



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Guilherme Davi Aschar

**Estudo de pré-formulação de Ramipril comprimidos,
avaliação da interação entre fármaco e excipientes e
elucidação das vias de degradação**

CAMPINAS

2017

Guilherme Davi Aschar

**ESTUDO DE PRÉ-FORMULAÇÃO DE RAMIPRIL
COMPRIMIDOS, AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO
ENTRE FÁRMACO E EXCIPIENTES E ELUCIDAÇÃO
DAS VIAS DE DEGRADAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em biociências e tecnologia de produtos bioativos na área de fármacos, medicamentos e insumos para saúde.

Orientador: PAULO CÉSAR PIRES ROSA

O arquivo digital corresponde à versão final da dissertação defendida pelo aluno Guilherme Davi Aschar e orientada pelo Dr. Paulo César Pires Rosa.

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

Aschar, Guilherme Davi, 1987-
As23e Estudo de pré-formulação de ramipril comprimidos, avaliação da interação entre fármaco e excipientes e elucidação das vias de degradação / Guilherme Davi Aschar. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Paulo César Pires Rosa.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Ramipril. 2. Diketopiperazinas. 3. Análise cromatográfica. 4. Composição de medicamentos. 5. Degradação forçada. I. Rosa, Paulo César Pires, 1976-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Preformulation study of ramipril tablets, evaluation of interaction between drug and excipients and elucidation of degradation routes

Palavras-chave em inglês:

Ramipril

Diketopiperazine

Chromatographic analysis

Drug compounding

Stress testing

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde

Titulação: Mestre em Ciências

Banca examinadora:

Paulo César Pires Rosa [Orientador]

Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya

Gislaine Ricci Leonardi

Data de defesa: 08-06-2017

Programa de Pós-Graduação: Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

Campinas, 08/06/2017.

Comissão Examinadora de Defesa

Prof. Dr. Paulo César Pires Rosa (orientador)

Profa. Dra. Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya

Profa. Dra. Gislaine Ricci Leonardi

Observação: Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

*“O saber se aprende com os mestres
e com os livros. A sabedoria se aprende
é com a vida e com os humildes.”*

Cora Coralina

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus, que me possibilitou a oportunidade e o interesse em realizar esse trabalho.

Aos meus pais, Sergio e Cidinha, por transmitirem valores não só por palavras, mas com exemplo de vida, e por me fazerem acreditar que seria capaz de vencer os desafios.

À minha esposa Alyne, pelo companheirismo e por me encorajar a seguir em frente, me apoiando sempre.

À minha filha Clara, que desde que entrou na minha vida, deu mais sentido a tudo, transformando dificuldades em desafios, fortalecendo minha vontade de vencer e realizar meus objetivos e me possibilitou conhecer o amor incondicional.

Aos meus irmãos Juliana e Sergio e a todos meus familiares, pelo amor, carinho e por apoiar, torcer e vibrar pelas minhas conquistas.

Aos meus amigos que me ajudaram, apoiaram e tornam minha vida mais feliz.

Aos professores Dra. Priscila Mazzola, Dr. Francisco Pessine e Dr. Marcos Salvador, pelas contribuições durante a qualificação do projeto de pesquisa e a disponibilidade, as professoras Dra. Lucildes Mercuri, Dra. Maria Teresa Clerici e novamente Dra. Priscila G. Mazzola pelas contribuições no exame de análise prévia e às professoras Dra. Alexandra Sawaya e Dra. Gislaine Leonardi, por aceitarem participar do exame de defesa.

À indústria de medicamentos Medley Farmacêutica, especialmente à Flávia Bonetti e Mário Braga, pelos ensinamentos sobre formulação e tecnologia farmacêutica.

Por fim, e não menos importante, eu agradeço imensamente ao Prof. Dr. Paulo Cesar Pires Rosa, pela oportunidade e por todos os ensinamentos e direcionamentos. Sem você me orientando e apoiando, com certeza, este projeto jamais seria concretizado.

Muito obrigado a todos vocês!

RESUMO

O Ramipril é um anti-hipertensivo muito eficaz e amplamente utilizado por ser indicado no tratamento de casos de hipertensão em pacientes pós-infarto do miocárdio e/ou com complicações renais. Estudos indicam que esse fármaco apresenta considerável grau de instabilidade frente a algumas condições de estresse, fabricação e armazenagem. Diante disso, surgiu a motivação de elucidar a etapa de pré-formulação de medicamentos contendo o fármaco Ramipril, sendo realizado um estudo com análises cromatográficas de teor e impurezas que auxiliam na interpretação dos dados de análises térmicas, possibilitando uma investigação mais concisa que à presente na literatura até o momento. Para garantir a confiabilidade dos resultados, foi realizado um estudo de validação parcial da metodologia farmacopeica empregada para quantificar o ativo e as impurezas, obtendo-se dados de seletividade, linearidade, exatidão e precisão que comprovam que o método é adequado para a finalidade pretendida. A fim de se verificar quais as vias de degradação e os principais produtos de degradação formados quando o Ramipril é submetido às condições de estresse, realizou-se o estudo de degradação forçada, demonstrando que o Ramipril é muito sensível à hidrólise básica, ocorrendo formação do Ramiprilato e à degradação por aquecimento, formando o Ramipril dicetopiperazina. Foram preparadas misturas de Ramipril com excipientes que foram analisadas logo após preparo e depois de serem expostas a 40 °C e 75% de umidade relativa por três meses e seis meses. Os resultados mostraram que os excipientes estudados não apresentaram interações prejudiciais para a estabilidade da formulação, portanto eles são adequados para o uso em formas farmacêuticas sólidas contendo Ramipril. Não se obteve nenhuma evidência de que misturas prévias com determinados excipientes podem aumentar a estabilidade do produto. O fármaco estudado mostrou-se extremamente sensível ao aquecimento e a umidade, podendo ocasionar a ciclização e a hidrólise do fármaco, respectivamente, por isso recomenda-se evitar processos de granulação via úmida, que necessitam de secagem por aquecimento e o uso de embalagens condutoras de calor como alumínio, sendo preferível o uso de plásticos com baixa permeabilidade e evitar o uso de excipientes higroscópicos em formulações contendo Ramipril.

PALAVRAS-CHAVE: Ramipril, Ramipril Dicetopiperazina, Ramiprilato, Pré-formulação, Degradação forçada.

ABSTRACT

Ramipril is an important antihypertensive, indicated for the treatment of hypertension cases in post-myocardial infarction patients and/or renal complications. This drug, however, has considerable instability degree in some stress conditions. This information led to elucidate the stage of pre-formulation the medicament containing Ramipril, and a study with assay and impurities chromatographic analyzes that can auxiliary in the interpretation of the thermal analysis results, it was enabling a research much more complete than the present in literature today. To ensure to confiability of results, it was performed a partial validation study of pharmacopoeial methodology used for quantifying the active and impurities, with date of selectivity, linearity, accuracy and precision which prove that the method is suitable for the intended purpose. In order to check which degradation pathways and major degradation products formed when ramipril is submitted to stress conditions, it was conduced out the study of forced degradation, demonstrating that the Ramipril is very sensitive to basic hydrolysis occurring formation to ramiprilat and thermal degradation occurring formation to Diketopiperazine. Ramipril mixtures with excipients that were prepared and analyzed immediately after preparation, and after exposure to 40 °C and 75% RH for three and six months. The excipients studied do not have any detrimental interactions for the formulation stability, therefore they are suitable for use in solid pharmaceutical forms containing Ramipril. There was obtained no evidence that premixes with certain excipients may increase the stability of the product. The study drug was shown to be extremely sensitive to heat and humidity can cause its hydrolysis, so it is recommended to avoid using conductive packing heat like aluminum, being preferred the use of plastics with low permeability. It is important to avoid the use of excipients hygroscopic in formulations containing ramipril.

KEYWORDS: *Ramipril, Ramipril Diketopiperazine, Ramiprilate, Pre-formulation and Stress testing.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do Ramipril.	19
Figura 2: Estrutura química do Ramipril diácido (Ramiprilato).	20
Figura 3: Reação de hidrólise do Ramipril com formação do Ramipril diácido.	20
Figura 4: Estrutura química do Ramipril Diketopiperazina (DKP).	21
Figura 5: Reação de ciclização do Ramipril com formação do Ramipril DKP.	21
Figura 6: Diferentes tipos de estudo de compatibilidade.	24
Figura 7: Cromatograma obtido com a solução padrão mix	46
Figura 8: Cromatograma obtido com a solução diluente (fase móvel)	47
Figura 9: Gráfico 3D de 200 a 400 nm obtido com a solução Diluente	47
Figura 10: Cromatograma obtido com a solução placebo	47
Figura 11: Gráfico 3D de 200 a 400 nm obtido com a solução placebo	48
Figura 12: Cromatograma obtido com a solução de Insumo Farmacêutico Ativo (API) Ramipril	48
Figura 13: Espectro Ultravioleta (UV) de 200 a 400 nm e pureza de pico do Insumo Farmacêutico Ativo (API) Ramipril	48
Figura 14: Gráfico 3D de 200 a 400 nm do Insumo Farmacêutico Ativo (API) Ramipril	48
Figura 15: Cromatograma obtido com a solução de CRA fornecido pela USP	49
Figura 16: Espectro Ultravioleta (UV) de 200 a 400 nm obtido com a solução de CRA fornecido pela USP	49
Figura 17: Gráfico 3D de 200 a 400 nm obtido com a solução de CRA fornecido pela USP	49
Figura 18: Cromatograma obtido com a solução de Imp K fornecido pela PGS	49
Figura 19: Espectro Ultravioleta (UV) de 200 a 400 nm obtido com a solução de Imp K fornecido pela PGS	50
Figura 20: Gráfico 3D de 200 a 400 nm obtido com a solução de Imp K fornecido pela PGS	50
Figura 21: Cromatograma obtido com a solução de CRD fornecido pela USP	50
Figura 22: Espectro Ultravioleta (UV) de 200 a 400 nm obtido com a solução de CRD fornecido pela USP	50
Figura 23: Gráfico 3D de 200 a 400 nm obtido com a solução de CRD fornecido pela USP	51

Figura 24: Cromatograma obtido com a solução Mix de Ramipril, CRA, CRD e Imp K fornecido pela PGS _____	51
Figura 25: Pureza de pico do Ramipril de 200 a 400 nm obtido com a solução de Mix de Ramipril, CRA, CRD e Imp K fornecido pela PGS _____	51
Figura 26: Gráfico 3D de 200 a 400 nm obtido com a solução de Mix de Ramipril, CRA, CRD e Imp K fornecido pela PGS _____	51
Figura 27: Cromatogramas da degradação forçada _____	53
Figura 28: Curva analítica experimental de Ramipril de 80 a 120% _____	57
Figura 29: Gráfico de resíduos de ramipril de 80 a 120% _____	57
Figura 30: Curva analítica experimental de ramipril de 0,5% a 7,5% _____	59
Figura 31: Gráfico de resíduos da linearidade nível de Impurezas _____	59
Figura 32: Cromatograma da solução padrão mix para avaliação do sistema _____	62
Figura 33: Curva de DSC do Ramipril _____	66
Figura 34: Curva de TGA do Ramipril _____	66
Figura 35: Curva de DSC da Celulose Microcristalina _____	67
Figura 36: Curva de TGA da Celulose Microcristalina _____	67
Figura 37: Curva de DSC do Estearilfumarato de sódio _____	68
Figura 38: Curva de TGA do Estearilfumarato de sódio _____	68
Figura 39: Curva de DSC da Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) _____	69
Figura 40: Curva de TGA da Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) _____	69
Figura 41: Curva de DSC da Lactose _____	70
Figura 42: Curva de TGA da Lactose _____	70
Figura 43: Curvas de DSC da mistura A (Ramipril: Celulose) _____	71
Figura 44: Curvas de TGA da mistura A (Ramipril: Celulose) _____	71
Figura 45: Curvas de DSC da mistura B (Ramipril: Est. Fum. Sódio) _____	71
Figura 46: Curvas de TGA da mistura B (Ramipril: Est. Fum. Sódio) _____	72
Figura 47: Curvas de DSC da mistura C (Ramipril: HPMC) _____	74
Figura 48: Curvas de TGA da mistura C (Ramipril: HPMC) _____	74
Figura 49: Curvas de DSC da mistura D (Ramipril: Lactose) _____	75
Figura 50: Curvas de TGA da mistura D (Ramipril: Lactose) _____	75
Figura 51: Curvas de DSC da mistura E (Ramipril: Celulose: Est. Fum. Sódio) _____	76
Figura 52: Curvas de TGA da mistura E (Ramipril: Celulose: Est. Fum. Sódio) _____	76
Figura 53: Curvas de DSC da mistura F (Ramipril: Celulose: HPMC) _____	77
Figura 54: Curvas de TGA da mistura E (Ramipril: Celulose: HPMC) _____	77

Figura 55: Curvas de DSC da mistura G (Ramipril: Celulose: Lactose)	78
Figura 56: Curvas de TGA da mistura G (Ramipril: Celulose: Lactose)	78
Figura 57: Curvas de DSC da mistura H (Ramipril: Est. Fum. Sódio: HPMC)	79
Figura 58: Curvas de TGA da mistura H (Ramipril: Est. Fum. Sódio: HPMC)	79
Figura 59: Curvas de DSC da mistura I (Ramipril: Est. Fum. Sódio: Lactose)	80
Figura 60: Curvas de TGA da mistura I (Ramipril: Est. Fum. Sódio: Lactose)	80
Figura 61: Curvas de DSC da mistura J (Ramipril: HPMC: Lactose)	81
Figura 62: Curvas de TGA da mistura J (Ramipril: HPMC: Lactose)	81
Figura 63: Curvas de DSC da mistura K (Ramipril: CMC: Est. Fum.: HPMC)	82
Figura 64: Curvas de TGA da mistura K (Ramipril: CMC: Est. Fum.: HPMC)	82
Figura 65: Curvas de DSC da mistura L (Ramipril: CMC: Est. Fum.: Lactose)	83
Figura 66: Curvas de TGA da mistura L (Ramipril: CMC: Est. Fum.: Lactose)	83
Figura 67: Curvas de DSC da mistura M (Ramipril + CMC+ HPMC + Lactose)	84
Figura 68: Curvas de TGA da mistura M (Ramipril + CMC+ HPMC + Lactose)	84
Figura 69: Curvas de DSC da mistura N (Ramipril + Est. + HPMC + Lactose)	85
Figura 70: Curvas de TGA da mistura N (Ramipril + Est. + HPMC + Lactose)	85
Figura 71: Curvas de DSC da mistura O (Ramipril: Est.: CMC: HPMC: Lactose)	86
Figura 72: Curvas de TGA da mistura O (Ramipril: Est.: CMC: HPMC: Lactose)	86
Figura 73: Curvas de DSC da mistura P [(Ram: HPMC): Est. + CMC + Lac]	87
Figura 74: Curvas de TGA da mistura P [(Ram: HPMC): Est. + CMC + Lac]	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Impurezas, nomenclatura nos compêndios e estrutura química	16
Tabela 2: Dados dos Reagentes, Excipientes e Insumo Farmacêutico Ativo.	27
Tabela 3: Padrões de Referência.	27
Tabela 4: Excipientes e suas funções	28
Tabela 5: Tempos de retenção relativos das impurezas.	30
Tabela 6: Critérios de aceitação de adequação do sistema	31
Tabela 7: Preparo das soluções padrão de Ramipril para avaliação da linearidade ao nível de teor.	34
Tabela 8: Preparo das soluções padrão de Ramipril para avaliação da linearidade ao nível de impurezas	34
Tabela 9: Preparo das soluções placebo fortificadas com Ramipril para avaliação da exatidão ao nível de teor	35
Tabela 10: Preparo de amostras de Ramipril comprimidos para avaliação da precisão	36
Tabela 11: Preparo das soluções degradantes	39
Tabela 12: Proporção dos componentes nas misturas de ramipril com os excipientes, onde Ram (Ramipril), Cel (Celulose microcristalina), Est (Estearilfumarato de sódio), Hip (hipromelose ou hidroxipropilmetilcelulose), Lac (Lactose monohidratada).	42
Tabela 13: Resultados de pureza de pico	55
Tabela 14: Resultados analíticos da linearidade ao nível de teor	56
Tabela 15: Resultados analíticos da linearidade ao nível de impurezas	58
Tabela 16: Resultados da Exatidão	60
Tabela 17: Intervalo (teor)	60
Tabela 18: Resultados da precisão	61
Tabela 19: Resultados da adequação do sistema	63
Tabela 20: Concentrações das soluções de referência	63
Tabela 21: Teor de ramipril (%) das misturas de ramipril + excipientes.	64
Tabela 22: Resultados de Impureza D (EP) nas amostras recém-preparadas e nas amostras expostas em estudo de estabilidade.	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ECA – Enzima Conversora da Angiotensina
ANVISA– Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DKP – Ramipril Dicetopiperazina
CV– Coeficiente de Variação
DP– Desvio Padrão
DPR – Desvio Padrão Relativo
DSC – Calorimetria Diferencial de Varredura
TGA – Análise Termogravimétrica
HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CRA – Composto Relacionado A
CRD – Composto Relacionado D
Imp K – Impureza K
mW - Miliwatts
FDA – Administração de Medicamentos e Alimentos
EMA – Agência de Medicamentos da Europa
FB – Farmacopeia Brasileira
BP – Farmacopeia Britânica
EP – Farmacopeia Européia
USP – Farmacopeia dos Estados Unidos
UV – Ultravioleta
IV - Infravermelho
RDC – Resolução da Diretoria Colegiada
RE – Resolução
CP – Consulta Pública
DAD – Detector com Arranjo de Fotodiodos
R – Resolução
N – Número de Pratos Teóricos
T – Fator de Assimetria (Tailing Factor)
K' – Fator de capacidade
IFA – Insumo Farmacêutico Ativo
F – Fármaco
E – Excipiente
Ram – Ramipril
Cel – Celulose Microcristalina
Est – Estearil Fumarato de Sódio
HPMC – Hidroxipropilmetilcelulose
Lac – Lactose Monohidratada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 Hipertensão arterial	20
2.2 Fármaco ramipril.....	20
2.3 Impurezas	21
2.4 Produtos de degradação do ramipril e suas principais vias de formação ..	22
2.5 Regulamentação Sanitária	26
2.5.1 Estudo de estabilidade	26
2.5.2 Produtos de degradação	27
2.5.3 Validação Analítica.....	28
2.6 Excipientes e formulações.....	28
2.7 Métodos instrumentais utilizados	31
2.7.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	31
2.7.2 Análise Térmica.....	32
2.7.2.1 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	32
2.7.2.2 Análise Termogravimétrica (TGA)	32
2.7.2.3 Estudo de compatibilidade fármaco x excipiente	33
3. OBJETIVOS	36
3.1 Objetivos gerais	36
3.2 Objetivos específicos	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1 Equipamentos e coluna cromatográfica.....	37
4.2 Reagentes, Excipientes e Insumo Farmacêutico Ativo	38
4.3 Padrões de Referência	38
4.4 Excipientes.....	39
4.5 Determinação de Teor e Substâncias Relacionadas por HPLC.....	39
4.5.1 Preparo das soluções amostra	40
4.5.2 Preparo das soluções padrão	40
4.5.3 Preparo da solução de sensibilidade	41
4.5.4 Preparo da solução de identificação dos picos e resolução	41
4.5.5 Identificação das impurezas e tempos de retenção relativos	41
4.5.6 Avaliação da adequação do sistema cromatográfico	42

4.5.7	Preparo da fase móvel	43
4.5.8	Condições cromatográficas	43
4.5.9	Otimização da metodologia.....	43
4.5.10	Cálculos de Teor e Impurezas	44
4.6	Validação parcial da metodologia	45
4.6.1	Linearidade	45
4.6.2	Exatidão	46
4.6.3	Precisão	48
4.6.4	Seletividade e Especificidade	49
4.6.4.1	Preparo das soluções da seletividade	50
4.6.4.2	Avaliação das soluções da seletividade	50
4.6.5	Degradação forçada.....	50
4.6.5.1	Preparo das soluções degradantes	51
4.6.5.2	Preparo das soluções amostra.....	51
4.6.5.3	Avaliação das soluções da degradação forçada	53
4.6.6	Metodologia para determinação de Umidade	53
4.6.7	Estudo de interação Fármaco x Excipiente	53
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1	Adequabilidade da metodologia BP2015.....	56
4.2	Seletividade e Especificidade.....	57
4.2.1	Soluções de diluente, placebo, IFA e padrões de referência	57
4.2.2	Degradação forçada.....	63
4.3	Validação parcial da metodologia BP2015 de Substâncias relacionadas para doseamento de Ramipril	66
4.3.1	Linearidade	66
4.3.2	Exatidão	70
4.3.3	Intervalo para determinação de teor.....	70
4.3.4	Precisão	71
4.4	Análises de Teor e Substâncias Relacionadas por HPLC.....	72
4.4.1	Adequação do sistema	72
4.4.2	Análise térmica por DSC e TGA.....	77
4.4.2.1	Ramipril.....	77
4.4.2.2	Celulose Microcristalina.....	78
4.2.1.1	Estearilfumarato de sódio	79

4.2.1.1	Hidroximetilpropilcelulose (HPMC)	81
4.2.1.1	Lactose Monohidratada.....	82
4.2.1.2	Mistura de Ramipril + CMC	83
4.2.1.3	Mistura de Ramipril + Estearilfumarato de sódio.....	85
4.2.1.4	Mistura de Ramipril + Hidroxipropilmetilcelulose.....	86
4.2.1.5	Mistura de Ramipril + Lactose monohidratada	87
4.2.1.6	Misturas ternárias	89
4.2.1.7	Misturas quaternárias.....	96
4.2.1.8	Formulações completas	101
5.	CONCLUSÃO.....	104
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS.....	106
	ANEXOS	111

1. INTRODUÇÃO

Segundo guias do International Council for Harmonisation (ICH), regido pelo *Food and Drugs Administration* (FDA), para garantir que os medicamentos apresentem as características físico-químicas e microbiológicas que proporcionem o efeito esperado, com segurança e eficácia, são normatizados diversos atributos de qualidade, sendo exigidos documentos que comprovem a identidade, quantidade de ativo, pureza, toxicidade e desempenho dos medicamentos, através de testes *in vitro* e *in vivo*, desde a etapa de desenvolvimento aos estudos de estabilidade, para obtenção do registro do produto e autorização para sua fabricação.¹

Lawrence et al (2017) relembra de casos catastróficos de desvios de qualidade em medicamentos e discute o que temos para o futuro da qualidade de medicamentos, A talidomida e a heparina marcaram a história e levaram a danos terríveis, no primeiro caso devido ao isômero do ativo apresentar efeito teratogênico, e no segundo caso, por não ocasionar o efeito anticoagulante esperado. Tudo isso deveu-se à falta de conhecimento na etapa de desenvolvimento do produto, irresponsabilidade ou mesmo por negligência de empresas.

