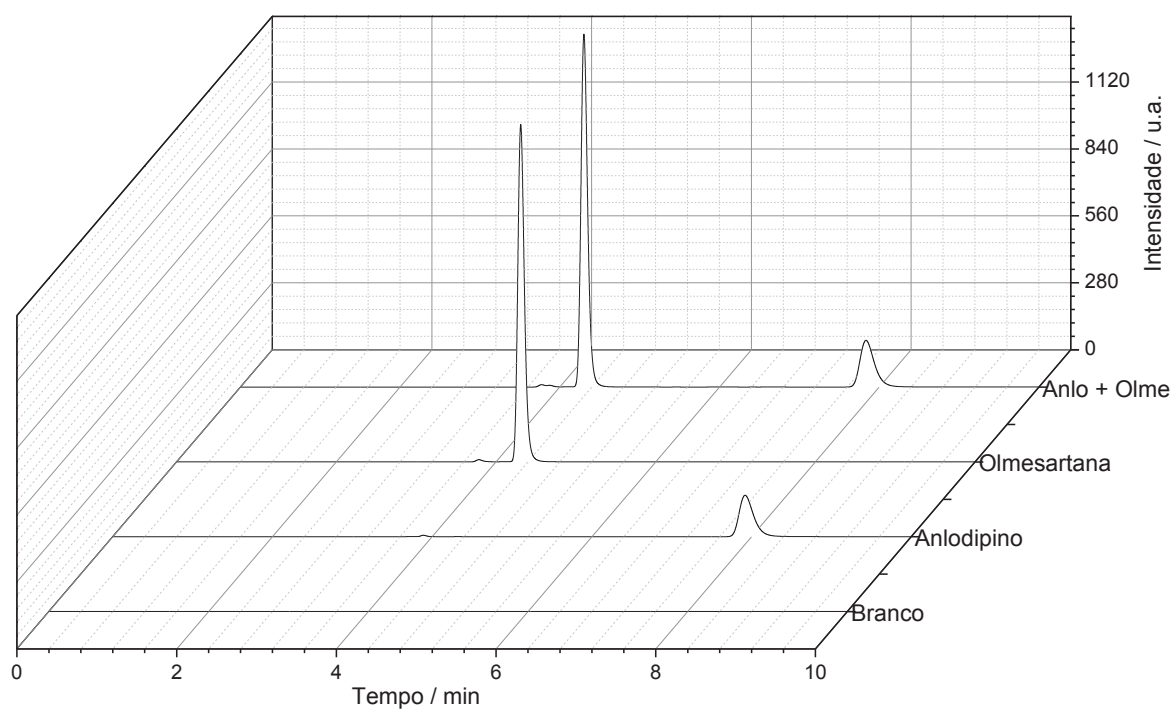
Primeiramente foi avaliado o perfil cromatográfico, a fim de conhecer os tempos de retenção para cada fármaco. Foram utilizados os detectores UV e CAD. No detector UV os comprimentos de onda selecionados foram de 239 nm e 250 nm. Conforme pode-se observar nas Figuras 41, 42 e 43, a olmesartana possui tempo de retenção de 4,336 min e o anlodipino de 7,854 min, e quando analisamos a mistura não há alteração significativa nos tempos de retenção de nenhum dos fármacos. O fator de assimetria dos picos para ambos os analitos foi satisfatório, obtendo valores de 1,28 e 1,27, para anlodipino e olmesartana, respectivamente, com pouca ou nenhuma influência de cauda nos picos cromatográficos (DA SILVA et al., 2010). O recomendado é que o valor do fator de assimetria seja inferior a 2 (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Figura 41 - Cromatogramas da olmesartana, anlodipino e da mistura de olmesartana e anlodipino no comprimento de onda 239 nm



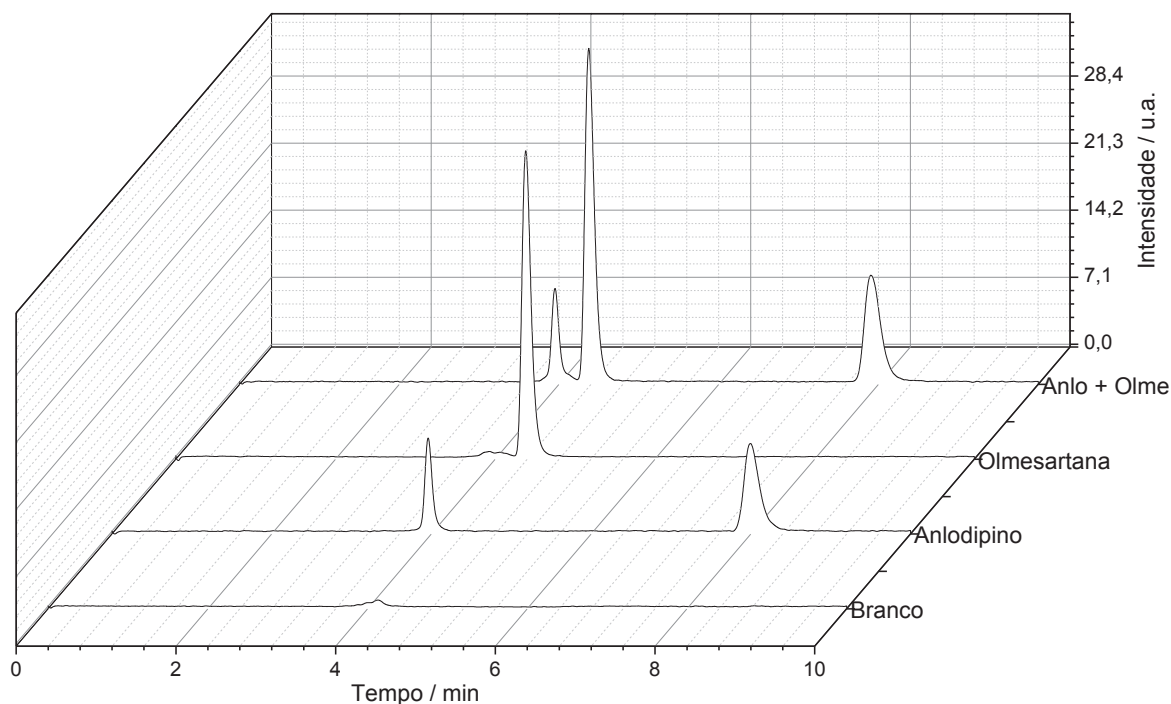
Fonte: Do autor.

Figura 42 - Cromatogramas da olmesartana, anlodipino e da mistura de olmesartana e anlosipino no comprimento de onda 250 nm



Fonte: Do autor.

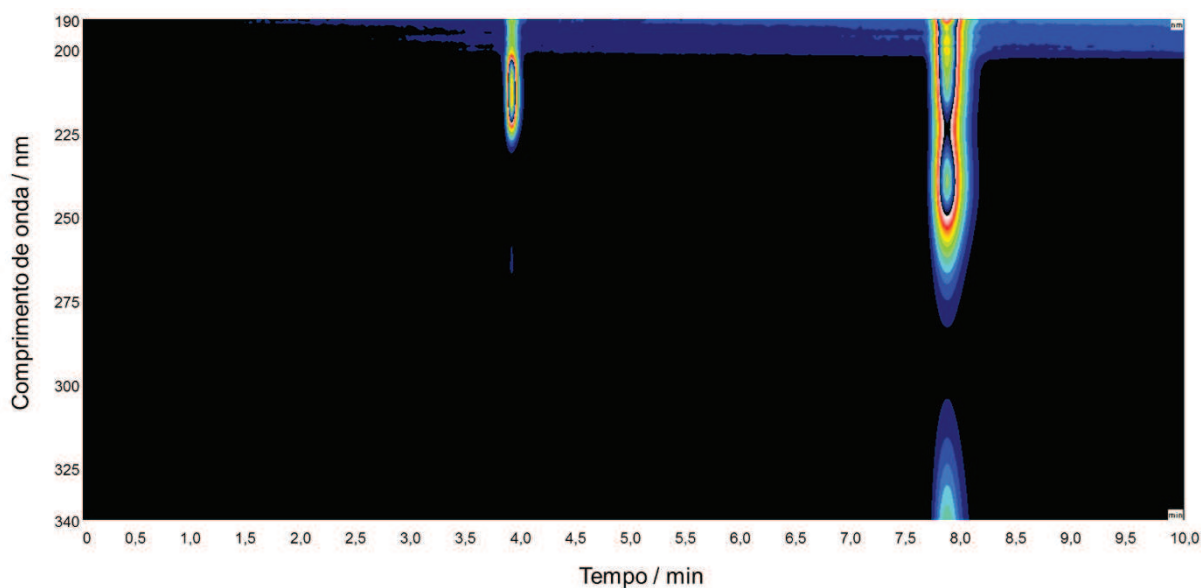
Figura 43 - Cromatogramas da olmesartana, anlodipino e da mistura de olmesartana e anlosipino utilizando detector CAD



Fonte: Do autor.

O cromatograma da olmesartana, obtido por meio do detector CAD, apresenta apenas um pico no tempo de 4,408 min. O cromatograma do anlodipino possui dois picos, o primeiro em 3,987 min e o segundo em 7,926 min. O primeiro pico é referente ao besilato, que não está presente nos cromatogramas registrados nos comprimentos de onda de 239 e 250 nm, mas pode ser observado em outros comprimentos de onda (FIGURA 44), o segundo pico é referente ao anlodipino. A pequena alteração nos tempos de retenção observada (0,072 min de atraso em relação ao detector UV) ocorre devido a distância adicional que o fluxo precisa percorrer para chegar até este detector.

Figura 44 - Varredura espectral do cromatograma do besilato de anlodipino



Fonte: Do autor.

Foi possível observar que o método possui maior sensibilidade para a olmesartana em 250 nm, e para o anlodipino em 239 nm, comprimentos de onda nos quais cada um apresentou maiores áreas de pico, como mostra a Tabela 14. A integração dos picos foi realizada utilizando o software Chromeleon 6.8.

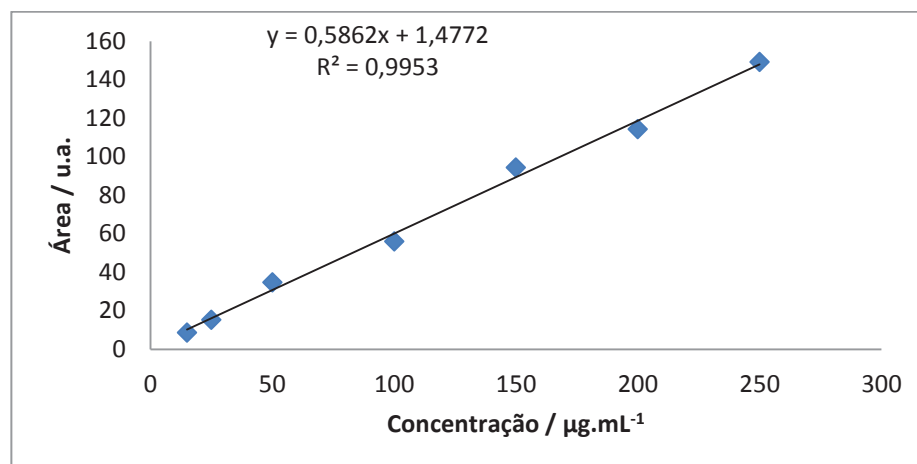
Tabela 14 - Áreas referentes aos picos de anlodipino e olmesartana nos comprimentos de onda 329 nm e 250 nm

	Áreas	
	239 nm	250 nm
Anlodipino (200 µg.mL <sup>-1</sup> )	257,16	76,30
Olmesartana (400 µg.mL <sup>-1</sup> )	114,41	270,00

Fonte: Do autor.

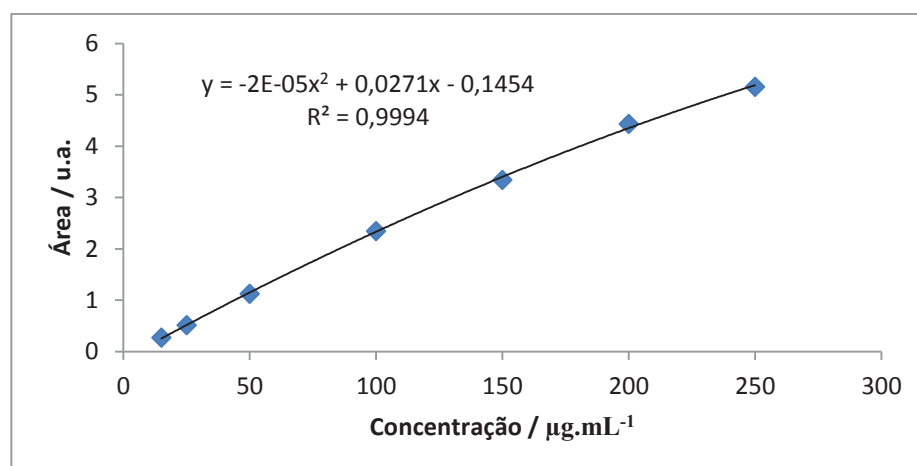
As curvas de calibração com sete pontos foram construídas para o anlodipino, no comprimento de onda de 239 nm e CAD, conforme as Figuras 45 e 46, a partir da análise, em triplicata, de soluções nas concentrações de 15,0; 25,0; 50,0; 100,0; 150,0; 200,0 e 250,0 µg.mL<sup>-1</sup>. No comprimento de onda de 239 nm, o método foi linear dentro da faixa de trabalho, com um valor de  $R^2 = 0,9953$ . Já para o resultado obtido pelo detector CAD a curva foi polinomial de ordem 2, com valor de  $R^2 = 0,9994$ .

Figura 45 - Curva de calibração para anlodipino no comprimento de onda de 239 nm



Fonte: Do autor.

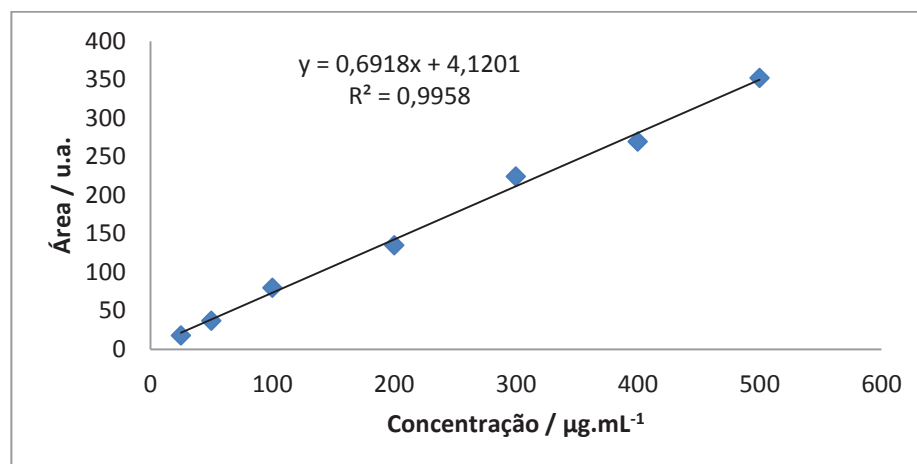
Figura 46 - Curva de calibração para anlodipino utilizando detector CAD



Fonte: Do autor.

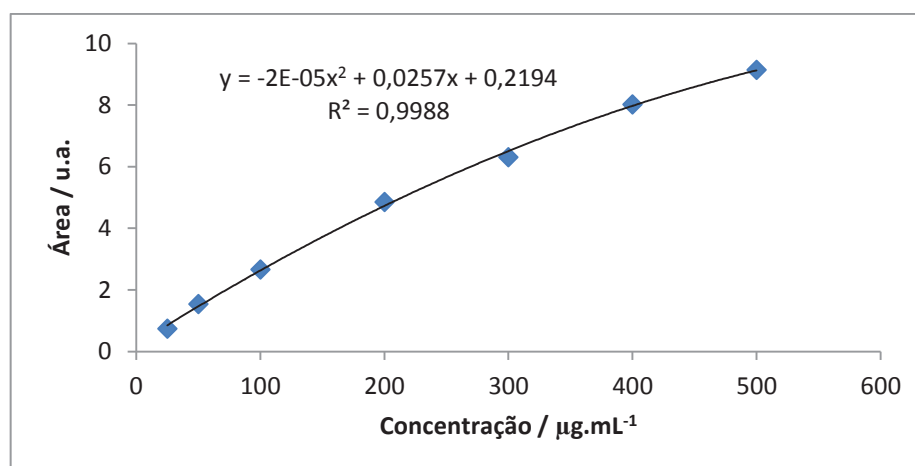
As curvas de calibração com sete pontos foram construídas para a olmesartana, no comprimento de onda de 250 nm e CAD, conforme as Figuras 47 e 48, a partir da análise, em triplicata, de soluções nas concentrações de 25,0; 50,0; 100,0; 200,0; 300,0; 400,0 e 500,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . No comprimento de onda de 250 nm, o método foi linear dentro da faixa de trabalho, com um valor de  $R^2 = 0,9958$ . Para o resultado obtido pelo detector CAD a curva foi polinomial de ordem 2, com valor de  $R^2 = 0,9988$ .