Hamburg (2012) relata que 50 anos após ocorridos os casos acima citados a legislação está muito mais rigorosa para garantir a qualidade, segurança e eficácia dos medicamentos. As pessoas que procuram auxílio médico já se encontram debilitadas, e de forma alguma podem estar expostas a produtos que apresentem risco ou que não promovam a melhora esperada com o tratamento.³

Lagace et al (2004) discutem que durante a etapa de desenvolvimento de produtos farmacêuticos, é fundamental conhecer todas as características do princípio ativo, mas muitos problemas encontrados em estudos de estabilidade e testes de desempenho do produto podem estar relacionados aos excipientes que, apesar de terem caráter inerte, podem comprometer à qualidade do produto. No teste de dissolução podem ocorrer problemas com a liberação do fármaco se forem empregados excipientes que formem cone e/ou que apresentem características hidrofóbicas, diminuindo a acessibilidade do meio de dissolução às partículas de fármaco e retardando sua dissolução.⁴

De acordo com Bharate et al (2010), existem relatos de casos de queda de teor e formação de impurezas em medicamentos durante o estudo de estabilidade por serem usados excipientes inadequados ou incompatíveis com a formulação. Isso pode ocorrer por apresentarem características oxidantes e/ou higroscópicos, ocasionando a decomposição do princípio ativo.

A ordem de adição dos componentes da formulação também pode influenciar na qualidade do produto, como no caso do lorazepam, citado por Bereuter (2007), em que o ativo precisa estar em contato íntimo com a polacrilina potássica, sendo misturado previamente, e depois adicionados os outros componentes da formulação. Alguns excipientes, como a povidona, podem funcionar como uma barreira física no insumo farmacêutico ativo, impedindo ou minimizando sua degradação e tornando-o mais estável. ⁶

De acordo com Sahitya et al (2012), os estudos de pré-formulação geram dados relevantes, permitindo mitigar possíveis interações dos princípios ativos com excipientes e entender as principais vias de degradação do fármaco. Isso possibilita escolher os excipientes, as embalagens e os processos de fabricação mais adequados para o produto, reduzindo os riscos de que o medicamento em desenvolvimento não atenda aos requisitos de qualidade, realizando os cuidados necessários durante o processo de fabricação e armazenagem. Dessa forma é possível produzir medicamentos com maior prazo de validade, mapear características relevantes dos componentes da formulação, especialmente relacionados à sensibilidade do ativo em determinadas condições de estresse e processos, tornando-se possível eleger os mais adequados excipientes, processos de fabricação e materiais de embalagens para o produto. ⁷

Atualmente o ramipril é amplamente utilizado, especialmente em casos de pacientes com complicações, como insuficiência cardíaca congestiva e limitações renais, por ser extremamente eficiente no controle da hipertensão, especialmente por não causar efeito na musculatura cardíaca. Contudo, estudos indicam que o ramipril apresenta considerável grau de instabilidade, podendo sofrer degradação pelo aquecimento, formando o ramipril dicetopiperazina, e também pela hidrólise, formando o ramipril diácido. O ativo é bastante sensível, sendo que o processo de

compressão pode ocasionar formação de impurezas devido ao aquecimento do punção.^{8,9}

Diante da fragilidade da molécula de ramipril, que pode colocar em dúvida a segurança das formulações contendo essa substância, e da escassez de publicações de estudos concisos, contendo dados de análise térmica complementados com a avaliação de teor e impurezas por cromatografia, surgiu à motivação de desenvolver este estudo de pré-formulação, a fim de estabelecer com segurança quais os excipientes, processos de fabricação e embalagens são mais adequadas para produtos contendo esse fármaco.¹⁰

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Hipertensão arterial

A hipertensão arterial é causada por fatores que aumentam a resistência do sangue ao circular nas artérias, causando a elevação dos níveis de pressão sanguínea, fazendo com que o coração tenha que exercer um esforço maior do que o normal para realizar a circulação do sangue através dos vasos sanguíneos. Com esse esforço excessivo, a musculatura do coração tende a aumentar, além de aumentar os riscos de ocorrer um acidente vascular cerebral, enfarte agudo do miocárdio, aneurisma, insuficiência renal, dentre outras complicações, diminuindo a expectativa de vida.⁸

2.2 Fármaco ramipril

O ramipril (Figura 1) é o pró-fármaco de seu metabólito ativo, o ramiprilato. Enzimas hepáticas do tipo esterases realizam a conversão do ramipril em ramiprilato. A absorção desse metabólito ocorre de forma rápida, alcançando máxima concentração plasmática três horas após sua ingestão. O ramiprilato inibe a enzima conversora de angiotensina - ECA (Dipeptidilcarboxipeptidase I), causando efeito farmacológico vasodilatador e reduzindo a pressão arterial. O ramipril é utilizado no tratamento de quadros de hipertensão associados à insuficiência cardíaca congestiva, indicado para pacientes pós-infarto do miocárdio e/ou com complicações renais, por isso tem significativa importância clínica frente aos outros anti-hipertensivos. Sua excreção é feita pelos rins, após a conversão em ramiprilato e em alguns metabólitos inativos. A dose diária oral do ramipril varia de 1,25 mg a 20 mg, podendo ser ingestão única ou fracionada.⁹

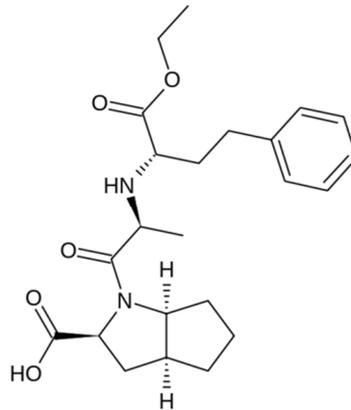


Figura 1: Estrutura química do ramipril.

O ramipril está disponível nas formas farmacêuticas de comprimidos e cápsulas, e também em associações contendo ramipril com Hidroclorotiazida e ramipril com Besilato de Anlodipino.^{10,11}

Também estão disponíveis medicamentos genéricos, que tem sua equivalência terapêutica comprovada por um conjunto de testes “*in vitro*” (equivalência farmacêutica) e “*in vivo*” (bioequivalência), e são mais acessíveis, tendo o preço reduzido no mínimo em 35%.¹²

2.3 Impurezas

Pode-se definir impureza como qualquer substância que não seja o Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) e excipientes presentes na formulação. As impurezas podem ser classificadas como Impurezas Orgânicas, Impurezas Inorgânicas e Solventes Residuais. As impurezas orgânicas podem ser originadas da síntese do fármaco, proveniente de material de partida, reações incompletas, produtos intermediários ou impurezas de processo, material de partida ou reagentes, ou originadas da degradação do fármaco, denominadas produtos de degradação. As Impurezas Inorgânicas podem ser metais pesados, resíduos de material inorgânico ou cinzas. Os Solventes Residuais são resíduos de solventes utilizados na síntese do insumo farmacêutico que não foram totalmente eliminados pelo processo de purificação.¹³

2.4 Produtos de degradação do ramipril e suas principais vias de formação

Estudos apresentam que o ramipril tem considerável grau de instabilidade e sua degradação ocorre por duas vias principais: a hidrólise, na presença de radicais provenientes da umidade, e a ciclização por ataque nucleofílico, quando exposto ao aquecimento.^{14,15,16,17}

Através da hidrólise ocorre a formação do ramipril diácido (ramiprilato), ilustrado na figura 2.^{14,15,16,17}

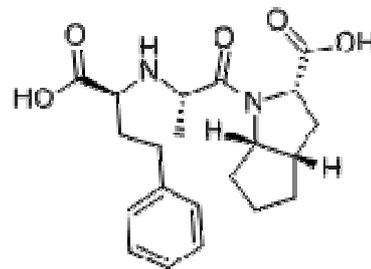


Figura 2: Estrutura química do ramipril diácido (ramiprilato).

A reação de hidrólise (representada na figura 3) ocorre através do ataque de hidrogênio ao grupamento éster da molécula de ramipril, formando o ácido carboxílico, originando o Ramipril-diácido (ramiprilato).^{14,15,16,17}

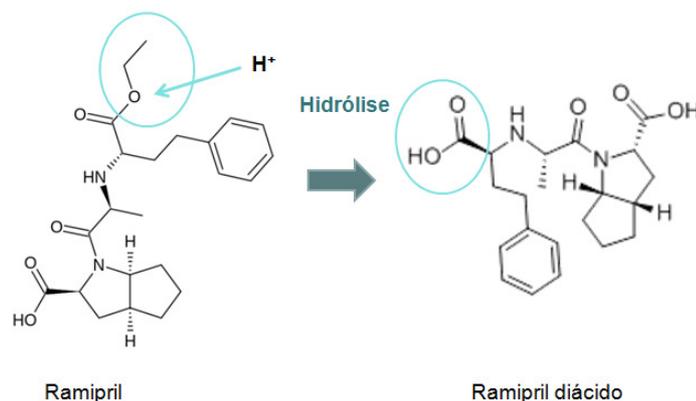


Figura 3: Reação de hidrólise do ramipril com formação do ramipril diácido.

Pelo aquecimento é formado a impureza ramipril dicetopiperazina, demonstrado na figura 4.^{14,15,16,17}

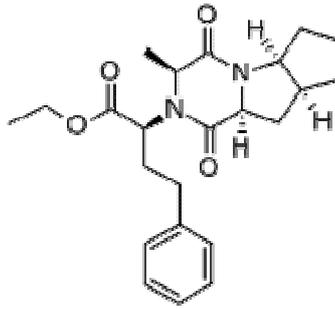


Figura 4: Estrutura química do ramipril dicetopiperazina (DKP).

A ciclização por ataque nucleofílico interno ocorre através do aquecimento, em que há liberação de íons hidrogênio e hidroxila, originando uma molécula de água, e possibilitando a ciclização da molécula, que fica ionizada, em junção do átomo de nitrogênio com o átomo de carbono, formando o ramipril dicetopiperazina (DKP), conforme ilustrado na figura 5.^{14,15,16,17}

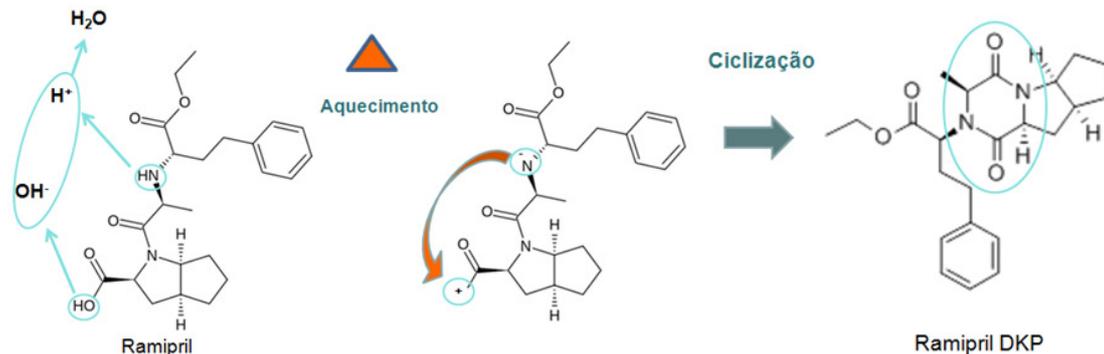


Figura 5: Reação de ciclização do ramipril com formação do ramipril DKP.

Alguns fatores extrínsecos como a umidade, o aquecimento, o oxigênio do ar, o atrito físico durante a compressão, podem ocasionar à formação de produtos de degradação de ramipril. Apesar de ser o metabólito ativo do ramipril, o ramiprilato administrado via oral não é bem absorvido no trato gastrointestinal, por isso é primordial monitorar o nível de formação desse composto.^{14,15,16,17}

Devido à presença do grupamento éster, que é o principal grupo reativo para formação de produtos de degradação, o ramipril é altamente susceptível a sofrer degradação.¹⁴

Segundo estudo realizado por DIEGO et al (2010), na Universidade de Conceição, no Chile, o ramipril sofre degradação por diversas vias, podendo sofrer degradação por hidrólise (principalmente alcalina), oxidativa e térmica. Os resultados obtidos nos testes de estresse mostram que o ramipril é fortemente instável em condições alcalinas. O fármaco também é instável em condições ácidas e neutras em termos de hidrólise, oxidação e pode ser submetida à degradação térmica.¹⁵

A estabilidade do ramipril foi estudada por HANYSOVÁ et al (2005), avaliando através de ensaios analíticos a formação de produtos de degradação e a influência do pH ácido, básico e do meio oxidativo em soluções tamponadas com diferentes pHs. Os produtos de degradação de ramipril foram determinados por HPLC, sendo que 0,2% de impureza D (ramipril DKP) foi detectado no tampão de pH 3 e pH 5. No tampão de pH 8 detectou-se cerca de 1% de impureza E (ramipril-diácido). Nenhum pico dos outros produtos de degradação foi observado nos cromatogramas acima do limite de quantificação, segundo descrição do método. O meio alcalino (pH 8,0) apresentou o maior efeito sobre a degradação de ramipril em impureza E.¹⁶

Amostras de cápsulas de ramipril foram expostas às condições de estresse em soluções ácidas, alcalinas e oxidantes e também foram expostas ao calor e à luz. As amostras estressadas foram comparadas às não expostas. O objetivo do teste foi demonstrar a seletividade do método proposto, e a capacidade de quantificar separadamente o ramipril e os seus compostos de degradação (conhecidos e desconhecidos). As amostras foram consideradas contanto que apresentassem degradação maior que 10%. As amostras degradadas por aquecimento produziram ramipril DKP. Em outras condições de estresse não foram encontrados produtos de degradação em níveis significativos. Outras impurezas mencionadas nesse artigo foram consideradas impurezas de síntese. Estas impurezas foram estudadas na validação do método analítico e usadas na fortificação das amostras para demonstrar a seletividade do método.¹⁷

De acordo com SHETGIRI et al (2008), a impureza D (ramipril DKP) pode ser produzida *in vitro* por degradação térmica, aquecendo o ramipril a 120°C durante 6 a 8 horas. No estudo foram apresentados a síntese, o isolamento e a elucidação de impureza D e outros compostos.¹⁸

Em estudo de *stress testing* realizado por SHI-YING DAÍ et al (2013), na China, as amostras foram sujeitas às condições de stress por luz, calor, ácido, base e oxidação, a fim de avaliar a capacidade do método proposto em separar o ramipril, o Besilato de Anlodipino e os produtos de degradação desses fármacos. Todas as amostras estressadas foram comparadas com uma solução não exposta. Este estudo não demonstrou claramente a origem dos compostos de degradação, mostraram apenas alguns cromatogramas que não estão devidamente identificadas. Os resultados confirmam que o método desenvolvido é adequado para aplicação analítica de comprimidos ramipril associado com Besilato de Anlodipino, porém não traz informações relevantes quanto à degradação dos fármacos estudados.¹⁹

Tabela 1: Impurezas de ramipril, nomenclatura nos compêndios e estrutura química

Substância	Nome USP	Nome BP	Estrutura Molecular
Ramipril dicetopiperazina	Impureza D	Ramipril dicetopiperazina	
Ramipril metil éster	Impureza A	Ramipril metil éster	
Impureza K	Não consta	Dicetopiperazina ácida	

2.5 Regulamentação Sanitária

No Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é responsável por regulamentar as normas e legislações necessárias para medicamentos e outros produtos. Nos itens a seguir estão descritos alguns parâmetros importantes de serem avaliados nos medicamentos para assegurar sua qualidade, de forma que sejam garantidos a eficácia e segurança dos medicamentos. Algumas legislações e guias estabelecidas por órgãos internacionais, como *Food and Drug Administration* (FDA), dos Estados Unidos e *European Medicines Agency* (EMA), da Europa, devem ser considerados para auxiliar nas definições de testes e atributos de qualidade dos produtos farmacêuticos.^{1,11,12,13}

2.5.1 Estudo de estabilidade

É importante estudar a estabilidade de produtos farmacêuticos para garantir que sejam mantidas as suas características durante o prazo de validade, para que quando administrado, possa exercer o efeito farmacológico desejado sem causar risco à saúde do paciente. Os fatores ambientais como temperatura, umidade, luz, e outros relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e dos excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, materiais de embalagem, influenciam diretamente no comportamento do produto no estudo de estabilidade.²⁰

Estudos de estabilidade acelerados são realizados em condições mais drásticas que as encontradas naturalmente no ambiente em que se pretende comercializar o produto, por isso visam acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas de um produto farmacêutico. Este tipo de estudo vem demonstrando empiricamente e com grande probabilidade de acerto o que ocorreria no produto farmacêutico quando este é submetido a condições normais de armazenamento por longo período de tempo, que é avaliado no estudo de longa duração.²⁰

Devem ser avaliadas as características químicas, físicas e microbiológicas dos produtos. Testes como teor, umidade, dissolução e compostos de degradação são de fundamental importância para verificar se a formulação e o material de embalagem são adequados para o medicamento. Eles possibilitam ainda, confrontando dados de queda de teor com a formação de compostos de degradação, verificar se o método de análise utilizado é adequado para a avaliação de todos os compostos formados devido à degradação do ativo. A técnica mais utilizada para a avaliação da estabilidade de produtos farmacêuticos é a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção na região do ultravioleta (UV) ou com detector de arranjo de fotodiodos (DAD).^{20,21}

2.5.2 Produtos de degradação

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 53, de 4 de dezembro de 2015, estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semi-sintéticas, classificados como novos, genéricos e similares. Essa avaliação é fundamental para garantir a segurança do produto. Nesta norma são definidos parâmetros para se estudar os compostos de degradação formados, de acordo com a quantidade presente no produto, relacionando com a máxima dose diária. O limite do produto de degradação está relacionado com sua toxicidade, sendo que compostos desconhecidos são permitidos em quantidades mínimas, enquanto que compostos conhecidos podem estar presentes em níveis intermediários e compostos com estudo de toxicidade realizado, comprovando sua baixa toxicidade, podem estar presentes até níveis maiores, considerados seguros.²¹

As condições de degradação e os parâmetros do perfil de degradação são citados no guia 04 de 2015, que dispõe sobre os requisitos para obtenção do perfil de degradação, e identificação e qualificação de produtos de degradação. O perfil de degradação é a descrição detalhada dos resultados e das práticas analíticas utilizadas na detecção, identificação, elucidação estrutural e determinação quantitativa dos produtos de degradação presentes no insumo farmacêutico ativo e no medicamento e tem como ponto chave os estudos de degradação forçada. Os estudos de degradação forçada têm a finalidade de acelerar a degradação do

fármaco em um medicamento, para que se possa avaliar tanto a susceptibilidade deste produto a situações de estresse, elucidar os mecanismos envolvidos, as reações cinéticas, as estruturas dos produtos de degradação formados, bem como verificar a adequabilidade do método analítico para aplicação em um estudo de estabilidade. Os estudos de degradação forçada também auxiliam na seleção adequada do material de embalagem primária e excipientes mais compatíveis com o fármaco.²²

2.5.3 Validação Analítica

A Resolução RE 899/2003 da ANVISA que trata sobre a validação de métodos analíticos, determina que o teste de seletividade e especificidade utilize padrões de impurezas específicos relacionados aos produtos de degradação do fármaco ou, que na ausência destes padrões, sejam feitas comparações com amostras submetidas às condições de estresse aplicáveis. Ou seja, o método analítico necessita ter seletividade, ou seja, ser capaz de medir inequivocamente o analito (fármaco) e seus possíveis produtos de degradação na presença de interferentes potenciais, como por exemplo, excipientes e impurezas. Ainda é exigido que, para testes quantitativos, como ensaios de doseamento e determinação de impurezas, sejam demonstrados através de testes práticos, parâmetros de linearidade, exatidão e precisão da metodologia analítica.²³

2.6 Excipientes e formulações

No medicamento de referência do ramipril comprimidos são empregados os excipientes hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), amido de milho pré-gelatinizado, celulose microcristalina, estearilfumarato de sódio e óxido férrico amarelo (comprimido). No medicamento de referência Ramipril em cápsulas, a lactose monohidratada é o principal excipiente utilizado, além da gelatina, dióxido de titânio e corantes presentes nas cápsulas de gelatina dura. Um dos medicamentos similares do mercado traz em sua formulação os excipientes: amido, bicarbonato de sódio, celulose microcristalina, croscarmelose sódica, dióxido de silício, estearilfumarato de sódio, fosfato de cálcio dibásico dihidratado, óxido férrico vermelho e povidona (cápsula). Em associação de ramipril com anlodipino na forma

farmacêutica de comprimido, os excipientes carbonato de sódio, hipromelose, sacarose, amido, copovidona, povidona, macrogol, óxido férrico amarelo, dióxido de titânio e gelatina (microgrânulos em cápsula) são empregados. Formulações contendo ramipril em comprimidos genéricos apresentam em suas fórmulas os excipientes hipromelose, lactose monoidratada, celulose microcristalina, óxido de ferro vermelho e estearilfumarato de sódio. Sendo assim, a maior parte das formulações empregam os seguintes excipientes: com função de diluente os mais usados são celulose microcristalina, amido pré-gelatinizado, povidona (que apresentam baixo índice de água de adsorção), e a lactose monoidratada (que tem água de hidratação, mas pouca água de adsorção); como lubrificante o estearilfumarato de sódio é mais utilizado, como corante o óxido férrico, como aglutinante a Hipromelose ou Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC).²⁴