Figura 47 - Curva de calibração para olmesartana no comprimento de onda de 250 nm



Fonte: Do autor.

Figura 48 - Curva de calibração para olmesartana utilizando detector CAD



Fonte: Do autor.

A princípio curvas de calibração polinomiais não são comuns, sendo para a maioria dos métodos analíticos o ajuste linear o mais adequado. Porém uma das características do detector CAD é fornecer curvas parabólicas e, quando em intervalos de concentração muito baixas, pode se aproximar ao ajuste linear (ALMELING; ILKO; HOLZGRABE, 2012; VEHOVEC; OBREZA, 2010).

Os limites de detecção e quantificação foram determinados por UV e CAD. Para o anlodipino o LD é de  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , e o LQ é igual a  $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , por UV; e  $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente, utilizando detector CAD. O LD e LQ para a olmesartana são, respectivamente,  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , por UV; e  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente, utilizando detector CAD.

A exatidão foi avaliada utilizando o método de adição e recuperação. A Tabela 15 apresenta os resultados obtidos a partir do procedimento de adição e recuperação de anlodipino. Estes resultados foram obtidos pelo detector UV em 239 nm e detector CAD.

Tabela 15 - Resultados do teste de exatidão para anlodipino

Amostra	Concentração de anlodipino adicionado ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Concentração de anlodipino encontrado ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Recuperação (%)
1	0	22,80 $\pm$ 0,03	---
	20	41,90 $\pm$ 0,08	95,46
2	0	37,80 $\pm$ 0,04	---
	40	78,55 $\pm$ 0,06	101,85
3	0	44,36 $\pm$ 0,03	---
	80	124,61 $\pm$ 0,02	100,31

Fonte: Do autor.

A Tabela 16 apresenta os resultados obtidos a partir do procedimento de adição e recuperação da olmesartana. Estes resultados foram obtidos pelo detector UV em 250 nm e detector CAD.

Tabela 16 - Resultados do teste de exatidão para a olmesartana

Amostra	Concentração de olmesartana adicionado ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Concentração de olmesartana encontrado ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Recuperação (%)
1	0	123,69 $\pm$ 0,08	---
	50	173,36 $\pm$ 0,09	99,34
2	0	222,13 $\pm$ 0,08	---
	100	322,79 $\pm$ 0,07	100,66
3	0	287,08 $\pm$ 0,05	---
	150	433,96 $\pm$ 0,06	97,92

Fonte: Do autor.

A repetibilidade (precisão intra-corrída) do método foi avaliada a partir da repetição de análise de uma mesma amostra. As leituras apresentaram coeficiente de variação de 0,54% para a anlodipino e 0,48% para o olmesartana.

A precisão intermediária (precisão inter-corrída) foi avaliada através da análise de soluções padrão em dias diferentes. Porém devido à instabilidade do fármaco em solução, as soluções precisaram ser preparadas no momento da análise, o que pode ter aumentado a variação nas respostas. O coeficiente de variação para o anlodipino foi de 0,96%, e para a olmesartana de 0,89%.

Os resultados da avaliação da robustez estão apresentados na Tabela 17. Inicialmente fez-se a alteração da fase móvel, aumentando a proporção de acetonitrila para 62%, não houve alteração nos tempos de retenção do anlodipino e da olmesartana, porém as concentrações variaram em 6,44% e 3,72%, respectivamente. Ao alterar a proporção de acetonitrila para 58%, novamente não houve alteração nos tempos de retenção dos fármacos, porém as concentrações encontradas variaram em 5,96% para o anlodipino e 3,07% para olmesartana.

Quando foram feitas alterações na temperatura da coluna, também não foi observada alterações nos tempos de retenção dos fármacos. Apenas as concentrações encontradas que sofreram variações de 3,04% e 6,90%, para anlodipino e olmesartana, respectivamente, quando a temperatura da coluna foi ajustada para 20 °C; e de 6,52% e 5,32%, quando a temperatura da coluna foi ajustada para 30 °C.

Quando o fluxo da fase móvel variou em  $0,5 \pm 0,1$  mL.min<sup>-1</sup>, houve apenas pequenas variações nos tempos de retenção, o que já era esperado. As variações nas concentrações encontradas foram inferiores a 2% tanto para anlodipino, como para a olmesartana.



Tabela 17 - Resultados da avaliação da robustez

Condição	Anlodipino		Olmesartana	
	Tempo de retenção (min)	Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Tempo de retenção (min)	Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
Original	7,854	176,4 $\pm$ 0,1	4,336	300,3 $\pm$ 0,1
Acetonitrila 62%	7,556	164,7 $\pm$ 0,1	4,327	288,8 $\pm$ 0,1
Acetonitrila 58%	7,921	165,5 $\pm$ 0,1	4,406	309,2 $\pm$ 0,1
Temperatura da coluna 30 °C	7,601	187,4 $\pm$ 0,1	4,391	284,6 $\pm$ 0,1
Temperatura da coluna 20 °C	8,095	181,3 $\pm$ 0,1	4,395	280,1 $\pm$ 0,1
Fluxo 0,4 mL.min <sup>-1</sup>	8,291	172,5 $\pm$ 0,1	4,512	295,9 $\pm$ 0,1
Fluxo 0,6 mL.min <sup>-1</sup>	7,125	173,1 $\pm$ 0,1	4,154	298,2 $\pm$ 0,1

Fonte: Do autor.

#### 4.6.3 Conclusão Parcial

A metodologia foi devidamente validada, possibilitando a quantificação simultânea de anlodipino e olmesartana com precisão e exatidão.

O detector CAD é uma ferramenta poderosa e relativamente recente e possui poucas metodologias validadas com o seu uso. Em vista da não necessidade de utilização de um padrão analítico torna-se uma técnica atrativa e com potencialidade para complementar o detector UV atualmente empregado nas indústrias.

#### 4.7 ESTUDO DE ESTABILIDADE E COMPATIBILIDADE UTILIZANDO HPLC

Esta etapa teve como objetivo avaliar a compatibilidade dos fármacos besilato de anlodipino e olmesartana medoxomila, e da associação farmacêutica entre os fármacos citados, com excipientes utilizando a técnica HPLC, pela metodologia

validada no item 4.6, através do doseamento dos fármacos antes e após a incubação das amostras nas condições determinadas pelo ICH para esse tipo de estudo.

#### 4.7.1 Materiais e métodos

As amostras analisadas foram os fármacos isolados – besilato de anlodipino e olmesartana medoxomila; os dez excipientes isolados, 20 (vinte) misturas binárias fármaco-excipiente na proporção 1:1 (m/m) (dez misturas contendo olmesartana e dez misturas contendo anlodipino); 1 (uma) mistura binária 4:1 (m/m) de olmesartana e anlodipino e 10 (dez) misturas ternárias 4:1:5 (m/m/m) contendo olmesartana, anlodipino e excipiente. Para os estudos de compatibilidade foram utilizados os excipientes: amido pré-gelatinizado, celulose, croscarmelose sódica, estearato de magnésio, álcool polivinílico, dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>), talco, polivinilpirrolidona (PVP), lactose e polietilenoglicol (PEG), presentes na formulação comercial de referência. No total foram preparadas 10 (dez) amostras de cada mistura, e foram divididas em 5 (cinco) grupos: tempo inicial, tempo 3 meses seco, tempo 3 meses úmido, tempo 6 meses seco e tempo 6 meses úmido.

As misturas foram preparadas a partir da pesagem precisa de cada componente, utilizando balança analítica (Shimadzu AUW220D), as quais foram adicionadas em frascos de polietileno com tampa e homogeneizadas utilizando um agitador do tipo vortex por 5 minutos.

As amostras de tempo inicial foram analisadas por HPLC imediatamente após o seu preparo. As demais amostras foram incubadas em câmara de estabilidade para avaliar a influência da temperatura e da umidade na estabilidade química dos fármacos e das misturas durante os períodos de tempo de 3 e 6 meses. As amostras foram mantidas em frascos abertos sob umidade relativa de 75%±5% e temperatura de 40°C±1°C, e fechados em ambiente livre de umidade a temperatura de 40°C±1°C, conforme as recomendações do ICH (ICH, 1999).

A metodologia utilizada para análise simultânea de anlodipino e olmesartana por HPLC está descrita no item 4.6.

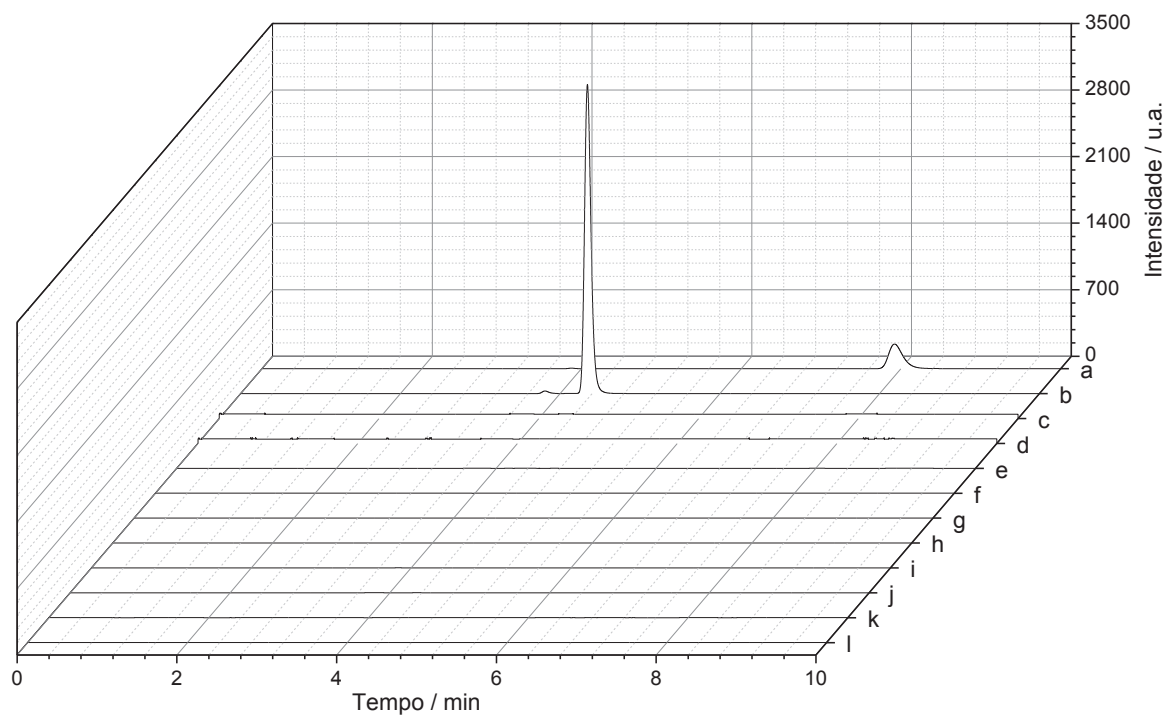
## 4.7.2 Resultados e discussão

A seguir estão apresentados os resultados das análises realizadas e a discussão dos mesmos.

### 4.7.2.1 Análise das amostras em tempo inicial

Inicialmente foram realizadas as análises de todos os excipientes puros, a fim de verificar se eles apresentam picos com os mesmos tempos de retenção da olmesartana e do anlodipino. Como pode-se observar nas Figuras 49 e 50, nenhum dos excipientes utilizados neste estudo apresentam picos, e isso pode ser observado tanto no detector UV, como no CAD, o que torna a metodologia por HPLC adequada para avaliar a compatibilidade da olmesartana e do anlodipino com cada excipiente.

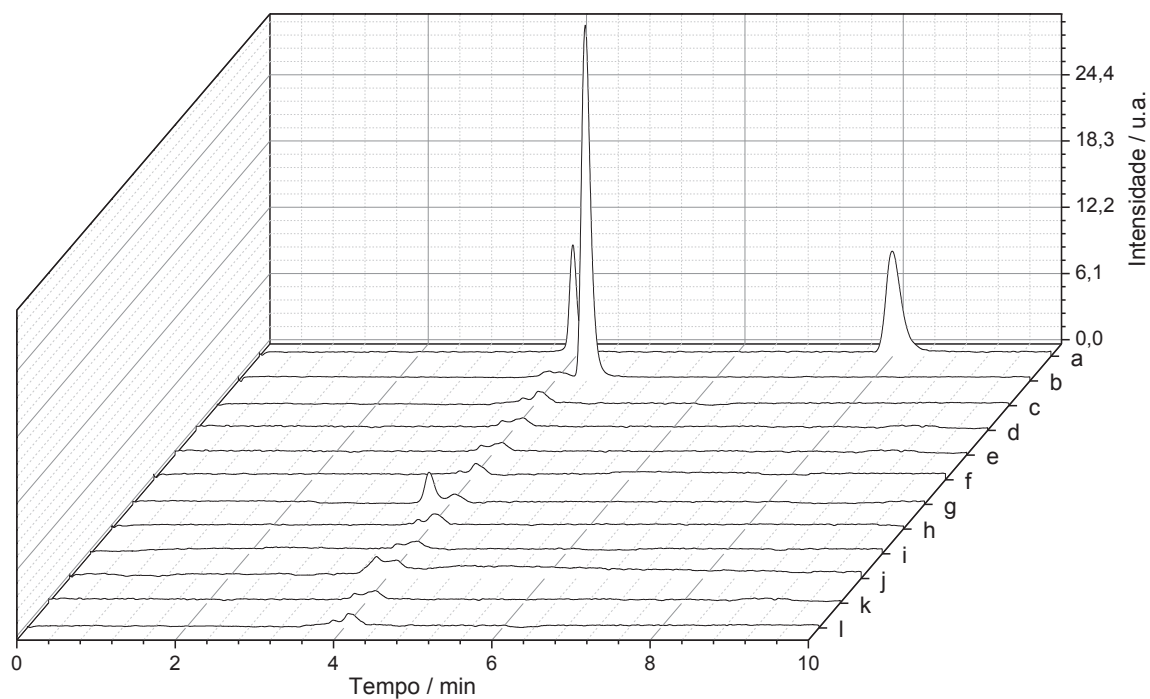
Figura 49 - Cromatogramas por UV em 239 nm no tempo inicial do anlodipino, olmesartana e de todos os excipientes puros



Fonte: Do autor.

Legenda: (a) anlodipino;  
(b) olmesartana;  
(c) amido pré-gelatinizado;  
(d) celulose;  
(e) croscarmelose sódica;  
(f) estearato de magnésio;  
(g) álcool polivinílico;  
(h)  $\text{TiO}_2$ ;  
(i) talco;  
(j) PVP;  
(k) lactose;  
(l) PEG.

Figura 50 - Cromatogramas por CAD no tempo inicial do anlodipino, olmesartana e de todos os excipientes puros

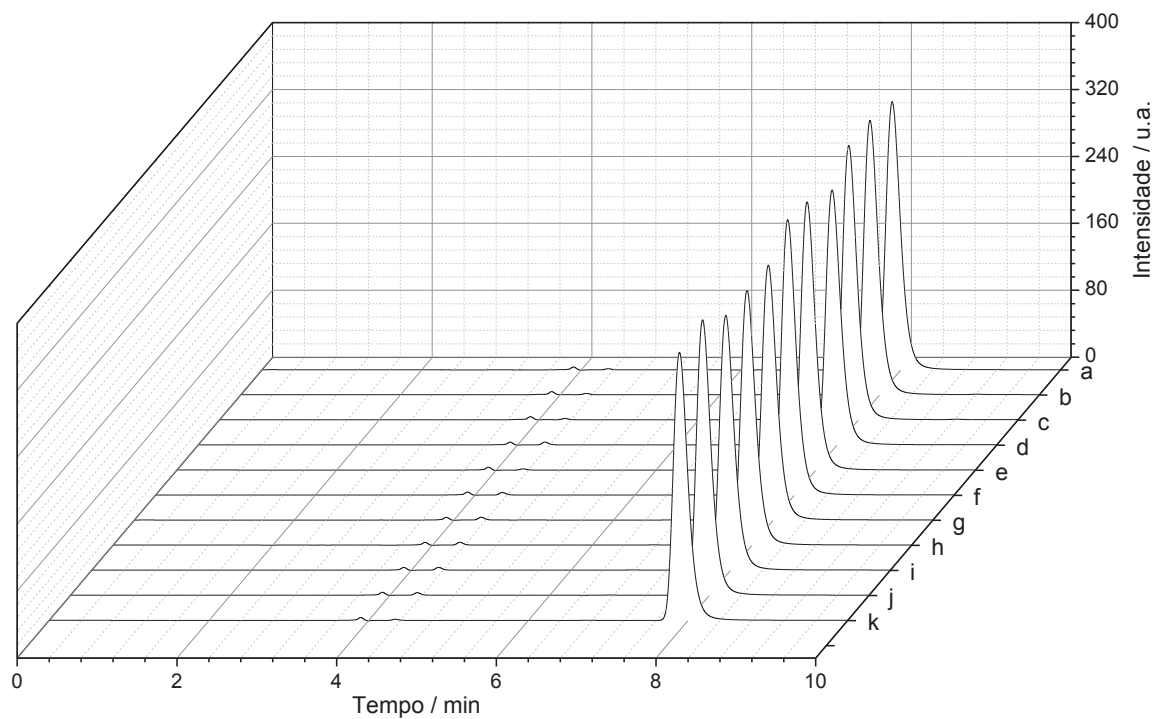


Fonte: Do autor.