Há relatos que dizem que excipientes que contenham umidade podem contribuir para a instabilidade do ramipril. É recomendado o uso de excipientes com baixa umidade, pré-gelatinizados ou em cristais em forma de hidrato, para inibir o efeito de hidrólise que pode ocorrer quando o fármaco fica em contato com excipientes com água de adsorção. Nos hidratos e nos amidos pré-gelatinizados, a água não é reativa, pois precisa romper uma barreira (cristal ou gelatina) para poder reagir com o fármaco. Associado ao cuidado na escolha dos excipientes é fundamental considerar o uso de embalagens primárias que promovam proteção contra umidade, evitando que excipientes higroscópicos possam adsorver umidade

14

A obtenção de formulações estáveis de produtos com ativos como o ramipril através de revestimento com polímeros foi estudada por Hrakovsky e Tenengauzer (2008). Misturando intimamente o ativo com um lubrificante, sendo citado como o de escolha estearilfumarato de sódio, seguida de um excipiente diluente. Para impurezas, os resultados apresentados foram de 2,0% de DKP + ramiprilato, obtidos com exposição das amostras a 40°C e 75% de umidade relativa por um mês, contudo, não foi apresentada a estabilidade a 40°C por seis meses. Portanto esses resultados não são adequados ao que recomenda a legislação sanitária brasileira.²⁵

Sherman (2005) descreve cápsulas de ramipril formuladas com uma mistura de ramipril e lactose monohidratada como diluente obtendo formulação estável. Amostras de misturas de lactose e ramipril foram expostas a 50°C por uma semana e os resultados foram de 1 a 3% de ramiprildicetopiperazina, considerando o curto período de tempo esse valor mostra-se bastante alto.²⁶

A forma polimórfica do fármaco pode interferir na solubilidade, como descrito por Aguiar (1999), sendo que as formas de hidratos tendem a ser menos solúveis que as formas anidras. A presença de umidade em formulações farmacêuticas pode levar à degradação por hidrólise, porém quando a água se encontra intimamente ligada à estrutura cristalina da partícula (água de hidratação) tende a ser menos reativa, pois para estar disponível necessita de energia suficiente para romper partícula. A água que está adsorvida às partículas (umidade) normalmente é mais acessível, pois se situa fora da estrutura do cristal, sendo mais reativa para a hidrólise do fármaco.²⁷

No intuito de aumentar a estabilidade do fármaco, AKSU et al (2012) elaborou um processo de revestimento polimérico do ativo com Hidroxipropilmetilcelulose. Esta manobra é particularmente importante, pois é relatado que, além de umidade e temperatura, o estresse mecânico exerce forte influência na degradação do fármaco.²⁸

ASCHAR et al (2015) realizaram um levantamento bibliográfico atual e completo das vias de degradação e das formulações citadas em patentes discutindo os aspectos mais relevantes do fármaco ramipril. Diante disso, percebe-se a importância de evitar a exposição do fármaco à temperatura, umidade e hidrólise, principalmente a hidrólise básica, sendo importante considerar excipientes e processos de fabricação que não possibilitem a presença de umidade no produto final. Também é necessário avaliar a escolha da embalagem, optando pelas protetoras e que não sejam condutoras de calor.²⁹

2.7 Métodos instrumentais utilizados

2.7.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A cromatografia é um método físico-químico de separação que consiste basicamente na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis: a móvel e a estacionária. A grande variedade de combinações entre essas fases a torna uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação.³⁰

No caso de HPLC, fases estacionárias são colunas cromatográficas, contendo esferas de sílica (que é um polímero inorgânico inerte, resistente, amorfo, com alta porosidade) e ligadas a grupamentos específicos, empacotadas dentro de um cilindro. Essas fases estacionárias, dependendo da modificação dos grupos sinalóis, podem atuar no modo normal, reverso ou em ambos. Na cromatografia em fase normal, a fase estacionária é mais polar que a fase móvel, sendo utilizadas colunas polares e solventes orgânicos apolares, e em fase reversa, a fase móvel é mais polar, sendo usadas colunas com características mais apolares, e mistura de água com solventes mais fracos que os usados em fase normal.³¹

A aplicação mais comum no controle de qualidade de medicamentos é a cromatografia em fase reversa, sendo as colunas com recheio C18 (octadecilsilano) as mais usadas. A utilização de sais, ácidos e bases no preparo de fases móveis é muito comum, e são importantes para ajustar o pH da fase móvel, controlando assim o tipo de ionização da molécula a ser analisada, de acordo com seu coeficiente de partição, para que não tenha duas formas de ionização do mesmo composto durante a análise, ocasionando deformação do pico. Além disso, o uso de sais ou aditivos básicos (como dietilamina) na fase móvel pode diminuir a interação dos analitos com os grupos silanóis livres da coluna, melhorando a separação e a simetria dos picos.^{32,33}

De acordo com ROSA et al (2010), o uso de colunas contendo grupamentos polares embutidos, como as colunas empacotadas com grupamentos C8 ligados à uréia, podem evitar a interação iônica entre o silanol residual e grupos básicos dos analitos. Além do processo de capeamento da sílica, que aumenta a vida útil da coluna e inibe interações indesejadas.³⁴

2.7.2 Análise Térmica

Análise térmica é o estudo de determinada propriedade física de uma substância (e/ou de seus produtos) em função do tempo ou da temperatura enquanto a amostra é submetida a um programa controlado de mudança temperatura. As duas técnicas de análises térmicas mais utilizadas na avaliação de fármacos e excipientes são a Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e a Análise Termogravimétrica (TGA) ³⁵

2.7.2.1 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) pode ser definida como a técnica termo analítica na qual as variações de entalpia da amostra são monitoradas em relação a um material de referência termo analiticamente inerte enquanto ambas são submetidas a uma programação controlada de temperatura. Com essa técnica é possível observar eventos de fusão, cristalização, realizar avaliação de formas polimórficas, entre outras aplicações. Os resultados são expressos em curvas contendo informações de medição, em miliwatts (mW), no eixo y, em determinado período de tempo, em minutos, no eixo x. As diferenças de mW expressas nas curvas de DSC são obtidas pela variação de temperatura de recipiente de alumínio contendo a amostra em relação ao recipiente de referência, detectada pelos sensores térmicos do equipamento. ^{36,37}

2.7.2.2 Análise Termogravimétrica (TGA)

A Análise Termogravimétrica é a técnica termo analítica que acompanha a variação de massa da amostra, em função da programação de temperatura. Pode-se dizer que o equipamento para análise termogravimétrica é composto basicamente por uma termobalança dentro de um forno. Esse tipo de avaliação permite estimar a quantidade de impurezas inorgânicas, solventes residuais e água de adsorção e hidratação em insumos farmacêuticos ativos e excipientes, além de apresentar outras aplicações em diversos materiais. Pode ser acoplada a outros equipamentos como infravermelho para identificação de compostos voláteis. ³⁷

2.7.2.3 Estudo de compatibilidade fármaco x excipiente

Os estudos de compatibilidade entre fármacos e excipientes podem ser realizados por análise térmica, infravermelho, cromatografia, difração de raios X, testes de dissolução e solubilidade, trazendo informações sobre o comportamento do fármaco e os excipientes e suas possíveis interações. São empregados na etapa de pré-formulação de modo a prever possíveis interações físicas ou químicas entre este princípio ativo e excipientes utilizados nas formulações. Os ensaios auxiliam na escolha dos excipientes mais adequados à formulação do medicamento, possibilitando controlar a liberação do fármaco, minimizar problemas de estabilidade, prever possíveis produtos de degradação, enfim, mapear todos os dados relevantes na escolha da formulação. ³⁶

O estudo de interação fármaco x excipiente é um importante instrumento para elucidar as possíveis interações que favorecem à formação de impurezas e/ou compostos de degradação, além de permitir conhecer melhor o comportamento da mistura fármaco x excipiente quando exposta a condições de estresse. ^{35,36,37}

Os estudos de compatibilidade por análise térmica podem ser utilizados para contribuir na etapa de pré-formulação de modo a prever possíveis interações físicas ou químicas entre este princípio ativo e excipientes utilizados nas formulações. ³⁷

Segundo ARAUJO et al (2002), o estudo de compatibilidade fármaco x excipiente pode ser realizado através de diferentes desenhos de estudo dependendo do que se pretende. O elemento gráfico abaixo (figura 6) apresenta os principais desenhos do estudo de compatibilidade. ³⁷

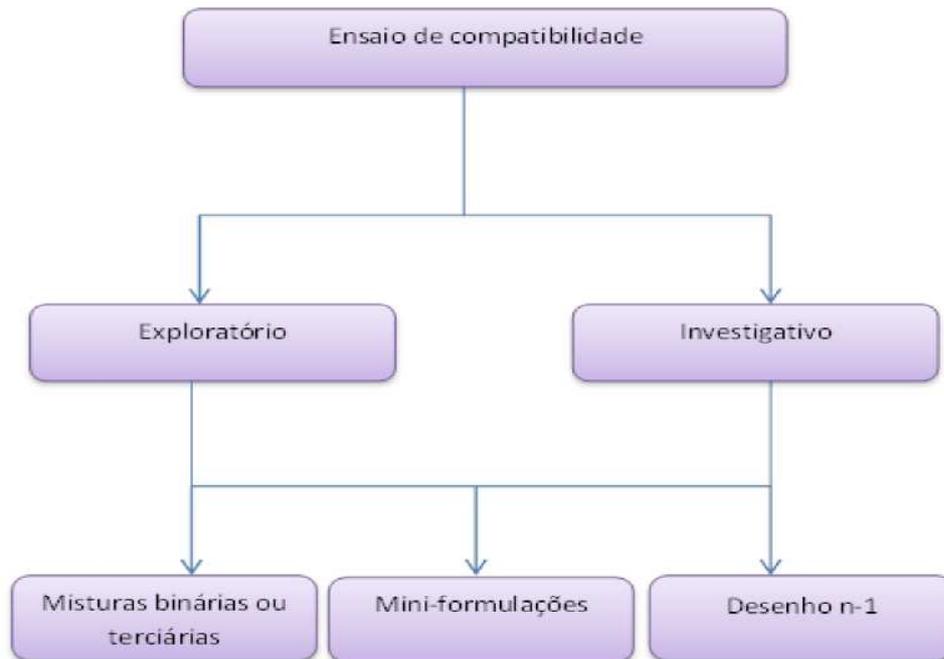


Figura 6: Diferentes tipos de estudo de compatibilidade. ³⁷

O estudo de compatibilidade mais tradicional é o que envolve misturas físicas entre os componentes de uma formulação. As misturas binárias são misturas entre o fármaco e um excipiente (diluente, desintegrante ou lubrificante) e as misturas terciárias podem conter o fármaco, um diluente e um desintegrante ou lubrificante. Essas misturas são expostas às condições de temperatura e umidade altas durante um determinado período de tempo, tendo como controle o fármaco e os excipientes puros sob as mesmas condições. ^{36,37}

A preparação das amostras está relacionada com a natureza física dos materiais que serão analisados e do tipo de formulação final. A seleção dos excipientes para as misturas binárias ou ternárias dependem da massa molar e da quantidade utilizada na formulação final, sendo que a relação fármaco x excipiente deverá proporcionar uma grande interação para que seja possível verificar as incompatibilidades. ³⁷

Para os estudos envolvendo substâncias sólidas, a preparação das amostras envolve somente misturas físicas dos componentes. Algumas vezes, podem-se utilizar artifícios para promover misturas mais homogêneas como, por exemplo, tamisação do material (para padronizar o tamanho das partículas de algum componente ou para promover a desaglomeração do material), compactação dessas

misturas ou moagem e compactação para substâncias sensíveis à umidade ou com baixo ponto de fusão. Além disso, a água pode ser adicionada nas misturas fármaco x excipiente em sistemas fechados para aumentar a umidade.³⁷

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Elaborar um estudo de pré-formulação que avalie os excipientes mais comuns em formulações contendo ramipril, com dados de doseamento do ativo e das impurezas por cromatografia, complementares à avaliação dos resultados obtidos por análise térmica, obtendo dados relevantes para definição de formulações, embalagens e processos de fabricação para o produto ramipril comprimidos.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar a adequabilidade do método analítico através da validação parcial.
- Avaliar misturas de ramipril com os excipientes mais utilizados nas formulações do mercado farmacêutico brasileiro e estudar o comportamento do fármaco na presença desses excipientes e possíveis interações.
- Entender quais os melhores excipientes para inibir a formação dos produtos de degradação e quais podem favorecer a formação desses compostos.
- Elucidar as principais vias de degradação do ramipril, através do teste de degradação forçada.
- A partir dos dados obtidos com os testes práticos, determinar os cuidados necessários ao fabricar os comprimidos de ramipril e as embalagens mais adequadas para o produto.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Equipamentos e coluna cromatográfica

Os ensaios analíticos foram realizados no laboratório de pesquisa e desenvolvimento da indústria de medicamentos Medley Farmacêutica Ltda, utilizando os equipamentos e coluna cromatográfica listados abaixo:

- HPLC Merck (Hitachi) modelo LaChrom Elite com detector DAD para análise de teor e substâncias relacionadas;
- TGA Mettler Toledo modelo Star 1 TGA/DSC para avaliação da perda de massa em função do aquecimento, das amostras isoladas e misturas no estudo de pré-formulação;
- DSC Mettler Toledo modelo 823e para avaliação da entalpia dos eventos observados nas curvas de DSC das amostras isoladas e misturas, verificando possíveis interações entre fármaco x excipiente;
- Coluna cromatográfica fabricada pela empresa Sigma Aldrich, modelo Nucleosil C18 125 x 4,6mm 5um, de número de série S3713 e lote 21309041.
- Banho de ultrassom Unique modelo USC28000 para auxiliar na solubilização durante o preparo das amostras usadas para avaliação de teor e impurezas.
- Peagâmetro Metrohm com eletrodo de KCl em KCl 3M para medição do pH da fase móvel.
- Balanças Analíticas Mettler Toledo para preparo das amostras de teor e impurezas (sensibilidade de 0,01mg).
- Microbalança Mettler Toledo para pesagem das amostras utilizadas nos testes de DSC e TGA (sensibilidade de 0,001mg).

4.2 Reagentes, Excipientes e Insumo Farmacêutico Ativo

Na tabela 2 estão descritos os reagentes, o insumo farmacêutico ativo e os excipientes utilizados, seus respectivos fabricantes, lotes e data de validade. Todos esses materiais foram concedidos pelo Laboratório Medley e disponibilizados para a realização dos testes.

Tabela 2: Dados dos Reagentes, Excipientes e Insumo Farmacêutico Ativo.

Substância	Fabricante	Lote
Ramipril	Neuland Laboratories Limited	RPI0614015
Lactose monoidratada	Foremost Farms	8514041261
Celulose microcristalina	Blanver Farmoquimica Ltda	135002337
Estearilfumarato de sódio	Rank Organics Chemical PVTL tda	SSF/2013/01/213
Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC)	The dowchemicalco.	YF280124L1
Óxido férrico vermelho	Rockwood Italia S.P.A.	W926A
Ácido fosfórico	Sigma Aldrich	SZBF1820V
Acetonitrila	Merck	I789530
Perclorato de sódio	Sigma Aldrich	MKBT7171V

4.3 Padrões de Referência

Os padrões de referência utilizados estão descritos na tabela 3:

Tabela 3: Padrões de Referência.

Substância	Fabricante	Lote
Ramipril	USP	R019T0
Impureza A (BP)	USP	G0H441
Impureza D (BP)	USP	R002S0
Impureza K (BP)	PGS	1343-014A7

4.4 Excipientes

Os excipientes que serão estudados foram escolhidos por estarem presentes na maior parte das formulações, sendo excluído o corante, por estar presente em quantidades mínimas. Na tabela 4 estão descritos os excipientes selecionados para realização do estudo de pré-formulação e suas funções no produto farmacêutico.

Tabela 4: Excipientes e suas funções.

Excipiente	Função
Lactose Monoidratada	Diluyente
Celulose Microcristalina	Diluyente
Estearilfumarato de sódio	Lubrificante
HPMC	Aglutinante

4.5 Determinação de Teor e Substâncias Relacionadas por HPLC

De acordo com o capítulo geral <1086> da Farmacopeia Americana (USP), as substâncias relacionadas são moléculas estruturalmente parecidas com o princípio ativo, podendo ser identificadas ou não identificadas. São originadas da degradação da substância ativa ou formadas no processo de fabricação do fármaco. ³⁸

O teste de substâncias relacionadas avalia as substâncias originadas do ativo, que podem comprometer a segurança do medicamento caso estejam acima dos limites permitidos. De acordo com a Farmacopeia Britânica, os critérios de aceitação para o teste de teor é de 90,0 a 105,0% e para substâncias relacionadas é de no máximo 6,0% de ramipril Impureza D (ramipril dicetopiperazina), no máximo 0,5% para Impurezas desconhecidas e de no máximo 6,0% de Impurezas totais desconhecidas.³⁹

A metodologia descrita na monografia de ramipril comprimidos da BP 2015 foi empregada para determinação de teor e substâncias relacionadas, conforme descrito a seguir:³⁹

4.5.1 Preparo das soluções amostra

Prepararam-se, a partir das amostras, soluções contendo o equivalente a aproximadamente $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ de ramipril em fase móvel, transferindo-se o equivalente a cerca de 12,5 mg de ramipril para balão volumétrico de 25 mL, adicionando fase móvel até metade do volume e levando-se ao banho de ultrassom por 10 minutos e completando-se ao volume com fase móvel, filtrando em membrana PVDF de $0,45 \mu\text{m}$.³⁵

4.5.2 Preparo das soluções padrão

Para avaliação do doseamento prepararam-se soluções padrão contendo o equivalente a aproximadamente $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ de ramipril padrão em fase móvel, utilizando padrão de referência farmacopeico de ramipril fornecido pela Farmacopeia dos Estados Unidos (USP), transferindo-se cerca de 12,5 mg para balão volumétrico de 25 mL, adicionando fase móvel e dissolvendo em ultrassom, completando o volume com fase móvel posteriormente.³⁵

Para avaliação das impurezas prepararam-se soluções contendo o equivalente a aproximadamente $0,025 \text{ mg.mL}^{-1}$ de ramipril em fase móvel, partindo da solução padrão a $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ de ramipril, realizando diluição de 1 mL para balão volumétrico de 20 mL e completando o volume com fase móvel (concentração equivalente à cerca de 5 % da concentração da amostra).³⁵

4.5.3 Preparo da solução de sensibilidade

Para verificar a sensibilidade do sistema cromatográfico preparou-se solução contendo o equivalente a aproximadamente $0,00025 \text{ mg.mL}^{-1}$ de ramipril em fase móvel, utilizando padrão a $0,025 \text{ mg.mL}^{-1}$ de ramipril, diluindo 1 mL para balão volumétrico de 100 mL e completando-se o volume com fase móvel (equivalente à cerca de 0,05 % da concentração da amostra).³⁵

4.5.4 Preparo da solução de identificação dos picos e resolução

Foram preparadas soluções estoque contendo ramipril Impureza A (EP), ramipril impureza D (EP) e ramipril Impureza K (PGS), separadamente, com concentração de cerca de $0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$ em fase móvel, transferindo-se cerca de 1 mg para balão volumétrico de 20 mL, dissolvendo em fase móvel com o auxílio de banho de ultrassom.³⁵

Para avaliar a adequação do sistema, foi preparada uma solução padrão mix de impurezas e ramipril, transferindo-se cerca de 10mg de ramipril padrão USP para balão volumétrico de 20 mL, adicionando-se 2 mL de cada solução de impurezas A, D e K, diluindo-se e completando-se o volume com metanol. ($0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ de ramipril e $0,005 \text{ mg mL}^{-1}$ das impurezas A, D e K)³⁵

4.5.5 Identificação das impurezas e tempos de retenção relativos

A identificação das impurezas nas soluções amostras foi realizada por comparação com os tempos de retenção relativos obtidos no cromatograma da solução padrão mix de impurezas.

A tabela 5 descreve os tempos de retenção relativos dos compostos descritos na BP:

Tabela 5: Tempos de retenção relativos das impurezas.³⁵

Impureza	Tempo de Retenção Relativo
Impureza E (Ramiprilato)	0,3
Impureza K (Dicetopiperazina ácida)	0,6
Impureza A (metil éster)	0,7
Impureza D (Dicetopiperazina)	2,6

4.5.6 Avaliação da adequação do sistema cromatográfico

Na monografia de ramipril comprimidos, descrita na BP, o critério de adequação do sistema é que a resolução entre a Impureza K e a Impureza A seja maior ou igual a 1,0.³⁵

Além da resolução entre os compostos, segundo o capítulo geral de cromatografia da USP, para que o sistema cromatográfico desempenhe funcionamento adequado, é recomendado avaliar parâmetros como pratos teóricos, fator de assimetria e fator de capacidade dos picos. Utilizando o cromatograma obtido com a solução mix de impurezas, avaliaram-se esses parâmetros, assumindo como critério de aceitação os dados informados na tabela 6.³⁶

Tabela 6: Critérios de aceitação de adequação do sistema.^{35,36}

Parâmetro	Critério de aceitação
Resolução (R) entre Imp. K e Imp. A	$R \geq 1,0$
Pratos teóricos (N)	$N > 2000$
Fator de Assimetria (T)	$T \leq 2,0$
Fator de capacidade (K')	$K' \geq 1,5$

Os cálculos utilizados para avaliação dos parâmetros cromatográficos R, N, As e K estão descritos no anexo 1.³⁶

4.5.7 Preparo da fase móvel

A fase móvel foi obtida pela mistura de 350 volumes de acetonitrila (grau HPLC) e 680 volumes de uma solução contendo 1,4 % (p/v) de perclorato de sódio e 0,58 % (p/v) de ácido fosfórico, com pH ajustado para 3.9 com trietilamina. O pH da mistura final é então ajustado para 2,6 com ácido fosfórico.³⁵

4.5.8 Condições cromatográficas

Utilizou-se uma coluna cromatográfica Nucleosil com recheio de sílica quimicamente ligada a grupamentos C18, com comprimento de 125 mm, diâmetro de 4,6 mm e partículas de 5 µm. O fluxo de fase móvel foi de 1,0 mL.min⁻¹, a temperatura do forno de 25 °C, a detecção foi realizada em detector com arranjo de fotodiodos (DAD) de 200 a 400 nm, sendo extraídos dados de cromatogramas no comprimento de onda de 210 nm, sendo o volume de injeção de 15 µL.³⁵

4.5.9 Otimização da metodologia

O teste de teor da BP descreve condições cromatográficas semelhantes às do teste de substâncias relacionadas, sendo que a principal diferença está no diluente utilizado no preparo das soluções padrão e amostra, nas concentrações finais dessas soluções e em seus volumes de injeção. Diante disso, foi avaliado o pico de ramipril na solução amostra que seria usada para avaliação de impurezas para a verificação dos parâmetros cromatográficos de N, As e K do pico do ativo, verificando a possibilidade de quantificar o teor simultaneamente nessa solução, em comparação à solução padrão preparada com o mesmo diluente em concentração semelhante.³²

Para se comprovar que o método de substâncias relacionadas é adequado para avaliar também o teor de ramipril, foram realizados testes de validação parcial do método, avaliando a linearidade, exatidão e precisão, já que a única alteração foi na faixa de concentração da amostra e do padrão.