Legenda: (a) anlodipino;  
(b) olmesartana;  
(c) amido pré-gelatinizado;  
(d) celulose;  
(e) croscarmelose sódica;  
(f) estearato de magnésio;  
(g) álcool polivinílico;  
(h)  $\text{TiO}_2$ ;  
(i) talco;  
(j) PVP;  
(k) lactose;  
(l) PEG.

As Figuras 51 e 52 apresentam os cromatogramas das misturas binárias de anlodipino e excipientes no tempo inicial. Esses resultados mostram que os excipientes não causaram interferência na análise do anlodipino.

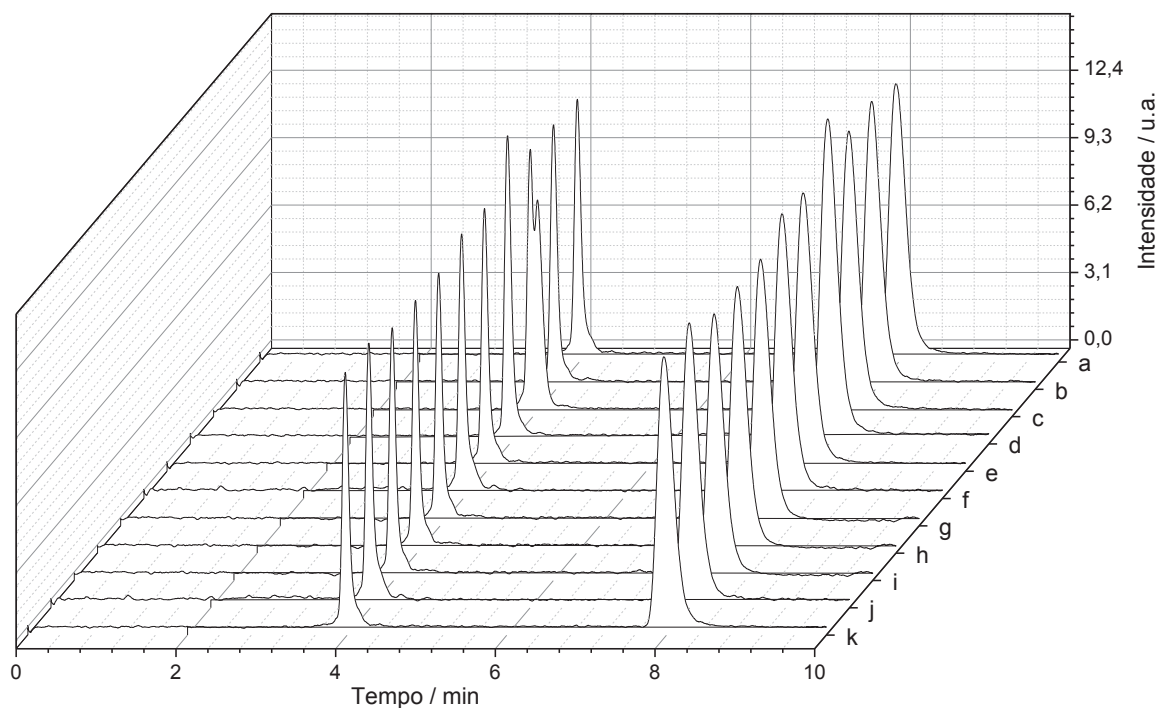
Figura 51 - Cromatogramas por UV em 239 nm no tempo inicial das misturas binárias de anlodipino e excipientes



Fonte: Do autor.

- Legenda: (a) Anlodipino puro;  
(b) Anlodipino+amido pré-gelatinizado;  
(c) Anlodipino+celulose;  
(d) Anlodipino+croscarmelose sódica;  
(e) Anlodipino+estearato de magnésio;  
(f) Anlodipino+álcool polivinílico;  
(g) Anlodipino+TiO<sub>2</sub>;  
(h) Anlodipino+talco;  
(i) Anlodipino+PVP;  
(j) Anlodipino+lactose;  
(k) Anlodipino+PEG.

Figura 52 - Cromatogramas por CAD no tempo inicial das misturas binárias de anlodipino e excipientes

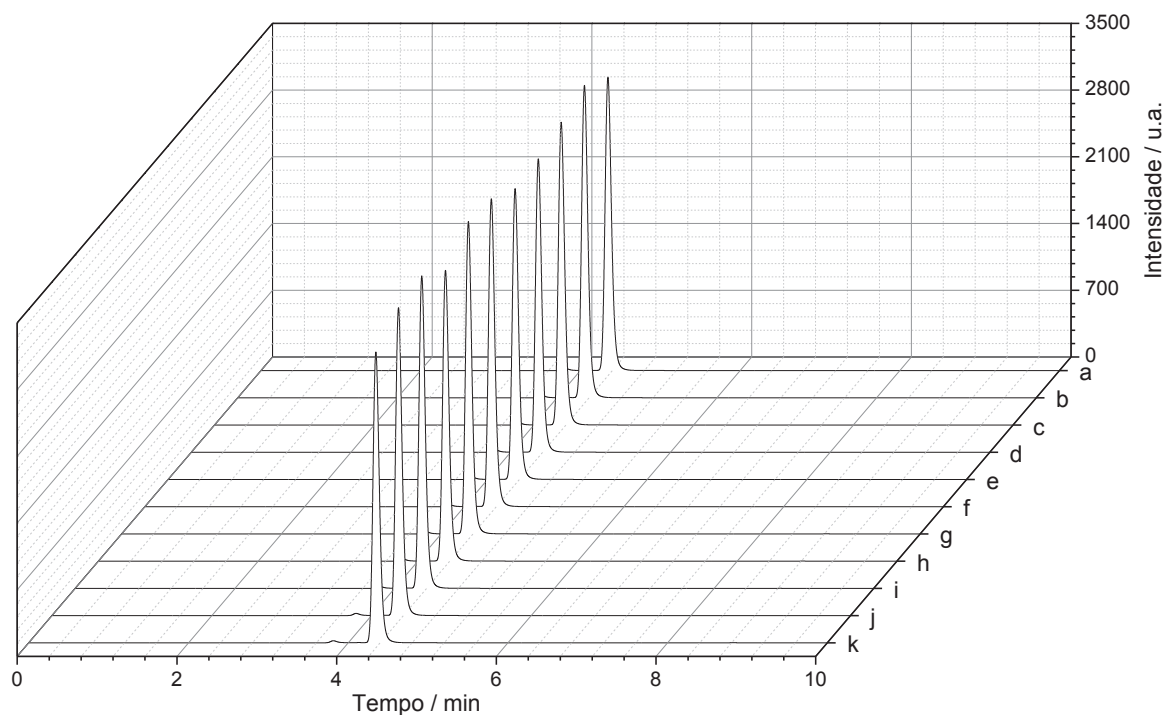


Fonte: Do autor.

Legenda: (a) Anlodipino puro;  
 (b) Anlodipino+amido pré-gelatinizado;  
 (c) Anlodipino+celulose;  
 (d) Anlodipino+croscarmelose sódica;  
 (e) Anlodipino+estearato de magnésio;  
 (f) Anlodipino+álcool polivinílico;  
 (g) Anlodipino+TiO<sub>2</sub>;  
 (h) Anlodipino+talco;  
 (i) Anlodipino+PVP;  
 (j) Anlodipino+lactose;  
 (k) Anlodipino+PEG.

As Figuras 53 e 54 apresentam os cromatogramas das misturas binárias da olmesartana e excipientes no tempo inicial. Esses resultados mostram que os excipientes não causaram interferência na análise da olmesartana.

Figura 53 - Cromatogramas por UV em 250 nm no tempo inicial das misturas binárias da olmesartana e excipientes

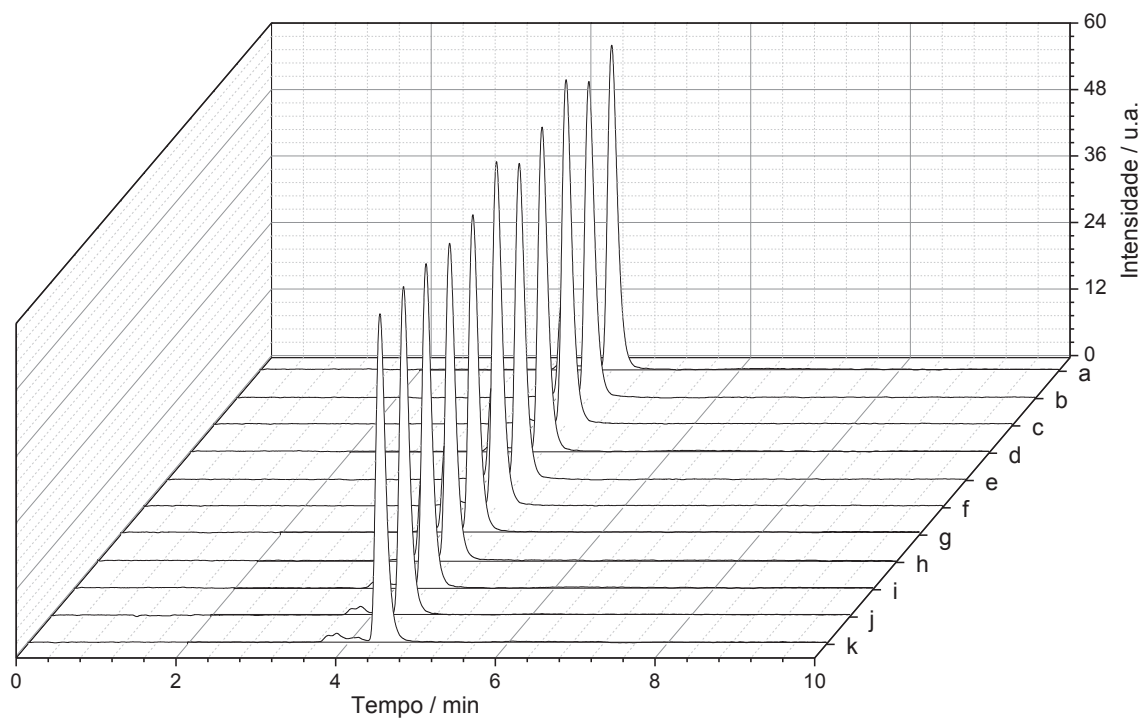


Fonte: Do autor.

- Legenda: (a) Olmesartana pura;  
(b) Olmesartana+amido pré-gelatinizado;  
(c) Olmesartana+celulose;  
(d) Olmesartana+croscarmelose sódica;  
(e) Olmesartana+estearato de magnésio;  
(f) Olmesartana+álcool polivinílico;  
(g) Olmesartana+TiO<sub>2</sub>;  
(h) Olmesartana+talco;  
(i) Olmesartana+PVP;  
(j) Olmesartana+lactose;  
(k) Olmesartana+PEG.



Figura 54 - Cromatogramas por CAD no tempo inicial das misturas binárias da olmesartana e excipientes

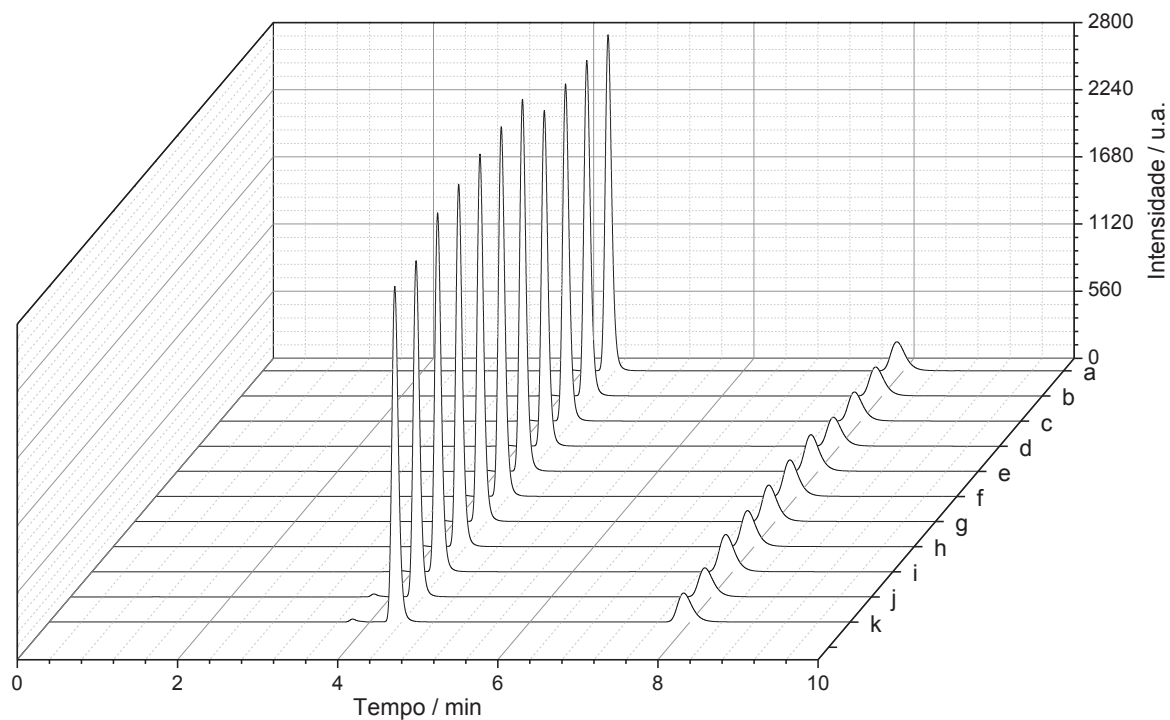


Fonte: Do autor.

Legenda: (a) Olmesartana pura;  
 (b) Olmesartana+amido pré-gelatinizado;  
 (c) Olmesartana+celulose;  
 (d) Olmesartana+croscarmelose sódica;  
 (e) Olmesartana+estearato de magnésio;  
 (f) Olmesartana+álcool polivinílico;  
 (g) Olmesartana+TiO<sub>2</sub>;  
 (h) Olmesartana+talco;  
 (i) Olmesartana+PVP;  
 (j) Olmesartana+lactose;  
 (k) Olmesartana+PEG.

As Figuras 55 e 56 apresentam os cromatogramas das misturas ternárias da olmesartana, anlodipino e excipientes no tempo inicial. Esses resultados mostram que os excipientes não causaram interferência na análise simultânea de olmesartana e anlodipino.

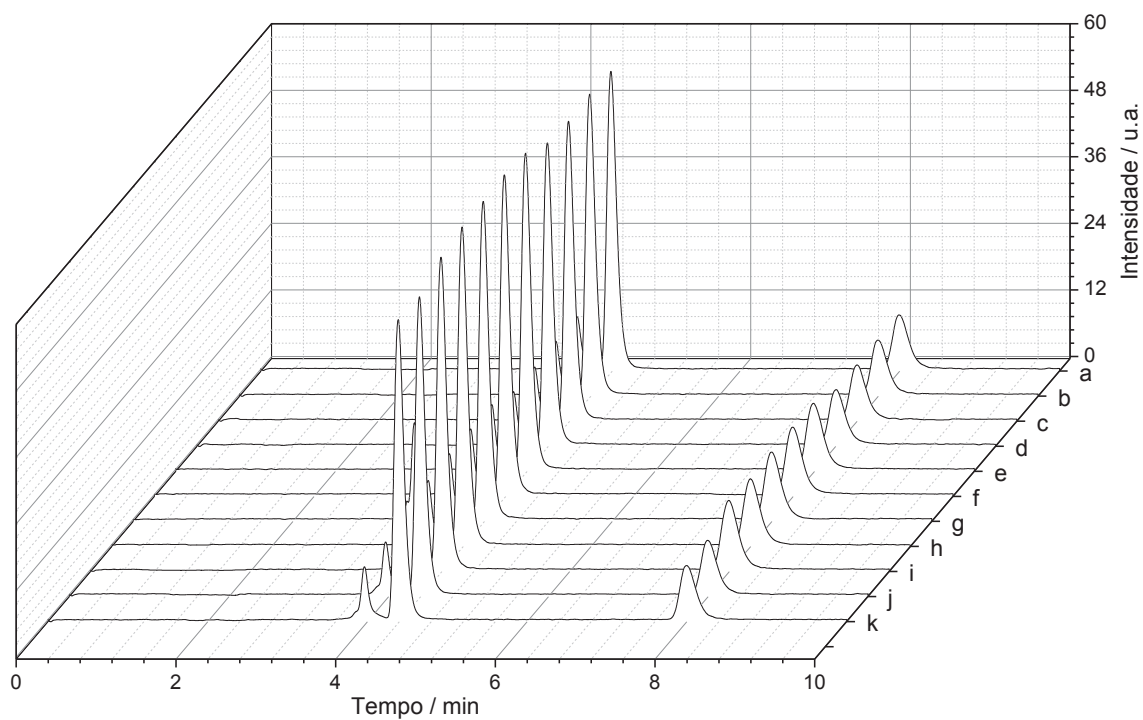
Figura 55 - Cromatogramas por UV em 239 nm no tempo inicial das misturas ternárias da olmesartana, anlodipino e excipientes



Fonte: Do autor.