Tal proposta possibilita economia de tempo, reagentes e torna mais eficiente a avaliação das amostras estudadas nesse projeto.

4.5.10 Cálculos de Teor e Impurezas

O teor foi calculado conforme a equação 1 e as substâncias relacionadas conforme equação 2.

$$\text{Ramipril (\%)} = \frac{Aa \times Pp \times mp \times FDA \times PM}{Ap \times FDP \times ma \times Q} \quad \text{Equação 1}$$

Onde: Aa é a área obtida para ramipril na solução amostra, Ap é a média das áreas de ramipril obtidas nas injeções da solução padrão (teor), Pp é a potência do padrão em porcentagem, mp é a massa pesada miligrama para o preparo da solução padrão, ma é a massa pesada em miligrama para o preparo da solução amostra, FDA é o fator de diluição da amostra, FDP é o fator de diluição do padrão, PM é o peso médio das cápsulas, determinado no momento do preparo da amostra e Q é a quantidade rotulada de ramipril por comprimido.

$$\text{Impureza (\%)} = \frac{Aimp \times Pp \times mp \times FDA \times PM}{Ap \times FDP \times ma \times Q} \quad \text{Equação 2}$$

Onde: $Aimp$ é a área obtida para Impureza na solução amostra, Ap é a média das áreas de ramipril obtidas nas injeções da solução padrão (impurezas), Pp é a potência do padrão em porcentagem, mp é a massa pesada miligrama para o preparo da solução padrão, ma é a massa pesada em miligrama para o preparo da solução amostra, FDA é o fator de diluição da amostra, FDP é o fator de diluição do padrão, PM é o peso médio das cápsulas, determinado no momento do preparo da amostra e Q é a quantidade rotulada de ramipril por comprimido.

4.6 Validação parcial da metodologia

4.6.1 Linearidade

É importante avaliar a linearidade do método para verificar se a resposta apresentada pelo ramipril é proporcional a sua concentração, na faixa de 80 a 120% da concentração da amostra ($0,5\text{mg mL}^{-1}$) do método analítico de substâncias relacionadas, para verificar se ele é aplicável ao doseamento.

De acordo com VALCARCEL (2012), o método dos mínimos quadrados é indicado para avaliação da linearidade de métodos analíticos. A determinação é realizada através da regressão linear, determinando a equação da reta e o coeficiente de correlação, conforme descrito no Anexo 2.³⁷

A linearidade do teste de doseamento foi avaliada em 5 níveis de concentração, sendo $0,50\text{ mg mL}^{-1}$ o ponto central da curva (100%), e os pontos de 80%, 90%, 110% e 120% dessa concentração os outros pontos avaliados, sendo aceito o coeficiente de correlação $\geq 0,99$, conforme preconizado na RE 899.¹⁹

Transferiram-se 25,09 mg de padrão de ramipril fornecido pela USP, de lote G11058 e potência 99,8%, para balão volumétrico de 25 mL. Diluiu-se e completou-se ao volume com fase móvel, obtendo-se a concentração teórica de $1,0016\text{ mg mL}^{-1}$. Essa solução estoque foi diluída para o preparo das soluções utilizadas na linearidade, conforme tabela 7.

Tabela 7: Preparo das soluções padrão de ramipril para avaliação da linearidade ao nível de teor

Ponto (%)	Alíquota (mL)	Balão volumétrico (mL)	Concentração Teórica (mg.mL^{-1})
80,0	2,000	5	0,40063712
90,0	2,250	5	0,45071676
100,0	2,500	5	0,50079640
110,0	2,750	5	0,55087604
120,0	3,000	5	0,60095568

A linearidade do teste de impurezas foi preparada em oito níveis de concentração, sendo de 0,50 % a 7,50 % em relação à concentração da solução amostra, se transferindo 10,10 mg de padrão de ramipril fornecido pela USP, de lote

G11058 e potência 99,8%, para balão volumétrico de 50 mL. Diluiu-se e completou-se o volume com fase móvel, e transferiram-se 12,5 mL dessa solução para balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com diluente, obtendo-se a concentração teórica de 50,4 mcg mL⁻¹. Essa solução estoque foi diluída conforme tabela 8.

Tabela 8: Preparo das soluções padrão de ramipril para avaliação da linearidade ao nível de impurezas

Ponto (%)	Alíquota (mL)	Balão volumétrico (mL)	Concentração Teórica (mcg.mL ⁻¹)
0,5	0,500	10	2,51995
1,0	1,000	10	5,03990
2,0	2,000	10	10,07980
3,0	3,000	10	15,11970
4,0	4,000	10	20,15960
5,0	5,000	10	25,19950
6,0	6,000	10	30,23940
7,5	7,500	10	37,79925

4.6.2 Exatidão

A exatidão foi avaliada para verificar se seria possível dosear a quantidade de padrão de ramipril que foi adicionada à matriz (placebo), permitindo-se resultados de 100% ± 5%. Os preparos foram com concentração aproximada a 0,5 mg.mL⁻¹, conforme preparo do método analítico de substâncias relacionadas, para verificar se ele é aplicável ao doseamento. Foram preparadas três soluções de cada nível (80%, 100% e 120%), a partir de três soluções estoque, totalizando nove preparos, conforme descrito na tabela 9.

Tabela 9: Preparo das soluções placebo fortificadas com ramipril para avaliação da exatidão ao nível de teor

Dados do Padrão			Substância:	Ramipril			
Padrão Estoque - 1			Substância:	Exatidão preparada a partir do Padrão Estoque 1			
MP	10,510	mg		Alíquota 1	BV 1 (mL)	FDP	Conc. Teórica
BV1	10	mL		(mL)			mg.mL ⁻¹
Conc. do Estoque - 1							
1,0489		mg.mL ⁻¹					
			Ponto (%)				
			80,0	2,000	5	25,0	0,4196
			100,0	2,500	5	20,0	0,5244
			120,0	3,000	5	16,7	0,6293
Padrão Estoque - 2			Substância:	Exatidão preparada a partir do Padrão Estoque 2			
MP	10,040	mg		Alíquota 1	BV 1 (mL)	FDP	Conc. Teórica
BV1	10	mL		(mL)			mg.mL ⁻¹
Conc. do Estoque - 2							
1,0020		mg.mL ⁻¹					
			Ponto (%)				
			80,0	2,000	5	25,0	0,4008
			100,0	2,500	5	20,0	0,5010
			120,0	3,000	5	16,7	0,6012
Padrão Estoque - 3			Substância:	Exatidão preparada a partir do Padrão Estoque 3			
MP	10,080	mg		Alíquota 1	BV 1 (mL)	FDP	Conc. Teórica
BV1	10	mL		(mL)			mg.mL ⁻¹
Conc. do Estoque - 3							
1,0060		mg.mL ⁻¹					
			Ponto (%)				
			80,0	2,000	5	25,0	0,4024
			100,0	2,500	5	20,0	0,5030
			120,0	3,000	5	16,7	0,6036

BV: Balão volumétrico; FDP: Fator de diluição do padrão; FDA: Fator de diluição da amostra;
Potência do padrão de ramipril: 99,8%;

Para avaliar a exatidão do método de teor foi utilizado o cálculo de recuperação do ativo nos placebos fortificados, conforme equações 3.3.

$$\text{Recuperação de Ramipril (\%)} = \frac{\text{Concentração obtida}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad \text{Equação 3.3}$$

Onde: concentrações obtidas foram calculadas através da equação da reta de linearidade, utilizando como Y a área obtida com o pico do ramipril nas soluções avaliadas, e as concentrações teóricas foram calculadas a partir da massa, potência e diluição do padrão adicionado à matriz, no preparo das soluções.

4.6.3 Precisão

A precisão foi estudada com 6 amostras preparadas por um analista e 6 amostras preparadas por outro analista, em dias diferentes, totalizando 12 preparos, seguindo conforme descrito no item preparo das soluções amostra (3.5.1), avaliando a repetibilidade do método em cada grupo (n=6) e a precisão intermediária considerando todos os preparos (n=12), sendo aceita uma variação de 5 %, de acordo com a RE 899. As massas pesadas estão descritas na tabela 10.¹⁵

Tabela 10: Preparo de amostras de ramipril comprimidos para avaliação da precisão

Amostra	Massa da amostra (mg)
Precisão Intradia 01	12,63
Precisão Intradia 02	12,67
Precisão Intradia 03	12,52
Precisão Intradia 04	12,50
Precisão Intradia 05	12,60
Precisão Intradia 06	12,49
Precisão Interdia 01	12,64
Precisão Interdia 02	12,52
Precisão Interdia 03	12,32
Precisão Interdia 04	12,55
Precisão Interdia 05	12,66
Precisão Interdia 06	12,73

De acordo com PAGANO et al (2004), a avaliação estatística da precisão (n=6) pode ser realizada calculando o coeficiente de variação ou desvio padrão relativo (DPR) em porcentagem, conforme equação 3, e a avaliação entre os grupos (n=12) pode ser realizado além do cálculo do DPR (%), é recomendado realizar a comparação das variâncias empregando o teste F e a comparação das médias obtidas através do teste t, descritos nas equações 4, 5 e 6, respectivamente.³⁸

$$c_v = \frac{S}{\bar{x}}$$

Equação 3

Onde: Cv é o coeficiente de variação, S é o desvio padrão amostral (n-1) e \bar{x} é a média das amostras (n).

$$F = S_B^2 / S_W^2$$

Equação 4

Onde: S_B é o maior desvio padrão amostral (n-1) na precisão e S_W é o menor desvio padrão amostral (n-1) obtido na precisão. O valor de F obtido deve ser comparado ao tabelado, conforme tabela do anexo 3, sendo aceito se F calculado for menor ou igual ao F tabelado.

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{S_{x_1x_2} \cdot \sqrt{\frac{2}{n}}}$$

Equação 5

Onde: $S_{x_1x_2}$ foi calculado conforme equação 6

$$S_{x_1x_2} = \sqrt{\frac{S_{x_1}^2 + S_{x_2}^2}{2}}$$

Equação 6

No teste t, a quantidade de graus de liberdade usada deve ser de $2n - 2$. Este teste pode ser usado quando o número de amostra (n) dos dois grupos é igual, neste caso (n=6), e podemos assumir que as duas distribuições possuem a mesma variância (atendem ao teste f).

4.6.4 Seletividade e Especificidade

Para comprovar a seletividade e especificidade do método, demonstrando que na condição cromatográfica proposta ele promove a separação adequada dos compostos de interesse, foram avaliadas as soluções: diluente, insumo farmacêutico ativo (IFA), padrão de referência farmacopeico das substâncias isoladas de ramipril, Composto Relacionado A da USP (sendo a mesma substância da Impureza A descrita na EP – ramipril diácido), Composto Relacionado D da USP (sendo o mesmo composto da Impureza D descrita na EP - ramipril dicetopiperazina), e ramipril Impureza K BP (fornecida pela PGS), identificando os compostos e obtendo seus espectros de absorvidade na faixa de 200 a 400 nm através do detector DAD e também uma mistura de todas as impurezas e do ramipril, avaliando a resolução entre os picos.

4.6.4.1 Preparo das soluções da seletividade

A solução diluente foi preparada conforme descrito no item 3.5.7 (fase móvel).

A solução placebo foi preparada transferindo cerca de 200 mg de mistura de excipientes, conforme descrito na mistura O, na tabela 12, contendo CMC, HPMC, Lactose e estearil fumarato de sódio, exceto ramipril, para balão volumétrico de 25mL, adicionando cerca da metade do volume de diluente e levando ao ultrassom por 10 minutos. Completou-se o volume com fase móvel.

As soluções padrão de impurezas foram preparadas conforme item 3.5.4, diluindo separadamente 2 mL das soluções estoque de cada composto para balões de 20 mL, completando o volume com fase móvel. A solução padrão de ramipril foi preparada conforme item 3.5.2, a $0,025 \text{ mg.mL}^{-1}$. A solução da mistura das impurezas com o ramipril foi preparada conforme item 3.5.4 (padrão mix).

4.6.4.2 Avaliação das soluções da seletividade

Foram avaliadas as soluções da seletividade, verificando se algum pico, oriundo da solução diluente ou placebo, poderia interferir na quantificação dos picos de interesse.

Foi realizada a identificação dos picos e determinados seus tempos de retenção relativos. A resolução dos picos foi verificada na solução da mistura de todos os padrões de impurezas e o ativo ramipril, sendo aceitos valores maiores que 1,0, comprovando a eficiência da separação cromatográfica, calculados conforme anexo 1.

4.6.5 Degradação forçada

Para provar que o método é indicativo de estabilidade, foi realizada a degradação do ativo em diversas condições de estresse (hidrólises ácida e alcalina, oxidação, temperatura, umidade e luz), para elucidar suas principais vias de degradação e avaliar se a metodologia seria capaz de quantificar todos os produtos de degradação formados de forma inequívoca.

Para comparar com as soluções degradadas e verificar quais picos se formaram pela degradação do IFA, foram injetadas também soluções controle, que ficaram estocadas sem o agente degradante, pelo mesmo período de tempo avaliado.

4.6.5.1 Preparo das soluções degradantes

As escolhas das concentrações e tempos de exposição foram baseadas no teste descrito por DIEGO et al (2010), tendo que ser ajustadas em casos onde foram obtidas degradações muito severas, maiores que 30 %, podendo ter se formado produtos de degradação secundários.⁷

Foram preparadas soluções degradantes de ácido clorídrico 0,1 N, hidróxido de sódio 1,0 N, peróxido de hidrogênio 3 % (v/v), conforme tabela 11.

Tabela 11: Preparo das soluções degradantes

Solução	Quantidade / Reagente	Volume de água (mL)
Ácido clorídrico 1,0 N	8,3 mL de Ácido clorídrico PA (37%)	100 mL
Ácido clorídrico 0,1 N	10,0 mL de Ácido clorídrico 1,0 N	100 mL
Hidróxido de sódio 1,0 N	40 g de Hidróxido de sódio PA	100 mL
Hidróxido de sódio 0,1 N	10,0 mL de Hidróxido de sódio PA	100 mL
Peróxido de hidrogênio 3 % (v/v)	10 mL de Peróxido de Hidrogênio 30%	100 mL

4.6.5.2 Preparo das soluções amostra

Foram preparadas soluções amostra conforme descrito no item 3.5.1, denominadas soluções controle (não foram expostas a nenhum agente degradante).

A amostra exposta ao ácido foi preparada transferindo-se aproximadamente 12,5 mg de ramipril para balão volumétrico de 25 mL e adicionando-se 2,5 mL de ácido clorídrico 0,1 N, mantendo em repouso por 5 dias. Após exposição, foram adicionados 2,5 mL de hidróxido de sódio 0,1 N para neutralizar. Adicionaram-se 10

mL de diluente levando ao banho de ultrassom por 10 minutos. O volume foi completado com diluente. A solução foi filtrada em filtro PVDF 0,45 µm e transferida para vial.

A amostra exposta ao hidróxido foi preparada transferindo-se aproximadamente 12,5 mg de ramipril para balão volumétrico de 25 mL e adicionando 2,5 mL de hidróxido de sódio 1,0 N, realizando a neutralização imediata após exposição, adicionando 2,5 mL de ácido clorídrico 1,0 N. Adicionaram-se 10 mL de diluente levando ao banho de ultrassom por 10 minutos. O volume foi completado com diluente. A solução foi filtrada em filtro PVDF 0,45 µm e transferida para vial.

A amostra exposta ao peróxido foi preparada transferindo-se aproximadamente 12,5 mg de ramipril para balão volumétrico de 25 mL e adicionando 2,5 mL de peróxido de hidrogênio 3% (v/v), mantendo em repouso por 2 dias. Adicionaram-se 10 mL de diluente levando ao banho de ultrassom por 10 minutos. O volume foi completado com diluente. A solução foi filtrada em filtro PVDF 0,45 µm e transferida para vial.

A amostra exposta ao aquecimento foi preparada transferindo-se cerca de 12,5 mg de ramipril para béquer de vidro e levada a estufa a 105 °C por 5 minutos. Adicionaram-se 10 mL de diluente levando ao banho de ultrassom por 10 minutos. O volume foi completado com diluente. A solução foi filtrada em filtro PVDF 0,45 µm e transferida para vial.

As amostras expostas à luz foram preparadas transferindo-se cerca de 12,5 mg de ramipril para dois vials de vidro incolor, expondo um à luz UV e o outro à luz branca por 5 dias. Transferiram-se quantitativamente o conteúdo dos vials para balões volumétricos de 25 mL, lavando com frações de diluente, totalizando 10 mL, levando ao banho de ultrassom por 10 minutos. O volume foi completado com diluente e as soluções foram filtradas em filtro PVDF 0,45 µm e transferidas para vials.

4.6.5.3 Avaliação das soluções da degradação forçada

Avaliaram-se a pureza de pico do ativo nas soluções da degradação forçada e a resolução dos picos dos compostos formados, aceitando-se pureza de pico $> 0,99$ e resolução dos picos $> 1,0$, calculada conforme anexo 1.

4.6.6 Metodologia para determinação de Umidade

A BP recomenda que a umidade do ramipril comprimidos seja avaliada por pontenciometria (Karl Fischer), porém com a análise termogravimétrica (TGA), que apresenta dados concisos e muito confiáveis, o teste karl Fisher se torna desnecessário.

A umidade foi avaliada através de análise termogravimétrica, transferindo de 5 a 10 mg de amostra para cadinho de alumínio de 100 μL com tampa furada, aquecendo a $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ de 25 a $250\text{ }^{\circ}\text{C}$, em atmosfera de nitrogênio de 50 mL min^{-1} . A avaliação dos resultados foi feita considerando a perda de massa até $115\text{ }^{\circ}\text{C}$, temperatura em que toda água adsorvida no material já se vaporizou. Em amostras com hidratos, foram avaliadas também as perdas de massas até temperaturas maiores para estimar a massa da água de hidratação.

4.6.7 Estudo de interação Fármaco x Excipiente

Para avaliar a interação fármaco (F) + excipientes (E) foram preparadas misturas binárias F : E (1:1), ternárias F : E1 : E2 (1:1:1), quaternárias F : E1 : E2 : E3 (1:1:1:1) e da formulação completa de comprimidos de ramipril. Para verificar a influência da ordem de mistura dos componentes foi avaliada uma formulação completa com mistura prévia de F : HPMC, para depois adicionar os outros excipientes, verificando a possível inibição de degradação mencionada em algumas patentes, como a US 2006/0134213 A1 ³⁹, somente fazendo mistura física dos componentes, sem aplicar a técnica de recobrimento por *spray drier*.

Utilizando o fármaco ramipril e os excipientes HPMC, lactose monoidratada, celulose microcristalina, estearilfumarato de sódio, foram preparadas as misturas e denominadas em ordem alfabética (de A até P), com quantidades e proporções descritas na tabela 12:

Tabela 12: Proporção dos componentes nas misturas de ramipril com os excipientes, onde Ram (ramipril), Cel (celulose microcristalina), Est (estearilfumarato de sódio), HPMC (hidroxipropilmetilcelulose), Lac (lactose monohidratada).

Denominação	Composição	Ram (%)	Cel (%)	Est (%)	Hip (%)	Lac (%)	Total (%)
A	Ram + Cel	50,0	50,0	0,0	0,0	0,0	100,0
B	Ram + Est	50,1	0,0	49,9	0,0	0,0	100,0
C	Ram+ HPMC	49,9	0,0	0,0	50,1	0,0	100,0
D	Ram + Lac	49,9	0,0	0,0	0,0	50,1	100,0
E	Ram + Cel + Est	33,2	33,3	33,5	0,0	0,0	100,0
F	Ram + Cel+ HPMC	33,4	33,3	0,0	33,4	0,0	100,0
G	Ram + Cel + Lac	33,3	33,5	0,0	0,0	33,2	100,0
H	Ram + Est + HPMC	33,6	0,0	33,3	33,1	0,0	100,0
I	Ram + Est + Lac	33,3	0,0	33,1	0,0	33,6	100,0
J	Ram+ HPMC + Lac	33,3	0,0	0,0	33,4	33,2	100,0
K	Ram + Cel + Est + HPMC	25,0	25,0	24,9	25,1	0,0	100,0
L	Ram + Cel + Est + Lac	25,0	25,0	24,9	0,0	25,0	100,0
M	Ram + Cel+ HPMC + Lac	24,9	25,1	0,0	25,0	24,9	100,0
N	Ram + Est + HPMC + Lac	25,0	0,0	25,0	24,9	25,1	100,0
O	Ram + Cel + Est + HPMC + Lac	4,4	48,1	1,5	1,0	45,0	100,0
P	(Ram + Hip) + Cel + Est + Lac	4,4	48,0	1,5	1,0	45,1	100,0

As misturas foram expostas à 40 °C e 75 % de umidade relativa por seis meses. Foram realizadas análises térmicas e cromatográficas nos tempos: inicial (T0), após três meses (T1) e após seis meses (T2), simulando um estudo de estabilidade acelerado na zona climática IVb, de acordo com a RE nº1 de 2005. ¹²

No T0, além das misturas, foram analisados por análise térmica o ativo e cada um dos excipientes individualmente. Foram comparados os resultados de DSC e TGA obtidos das substâncias separadas com os resultados obtidos com as misturas, sendo avaliados aspectos que sejam indicativos de interação fármaco x excipiente.