- Legenda: (a) anlodipino+olmesartana;  
(b) Olmesartana+anlodipino+amido pré-gelatinizado;  
(c) Olmesartana+anlodipino+celulose;  
(d) Olmesartana+anlodipino+croscarmelose sódica;  
(e) Olmesartana+anlodipino+estearato de magnésio;  
(f) Olmesartana+anlodipino+álcool polivinílico;  
(g) Olmesartana+anlodipino+TiO<sub>2</sub>;  
(h) Olmesartana+anlodipino+talco;  
(i) Olmesartana+anlodipino+PVP;  
(j) Olmesartana+anlodipino+lactose;  
(k) Olmesartana+anlodipino+PEG.

Figura 56 - Cromatogramas por CAD no tempo inicial das misturas ternárias da olmesartana, anlodipino e excipientes



Fonte: Do autor.

- Legenda: (a) anlodipino+olmesartana;  
(b) Olmesartana+anlodipino+amido pré-gelatinizado;  
(c) Olmesartana+anlodipino+celulose;  
(d) Olmesartana+anlodipino+croscarmelose sódica;  
(e) Olmesartana+anlodipino+estearato de magnésio;  
(f) Olmesartana+anlodipino+álcool polivinílico;  
(g) Olmesartana+anlodipino+TiO<sub>2</sub>;  
(h) Olmesartana+anlodipino+talco;  
(i) Olmesartana+anlodipino+PVP;  
(j) Olmesartana+anlodipino+lactose;  
(k) Olmesartana+anlodipino+PEG.

#### 4.7.2.2 Análise das amostras de 3 e 6 meses

Após 3 e 6 meses de incubação em câmara de estabilidade a  $40^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  a seco e sob umidade relativa de  $75\%\pm 5\%$ , as amostras foram analisadas para verificar o teor de anlodipino e de olmesartana. As amostras foram preparadas de modo que a concentração esperada de olmesartana fosse de  $400\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , e de anlodipino,  $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , sendo que estes valores correspondem a teores de 100% de olmesartana e anlodipino, respectivamente. A obtenção de valores com redução de 5% a estes é indicativo de degradação do fármaco, e por consequência, incompatibilidade química entre o fármaco e o excipiente (ICH, 1999).

A Figura 57 apresenta os cromatogramas das análises das amostras do anlodipino puro e das suas misturas binárias com os excipientes após 3 meses de incubação à seco. Foi possível observar que nenhuma das amostras apresentou redução significativa no teor de anlodipino. Como pode ser observado pelas dosagens de anlodipino encontradas com relação ao teor inicial apresentados na Tabela 18.

A Figura 58 apresenta os cromatogramas das análises das amostras do anlodipino puro e das suas misturas binárias com os excipientes após 6 meses de incubação à seco. Foi possível observar que nenhuma das amostras apresentou redução significativa no teor de anlodipino. Como pode ser observado pelas dosagens de anlodipino encontradas com relação ao teor inicial apresentados na Tabela 18.

A Figura 59 apresenta os cromatogramas das análises das amostras de olmesartana pura e das suas misturas binárias com os excipientes após 3 meses de incubação à seco. Foi possível observar que nenhuma das amostras apresentou redução significativa no teor de olmesartana. Como pode ser observado pelas dosagens de olmesartana encontradas com relação ao teor inicial apresentados na Tabela 18.

A Figura 60 apresenta os cromatogramas das análises das amostras de olmesartana pura e das suas misturas binárias com os excipientes após 6 meses de incubação à seco. Foi possível observar que, mesmo após tempo prolongado, nenhuma das amostras apresentou redução significativa no teor de olmesartana. Como pode ser observado pelas dosagens de olmesartana encontradas com relação ao teor inicial apresentados na Tabela 18.

As Figura 61 e 62 apresentam os cromatogramas das análises das amostras de mistura de olmesartana e anlodipino e das suas misturas ternárias com os excipientes após 3 e 6 meses de incubação à seco. Foi possível observar que tanto para os períodos de 3 meses, como para o de 6 meses, nenhuma das amostras apresentou redução significativa nos teores de olmesartana e de anlodipino. Como pode ser observado pelas dosagens de olmesartana e anlodipino encontradas com relação ao teor inicial apresentados na Tabela 19.

Tabela 18 - Dosagens de olmesartana e anlodipino encontradas com relação ao teor inicial em misturas binárias após 3 e 6 meses a  $40^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  à seco

Excipiente	3 meses		6 meses	
	Olmesartana (%)	Anlodipino (%)	Olmesartana (%)	Anlodipino (%)
	$101,3 \pm 0,5$	$102,9 \pm 0,4$	$97,5 \pm 0,6$	$98,2 \pm 0,5$
Amido pré-gelatinizado	$101,7 \pm 0,3$	$100,3 \pm 0,2$	$98,7 \pm 0,5$	$101,6 \pm 0,6$
Celulose	$98,4 \pm 0,7$	$98,8 \pm 0,5$	$97,5 \pm 0,7$	$99,6 \pm 0,5$
Croscarmelose sódica	$99,8 \pm 0,3$	$109,2 \pm 0,4$	$103,9 \pm 0,5$	$97,9 \pm 0,4$
Estearato de magnésio	$98,0 \pm 0,6$	$103,0 \pm 0,5$	$100,9 \pm 0,4$	$105,0 \pm 0,7$
Álcool polivinílico	$98,0 \pm 0,4$	$104,6 \pm 0,4$	$102,5 \pm 0,3$	$98,6 \pm 0,5$
TiO <sub>2</sub>	$99,1 \pm 0,2$	$104,3 \pm 0,6$	$100,8 \pm 0,6$	$101,2 \pm 0,6$
Talco	$98,9 \pm 0,6$	$98,0 \pm 0,7$	$99,8 \pm 0,8$	$98,2 \pm 0,8$
PVP	$99,5 \pm 0,5$	$101,1 \pm 0,3$	$100,0 \pm 0,5$	$100,8 \pm 0,6$
Lactose	$103,6 \pm 0,9$	$100,2 \pm 0,8$	$103,5 \pm 0,8$	$97,9 \pm 0,7$
PEG	$98,7 \pm 0,4$	$99,3 \pm 0,3$	$99,2 \pm 0,5$	$101,4 \pm 0,5$

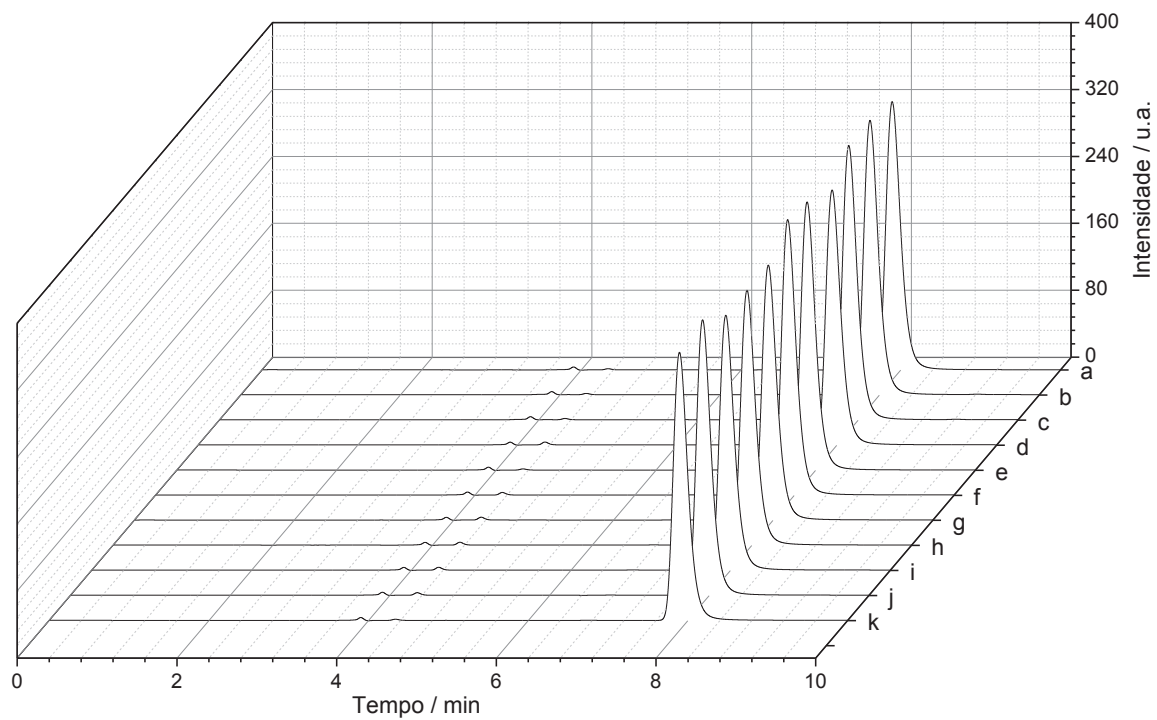
Fonte: Do autor.

Tabela 19 - Dosagens de olmesartana e anlodipino encontradas com relação ao teor inicial em misturas ternárias após 3 e 6 meses a 40°C±1°C à seco

Excipiente	3 meses		6 meses	
	Olmesartana (%)	Anlodipino (%)	Olmesartana (%)	Anlodipino (%)
	101,7 ± 0,6	99,4 ± 0,1	102,8 ± 0,9	98,0 ± 0,6
Amido pré-gelatinizado	100,6 ± 0,5	99,4 ± 0,6	103,6 ± 0,3	98,6 ± 0,9
Celulose	102,3 ± 0,9	100,8 ± 0,6	103,7 ± 0,5	98,1 ± 0,8
Croscarmelose sódica	101,8 ± 0,6	101,1 ± 0,2	101,5 ± 0,4	98,9 ± 0,6
Estearato de magnésio	99,0 ± 0,2	99,4 ± 0,6	100,9 ± 0,8	100,5 ± 0,4
Álcool polivinílico	100,2 ± 0,2	103,1 ± 0,4	101,9 ± 0,3	99,6 ± 0,3
TiO <sub>2</sub>	102,6 ± 0,8	99,8 ± 0,4	102,1 ± 0,7	99,8 ± 0,6
Talco	98,8 ± 0,7	103,7 ± 0,3	101,5 ± 0,6	99,5 ± 0,7
PVP	101,8 ± 0,8	98,5 ± 0,8	101,3 ± 0,9	101,9 ± 0,3
Lactose	98,5 ± 0,2	98,5 ± 0,4	99,7 ± 0,5	100,5 ± 0,7
PEG	99,5 ± 0,2	102,3 ± 0,5	102,7 ± 0,5	99,3 ± 0,4

Fonte: Do autor.

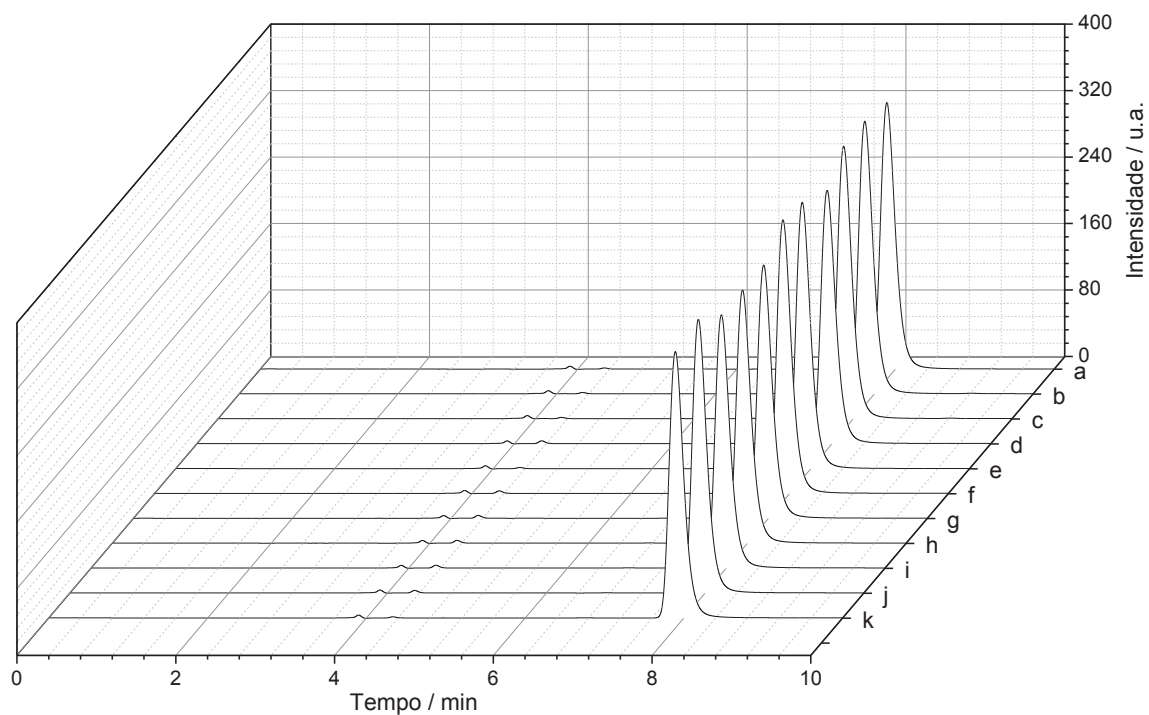
Figura 57 - Cromatogramas das amostras após 3 meses a  $40^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  à seco do anlodipino puro e das suas misturas binárias com os excipientes



Fonte: Do autor.

- Legenda: (a) Anlodipino puro;  
(b) Anlodipino+amido pré-gelatinizado;  
(c) Anlodipino+celulose;  
(d) Anlodipino+croscarmelose sódica;  
(e) Anlodipino+estearato de magnésio;  
(f) Anlodipino+álcool polivinílico;  
(g) Anlodipino+TiO<sub>2</sub>;  
(h) Anlodipino+talco;  
(i) Anlodipino+PVP;  
(j) Anlodipino+lactose;  
(k) Anlodipino+PEG.

Figura 58 - Cromatogramas das amostras após 6 meses a  $40^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  à seco do anlodipino puro e das suas misturas binárias com os excipientes

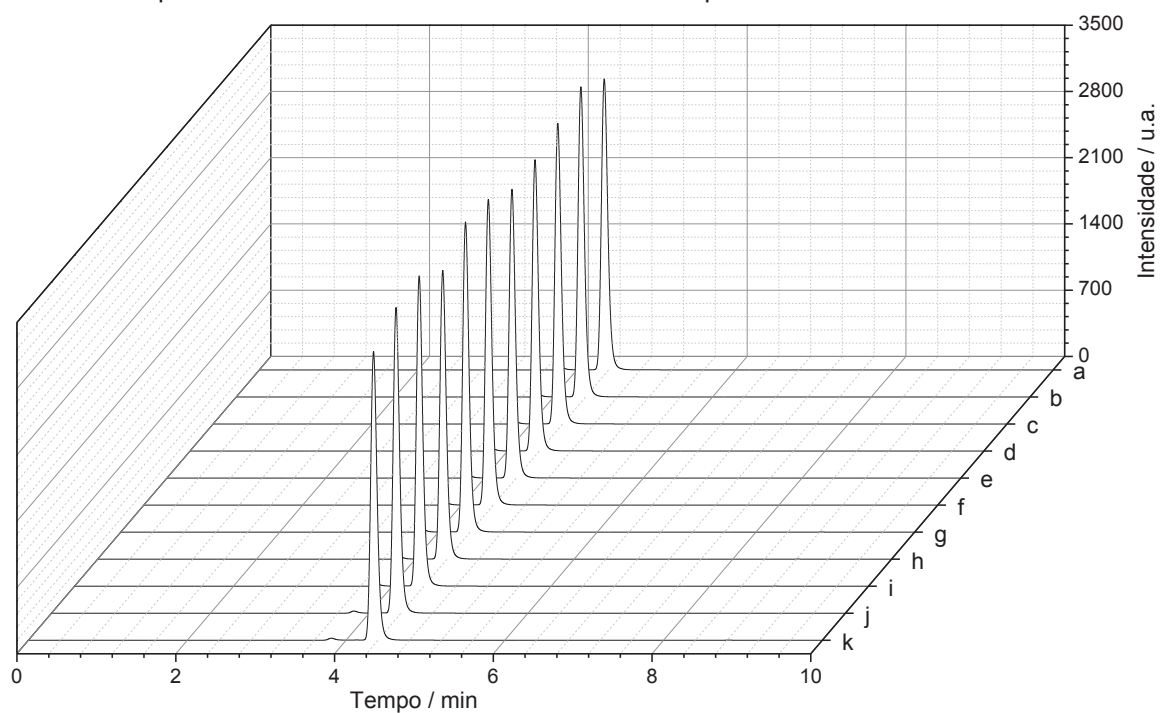


Fonte: Do autor.