DESAI et al (2003), cita que as técnicas mais utilizadas nos estudos envolvendo compatibilidade de fármacos e excipientes são: Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e Termogravimetria (TGA), sendo técnicas complementares as de Difração de Raio X (DRX), Microscopia Eletrônica por Varredura (MEV), Infravermelho (IV) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) ⁴⁰

As técnicas de DSC e TGA necessitam de pequena quantidade de amostra e trazem resultados rápidos, por esse motivo são amplamente utilizadas na etapa de pré-formulação, contudo, os resultados são de difícil interpretação, necessitando de uma técnica complementar para concluir a avaliação dos resultados. ⁴¹

Nos estudos realizados, foram comparados os dados obtidos da análise térmica e com os resultados de teor e impurezas por HPLC, possibilitando maior segurança na interpretação dos dados e também enriquecendo o trabalho com um comparativo que desafia a eficiência da análise térmica.

A avaliação da entalpia é possível quando os eventos não se sobrepõem na curva de DSC. O surgimento ou desaparecimento de eventos endotérmicos ou exotérmicos nos gráficos de análise térmica podem indicar interação entre os componentes avaliados. Essas interações podem ser confirmadas por Infravermelho (IR), com sobreposição de bandas. ^{41, 42, 43}

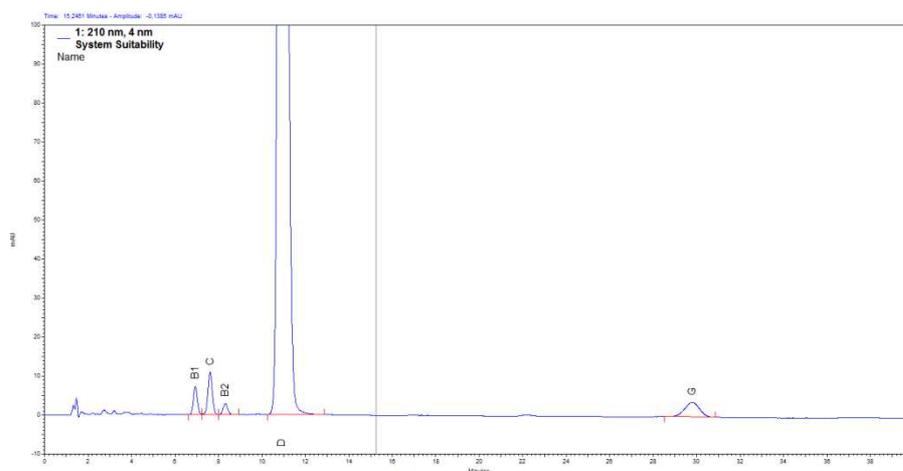
ARAUJO et al (2007) cita que para avaliação do ramipril por DSC e TGA, a rampa de aquecimento mais adequada é a de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, diante disso, os estudos de análise térmica foram desenvolvidos empregando essa rampa de aquecimento. ³³

Para as análises por DSC e TGA, a temperatura inicial foi de 25°C , sendo aumentada em rampa de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, finalizando o teste a 250°C . Empregou-se atmosfera de nitrogênio com vazão a $50\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A massa pesada foi cerca de 3mg para amostras analisadas no DSC e cerca de 7 mg para amostras avaliadas no TGA. Foram usados cadinhos de alumínio com tampa furada.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Adequabilidade da metodologia BP2015

Para avaliar a adequabilidade do sistema cromatográfico para o método descrito na BP, foi preparada uma solução contendo as substâncias: ramipril, ramipril impureza K (PGS) e ramipril impureza A, obtendo-se o cromatograma da figura 7.



Resultados:

1: 210 nm, 4 nm Results

Nome	TR	Área	Theoretical plates (USP)	Asymmetry	Capacity factor	Resolution (USP)
B1	7,01	343535	7008	1,11	5,74	0,00
C	8,06	452037	7669	0,98	6,75	3,00
B2	8,53	119958	9370	1,19	7,20	1,30
D	11,51	54970118	3632	1,26	10,07	5,35
G	30,67	580923	8029	1,01	28,49	0,00

Figura 7: cromatograma obtido com a solução padrão mix, sendo os isômeros da Impureza K (B1 e B2), ramipril impureza A (C), ramipril (D) e ramipril impureza D (G).

Em todas as análises realizadas, o sistema cromatográfico atendeu aos critérios de *system suitability* da BP, com $R \geq 1,0$ entre os picos da Impureza A e Impureza K. Os resultados também cumpriram as recomendações do guia de validação do FDA e capítulo geral de cromatografia da USP, sendo que todos os compostos avaliados apresentaram $R \geq 1,0$, $N > 2000$, $K' \geq 1,5$ e $T \leq 2,0$, portanto, pudemos concluir que o sistema estava adequado a prosseguir com o teste de teor e impurezas nas condições laboratoriais.^{35,36, 37}

A identificação das impurezas A e K foram realizadas com os padrões primários e o pico de ramipril Impureza D foi nomeado a partir do tempo de retenção relativo descrito na BP (2,6 que corresponde ao tempo de retenção de cerca de 30 minutos), sendo proveniente do ramipril, mesmo não tendo sido adicionado à solução foi possível detectá-lo.³⁵

4.2 Seletividade e Especificidade

4.2.1 Soluções de diluente, placebo, IFA e padrões de referência

Os cromatogramas obtidos com as soluções de diluente, placebo, IFA, CRA, Imp K, CRD e mix de impurezas, encontram-se nas figuras 8 a 26, respectivamente.

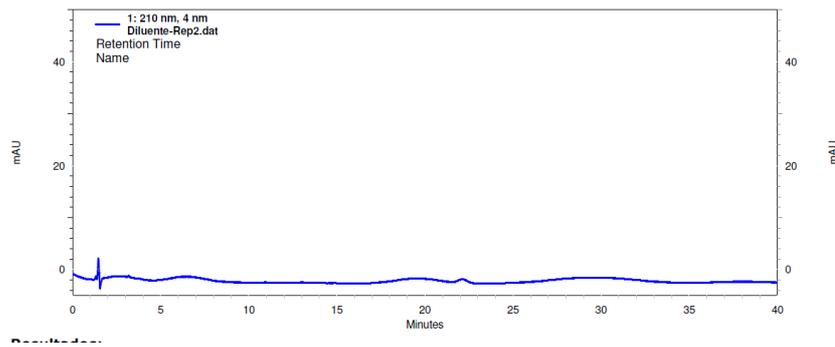


Figura 8: Cromatograma obtido com a solução diluente (fase móvel).

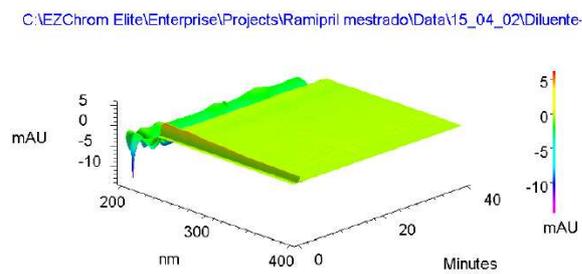


Figura 9: Gráfico 3D de 200 a 400 nm obtido com a solução Diluente.

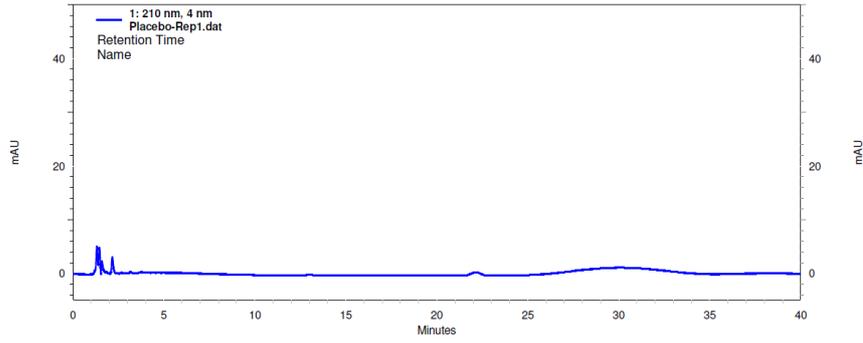


Figura 10: Cromatograma obtido com a solução placebo.

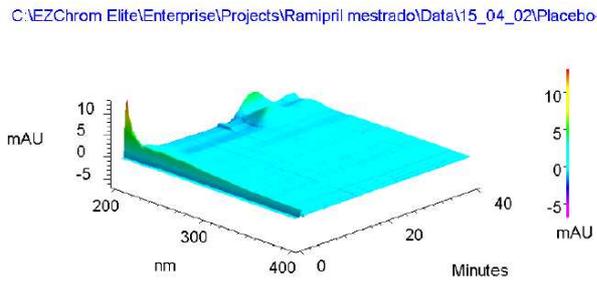


Figura 11: Gráfico 3D de 200 a 400 nm obtido com a solução placebo.

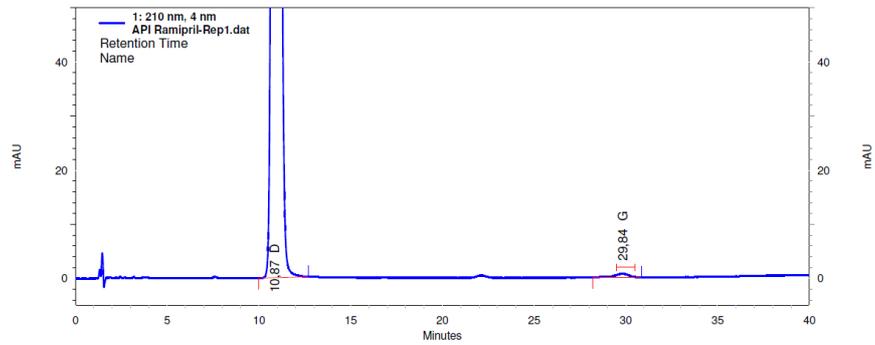


Figura 12: Cromatograma obtido com a solução de Insumo Farmacêutico Ativo (API) ramipril.

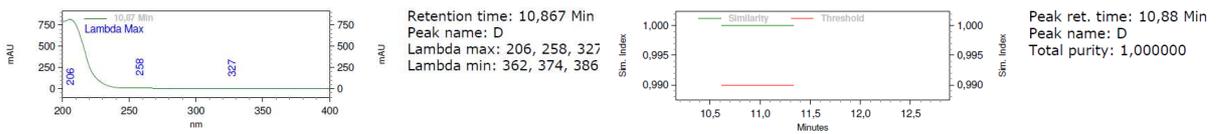


Figura 13: Espectro Ultravioleta (UV) de 200 a 400 nm e pureza de pico do Insumo Farmacêutico Ativo (API) ramipril.

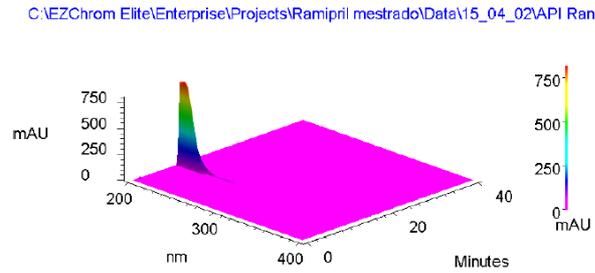


Figura 14: Gráfico 3D de 200 a 400 nm do Insumo Farmacêutico Ativo (API) ramipril.

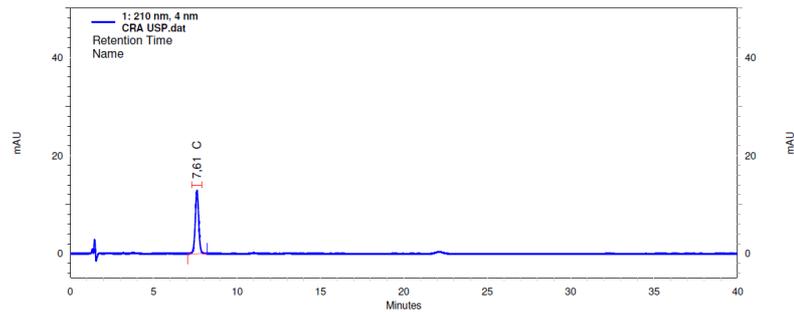


Figura 15: Cromatograma obtido com a solução de Composto Relacionado A fornecido pela USP.

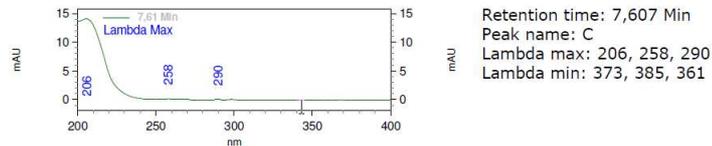


Figura 16: Espectro Ultravioleta (UV) de 200 a 400 nm obtido com a solução de CRA fornecido pela USP.

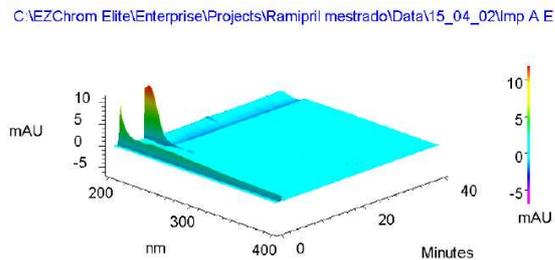


Figura 17: Gráfico 3D de 200 a 400 nm obtido com a solução de CRA fornecido pela USP.

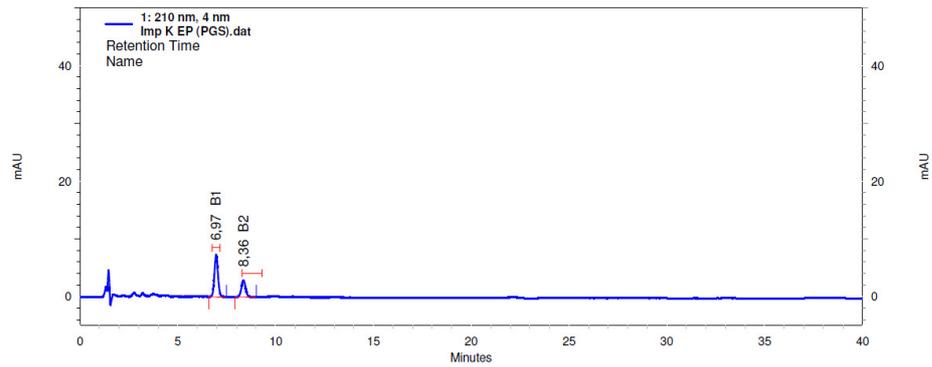


Figura 18: Cromatograma obtido com a solução de Imp K fornecido pela PGS.

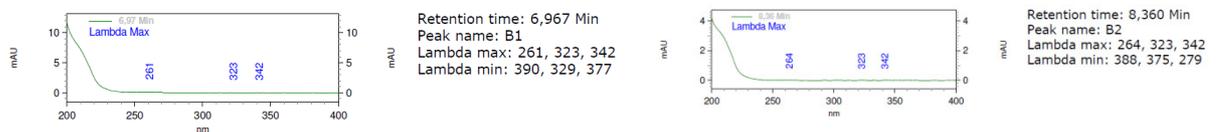


Figura 19: Espectro Ultravioleta (UV) de 200 a 400 nm obtido com a solução de Imp K fornecido pela PGS.

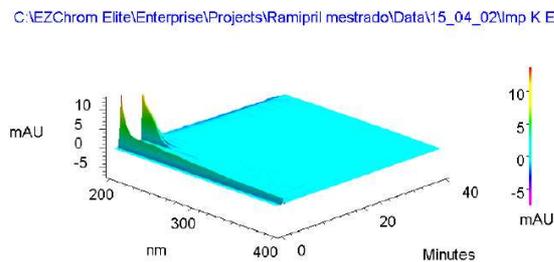


Figura 20: Gráfico 3D de 200 a 400 nm obtido com a solução de Imp K fornecido pela PGS.

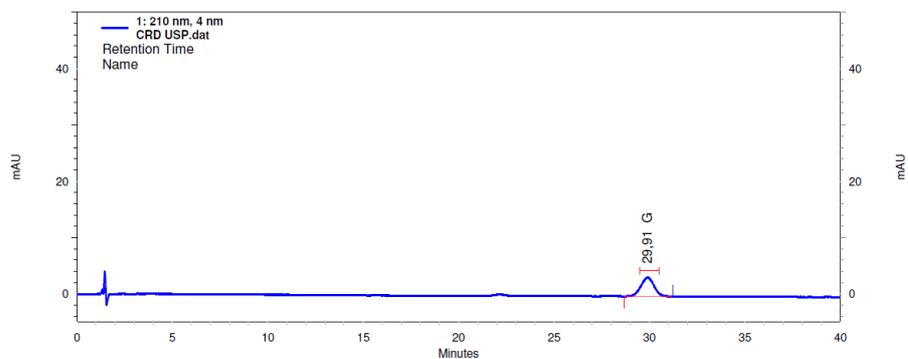


Figura 21: Cromatograma obtido com a solução de CRD fornecido pela USP.

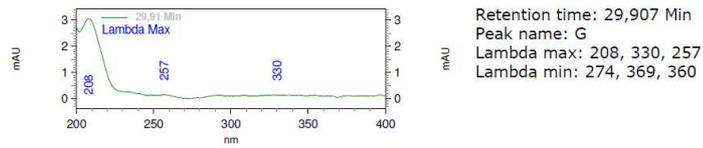


Figura 22: Espectro Ultravioleta (UV) de 200 a 400 nm obtido com a solução de CRD fornecido pela USP.

C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Ramipril mestrado\Data\15_04_02\CRD US

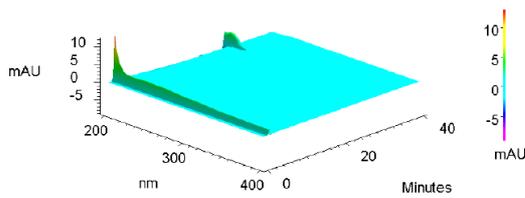


Figura 23: Gráfico 3D de 200 a 400 nm obtido com a solução de CRD fornecido pela USP.

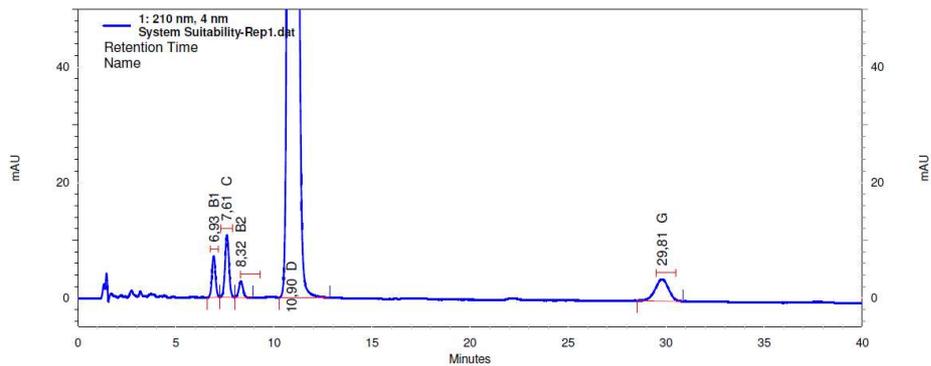


Figura 24: Cromatograma obtido com a solução Mix de ramipril, CRA, CRD e Imp K fornecido pela PGS.

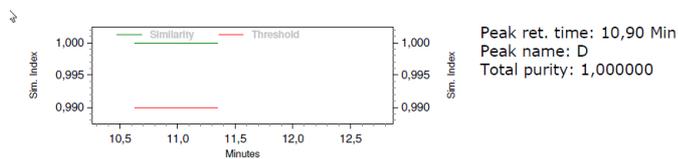


Figura 25: Pureza de pico do Ramipril de 200 a 400 nm obtido com a solução de Mix de ramipril, CRA, CRD e Imp K fornecido pela PGS

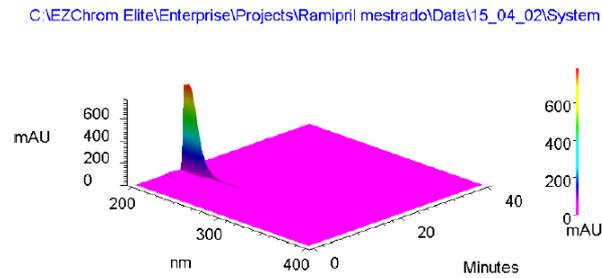


Figura 26: Gráfico 3D de 200 a 400 nm obtido com a solução de Mix de ramipril, CRA, CRD e Imp K fornecido pela PGS.

As soluções de diluente (fase móvel) e de placebo (mistura dos excipientes Cel, HPMC, Lac e Est) não apresentaram pico interferente nos tempos de retenção das substâncias de interesse.

Os cromatogramas obtidos com as soluções preparadas utilizando os padrões do fármaco e das impurezas conhecidas, individualmente, serviram para identificar os tempos de retenção desses compostos.

A solução da mistura de todas as substâncias de interesse apresentou separação adequada, com resolução $\geq 1,0$ e pureza de pico do ramipril de 1,0000.

O ramipril impureza K da farmacopeia britânica não estava disponível pelo compêndio, por isso foi utilizado o sintetizado e fornecido pela empresa PGS. Conforme mencionado no laudo de caracterização, esse padrão apresenta em sua composição a mistura de dois enantiômeros da impureza K, por isso aparecem dois picos no cromatograma, também bem resolvidos, com resolução maior que 1,0, e espectros UV semelhantes.

Os espectros do ramipril e das impurezas são parecidos, sendo que a maior parte delas apresentou máxima absorvidade em 206 nm. Isso é devido à semelhança nos grupamentos cromóforos das estruturas químicas das moléculas, já que as impurezas são originadas do ativo.