Legenda: (a) Anlodipino puro;  
(b) Anlodipino+amido pré-gelatinizado;  
(c) Anlodipino+celulose;  
(d) Anlodipino+croscarmelose sódica;  
(e) Anlodipino+estearato de magnésio;  
(f) Anlodipino+álcool polivinílico;  
(g) Anlodipino+TiO<sub>2</sub>;  
(h) Anlodipino+talco;  
(i) Anlodipino+PVP;  
(j) Anlodipino+lactose;  
(k) Anlodipino+PEG.



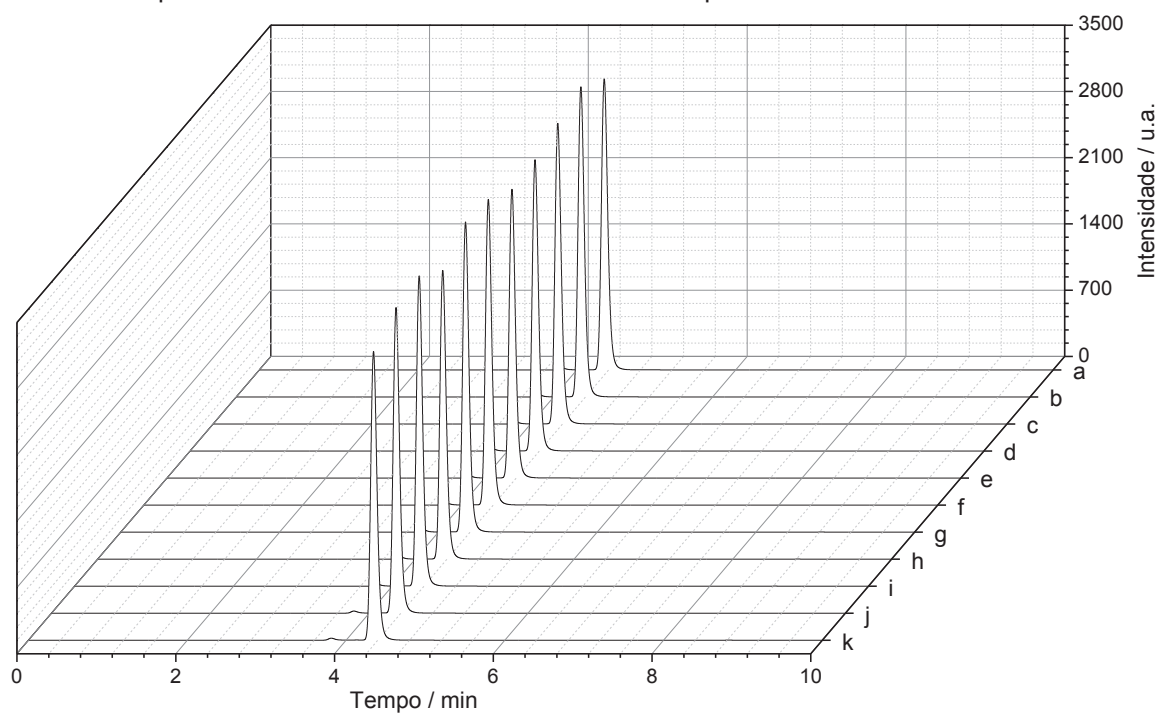
Figura 59 - Cromatogramas das amostras após 3 meses a  $40^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  à seco da olmesartana pura e das suas misturas binárias com os excipientes



Fonte: Do autor.

- Legenda: (a) Olmesartana pura;  
(b) Olmesartana+amido pré-gelatinizado;  
(c) Olmesartana+celulose;  
(d) Olmesartana+croscarmelose sódica;  
(e) Olmesartana+estearato de magnésio;  
(f) Olmesartana+álcool polivinílico;  
(g) Olmesartana+TiO<sub>2</sub>;  
(h) Olmesartana+talco;  
(i) Olmesartana+PVP;  
(j) Olmesartana+lactose;  
(k) Olmesartana+PEG.

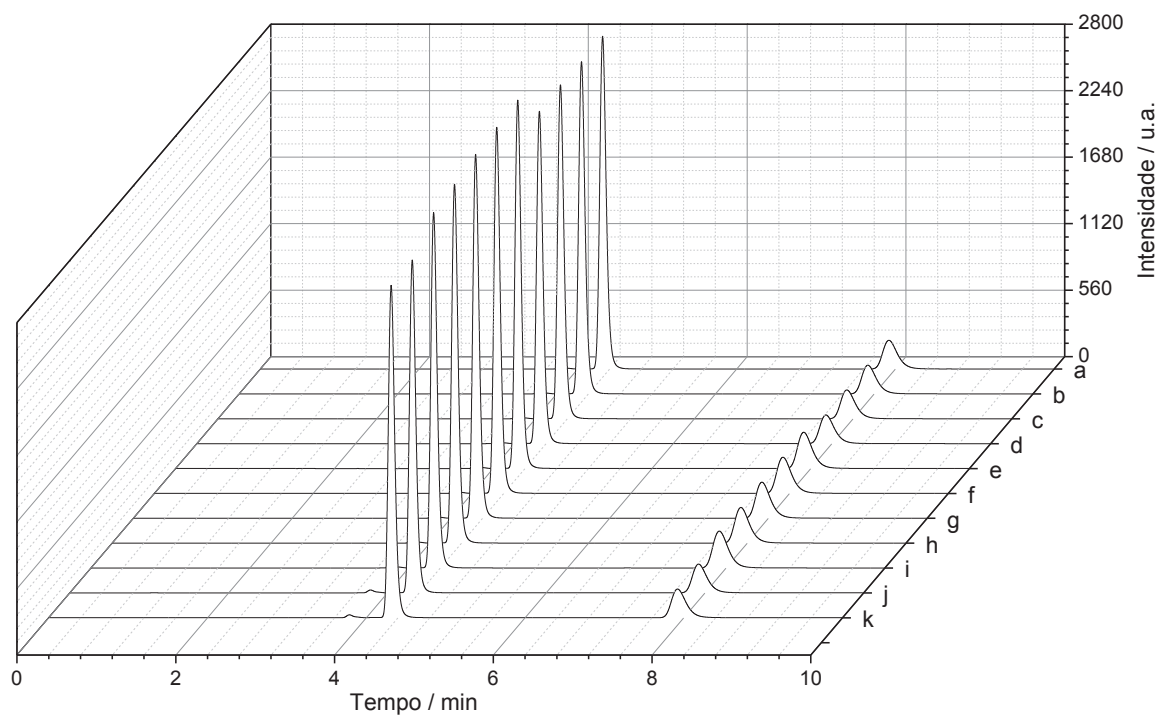
Figura 60 - Cromatogramas das amostras após 6 meses a  $40^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  à seco da olmesartana pura e das suas misturas binárias com os excipientes



Fonte: Do autor.

- Legenda: (a) Olmesartana pura;  
(b) Olmesartana+amido pré-gelatinizado;  
(c) Olmesartana+celulose;  
(d) Olmesartana+croscarmelose sódica;  
(e) Olmesartana+estearato de magnésio;  
(f) Olmesartana+álcool polivinílico;  
(g) Olmesartana+TiO<sub>2</sub>;  
(h) Olmesartana+talco;  
(i) Olmesartana+PVP;  
(j) Olmesartana+lactose;  
(k) Olmesartana+PEG.

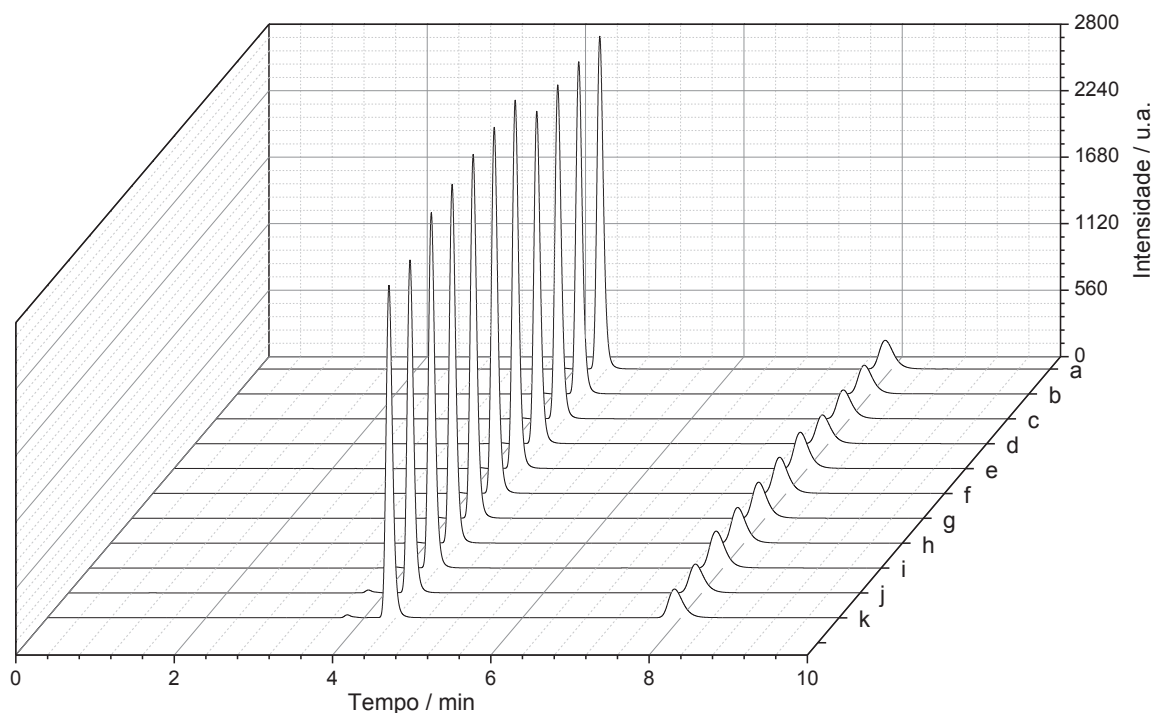
Figura 61 - Cromatogramas das amostras após 3 meses a  $40^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  à seco de mistura de olmesartana e anlodipino e das suas misturas ternárias com os excipientes



Fonte: Do autor.

- Legenda: (a) Olmesartana e anlodipino;  
(b) Olmesartana+anlodipino+amido pré-gelatinizado;  
(c) Olmesartana+anlodipino+celulose;  
(d) Olmesartana+anlodipino+crosarmelose sódica;  
(e) Olmesartana+anlodipino+estearato de magnésio;  
(f) Olmesartana+anlodipino+álcool polivinílico;  
(g) Olmesartana+anlodipino+TiO<sub>2</sub>;  
(h) Olmesartana+anlodipino+talco;  
(i) Olmesartana+anlodipino+PVP;  
(j) Olmesartana+anlodipino+lactose;  
(k) Olmesartana+anlodipino+PEG.

Figura 62 - Cromatogramas das amostras após 6 meses a  $40^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  à seco de mistura de olmesartana e anlodipino e das suas misturas ternárias com os excipientes



Fonte: Do autor.

Legenda: (a) Olmesartana e anlodipino;  
 (b) Olmesartana+anlodipino+amido pré-gelatinizado;  
 (c) Olmesartana+anlodipino+celulose;  
 (d) Olmesartana+anlodipino+croscarmelose sódica;  
 (e) Olmesartana+anlodipino+estearato de magnésio;  
 (f) Olmesartana+anlodipino+álcool polivinílico;  
 (g) Olmesartana+anlodipino+TiO<sub>2</sub>;  
 (h) Olmesartana+anlodipino+talco;  
 (i) Olmesartana+anlodipino+PVP;  
 (j) Olmesartana+anlodipino+lactose;  
 (k) Olmesartana+anlodipino+PEG.

A Figura 63 apresenta os cromatogramas das análises das amostras do anlodipino puro e das suas misturas binárias com os excipientes após 3 meses de incubação sob  $75\%\pm 5\%$  de umidade relativa. Foi possível observar que nenhuma das amostras apresentou redução significativa no teor de anlodipino. Como pode ser observado pelas dosagens de anlodipino encontradas com relação ao teor inicial apresentados na tabela 20.

A Figura 64 apresenta os cromatogramas das análises das amostras do anlodipino puro e das suas misturas binárias com os excipientes após 6 meses de incubação sob  $75\%\pm 5\%$  de umidade relativa. Foi possível observar que apenas as misturas contendo amido pré-gelatinizado e lactose apresentaram redução no teor de anlodipino. Portanto pode-se concluir que há incompatibilidade entre o anlodipino e os

excipientes: amido pré-gelatinizado e lactose, porém o método utilizado não foi capaz de detectar o(s) produto(s) de degradação. Como pode ser observado pelas dosagens de anlodipino encontradas com relação ao teor inicial apresentados na tabela 20.

A Figura 65 apresenta os cromatogramas das análises das amostras de olmesartana pura e das suas misturas binárias com os excipientes após 3 meses de incubação sob  $75\% \pm 5\%$  de umidade relativa. Foi possível observar que nenhuma das amostras apresentou redução significativa no teor de olmesartana. Como pode ser observado pelas dosagens de olmesartana encontradas com relação ao teor inicial apresentados na tabela 20.

A Figura 66 apresenta os cromatogramas das análises das amostras de olmesartana pura e das suas misturas binárias com os excipientes após 6 meses de incubação sob  $75\% \pm 5\%$  de umidade relativa. Foi possível observar que apenas as misturas contendo PVP e lactose apresentaram redução no teor de olmesartana. Portanto pode-se concluir que há incompatibilidade entre a olmesartana e os excipientes: PVP e lactose, porém o método utilizado não foi capaz de detectar o(s) produto(s) de degradação. Como pode ser observado pelas dosagens de olmesartana encontradas com relação ao teor inicial apresentados na tabela 20.

As Figura 67 e 68 apresentam os cromatogramas das análises das amostras de mistura de olmesartana e anlodipino e das suas misturas ternárias com os excipientes após 3 e 6 meses de incubação sob  $75\% \pm 5\%$  de umidade relativa. Foi possível observar que para o período de 3 meses nenhuma das amostras apresentou redução nos teores de olmesartana e de anlodipino. Porém, após 6 meses de incubação, as misturas ternárias contendo os excipientes: croscarmelose sódica, estearato de magnésio, álcool polivinílico, talco, PVP, lactose e PEG apresentaram redução nos teores de anlodipino e olmesartana. A mistura ternária contendo olmesartana, anlodipino e amido pré-gelatinizado apresentou redução apenas no teor do anlodipino. Como pode ser observado pelas dosagens de olmesartana e anlodipino encontradas com relação ao teor inicial apresentados na tabela 21.