Diante dos dados obtidos, podemos afirmar que o método da BP apresentou seletividade satisfatória para quantificação do ativo ramipril e das impurezas CRA, CRD e Impureza K, mesmo na presença dos excipientes presentes nas misturas.

Os laudos dos padrões de referência utilizados encontram-se no anexo 4.

4.2.2 Degradação forçada

Os resultados da degradação do ativo nas diversas condições de estresse (hidrólises ácida e alcalina, oxidação, temperatura, umidade e luz) estão demonstrados na figura 27.

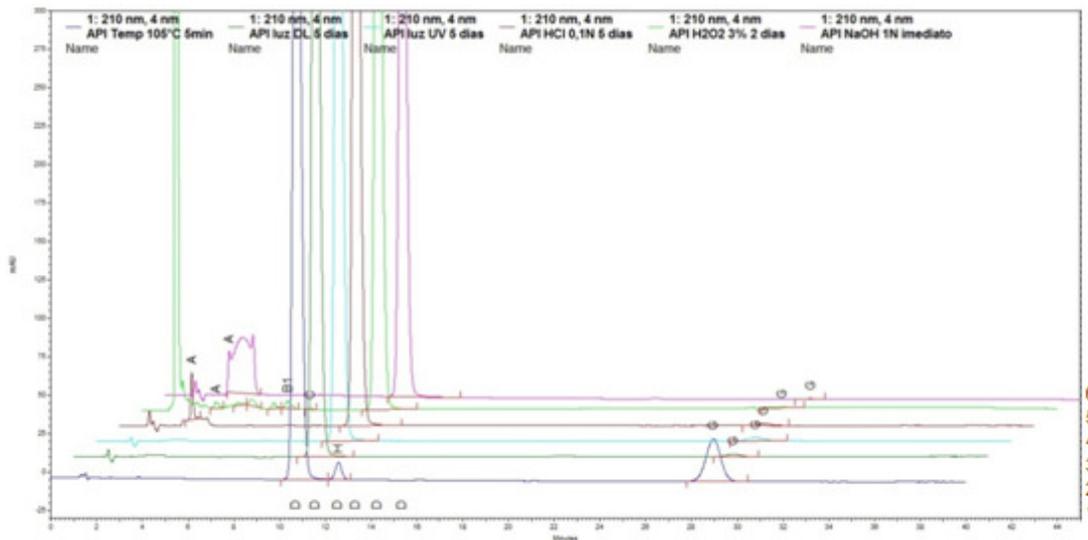


Figura 27: Cromatogramas das amostras submetidas à degradação forçada, onde são demonstrados os cromatogramas do fármaco exposto ao aquecimento (1), Luz visível (2), Luz ultravioleta (3), Ácido clorídrico (4), Peróxido de hidrogênio (5) e Hidróxido de sódio (6) e os picos de ramiprilato (A), ramipril impureza K (B1 e B2), ramipril impureza A (C), ramipril (D), ramipril impureza D (G), impureza desconhecida (H).

Inicialmente a degradação térmica foi testada a 60 °C, não alcançando a degradação de 10 % em 5 dias.

Procedeu-se então um teste a 105 °C por 2 dias, contudo, o ramipril sofreu total degradação, convertendo-se ao ramipril dicetopiperazina (Impureza D da EP), confirmando o que é citado na literatura, que informa a ciclização por aquecimento como a principal via de formação de tal composto e a possibilidade de produção *in vitro* por aquecimento.^{7, 9 e 10}

Foram realizados novos ensaios de degradação, obtendo a degradação de 7,1 % expondo o fármaco a 105 °C por 5 minutos.

A hidrólise básica também causa degradação rápida do ramipril, sendo que cerca de 17,5 % se degrada em hidróxido de sódio 1 N imediatamente após o contato sendo feita a neutralização logo em seguida, originando um pico com tempo de retenção relativo de 0,3 que, segundo descrito por DIEGO et al (2010), refere-se ao ramiprilato.⁷

Na solução estressada por hidrólise ácida, usando HCl 0,1 N por 5 dias, obteve-se degradação de cerca de 8,8 %, com formação de um pico com tempo de retenção relativo de 0,3, que segundo descrito por DIEGO et al (2010), refere-se ao ramiprilato.⁷

As amostras expostas à luz ultravioleta e à luz branca por 5 dias não apresentaram degradação significativa, não sendo observada formação de nenhum composto.

Na condição de estresse por oxidação, utilizando peróxido de hidrogênio 3 % (v/v) por 2 dias, observou-se degradação de cerca de 8,5 % e a formação dos compostos ramiprilato, Impureza K, Impureza A e compostos desconhecidos com tempos de retenção entre 4 e 5 minutos.

Com exceção da amostra estressada pelo aquecimento, todas as soluções avaliadas apresentaram pico da Impureza D (ramipril DKP) com intensidade semelhante nas amostras controle.

Em todas as condições de estresse a pureza de pico do ramipril foi avaliada, através de comparação espectral em diversos pontos do início ao fim da eluição do pico, através do software EzChrom[®]. Essa ferramenta permite verificar se houve interferência de algum produto de degradação no pico do ativo, avaliando a seletividade do método.

Os cálculos de pureza de pico foram realizados comparando o espectro do ápice do pico (espectro de referência, ponto que apresenta a maior concentração do analito e o espectro mais bem definido), com diversos espectros amostrados do início ao fim do pico de ramipril, sendo coletado um espectro a cada 400 milissegundos.

Desse total de espectros, foi realizada uma avaliação, contando todos os espectros que apresentaram pelo menos 95 % de semelhança com o espectro de referência e também calculando os que apresentaram menos de 95% de similaridade.

A razão entre o total espectros semelhantes pelo total de espectros que apresentaram diferença, representa o valor de pureza de pico. Dentre os espectros avaliados, desconsideraram-se 5 % de *absorbance threshold* (tratam-se dos espectros da base do pico, próximos do início e do término da integração, onde a concentração de analito é tão baixa que não é possível ter um espectro bem definido que possa ser comparado ao espectro do apse do pico).

Quando se tem um resultado de pureza de pico igual a 1,000, significa que todos os espectros avaliados apresentaram semelhança de no mínimo 95 % com o espectro de referência. O valor mínimo aceitável de pureza de pico é 0,990 para que se possa garantir que nada diferente do composto principal esteja eluindo ao mesmo tempo dele.

Os resultados de pureza de pico obtidos estão apresentados na tabela 13.

Tabela 13: Resultados de pureza de pico de ramipril

Condição de estresse	Pureza de pico do ramipril
Oxidação	1,000
Luz UV	1,000
Luz DL	1,000
Hidrólise Ácida	1,000
Hidrólise Alcalina	1,000
Térmica	1,000

O fator de pureza de pico obtido mostrou-se $\geq 0,990$, ou seja, houve pelo menos 95% de similaridade dos espectros do início ao fim da eluição do ramipril, demonstrando que os produtos de degradação e as impurezas conhecidas não apresentaram interferência no pico do ramipril. Esse resultado a seletividade e especificidade do método analítico proposto.

4.3 Validação parcial da metodologia BP2015 de Substâncias relacionadas para doseamento de Ramipril

Para se comprovar que o método de substâncias relacionadas descrito na farmacopeia britânica é adequado para avaliar também o teor de ramipril, de forma simultânea, foram realizados testes de validação de método, comprovando a linearidade, exatidão e precisão, pois a proposta é manter a mesma condição cromatográfica que apresentou resultados satisfatórios de seletividade e especificidade, conforme mencionado nos itens 3.5.

4.3.1 Linearidade

Foi relevante avaliar a linearidade do método para verificar se a resposta apresentada pelo ramipril seria proporcional a sua concentração, na faixa de 80 a 120% da concentração da amostra ($0,5\text{mg mL}^{-1}$) do método analítico de substâncias relatadas, para verificar se ele seria aplicável ao doseamento.

Os resultados obtidos com a curva de linearidade estão demonstrados na tabela 14 e a curva experimental e o gráfico de resíduos nas figuras 28 e 29, respectivamente.

Tabela 14: Resultados analíticos da linearidade de ramipril ao nível de teor

Ponto (%)	x	y
	Conc. Teórica (mg.mL^{-1})	Resposta
80,0	0,40063712	49668965
	0,40063712	49919625
	0,40063712	49975294
90,0	0,45071676	55812229
	0,45071676	55794451
	0,45071676	55696572
100,0	0,50079640	62065466
	0,50079640	62160373
	0,50079640	62232295
110,0	0,55087604	68606381
	0,55087604	68659311
	0,55087604	68750213
120,0	0,60095568	74025212
	0,60095568	74205504
	0,60095568	74124513

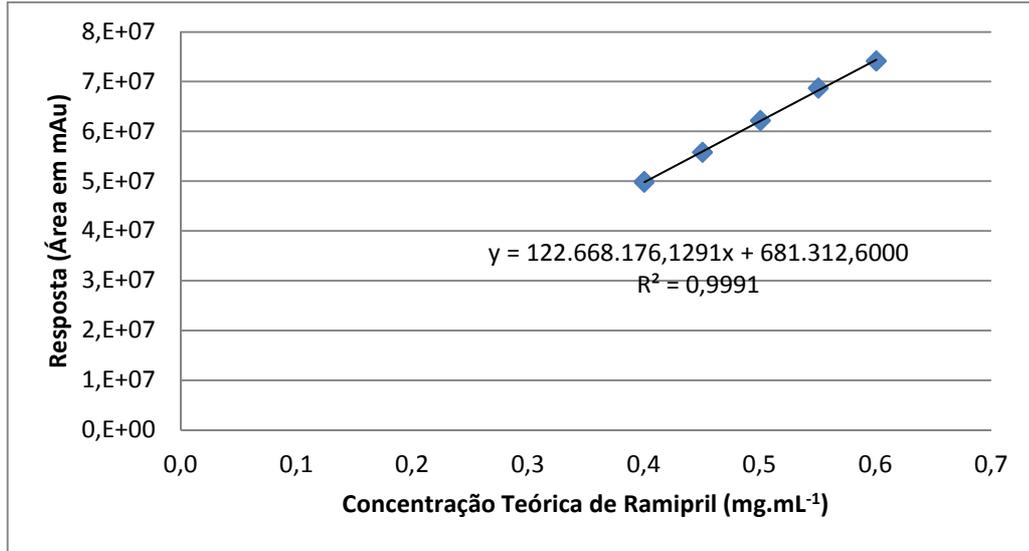


Figura 28: Curva analítica experimental de ramipril de 80 a 120%

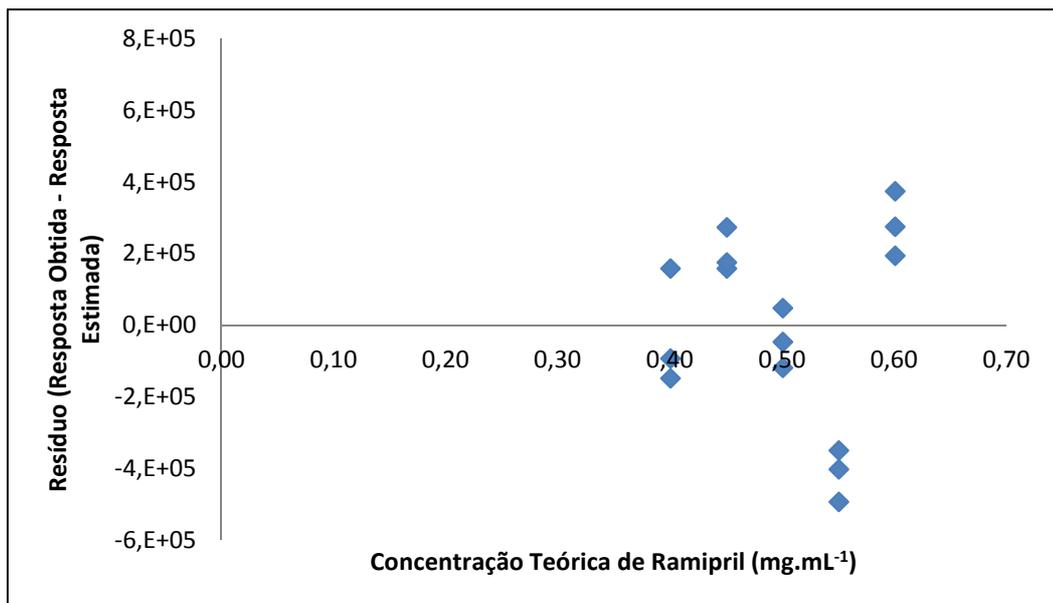


Figura 29: Gráfico de resíduos de ramipril de 80 a 120%

O coeficiente de correlação linear atende à RE899, sendo maior que 0,99, o desvio padrão relativo entre as injeções foi menor que 2,0% e o gráfico de resíduos apresentou erros aleatórios, sem indicar tendências. Diante dos dados obtidos, não foi observado nenhum impedimento na utilização do método de substâncias relacionadas para a quantificação do ramipril em relação à linearidade. Os dados

obtidos no teste de linearidade foram utilizados para obtenção da equação da reta. Empregou-se tal equação para avaliar a exatidão do método de substâncias relacionadas para avaliação do teor, conforme apresentado no item 4.3.2.

Foi avaliada a linearidade ao nível de impurezas (de 0,5 a 7,5%) para verificar se a resposta seria proporcional também no intervalo de menor concentração, em que se obtêm sinais de menor intensidade que podem sofrer maior interferência de ruídos. Os dados obtidos são apresentados na tabela 15 e a curva experimental e o gráfico de resíduos nas figuras 30 e 31, respectivamente.

Tabela 15: Resultados analíticos da linearidade ao nível de impurezas

Ponto (%)	x	Y
	Conc. Teórica (mcg.mL ⁻¹)	Resposta
0,5	2,5	312994
		312614
		313089
1,0	5,0	623890
		624453
		625461
2,0	10,1	1235437
		1235497
		1238453
3,0	15,1	1861508
		1868583
		1867404
4,0	20,2	2480233
		2479492
		2482503
5,0	25,2	3077960
		3079634
		3080073
6,0	30,2	3709146
		3707593
		3710056
7,5	37,8	4644256
		4632674
		4616788

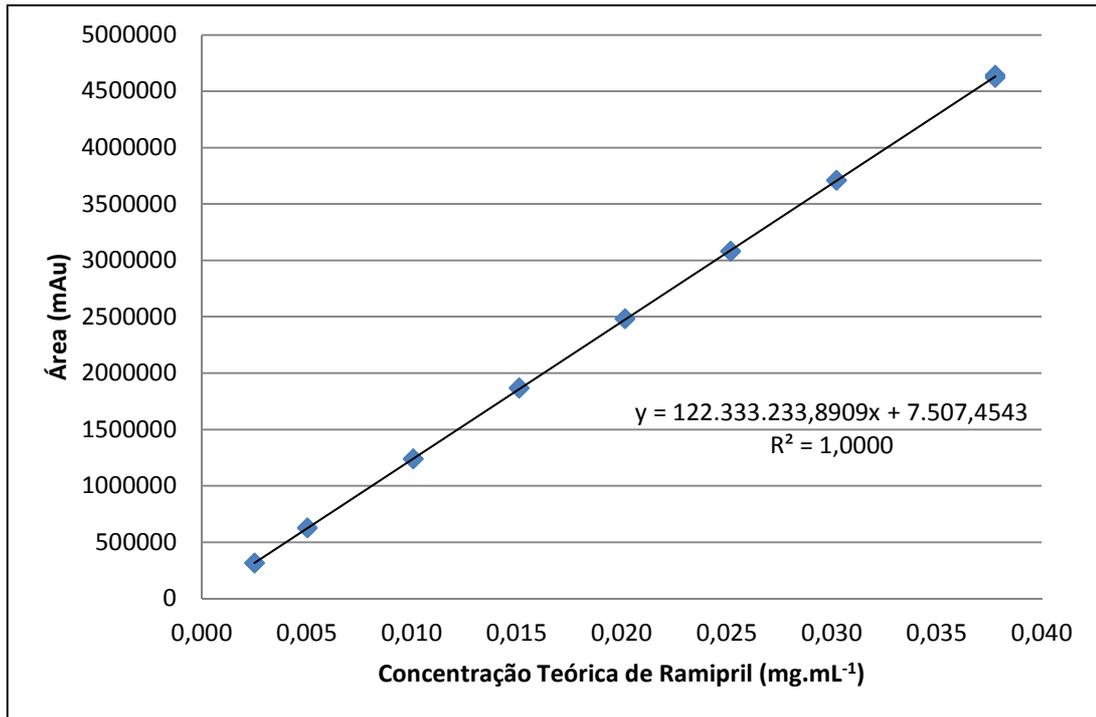


Figura 30: Curva analítica experimental de ramipril de 0,5% a 7,5%

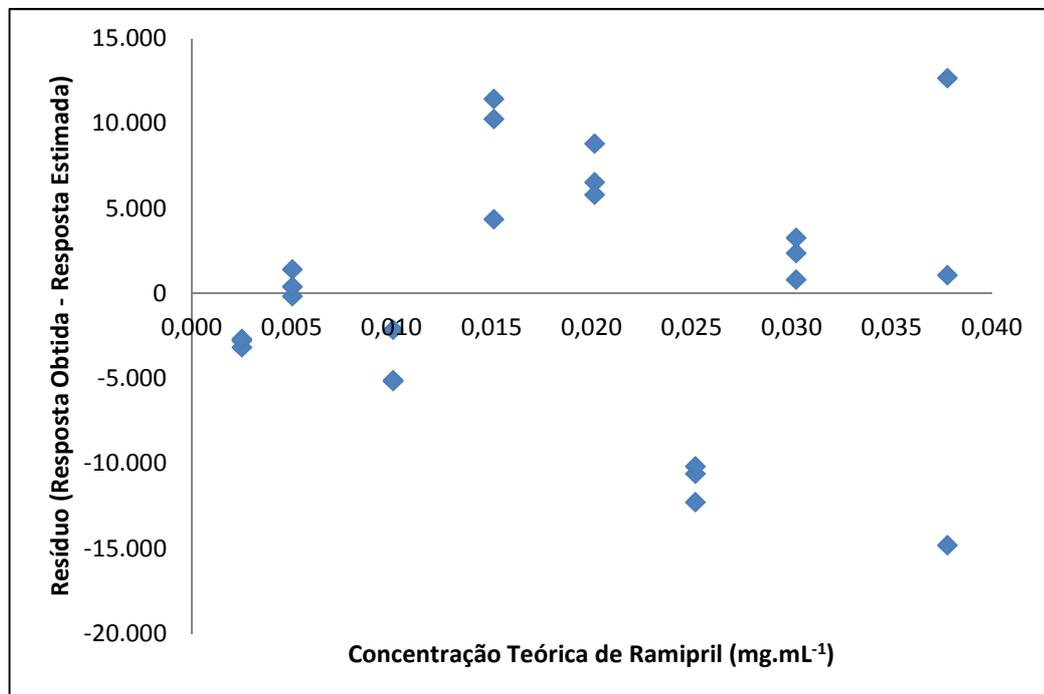


Figura 31: Gráfico de resíduos da linearidade nível de Impurezas

O coeficiente de correlação linear atende à RE899, sendo maior que 0,99 e o gráfico de resíduos apresentou-se com erros aleatórios, demonstrando que o método de impurezas responde de forma proporcional à concentração analisada.

4.3.2 Exatidão

A exatidão foi avaliada para verificar se seria possível quantificar de forma inequívoca a quantidade na concentração da amostra ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$), na presença do placebo, para confirmar que o método de substâncias relacionadas seria aplicável ao doseamento. Os resultados obtidos constam na tabela 16.

Tabela 16: Resultados da Exatidão

Coeficiente linear	a =	122668176,1291		
Coeficiente angular	b =	681312,6000		
Ponto (%)	Conc. Teórica (mg.mL^{-1})	Resposta	Conc. Obtida (mg.mL^{-1})	Recuperação (%)
80,0	0,4196	52844840	0,4252	101,35
	0,4008	51723273	0,4161	103,82
	0,4024	51081555	0,4109	102,11
100,0	0,5244	66035505	0,5328	101,59
	0,5010	64448532	0,5198	103,76
	0,5030	63880224	0,5152	102,43
120,0	0,6293	78862041	0,6373	101,27
	0,6012	77084123	0,6228	103,60
	0,6036	75619064	0,6109	101,21
			Critério de Aceitação	100% ± 5%
			Resultado	De Acordo

Os dados obtidos com o teste de exatidão demonstraram que o método de substâncias relacionadas da BP apresenta resultados exatos para quantificação do ativo ramipril, apresentando recuperação de $100 \pm 5\%$ do resultado estimado.

4.3.3 Intervalo para determinação de teor

O intervalo foi determinado com os dados da linearidade e exatidão, e define a faixa de trabalho da metodologia, conforme tabela 17.

Tabela 17: Intervalo (teor)

Menor Concentração	0,40	mg/mL
Maior Concentração	0,63	mg/mL

4.3.4 Precisão

A precisão foi estudada com 12 amostras, sendo avaliada a repetibilidade do método no primeiro grupo (6 preparações) e a precisão intermediária no segundo grupo (6 preparações).

As soluções foram preparadas conforme descrito no teste de substâncias relacionadas BP e os resultados constam na tabela 18.

Tabela 18: Resultados da precisão

Amostra	Teor(%)
Precisão Intradia 01	98,54
Precisão Intradia 02	98,51
Precisão Intradia 03	98,08
Precisão Intradia 04	97,41
Precisão Intradia 05	98,43
Precisão Intradia 06	99,01
Média grupo 1 (n=6)	98,33
DPR (%) grupo 1 (n=6)	0,55
Precisão Interdia 01	99,52
Precisão Interdia 02	98,11
Precisão Interdia 03	99,16
Precisão Interdia 04	98,13
Precisão Interdia 05	98,28
Precisão Interdia 06	98,38
Média grupo 02 (n=6)	98,60
DPR (%) grupo 2 (n=6)	0,60
Média Teor	98,46
Intermediária (n = 12) RSD (%)	0,57

O desvio padrão relativo do grupo de precisão repetibilidade (n=6) foi de 0,55% para o primeiro dia e de 0,60% para o segundo dia e entre os grupos (n=12) foi de 0,57%, atendendo ao estipulado para o teste, que é menor ou igual a 5%, portanto o método de substâncias relacionadas apresentou-se preciso para quantificação de ramipril de forma simultânea.

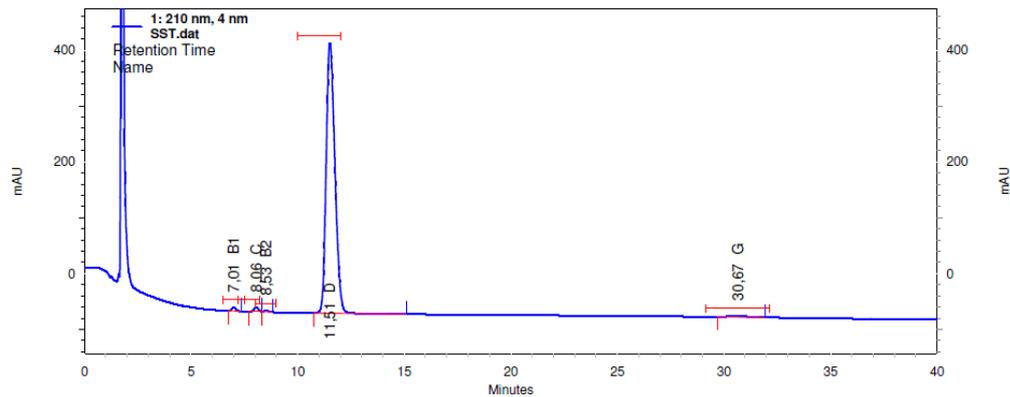
Os dados dos desvios obtidos foram tratados estatisticamente empregando-se o teste F, sendo considerados os DPRs resultantes dos dois grupos de dados (n=6), inserindo no numerador o valor do maior desvio e no denominador o valor do menor desvio. Dessa forma obteve-se o valor de 1,19, sendo que o f tabelado para o intervalo de confiança de 0,025 e n = 12 é de 3,89. Portanto, sendo o valor encontrado menor que o valor tabelado, podemos afirmar que os dois grupos de dados apresentam variância similar, atendendo ao teste F.

As médias foram comparadas estatisticamente empregando-se o teste t de student, sendo que o valor obtido foi de 1,15, sendo menor que o valor de t tabelado de 2,18, portanto as médias não apresentam diferença significativa.

4.4 Análises de Teor e Substâncias Relacionadas por HPLC

4.4.1 Adequação do sistema

Para avaliar se o sistema cromatográfico se encontrava nas condições adequadas, foi injetada a solução padrão mix de impurezas, conforme cromatograma apresentado na figura 32:

**Resultados:**

1: 210 nm, 4 nm Results

Nome	TR	Área	Theoretical plates (USP)	Asymmetry	Capacity factor	Resolution (USP)
B1	7,01	343535	7008	1,11	5,74	0,00
C	8,06	452037	7669	0,98	6,75	3,00
B2	8,53	119958	9370	1,19	7,20	1,30
D	11,51	54970118	3632	1,26	10,07	5,35
G	30,67	580923	8029	1,01	28,49	0,00

Figura 32: Cromatograma da solução padrão mix para avaliação do sistema.

Os parâmetros cromatográficos obtidos com a solução padrão mix de impurezas encontram-se expostos na tabela 19.

Tabela 19: Resultados da adequação do sistema

Parâmetro	Critérios de aceitação	Resultados		
		Análise Inicial	Análise 3 meses	Análise 6 meses
Resolução (R) entre Imp. K e Imp. A	$R \geq 1,0$	1,3	3,1	1,5
Pratos teóricos (N)	$N > 2000$	3632	4234	5065
Fator de Assimetria (T)	$T \leq 2,0$	1,3	1,3	1,3
Fator de capacidade (K')	$K' \geq 1,5$	10,1	9,2	10,3

As concentrações obtidas com os preparos das soluções padrão utilizadas como referência na quantificação de ramipril e das impurezas encontram-se na tabela 20.

Tabela 20: Concentrações das soluções de referência

Análise	Concentração (mg.mL ⁻¹)		
	Padrão Teor	Check	Padrão Impurezas
Inicial	0,5075	0,5225	0,0254
3 meses	0,5156	0,4856	0,0258
6 meses	0,5088	0,49996	0,0254

As soluções amostras foram preparadas conforme descrito no item preparo das soluções amostra (3.5.1), com concentrações teóricas de cerca de 0,50 mg.mL⁻¹ de ramipril em fase móvel. Os resultados obtidos de teor de ramipril comprados a solução padrão, calculados conforme item 4.3.10 estão descritos na tabela 21.

Tabela 21: Teor de ramipril (%) das misturas de ramipril + excipientes.

AMOSTRA	Teor de Ramipril (%)			Variações observadas (%)	
	INICIAL	3 MESES	6 MESES	Diferença entre T0 e T3 meses	Diferença entre T0 e T6 meses
A	95,2	94,4	96,0	-0,9	0,7
B	99,4	101,4	99,3	2,0	-0,1
C	95,0	92,6	93,2	-2,5	-1,8
D	96,7	93,7	95,1	-3,0	-1,6
E	99,0	98,6	96,0	-0,5	-3,1
F	98,5	94,3	97,2	-4,2	-1,3
G	98,3	98,6	93,8	0,3	-4,5
H	96,5	94,7	97,6	-1,7	1,2
I	102,1	97,4	101,6	-4,7	-0,5
J	97,9	96,1	92,9	-1,7	-5,0
K	107,3	110,3	106,2	3,0	-1,1
L	108,2	106,4	109,8	-1,8	1,6
M	92,7	94,1	94,4	1,4	1,6
N	98,8	97,6	98,8	-1,2	0,0
O	97,0	96,9	94,8	-0,2	-2,2
P	95,0	96,1	93,7	1,1	-1,3

Resultados reportados das médias dos dois preparos de misturas realizados para cada amostra.

Os resultados demonstram que o ramipril manteve-se estável em todas as misturas avaliadas durante 6 meses a 40 °C e 75 % de umidade relativa. Apesar de algumas misturas apresentarem resultados fora da faixa de 90,0 a 105,0%, estipulada pela farmacopeia britânica, isso não compromete a interpretação dos resultados, que tem caráter comparativo para avaliação do comportamento do fármaco em contato com os excipientes e investigação de possíveis interações entre eles.

Amostras com variação de até 5% em relação às respectivas amostras recém manipuladas foram considerados estáveis, pois existem erros aleatórios dos instrumentos e de preparo e análise das amostras, que podem causar essa variação analítica.

Os resultados de substâncias relacionadas foram menores que o limite de quantificação (0,5 %) para as impurezas A e K e não foram observadas impurezas desconhecidas nas amostras. Os resultados para a impureza D encontram-se descritos na tabela 22.

Tabela 22: Resultados de Impureza D (EP) nas amostras iniciais e nas amostras expostas em estudo de estabilidade.

Amostra	% Impureza D de Ramipril		
	Inicial	3meses	6 meses
A1	0,23	0,25	0,22
A2	0,25	0,25	0,21
B1	0,25	0,24	0,20
B2	0,24	0,24	0,17
C1	0,16	0,17	0,21
C2	0,20	0,20	0,21
D1	0,21	0,21	0,20
D2	0,22	0,21	0,16
E1	0,30	0,34	0,22
E2	0,19	0,34	0,21
F1	0,30	0,20	0,23
F2	0,22	0,21	0,23
G1	0,24	0,25	0,20
G2	0,28	0,25	0,19
H1	0,31	0,24	0,21
H2	0,30	0,25	0,20
I1	0,27	0,22	0,20
I2	0,27	0,21	0,28
J1	0,17	0,20	0,23
J2	0,25	0,20	0,18
K1	0,28	0,16	0,23
K2	0,36	0,17	0,35
L1	0,34	0,16	0,23
L2	0,27	0,17	0,24
M1	0,27	0,24	0,32
M2	0,27	0,26	0,22
N1	0,28	0,23	0,18
N2	0,36	0,24	0,21
O1	0,45	0,68	0,85
O2	0,55	0,72	0,85
P1	0,51	0,77	0,94
P2	0,50	0,76	0,98

Critério de aceitação: máximo 6,0%

Resultados reportados das médias dos dois preparos realizados para cada amostra.

A impureza D e o ramiprilato são os principais produtos de degradação do ramipril, portanto a ausência do ramiprilato e a quantidade mínima em que foi observada a impureza D, sem aumento considerável, indicam que não ocorreu degradação do ramipril nas misturas com excipientes, demonstrando que não houve incompatibilidade dos componentes estudados.

4.4.2 Análise térmica por DSC e TGA

Conforme LIRA et al (2007), resultados em que as curvas obtidas com as misturas representam a somatória de todos os eventos térmicos observados nas curvas dos materiais separados, sem alterações como novos eventos ou mudança significativa de entalpia (levando-se em consideração as proporções das misturas), indicam que não houve interação entre os componentes da mistura.⁴²

Todas as avaliações levaram em conta também os resultados obtidos com as análises de teor e impurezas, possibilitando verificar se a interação observada na análise térmica resultou na formação de impurezas e decaimento de teor, ou se foram apenas interações físicas sem impacto na formulação. Além disso, serão relacionados os resultados de aumento de umidade presente nas misturas e a formação de impurezas. Foram utilizados os equipamentos TGA, DSC e HPLC-DAD, disponíveis no laboratório de desenvolvimento analítico e de caracterização do estado sólido da empresa parceira, para realização de testes de compatibilidade fármaco x excipiente.

4.4.2.1 Ramipril

A curva de DSC obtida com o ativo ramipril está apresentada na figura 33 e de TGA na figura 34. Obteve-se pico de fusão em torno de 113 °C, coincidindo com o que foi citado por SILVA, R.C. que apresentou 112 °C, seguido de sua decomposição, conforme observado na curva de TGA, ocorrendo considerável perda de massa após a fusão.³⁸

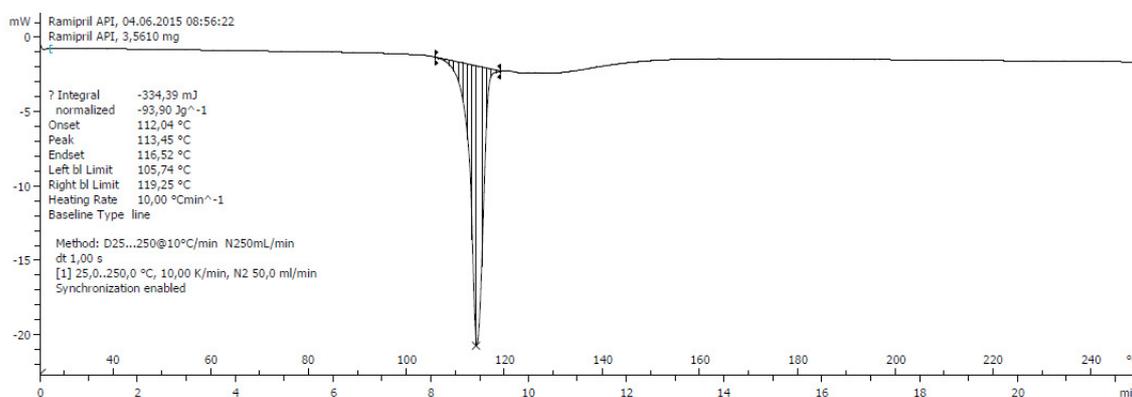


Figura 33: Curva de DSC do Ramipril

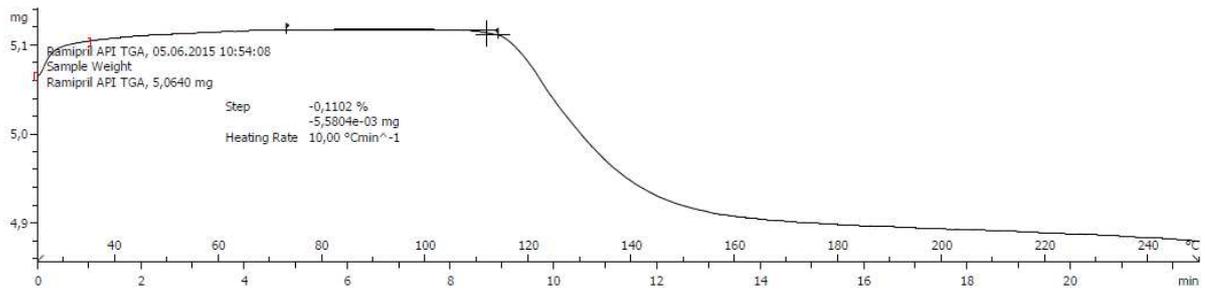


Figura 34: Curva de TGA do Ramipril

4.4.2.2 Celulose Microcristalina

A celulose microcristalina é um excipiente amplamente utilizado, com função de diluente das formulações. Além disso, possui caráter antiaderente, o que facilita o processo de compressão, sendo adequada para processos de compressão por via seca, sem necessidade de granulação e também é considerada desintegrante, facilitando a liberação do fármaco durante o processo de dissolução.

De acordo com Rowe (2015), a celulose apresenta estabilidade, apesar de ser um material higroscópico, que deve ser armazenado em recipientes perfeitamente fechados. A única incompatibilidade relatada é com agentes oxidantes. A celulose não é absorvida para a corrente sanguínea, não apresentando risco toxicológico. ⁴⁴

Existem variados tamanhos de partícula para a celulose (de 38 a 200 mesh) e a especificação de umidade que pode estar presente também varia de forma considerável (de 1,5 até 6%). Essas informações são importantes na escolha de qual tipo de celulose será utilizada na formulação, pois de acordo com às características do ativo e do processo de fabricação, elas podem influenciar na estabilidade e dissolução do produto. ⁴⁴

As curvas de DSC e de TGA obtidas com a celulose microcristalina estão representadas nas figuras 35 e 36 respectivamente.

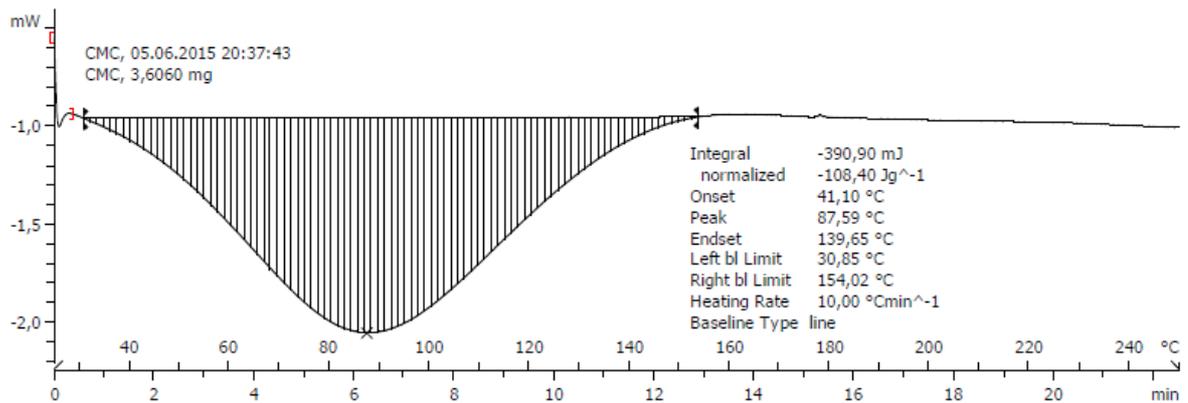


Figura 35: Curva de DSC da Celulose Microcristalina

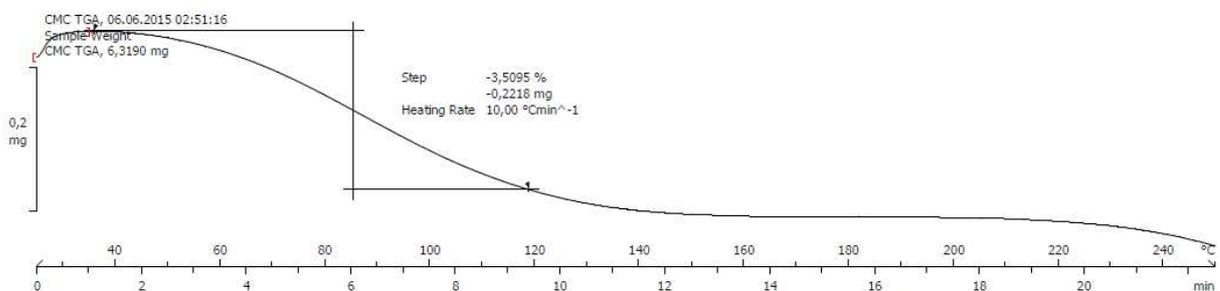


Figura 36: Curva de TGA da Celulose Microcristalina

O pico presente na curva de DSC da celulose é proveniente da perda de água presente no material. Por ser um evento que ocorre de forma gradativa e lenta, o pico fica alargado e com baixa intensidade. A fusão desse excipiente ocorre próxima de 300 °C, e como o forno chegou somente até 250 °C, tal evento não foi observado.

45

4.2.1.1 Estearilfumarato de sódio

O Estearilfumarato de sódio é um excipiente com função lubrificante, geralmente utilizado em substituição ao estearato de magnésio, que é o lubrificante mais comum nas formulações. No caso das fórmulas contendo ramipril, no levantamento realizado em bulas de medicamentos comercializados no mercado brasileiro, todas apresentaram o estearilfumarato de sódio.

Conforme citado por Rowe (2015), a concentração usual do estearilfumarato de sódio é de 0,5 a 2,0% (p/p), é um pó fino, podendo apresentar até 5% de umidade. Suas partículas apresentam-se aglomeradas e ele é incompatível com acetato de clorexidina. ⁴⁴

Analisando o material obteve-se a curva de DSC descrita na figura 37 e curva de TGA de acordo com a figura 38.

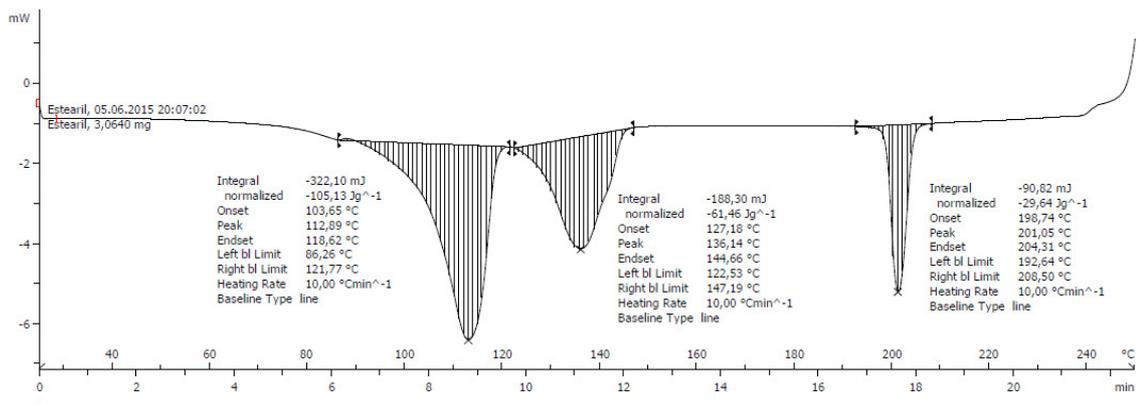


Figura 37: Curva de DSC do Estearilfumarato de sódio

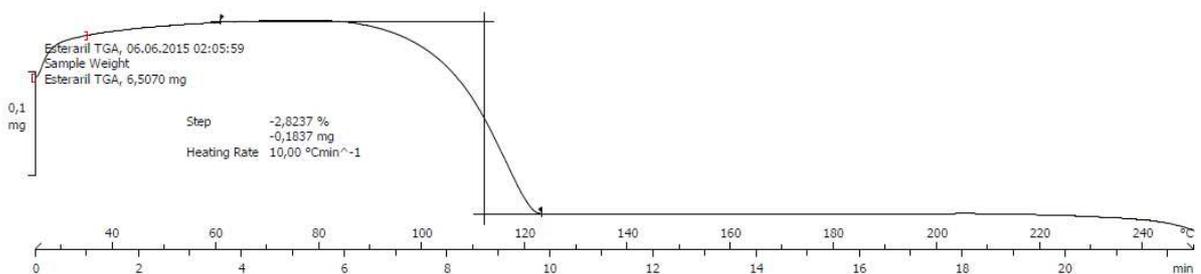


Figura 38: Curva de TGA do Estearilfumarato de sódio

Observaram-se três eventos endotérmicos na curva de DSC do estearil fumarato de sódio, sendo todos com baixa intensidade. Nos dois primeiros eventos ocorre perda de massa significativa na curva de TGA, portanto podem estar relacionados à perda de água e solventes. O pico endotérmico em ~200 °C corresponde à fusão do material, que de acordo com Rowe (2015), ocorre por volta de 230 °C, seguida de decomposição. ⁴⁴

4.2.1.1 Hidroximetilpropilcelulose (HPMC)

A Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) é derivada da celulose, com modificações nos substituintes metoxilas e hidroxipropila. Ela está descrita nas farmacopeias como Hipromelose, e a principal função desse excipiente é de aglutinante. Também pode ser empregada como película de revestimento e como uma matriz de produtos com liberação modificada. Concentrações entre 2% e 5% (p/p) são empregadas com intuito de revestimento ou granulação via seca (aglutinação da mistura para posterior compressão). HPMC também é usada em formas de dosagem orais líquidas como um agente de suspensão e/ou espessante em concentrações de 0,25 a 5,0%.^{44,46}

As curvas de DSC e TGA da HPMC estão dispostas na figura 39 e 40.