Tabela 20 - Dosagens de olmesartana e anlodipino encontradas com relação ao teor inicial em misturas binárias após 3 e 6 meses a 40°C±1°C sob 75%±5% de umidade relativa

Excipiente	3 meses		6 meses	
	Olmesartana (%)	Anlodipino (%)	Olmesartana (%)	Anlodipino (%)
	102,4 ± 0,4	99,3 ± 0,5	107,1 ± 0,8	104,3 ± 0,2
Amido pré-gelatinizado	100,5 ± 0,7	99,0 ± 0,5	102,5 ± 0,8	74,2 ± 0,4
Celulose	100,4 ± 0,4	102,3 ± 0,3	100,8 ± 0,5	98,2 ± 0,4
Croscarmelose sódica	100,3 ± 0,5	99,7 ± 0,8	102,6 ± 0,3	99,8 ± 0,3
Estearato de magnésio	101,6 ± 0,4	100,8 ± 0,8	100,4 ± 0,6	99,6 ± 0,6
Álcool polivinílico	98,5 ± 0,9	98,3 ± 0,9	102,9 ± 0,4	100,7 ± 0,8
TiO <sub>2</sub>	100,6 ± 0,5	98,1 ± 0,9	99,9 ± 0,5	98,3 ± 0,4
Talco	98,7 ± 0,6	99,9 ± 0,7	101,1 ± 0,3	104,1 ± 0,5
PVP	99,0 ± 0,7	98,1 ± 0,9	83,7 ± 0,9	98,2 ± 0,7
Lactose	101,8 ± 0,6	100,3 ± 0,6	76,1 ± 0,6	73,7 ± 0,3
PEG	99,8 ± 0,5	99,1 ± 0,7	98,2 ± 0,9	103,1 ± 0,3

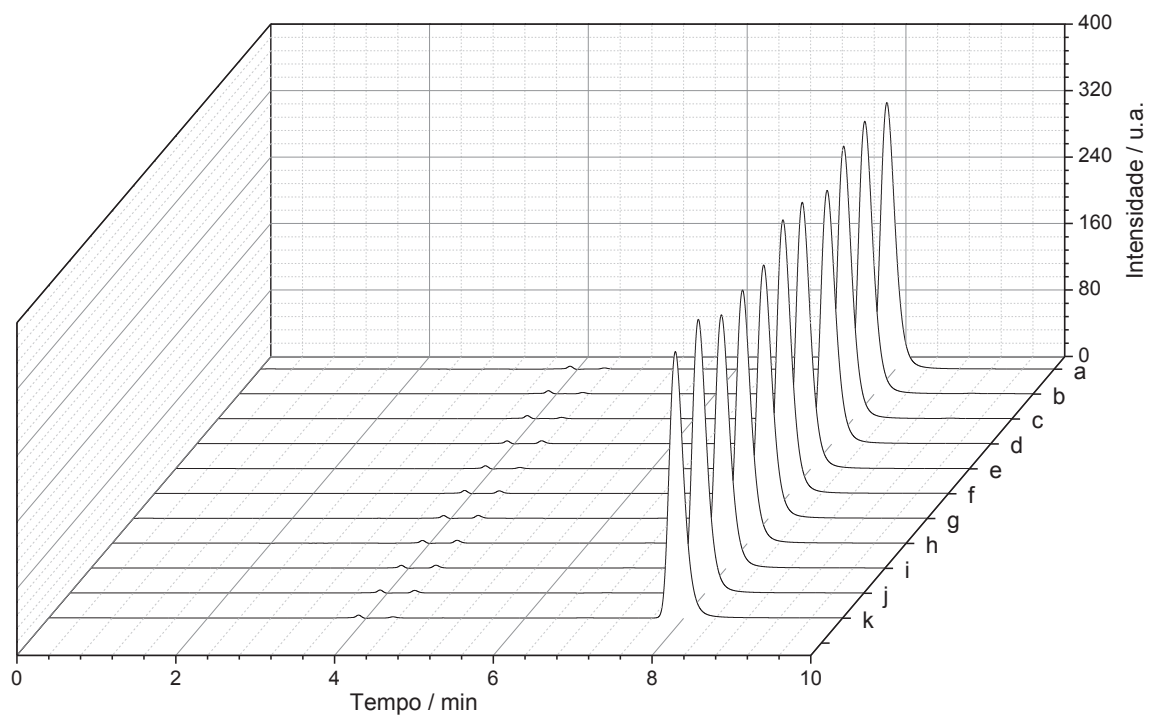
Fonte: Do autor.

Tabela 21 - Dosagens de olmesartana e anlodipino encontradas com relação ao teor inicial em misturas ternárias após 3 e 6 meses a 40°C±1°C sob 75%±5% de umidade relativa

Excipiente	3 meses		6 meses	
	Olmesartana (%)	Anlodipino (%)	Olmesartana (%)	Anlodipino (%)
	99,2 ± 0,9	101,7 ± 0,4	110,1 ± 0,7	99,2 ± 0,5
Amido pré-gelatinizado	98,7 ± 0,9	100,5 ± 0,7	101,5 ± 0,7	82,7 ± 0,9
Celulose	98,2 ± 0,4	105,9 ± 0,9	101,2 ± 0,2	101,7 ± 0,2
Croscarmelose sódica	99,4 ± 0,6	103,2 ± 0,8	93,7 ± 0,5	92,3 ± 0,3
Estearato de magnésio	99,5 ± 0,4	99,0 ± 0,2	83,1 ± 0,7	81,2 ± 0,7
Álcool polivinílico	100,3 ± 0,2	98,2 ± 0,6	83,6 ± 0,2	84,4 ± 0,6
TiO <sub>2</sub>	98,1 ± 0,4	98,4 ± 0,6	104,3 ± 0,4	101,8 ± 0,3
Talco	100,5 ± 0,5	99,4 ± 0,3	79,5 ± 0,6	84,2 ± 0,4
PVP	101,9 ± 0,4	101,3 ± 0,7	81,1 ± 0,9	75,2 ± 0,5
Lactose	101,3 ± 0,8	98,9 ± 0,9	74,2 ± 0,8	78,3 ± 0,8
PEG	99,1 ± 0,6	99,9 ± 0,5	86,9 ± 0,4	82,4 ± 0,7

Fonte: Do autor.

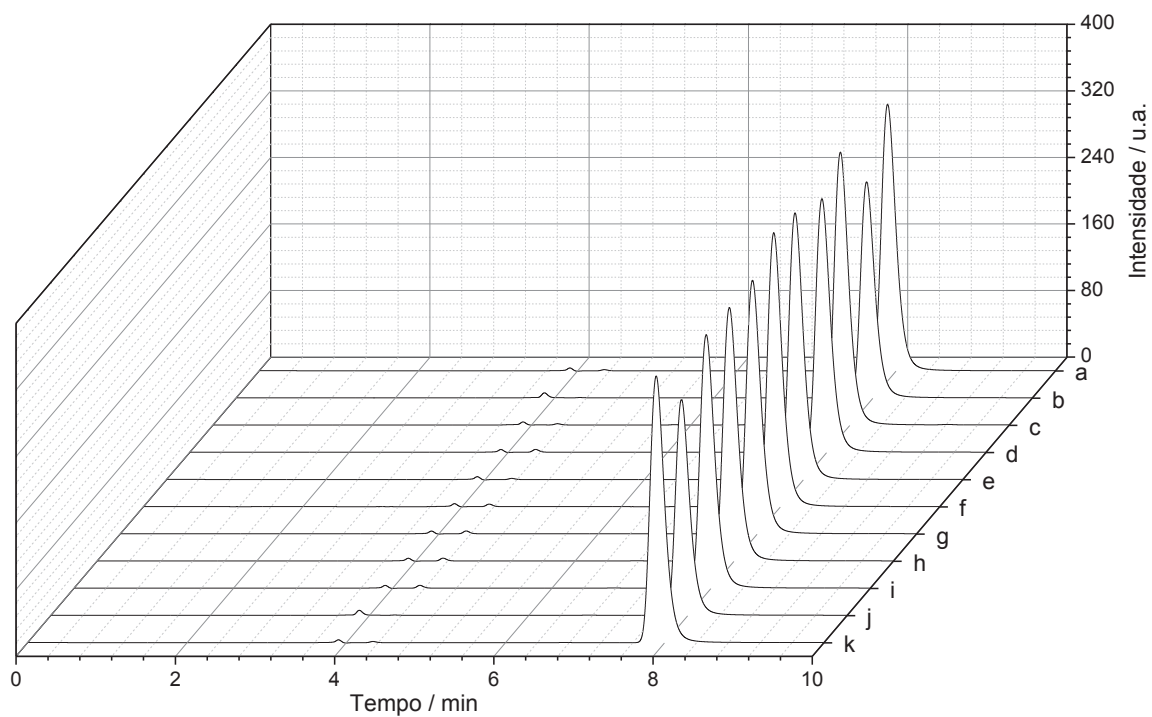
Figura 63 - Cromatogramas das amostras após 3 meses a  $40^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $75\%\pm 5\%$  de umidade relativa do anlodipino puro e das suas misturas binárias com os excipientes



Fonte: Do autor.

Legenda: (a) Anlodipino puro;  
(b) Anlodipino+amido pré-gelatinizado;  
(c) Anlodipino+celulose;  
(d) Anlodipino+croscarmelose sódica;  
(e) Anlodipino+estearato de magnésio;  
(f) Anlodipino+álcool polivinílico;  
(g) Anlodipino+TiO<sub>2</sub>;  
(h) Anlodipino+talco;  
(i) Anlodipino+PVP;  
(j) Anlodipino+lactose;  
(k) Anlodipino+PEG.

Figura 64 - Cromatogramas das amostras após 6 meses a  $40^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $75\%\pm 5\%$  de umidade relativa do anlodipino puro e das suas misturas binárias com os excipientes

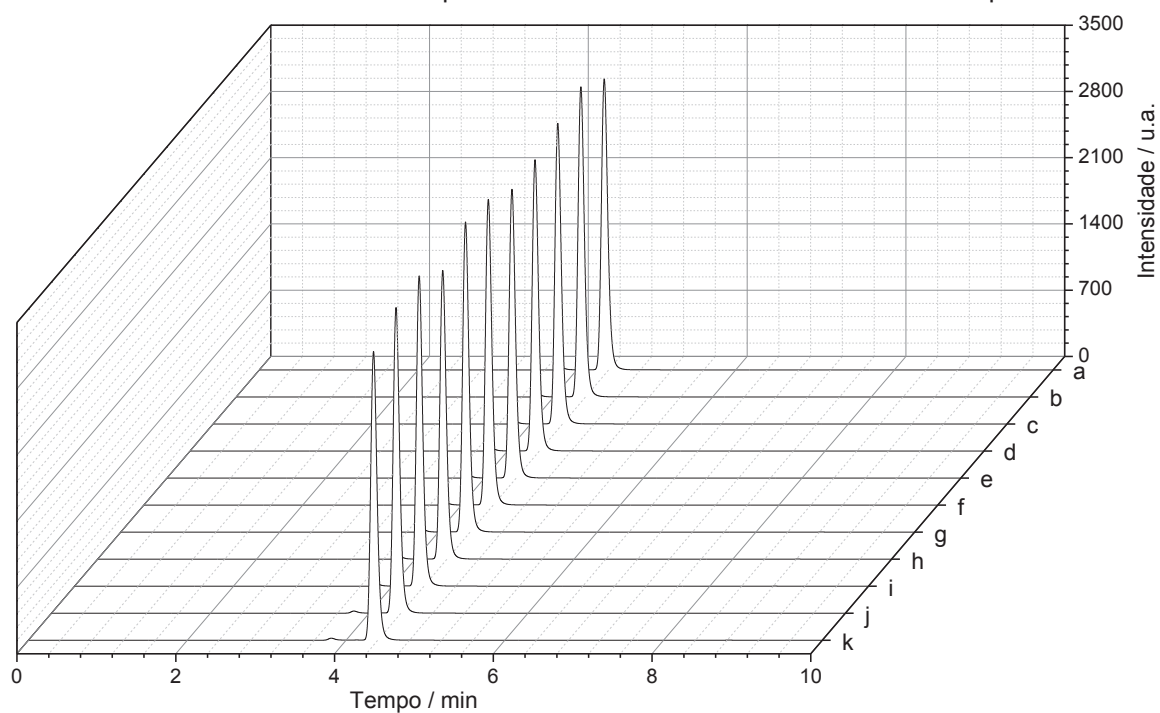


Fonte: Do autor.

- Legenda: (a) Anlodipino puro;  
(b) Anlodipino+amido pré-gelatinizado;  
(c) Anlodipino+celulose;  
(d) Anlodipino+croscarmelose sódica;  
(e) Anlodipino+estearato de magnésio;  
(f) Anlodipino+álcool polivinílico;  
(g) Anlodipino+TiO<sub>2</sub>;  
(h) Anlodipino+talco;  
(i) Anlodipino+PVP;  
(j) Anlodipino+lactose;  
(k) Anlodipino+PEG.



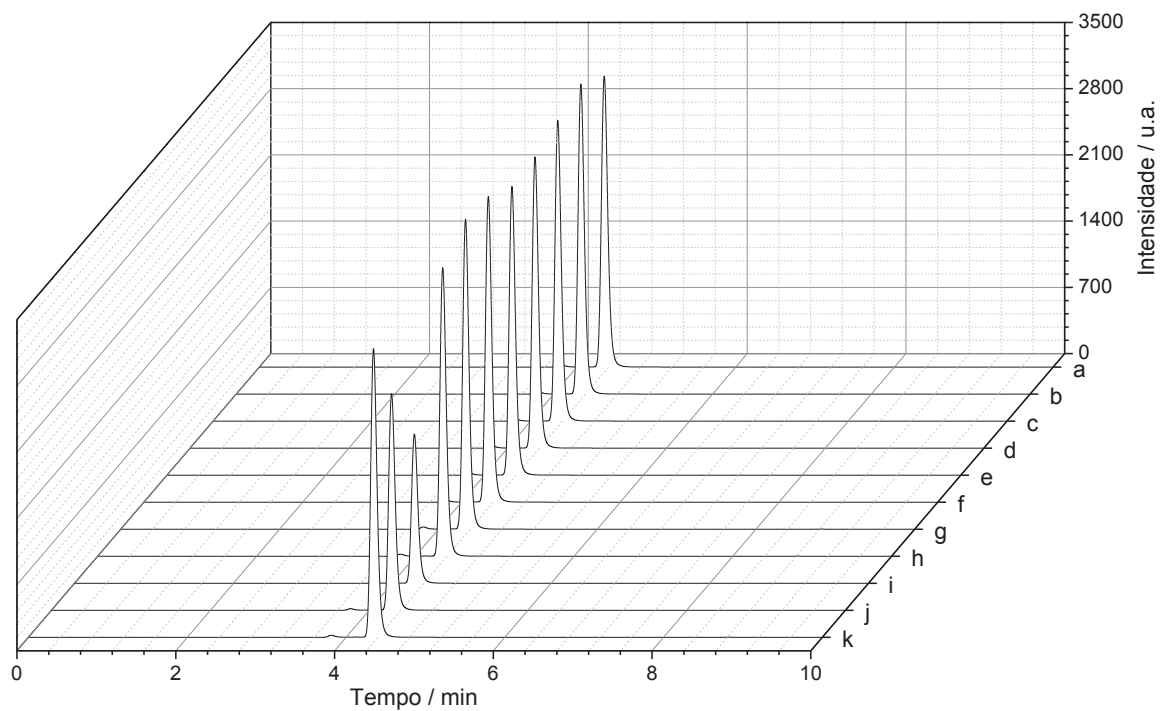
Figura 65 - Cromatogramas das amostras após 3 meses a  $40^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $75\%\pm 5\%$  de umidade relativa da olmesartana pura e das suas misturas binárias com os excipientes



Fonte: Do autor.

- Legenda: (a) Olmesartana pura;  
(b) Olmesartana+amido pré-gelatinizado;  
(c) Olmesartana+celulose;  
(d) Olmesartana+croscarmelose sódica;  
(e) Olmesartana+estearato de magnésio;  
(f) Olmesartana+álcool polivinílico;  
(g) Olmesartana+TiO<sub>2</sub>;  
(h) Olmesartana+talco;  
(i) Olmesartana+PVP;  
(j) Olmesartana+lactose;  
(k) Olmesartana+PEG.

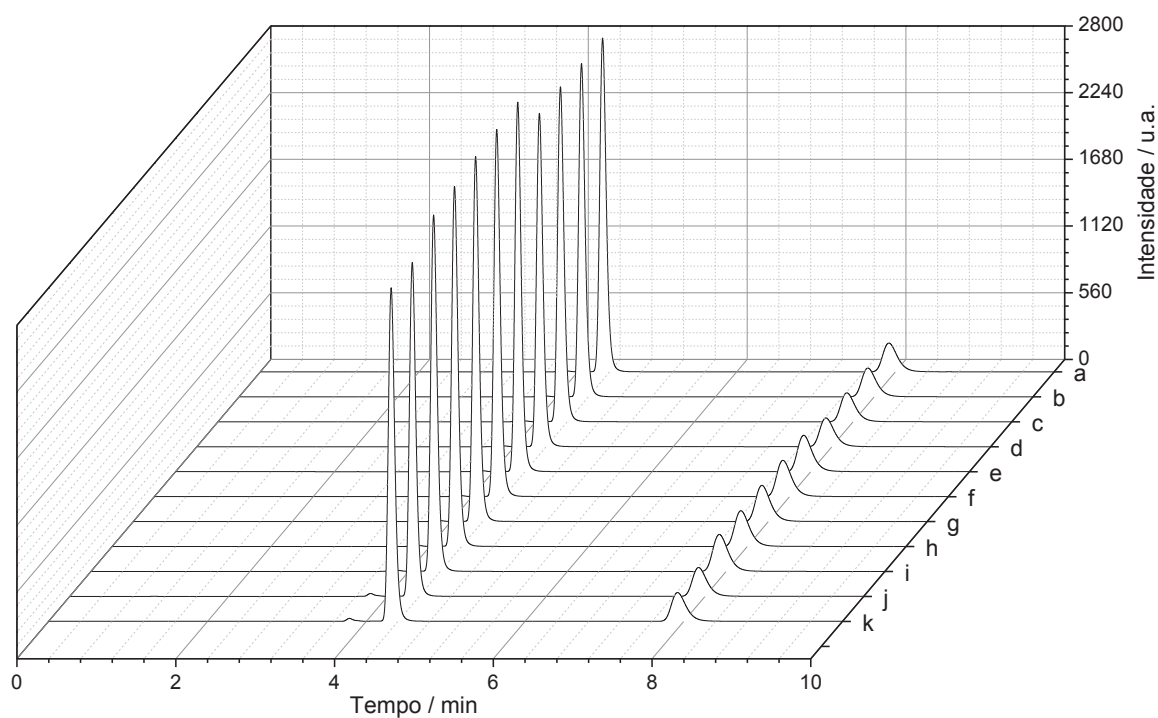
Figura 66 - Cromatogramas das amostras após 6 meses a  $40^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $75\%\pm 5\%$  de umidade relativa da olmesartana pura e das suas misturas binárias com os excipientes



Fonte: Do autor.

- Legenda: (a) Olmesartana pura;  
(b) Olmesartana+amido pré-gelatinizado;  
(c) Olmesartana+celulose;  
(d) Olmesartana+croscarmelose sódica;  
(e) Olmesartana+estearato de magnésio;  
(f) Olmesartana+álcool polivinílico;  
(g) Olmesartana+TiO<sub>2</sub>;  
(h) Olmesartana+talco;  
(i) Olmesartana+PVP;  
(j) Olmesartana+lactose;  
(k) Olmesartana+PEG.

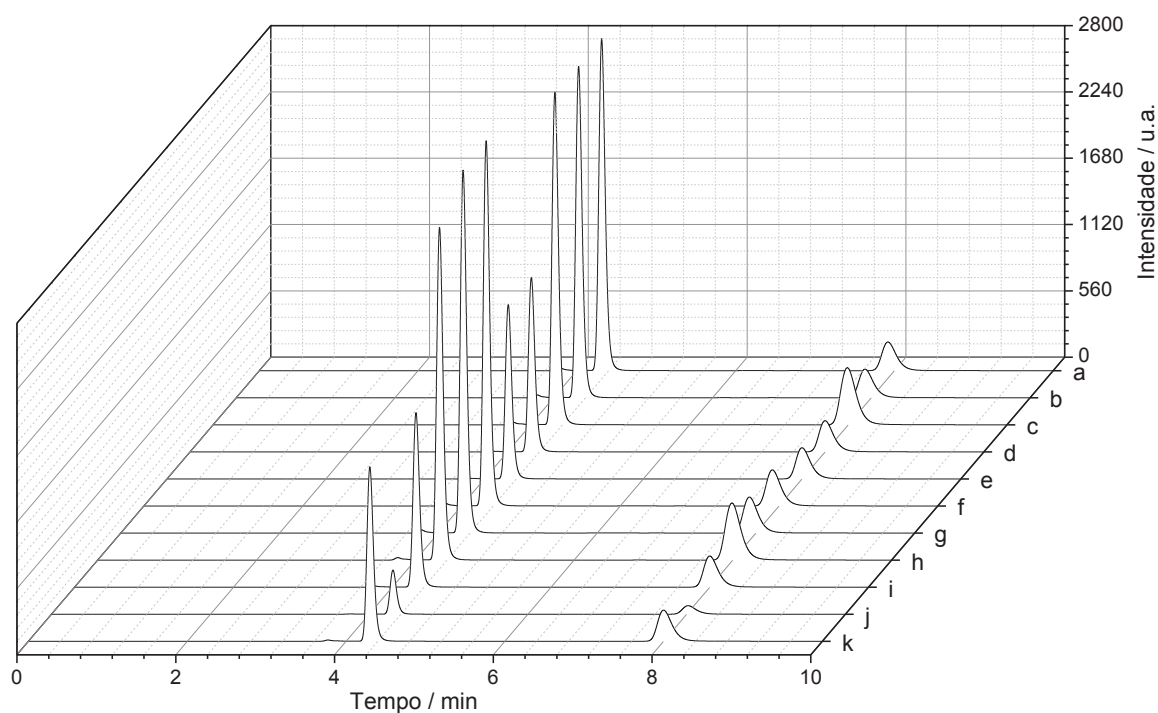
Figura 67 - Cromatogramas das amostras após 3 meses a  $40^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $75\%\pm 5\%$  de umidade relativa de mistura de olmesartana e anlodipino e das suas misturas ternárias com os excipientes



Fonte: Do autor.

- Legenda: (a) Olmesartana e anlodipino;  
(b) Olmesartana+anlodipino+amido pré-gelatinizado;  
(c) Olmesartana+anlodipino+celulose;  
(d) Olmesartana+anlodipino+croscarmelose sódica;  
(e) Olmesartana+anlodipino+estearato de magnésio;  
(f) Olmesartana+anlodipino+álcool polivinílico;  
(g) Olmesartana+anlodipino+TiO<sub>2</sub>;  
(h) Olmesartana+anlodipino+talco;  
(i) Olmesartana+anlodipino+PVP;  
(j) Olmesartana+anlodipino+lactose;  
(k) Olmesartana+anlodipino+PEG.

Figura 68 - Cromatogramas das amostras após 6 meses a  $40^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $75\%\pm 5\%$  de umidade relativa de mistura de olmesartana e anlodipino e das suas misturas ternárias com os excipientes



Fonte: Do autor.

Legenda: (a) Olmesartana e anlodipino;  
 (b) Olmesartana+anlodipino+amido pré-gelatinizado;  
 (c) Olmesartana+anlodipino+celulose;  
 (d) Olmesartana+anlodipino+croscarmelose sódica;  
 (e) Olmesartana+anlodipino+estearato de magnésio;  
 (f) Olmesartana+anlodipino+álcool polivinílico;  
 (g) Olmesartana+anlodipino+TiO<sub>2</sub>;  
 (h) Olmesartana+anlodipino+talco;  
 (i) Olmesartana+anlodipino+PVP;  
 (j) Olmesartana+anlodipino+lactose;  
 (k) Olmesartana+anlodipino+PEG.

#### 4.7.3 Conclusão Parcial

As análises cromatográficas indicaram por meio das amostras incubadas a  $40^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  à seco que não há incompatibilidade em nenhuma das misturas preparadas, indicando que os excipientes testados podem ser utilizados no preparo de formulações contendo anlodipino e olmesartana, desde que estas sejam armazenadas ao abrigo de umidade.

As amostras que foram incubadas a  $40^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $75\%\pm 5\%$  de umidade relativa não apresentaram nenhuma incompatibilidade após o tempo de 3 meses. Porém após

6 meses o anlodipino apresentou incompatibilidade com o amido pré-gelatinizado e lactose, e a olmesartana apresentou incompatibilidade com a polivinilpirrolidona e lactose.

Após 6 meses a  $40^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $75\%\pm 5\%$  de umidade relativa, as misturas ternárias, formadas por olmesartana, anlodipino e os excipientes: croscarmelose sódica, estearato de magnésio, álcool polivinílico, talco, polivinilpirrolidona, lactose e polietilenoglicol apresentaram redução nos teores de anlodipino e olmesartana, de modo que estes excipientes não são indicados no preparo de formulações contendo a associação farmacêutica anlodipino e olmesartana. A mistura ternária contendo olmesartana, anlodipino e amido pré-gelatinizado apresentou redução apenas no teor do anlodipino, e portanto, o amido pré-gelatinizado também não é indicado para o preparo de formulações contendo a associação farmacêutica anlodipino e olmesartana.

#### 4.8 CONCLUSÃO

Estudos de estabilidade de formulações farmacêuticas são necessários por serem exigidos pelas autoridades sanitárias para aprovação de uma nova formulação, seja ela um medicamento de referência, similar ou genérico. Atualmente, a literatura científica apresenta poucos dados relacionados ao estudo de estabilidade de associações farmacêuticas. Porém o estudo de estabilidade e compatibilidade de apenas um fármaco é muito explorado.

Por meio dos dados obtido por DSC foi possível concluir que o besilato de anlodipino apresenta incompatibilidade com o amido pré-gelatinizado, e a olmesartana medoxomila apresenta incompatibilidade com PVP e lactose. Não foi possível a compatibilidade entre anlodipino e lactose, e da associação farmacêutica anlodipino e olmesartana devido a sobreposição dos picos de fusão.

FTIR-ATR com aquecimento é capaz de fornecer dados relevantes, permitindo a análise da compatibilidade entre fármacos e excipientes. Foi possível observar a incompatibilidade do besilato de anlodipino com amido, croscarmelose, estearato de magnésio, álcool polivinílico, PVP, lactose e PEG, e da olmesartana medoxomila com estearato de magnésio, álcool polivinílico,  $\text{TiO}_2$ , PVP, lactose e PEG. Não há

incompatibilidade entre a associação farmacêutica de anlodipino e olmesartana, e dos excipientes testados, apenas o talco apresentou compatibilidade com a associação farmacêutica.

As análises cromatográficas indicaram que os excipientes testados podem ser utilizados no preparo de formulações contendo anlodipino e olmesartana, desde que estas sejam armazenadas ao abrigo de umidade. Porém após 6 meses, a  $40^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $75\%\pm 5\%$  de umidade relativa, o anlodipino apresentou incompatibilidade com o amido pré-gelatinizado e lactose, e a olmesartana apresentou incompatibilidade com a PVP e lactose, informações que condizem com os resultados obtidos pelo DSC.

Após 6 meses a  $40^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $75\%\pm 5\%$  de umidade relativa, a associação farmacêutica de anlodipino e olmesartana mostrou incompatibilidade com os excipientes: amido, croscarmelose sódica, estearato de magnésio, álcool polivinílico, talco, PVP, lactose e polietilenoglicol.

De acordo com os resultados obtidos por DSC, FTIR com aquecimento e HPLC foi possível observar que as condições de armazenamento são cruciais para a estabilidade da formulação, devendo esta ser armazenada em local fechado, livre de umidade e temperaturas amenas. Sendo que em todos os casos o anlodipino se mostrou incompatível com o amido, a olmesartana com o PVP e lactose, e a associação farmacêutica com amido, celulose, croscarmelose, estearato de magnésio, álcool polivinílico, PVP, lactose e PEG. A Tabela 22 resume os resultados obtidos para compatibilidade fármaco-excipiente pelas três técnicas.

Tabela 22 – Resultados dos testes de compatibilidade fármaco-excipiente utilizando DSC, FTIR-ATR e HPLC

	DSC	FTIR-ATR	HPLC
Anlodipino	Amido.	Amido, croscarmelose sódica, estearato de magnésio, álcool polivinílico, TiO <sub>2</sub> , PVP, lactose e PEG.	Amido e lactose.
Olmesartana	PVP e lactose.	Estearato de magnésio, álcool polivinílico, TiO <sub>2</sub> , PVP, lactose e PEG.	PVP e lactose.
Anlodipino e Olmesartana	-	Amido, celulose, croscarmelose sódica, estearato de magnésio, álcool polivinílico, TiO <sub>2</sub> , PVP, lactose e PEG.	Amido, croscarmelose sódica, estearato de magnésio, álcool polivinílico, talco, PVP, lactose e PEG.

Fonte: Do autor.

As técnicas de DSC, FTIR e HPLC são técnicas complementares que juntas fornecem dados com maior confiabilidade, trazendo mais segurança no desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas.

## 5 CONCLUSÕES GERAIS

A maioria dos trabalhos descritos na literatura envolvendo análises térmicas têm como finalidade a caracterização de materiais. Os trabalhos descritos nesta tese contribuíram na aplicação das técnicas termoanalíticas em áreas relativamente pouco exploradas pelas análises térmicas. Por meio da aplicação das análises térmicas na detecção e quantificação da adulteração do café por adição de milho e do estudo de pré-formulação farmacêutica do besilato de anlodipino e olmesartana medoxomila, foi possível explorar as potencialidades do TG e DSC.

As principais vantagens das análises térmicas é a necessidade de pequena quantidade de amostra (na ordem de mg), não precisar de preparo de amostra elaborado, ser relativamente rápida, e possuir baixo custo (equipamento e material de consumo).

A primeira aplicação permitiu detectar e quantificar o nível de adulteração do café com segurança. Apesar de o objetivo desta aplicação ser a detecção de fraude é possível verificar a potencialidade da aplicação do DSC para o controle de qualidade em setores industriais, para verificação de matérias primas, processo de preparo e produto acabado.

A segunda aplicação envolve o estudo de pré-formulação farmacêutica, o qual é exigido pelas autoridades sanitárias para a provação de uma nova formulação, seja ela um medicamento de referência, similar ou genérico. As análises térmicas se mostram promissoras nesta área por permitir a obtenção de resultados em prazos mais curtos.

Todos os procedimentos descritos, envolvendo outras técnicas, em ambas as aplicações mostraram que o TG, DSC, FTIR e HPLC são técnicas complementares que juntas fornecem dados com maior confiabilidade, tanto para emissão de laudos como para elaboração de novas formulações.



## REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. **Indicadores da Indústria de Café no Brasil**. Disponível em: <<http://www.abic.com.br/publicue/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=61#4178>>. Acesso em: 24 out. 2014.

AHUJA, S.; DONG., M. W. **Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC**. Oxford: Elsevier Academic Press, 2005. p. 600.

ALMELING, S.; ILKO, D.; HOLZGRABE, U. Charged aerosol detection in pharmaceutical analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 69, p. 50–63, 2012.

AMBONI, R. D. DE M. C.; FRANCISCO, A. DE; TEIXEIRA, E. Utilização de microscopia eletrônica de varredura para detecção de fraudes em café torrado e moído. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 3, p. 311–313, 1999.

ANJOS, O. et al. Application of FTIR-ATR spectroscopy to the quantification of sugar in honey. **Food Chemistry**, v. 169, p. 218–223, 2015.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JUNIOR, L. V. **Farmacotécnica: Formas Farmacêuticas e Sistema de Liberação de Fármacos**. 6. ed. São Paulo: Premier, 2000. p. 568.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **RE nº 1, de 29 de Julho de 2005: Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade**, 2005.

\_\_\_\_\_. **Lista A de Medicamentos de Referência**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/84b2d200484471dc99f5bdbdc15bfe28/Lista+A+05-05-2015.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 25 maio. 2015a.

\_\_\_\_\_. **Lista B de Medicamentos de Referência**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/b0f05080484472b999febdbdc15bfe28/Lista+B+05-05-2015.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 25 maio. 2015b.

AYALA, A. P. et al. Solid state characterization of olanzapine polymorphs using vibrational spectroscopy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 326, n. 1–2, p. 69–79, 1 dez. 2006.

AYALA, A. P. et al. Thermal stability of aripiprazole monohydrate investigated by Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 54, n. 2, p. 169–173, 18 nov. 2010.

BERNAL, C. et al. Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais - DSC. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 849–855, 2002.

BERNARDI, L. S. et al. Characterization of venlafaxine hydrochloride and compatibility studies with pharmaceutical excipients. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 97, n. 2, p. 729–733, 2009.

BOSQUE-SENDRA, J. M. et al. Combining chromatography and chemometrics for the characterization and authentication of fats and oils from triacylglycerol compositional data-A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 724, p. 1–11, 2012.

BOTELHO, B. G. et al. Development and analytical validation of a screening method for simultaneous detection of five adulterants in raw milk using mid-infrared spectroscopy and PLS-DA. **Food Chemistry**, v. 181, p. 31–37, 2015.

BRAGA, J. W. B. **Avaliação de Figuras de Mérito em Calibração Multivariada, Aplicada na Determinação de Carbamazepina por Espectroscopia no Infravermelho Próximo**. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2004.

BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Figures of merit for the determination of the polymorphic purity of carbamazepone by infrared spectroscopy and multivariate calibration. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, n. 8, p. 2124–2134, 2004.

BRERETON, R. G. **Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant**. Chichester: John Wiley & Sons, 2003. p. 504.

BRIANDET, R.; KEMSLEY, E. K.; WILSON, R. H. Approaches to adulteration detection in instant coffees using infrared spectroscopy and chemometrics. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 71, p. 359–366, 1996.

BROWN, M. E. **Introduction to Thermal Analysis: Techniques and Applications**. 2. ed. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2001. p. 280.

BROWN, M. E.; GALLAGHER, P. K. Recent Advances, Techniques and Applications. In: **Handbook of Thermal Analysis & Calorimetry**. Amsterdam: Elsevier, 2007. v. 5p. 780.

CONSELHO DOS EXPORTADORES DE CAFÉ DO BRASIL. **Exportações Brasileiras de Café 2015**. Disponível em: <<http://www.cecafe.com.br/dados-estatisticos/exportacoes-brasileiras/>>. Acesso em: 15 jan. 2016.

CESUR, S.; GOKBEL, S. Crystallization of mefenamic acid and polymorphs. **Crystal Research and Technology**, v. 43, n. 7, p. 720–728, 2008.

CHARTOFF, R.; SIRCAR, A. K. Thermal Analysis of Polymers. **Encyclopedia of Polymer Science and Technology**. John Wiley & Sons, 2004.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. p. 453

CORDELLA, C. et al. Use of differential scanning calorimetry (DSC) as a new technique for detection of adulteration in honeys. 1. Study of adulteration effect on honey thermal behavior. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 203–208, 2002.

CORDELLA, C. et al. Application of DSC as a tool for honey floral species characterization and adulteration detection. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 71, p. 279–290, 2003.

CRAIG, D. Q. M.; READING, M. **Thermal analysis of pharmaceuticals**. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis Group, 2007.

CRIADO, J. M.; PÉREZ-MAQUEDA, L. A.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, P. E. Dependence of the preexponential factor on temperature: Errors in the activation energies calculated by assuming that A is constant. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 82, p. 671–675, 2005.

DA SILVA, J. M. et al. Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de agrotóxicos em sedimentos por cromatografia gasosa monodimensional e bidimensional abrangente com micro detector de captura de elétrons. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 591–597, 2010.

DAHIMI, O. et al. Multivariate statistical analysis treatment of DSC thermal properties for animal fat adulteration. **Food Chemistry**, v. 158, p. 132–138, 2014.

DANDU, K. et al. Design, characterization and evaluation of polymorphism of amlodipine besylate. **International Journal of Biological & Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 1, p. 89–104, 2012.

DATTA, S.; GRANT, D. J. W. Crystal structures of drugs: advances in determination, prediction and engineering. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 1, p. 42–57, jan. 2004.

DE JONG, S. SIMPLS: an alternative approach to partial least squares regression. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 18, n. 3, p. 251–263, 1993.

DE JUAN, A.; TAULER, R. Multivariate Curve Resolution (MCR) from 2000: Progress in concepts and applications. **Critical reviews in analytical chemistry**, v. 36, n.3-4, p. 163-176, 2006.

DE LA MATA, P. et al. Olive oil assessment in edible oil blends by means of ATR-FTIR and chemometrics. **Food Control**, v. 23, n. 2, p. 449–455, 2012.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **International Conference on Harmonisation - Quality guidance documents**. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm065005.htm>>. Acesso em: 20 dez. 2012.

FENG, Y.; LEI, D.; HU, C. Rapid identification of illegal synthetic adulterants in herbal anti-diabetic medicines using near infrared spectroscopy. **Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 125, p. 363–74, 2014.

FERREIRA, M. M. C. et al. Chemometrics I: multivariate calibration, a tutorial. **Química Nova**, v. 22, p. 724–731, 1999.

GALLARDO-VELÁZQUEZ, T. et al. Application of FTIR-HATR spectroscopy and multivariate analysis to the quantification of adulterants in Mexican honeys. **Food Research International**, v. 42, n. 3, p. 313–318, 2009.

GARCIA, L. M. Z. et al. Chemometric evaluation of adulteration profile in coffee due to corn and husk by determining carbohydrates using HPAEC-PAD. **Journal of Chromatographic Science**, v. 47, n. October, p. 825–832, 2009.

GELADI, P.; KOWALSKI, B. R. Partial Least Squares Regression: a tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 185, p. 1–17, 1986.

GIRON, D. Contribution of thermal methods and related techniques to the rational development of pharmaceuticals—Part 1. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 1, n. 5, p. 191–199, 1998.

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO - SECRETARIA DA SAÚDE. **Medicamentos anti-hipertensivos**. Disponível em: <<http://www.saude.sp.gov.br/resources/ses/perfil/gestor/homepage//linhas-de-cuidado-sessp/hipertensao-arterial-sistemica/anexos/medicamentosanti-hipertensivos.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2015.

GROBÉRIO, T. S. et al. Discrimination and quantification of cocaine and adulterants in seized drug samples by infrared spectroscopy and PLSR. **Forensic Science International**, v. 257, p. 297–306, 2015.

GUILLARME, D.; VEUTHEY., J. L. **UHPLC in Life Sciences**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2012. p. 466.

HAINES, P. J. **Principles of Thermal Analysis and Calorimetry**. Manchester: Royal Society of Chemistry, 2002. p. 220.

HANSEN, P. W. Pre-processing method minimizing the need for reference analysis. **Journal of Chemometrics**, v. 15, p. 123–131, 2001.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 8. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2015. p. 898.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. **Specifications: Test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: Chemical substances Q6a**. 1999. Disponível em: <[http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q6A/Step4/Q6Astep4.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q6A/Step4/Q6Astep4.pdf)>. Acesso em: 15 dez. 2015.

IONASHIRO, M. **Giolito: Fundamentos de Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial/Calorimetria Exploratória Diferencial**. São Paulo: Giz, 2005. p. 80.

JAFARI, M.; KADIVAR, M.; KERAMAT, J. Detection of adulteration in Iranian olive oils using instrumental (GC, NMR, DSC) methods. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 86, p. 103–110, 2009.

JAIN, P. S. et al. Stability-indicating method for simultaneous estimation of olmesartan medoxomile, amlodipine besylate and hydrochlorothiazide by RP-HPLC in tablet dosage form. **Journal of Chromatographic Science**, v. 50, p. 680–687, 2012.

JAISWAL, P. et al. Detection and quantification of soymilk in cow-buffalo milk using Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared spectroscopy (ATR-FTIR). **Food chemistry**, v. 168, p. 41–7, 2015.

JAUMOT, J., et al. A graphical user-friendly interface for MCR-ALS: a new tool for multivariate curve resolution in MATLAB. **Chemometrics and intelligent laboratory systems**, v. 76, n.1, p. 101-110, 2005.

JAWAID, S. et al. Rapid detection of melamine adulteration in dairy milk by SB-ATR-Fourier transform infrared spectroscopy. **Food chemistry**, v. 141, n. 3, p. 3066–71, 2013.

JHAM, G. N. et al.  $\gamma$ -tocopherol as a marker of Brazilian coffee (*Coffea arabica* L.) adulteration by corn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 5995–5999, 2007.

JHAM, G. N. et al. The use of fatty acid profile as a potential marker for Brazilian coffee (*Coffea arabica* L.) for corn adulteration. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 8, p. 1462–1467, 2008.

JÚLIO, T. et al. Compatibility of sildenafil citrate and pharmaceutical excipients by thermal analysis and LC–UV. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 111, n. 3, p. 2037–2044, 2013.

KAPOOR, A. K. et al. **Polymorphic Form of Olmesartan Medoxomil**, 2010. Disponível em: <<http://www.ipaustralia.com.au/applicant/ranbaxy-laboratories-limited/patents/AU2010277221/>>. Acesso em: 15 dez. 2013.

KARABAS, I.; ORKOULA, M. G.; KONTOYANNIS, C. G. Analysis and stability of polymorphs in tablets: The case of Risperidone. **Talanta**, v. 71, n. 3, p. 1382–1386, 28 fev. 2007.

KUMAR, V. et al. Compatibility of atenolol with excipients: LC–MS/TOF characterization of degradation/interaction products, and mechanisms of their formation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, n. 4, p. 880–888, 1 maio 2009.

LARINI, L. **Fármacos e Medicamentos**. Porto Alegre: Artmed, 2008. p. 408.

LARKIN, P. J. **Infrared and Raman Spectroscopy: Principles and Spectral Interpretation**. Oxford: Elsevier, 2011. p. 230.

LAVOR, E. et al. Application of thermal analysis to the study of anti-tuberculosis drug compatibility. Part 1. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 108, n. 1, p. 207–212, 2012.

LI, X.; STREZOV, V.; KAN, T. Energy recovery potential analysis of spent coffee grounds pyrolysis products. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 110, p. 79–87, 2014.

LILTORP, K. et al. Solid state compatibility studies with tablet excipients using non thermal methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, n. 3, p. 424–428, 1 jun. 2011.

LIU, X. et al. Thermal-oxidative degradation of high-amylose corn starch. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 115, p. 659–665, 2014.

MANSOR, T. S. T.; MAN, Y. B. C.; SHUHAIMI, M. Employment of differential scanning calorimetry in detecting lard adulteration in virgin coconut oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, p. 485–496, 2012.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa nº16, de 24 de maio de 2010**. Disponível em: <[http://www.mpsp.mp.br/portal/page/portal/cao\\_consumidor/legislacao/leg\\_produtos\\_humano/IN-16-2010-MAPA.pdf](http://www.mpsp.mp.br/portal/page/portal/cao_consumidor/legislacao/leg_produtos_humano/IN-16-2010-MAPA.pdf)>. Acesso em: 05 nov. 2014.

MARIKKAR, J. M. N. et al. The use of cooling and heating thermograms for monitoring of tallow, lard and chicken fat adulterations in canola oil. **Food Research International**, v. 35, p. 1007–1014, 2002.

MAUER, L. J. et al. Melamine detection in infant formula powder using near- and mid-infrared spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 3974–3980, 2009.

MERCK CANADA INC. Olmetec - Product monograph. **Merck Canada Inc.**, p. 1–25, 2013.

MOHAMMED, J.; MARIKKAR, N.; RANA, S. Use of Differential Scanning Calorimetry to Detect Canola Oil ( *Brassica napus* L .) Adulterated with Lard Stearin. **Journal of Oleo Science**, v. 873, n. 9, p. 867–873, 2014.

MURAKAMI, F. S. et al. Physico-chemical solid-state characterization of omeprazole sodium: Thermal, spectroscopic and crystallinity studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, n. 1, p. 72–80, 15 jan. 2009.

MURAKAMI, T. et al. Identification of a degradation product in stressed tablets of olmesartan medoxomil by the complementary use of HPLC hyphenated techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, p. 553–559, 2008.

NOGUEIRA, T.; DO LAGO, C. L. Detection of adulterations in processed coffee with cereals and coffee husks using capillary zone electrophoresis. **Journal of Separation Science**, v. 32, p. 3507–3511, 2009.

OLIVEIRA, R. C. S. et al. Evaluation of the potential of SPME-GC-MS and chemometrics to detect adulteration of ground roasted coffee with roasted barley. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, p. 257–261, 2009.

OTTO, M. **Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry**. Weinheim: John Wiley & Sons, 2007. p. 328.

OZAWA, T. A New Method of Analyzing Thermogravimetric Data. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 38, n. 1952, p. 1881–1886, 1965.

PANI, N. et al. Application of DSC, IST, and FTIR study in the compatibility testing of nateglinide with different pharmaceutical excipients. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 108, n. 1, p. 219–226, 2012.



PATIL, K. R. et al. Stability indicating LC method for the simultaneous determination of amlodipine and olmesartan in dosage form. **Journal of Chromatographic Science**, v. 48, n. August, p. 601–606, 2010.

PFIZER CANADA INC. Norvasc - Product monograph. **Pfizer Canada Inc.**, p. 1–40, 2013.

PFIZER INC. Material safety data sheet - Olmesartan medoxomil/Amlodipine besylate Tablets. **Pfizer Canada Inc.**, p. 1–8, 2012.

PINEDA-GOÍMEZ, P.; ROSALES-RIVERA, A.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. E. Effect of the thermo-alkaline treatment over the thermal degradation of corn starch. **Starch/Staerke**, v. 64, p. 776–785, 2012.

PIZARRO, C.; ESTEBAN-DÍEZ, I.; GONZÁLEZ-SÁIZ, J. M. Mixture resolution according to the percentage of robusta variety in order to detect adulteration in roasted coffee by near infrared spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 585, p. 266–276, 2007.

QI, W. Y. et al. Simultaneous determination of olmesartan and amlodipine in human plasma and urine by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 938, p. 27–34, 2013.

QUINONES-ISLAS, N. et al. Detection of adulterants in avocado oil by Mid-FTIR spectroscopy and multivariate analysis. **Food Research International**, v. 51, n. 1, p. 148–154, 2013.

QUTAB, S. S. et al. Simultaneous Quantitation of Olmesartan Medoxomil and Amlodipine Besylate in Combined Tablets Using HPLC. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 3, p. 234–237, 2009.

RAVN, C.; SKIBSTED, E.; BRO, R. Near-infrared chemical imaging (NIR-CI) on pharmaceutical solid dosage forms—Comparing common calibration approaches. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, n. 3, p. 554–561, 2008.

REICH, G. Near-infrared spectroscopy and imaging: Basic principles and pharmaceutical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 8, p. 1109–1143, 15 jun. 2005.

REIS, N.; FRANCA, A. S.; OLIVEIRA, L. S. Discrimination between roasted coffee, roasted corn and coffee husks by Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, p. 715–722, 2013a.

REIS, N.; FRANCA, A. S.; OLIVEIRA, L. S. Performance of diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy and chemometrics for detection of multiple adulterants in roasted and ground coffee. **LWT - Food Science and Technology**, v. 53, p. 395–401, 2013b.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

ROCHA, W. F. DE C. et al. Quantitative analysis of piroxicam polymorphs pharmaceutical mixtures by hyperspectral imaging and chemometrics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 106, n. 2, p. 198–204, 2011.

ROONEY, J. S. et al. Evaluation of vibrational spectroscopic methods to identify and quantify multiple adulterants in herbal medicines. **Talanta**, v. 138, p. 77–85, 2015.

SCANSCI. **Análise Termogravimétrica Simultânea**. Disponível em: <<http://www.scansci.pt/produto/analise-termica/STA>>. Acesso em: 20 nov. 2016.

SENA, M. M.; TREVISAN, M. G.; POPPI, R. J. PARAFAC: Uma ferramenta quimiométrica para tratamento de dados multidimensionais. Aplicações na determinação direta de fármacos em plasma humano por espectrofluorimetria. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 910–920, 2005.

SHAH, S. et al. Simultaneous quantitative analysis of olmesartan medoxomil and amlodipine besylate in plasma by high-performance liquid chromatography technique. **Journal of Young Pharmacists**, v. 4, n. 2, p. 88, 2012.

SHAMSIPUR, M. et al. Thermal Stability and Decomposition Kinetic Studies of Acyclovir and Zidovudine Drug Compounds. **AAPS PharmSciTech**, v. 14, n. 1, p. 287–293, 2013.

SILVA, A. C. M. et al. Thermal stability and thermal decomposition of the antihypertensive drug amlodipine besylate. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 120, n. 1, p. 889–892, 2015.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007. p. 490.

SINGH, A. et al. A Rapid Stability-Indicating LC Method for Ziprasidone Hydrochloride. **Chromatographia**, v. 65, n. 3, p. 191–196, 2007.

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

SOARES, M. et al. Thermal characterization of antimicrobial drug ornidazole and its compatibility in a solid pharmaceutical product. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 104, n. 1, p. 307–313, 2011.

SOVIZI, M. R.; HOSSEINI, S. G. Studies on the thermal behavior and decomposition kinetic of drugs cetirizine and simvastatin. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 111, p. 2143–2148, 2013.

TALLI, C. C. **Das Novas Descobertas da Física Moderna à Nossa Alma**. São Paulo: Biblioteca24horas, 2009

TAULER, R.; SMILDE, A.; KOWALSKI, B. Selectivity, local rank, three way data analysis and ambiguity in multivariate curve resolution. **Journal of chemometrics**, v. 9, p. 31-58, 1995.

TAVARES, K. M. et al. Espectroscopia no infravermelho médio e análise sensorial aplicada à detecção de adulteração de café torrado por adição de cascas de café. **Química Nova**, v. 35, n. 6, p. 1164–1168, 2012.

THERMO SCIENTIFIC. **Charged Aerosol Detection Measures Charge Not Analytes**. Disponível em: <<http://www.dionex.com/static/flash/corona-veo/index.html>>. Acesso em: 2 abr. 2015.

TIȚA, B. et al. Compatibility study between ketoprofen and pharmaceutical excipients used in solid dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, n. 2, p. 221–227, 10 set. 2011.

TOMASZEWSKA-GRAS, J. Detection of butter adulteration with water using differential scanning calorimetry. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 108, p. 433–438, 2012.

TONETTI, C. et al. Differential scanning calorimetry for the identification of animal hair fibres. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 119, p. 1445–1451, 2015.

TORRECILLA, J. S. et al. Quantification of adulterant agents in extra virgin olive oil by models based on its thermophysical properties. **Journal of Food Engineering**, v. 103, p. 211–218, 2011.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Coffee: World Markets and Trade**. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/coffee.pdf>>. Acesso em: 12 jun. 2016.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. Amlodipine Besylate Tablets. **The United States Pharmacopeial Convention**, 2011.

VEHOVEC, T.; OBREZA, A. Review of operating principle and applications of the charged aerosol detector. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 10, p. 1549–1556, 5 mar. 2010.

WETTEN, I. A VAN et al. Oil Analysis by Fast DSC. **Procedia Engineering**, v. 87, p. 280–283, 2014.

WETTEN, I. A. VAN et al. Detection of sunflower oil in extra virgin olive oil by fast differential scanning calorimetry. **Thermochimica Acta**, v. 603, p. 237–243, 2015.

WHO. **The Importance of Pharmacovigilance: Safety Monitoring of Medicinal Products**, 2002.

WISE, B. M., ET AL. **Chemometrics Tutorial for PLS\_Toolbox and Solo**. Wenatchee: Eigenvector Research, 2006. p. 414.

XU, L. et al. Rapid and nondestructive detection of multiple adulterants in kudzu starch by near infrared (NIR) spectroscopy and chemometrics. **LWT - Food Science and Technology**, v. 61, p. 590–595, 2015.

YOSHIDA, M. I. et al. Thermal characterization of lovastatin in pharmaceutical formulations. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 106, n. 3, p. 657–664, 2011.

ZHAO, M.; DOWNEY, G.; O'DONNELL, C. P. Detection of adulteration in fresh and frozen beefburger products by beef offal using mid-infrared ATR spectroscopy and multivariate data analysis. **Meat Science**, v. 96, n. 2, p. 1003–1011, 2014.