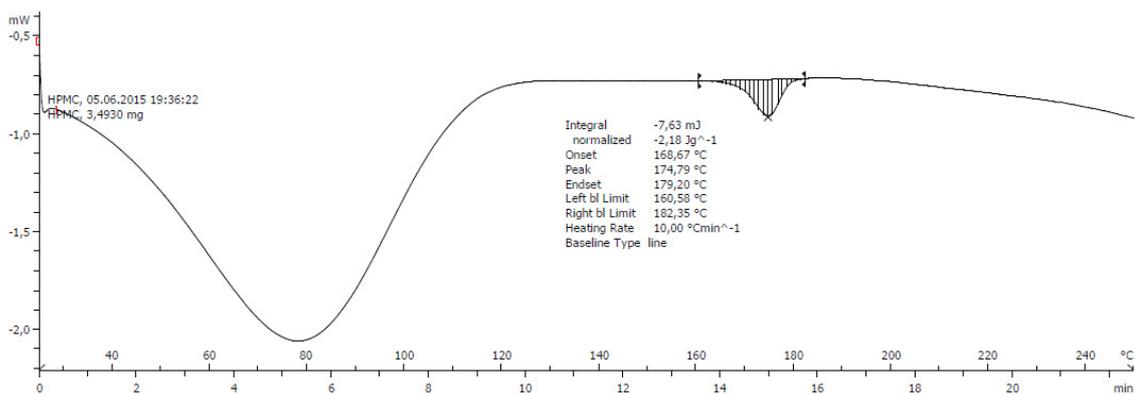


Figura 39: Curva de DSC da Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC)

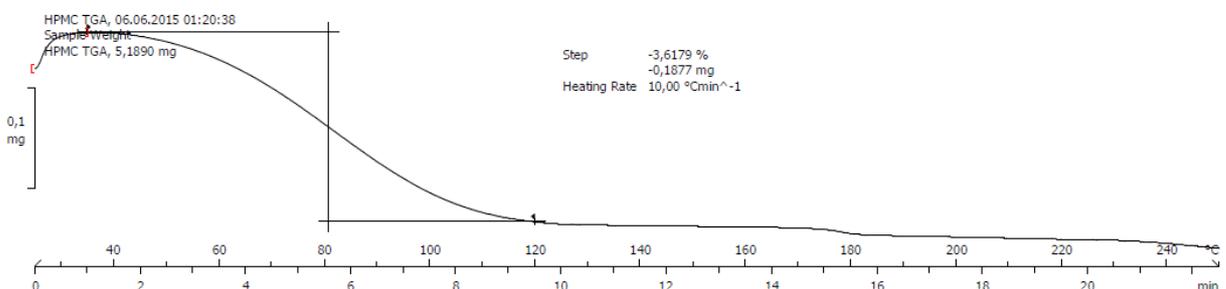


Figura 40: Curva de TGA da Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC)

Obtiveram-se dois eventos endotérmicos na curva de DSC. O primeiro evento ocorre de forma lenta e gradativa, entre 30 e 120 °C, com perda de massa associada (conforme curva de TGA), referente a perda de umidade e/ou solventes.

O segundo evento, de faixa de temperatura de 160 a 180 °C, trata-se da transição vítrea, que é uma passagem reversível de material amorfo em estado sólido, para uma condição de rigidez parcial (líquido de alta viscosidade), não sendo observada perda de massa nessa faixa de temperatura na curva de TGA. Materiais amorfos apresentam arranjos desordenados, não tendo uma estrutura definida. Esse tipo de material não apresenta fusão, como os sólidos cristalinos. ^{44,47}

4.2.1.1 Lactose Monohidratada

A lactose apresenta diversas formas isoméricas, dependendo do processo de secagem. As formas de maior estabilidade são a alfa-lactose monohidratada, a beta-lactose anidra e a alfa-lactose anidra. A principal função da lactose é a de diluente, sendo amplamente utilizada em formulações sólidas.

A lactose monohidratada apresenta cerca de 5% de água de hidratação, não é higroscópica e apresenta baixa quantidade de água de adsorção (no máximo 0,2%). Por apresentar partículas pequenas e finas, ela facilita o processo de mistura e melhora a compressibilidade do pó, especialmente em processos por via seca. Existem relatos de incompatibilidade da lactose com aminas primárias e secundárias por ser um açúcar com caráter redutor ⁴⁴

Uma restrição de uso desse excipiente é a intolerância a lactose que alguns pacientes podem apresentar, devido à deficiência da enzima lactase, por isso é importante alertar sobre a presença da substância na formulação aos potenciais usuários do medicamento. ⁴⁴

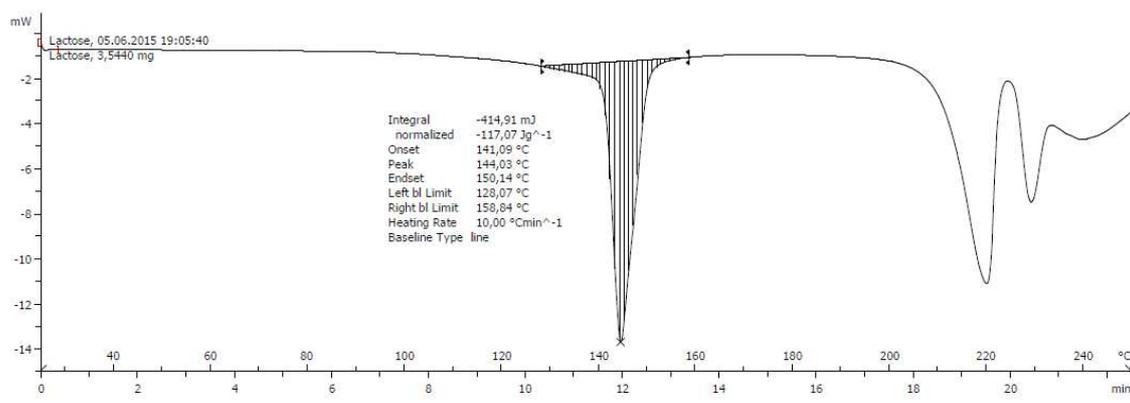


Figura 41: Curva de DSC da Lactose

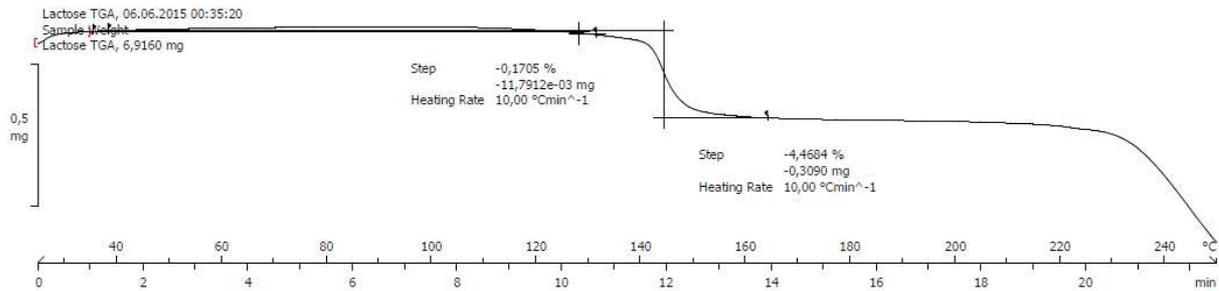


Figura 42: Curva de DSC da Lactose

A curva de DSC obtida com a lactose apresentou três eventos endotérmicos. Em aproximadamente 140 °C ocorre o primeiro pico correspondente à perda da água de hidratação, simultâneo à perda de massa de 130 a 160 °C na curva de TGA.

Os eventos próximos a 220 °C correspondem à fusão, seguido de decomposição térmica. Provavelmente a fusão ocorreu em dois eventos haver uma mistura de formas diferentes da lactose (a lactose anidra funde a temperaturas maiores que a hidratada).⁴⁴

4.2.1.2 Mistura de Ramipril + CMC

A mistura de celulose microcristalina: ramipril (1:1) foi preparada e analisada em tempo zero e após exposição a 40°C e 75 % UR durante 3 e 6 meses, apresentando as curvas de DSC e TGA, conforme as figuras 43 e 44, respectivamente.

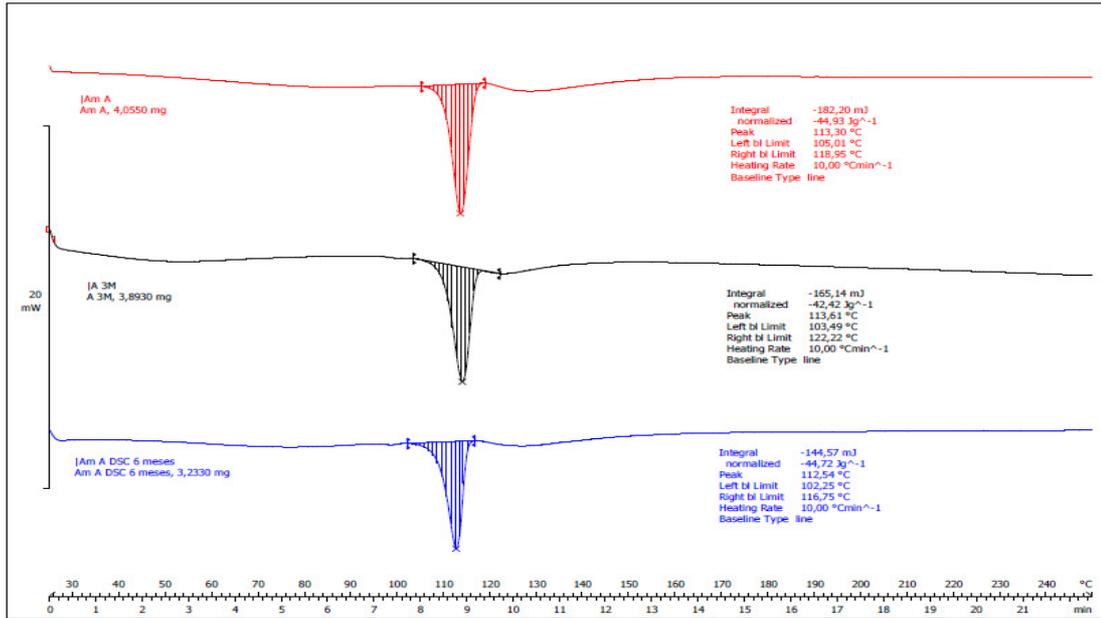


Figura 43: Curvas de DSC da mistura A (Ramipril: Celulose)

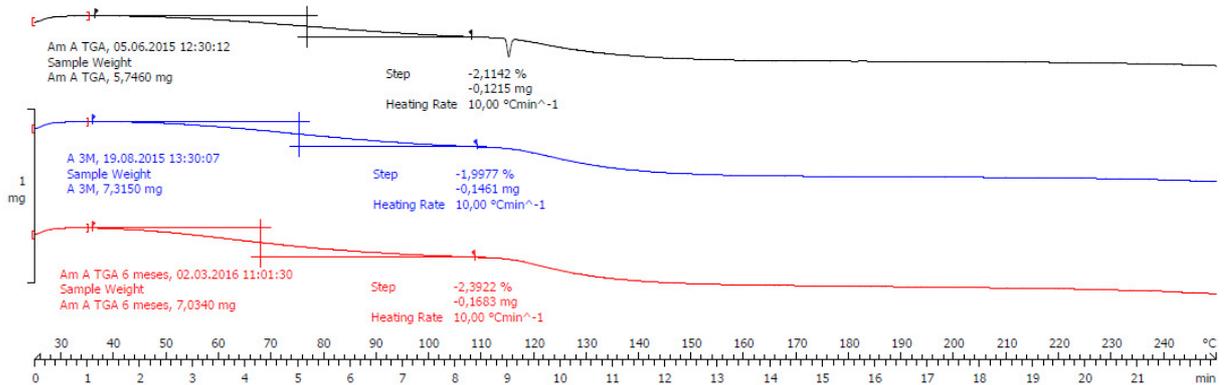


Figura 44: Curvas de TGA da mistura A (Ramipril: Celulose)

A mistura de ramipril: celulose (1:1) apresentou comportamento esperado, mantendo a temperatura de fusão do ativo em 113 °C e com entalpia de cerca de 43 Jg⁻¹, correspondendo a aproximadamente à metade da obtida com o ramipril separadamente (~94Jg⁻¹). O evento de perda de água observado na curva de DSC da celulose isolada não apareceu nas curvas de DSC obtidas com as misturas ramipril + celulose, por ser um evento de intensidade muito baixa comparado à fusão do ramipril, e por ocorrer de forma lenta, apresentando pico muito alargado.

Nas curvas de TGA observa-se a perda de água da celulose e durante o evento endotérmico de fusão do ativo a curva se mantém constante, indicando que

não houve perda de massa, e após a fusão observa-se a decomposição térmica do ramipril.

4.2.1.3 Mistura de Ramipril + Estearilfumarato de sódio

Obtiveram-se as curvas de DSC e TGA conforme figuras 45 e 46 com a mistura de estearilfumarato de sódio: ramipril (1:1) analisada em tempo zero e após exposição a 40°C e 75 % UR durante 3 e 6 meses.

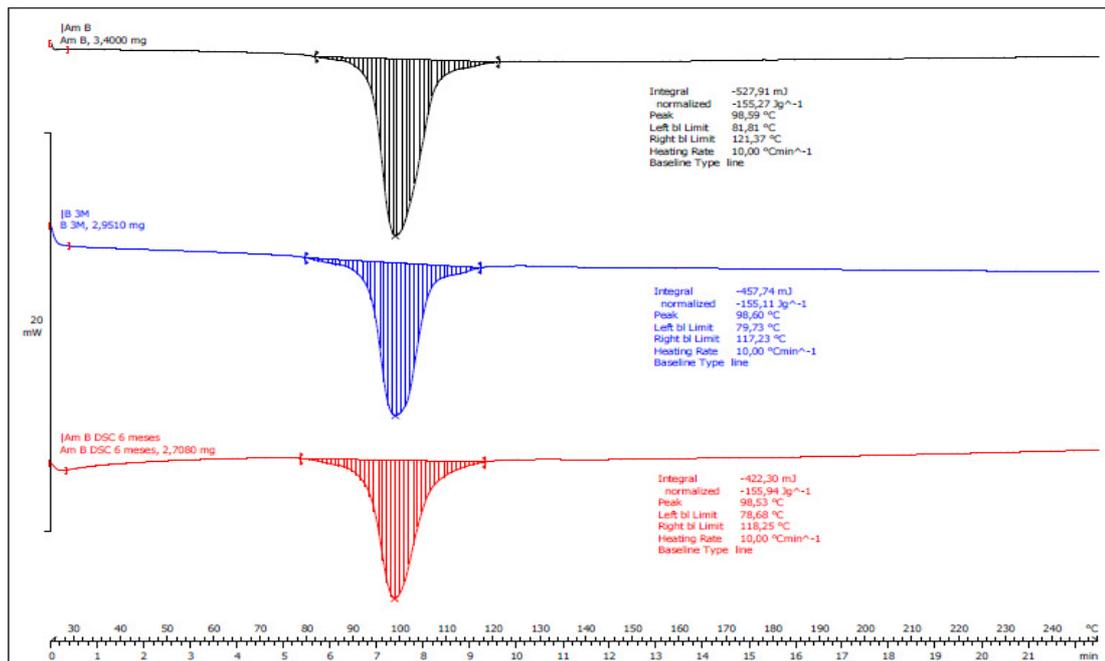


Figura 45: Curvas de DSC da mistura B (Ramipril: Est. Fum. Sódio)

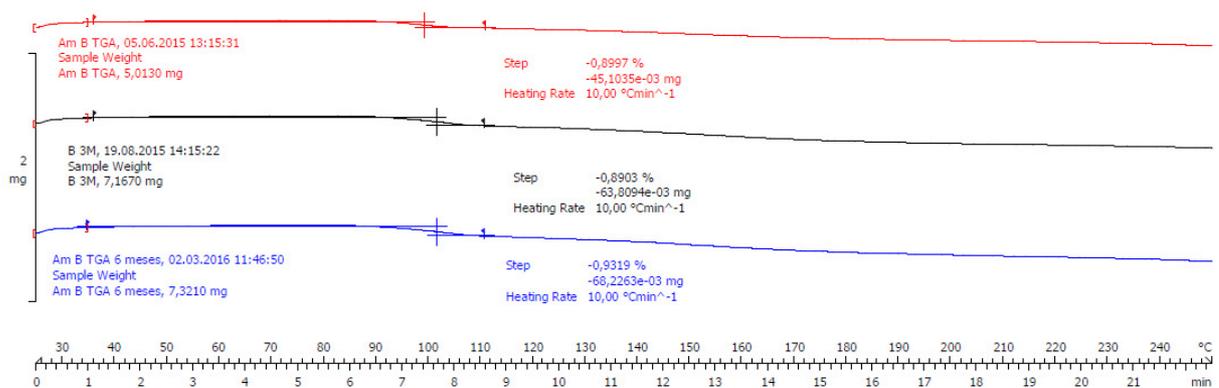


Figura 46: Curvas de TGA da mistura B (Ramipril: Est. Fum. Sódio)

A mistura de ramipril: estearilfumarato de sódio (1:1) apresentou curva de DSC indicativa de possível interação devido ao deslocamento do pico de fusão do ramipril de 112°C para 98°C. Nas duas substâncias separadas ocorreram eventos endotérmicos com temperatura próxima a 112 °C, portanto o esperado seria a somatória da entalpia desses eventos e o pico de fusão manter-se próximo de 112 °C. Essa interação provavelmente é apenas física, não sendo prejudicial à formulação, conforme dados obtidos por HPLC o teor e as impurezas mantiveram-se sem alterações significativas nas amostras expostas a 40 °C por seis meses.

A concentração usual desse excipiente em formulações, com finalidade de lubrificante, é de 0,5 a 2,0%, portanto a mistura estudada, contendo 50 % de estearilfumarato de sódio, superestima qualquer interação que possa acontecer na formulação.

4.2.1.4 Mistura de Ramipril + Hidroxipropilmetilcelulose

As figuras 47 e 48 representam as curvas de DSC e TGA obtidas com a mistura de ramipril: HPMC (1:1), sendo analisada em tempo zero e após exposição a 40°C e 75 % UR durante 3 e 6 meses.

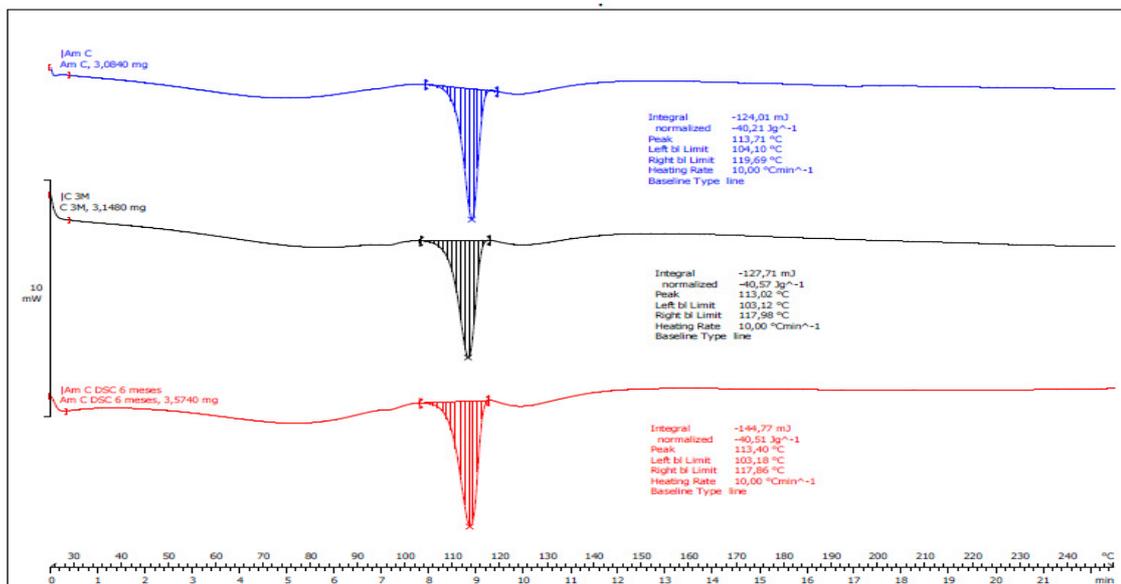


Figura 47: Curvas de DSC da mistura C (Ramipril: HPMC)

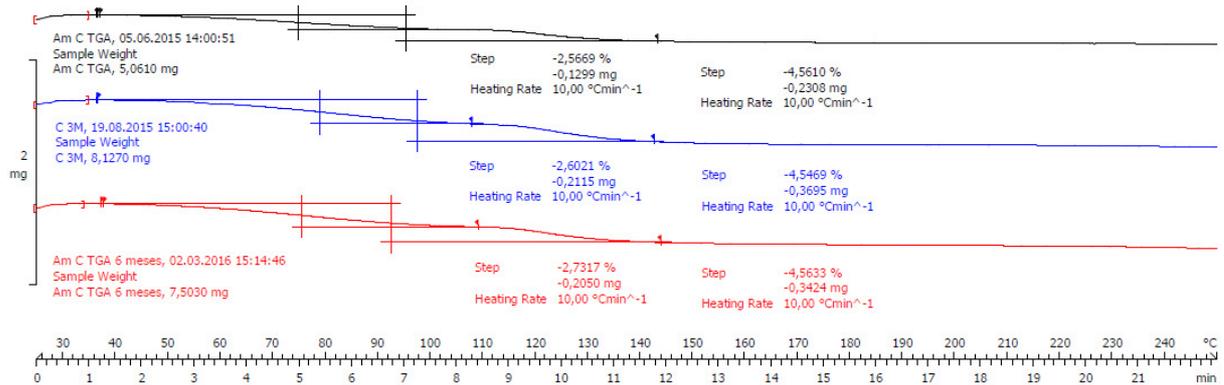


Figura 48: Curvas de DSC da mistura C (Ramipril: HPMC)

As curvas de DSC da mistura C não indicam interação entre seus componentes, pois o ramipril manteve-se com fusão próxima de 113 °C e entalpia de cerca da metade do ativo puro. Os eventos de perda de umidade e de transição vítrea observados com a HPMC separadamente não foram observados nas curvas obtidas com a mistura devido suas pequenas intensidades comparado ao pico de fusão do ramipril.

Nas curvas de TGA são observadas duas perdas de massa, a primeira é referente a água de adsorção e a segunda é a decomposição térmica do ativo.

4.2.1.5 Mistura de Ramipril + Lactose monohidratada

As figuras 49 e 50 foram as curvas de DSC e TGA obtidas com a mistura de lactose: ramipril (1:1), que foi analisada em tempo zero e após exposição a 40 °C e 75 % UR durante 3 e 6 meses.

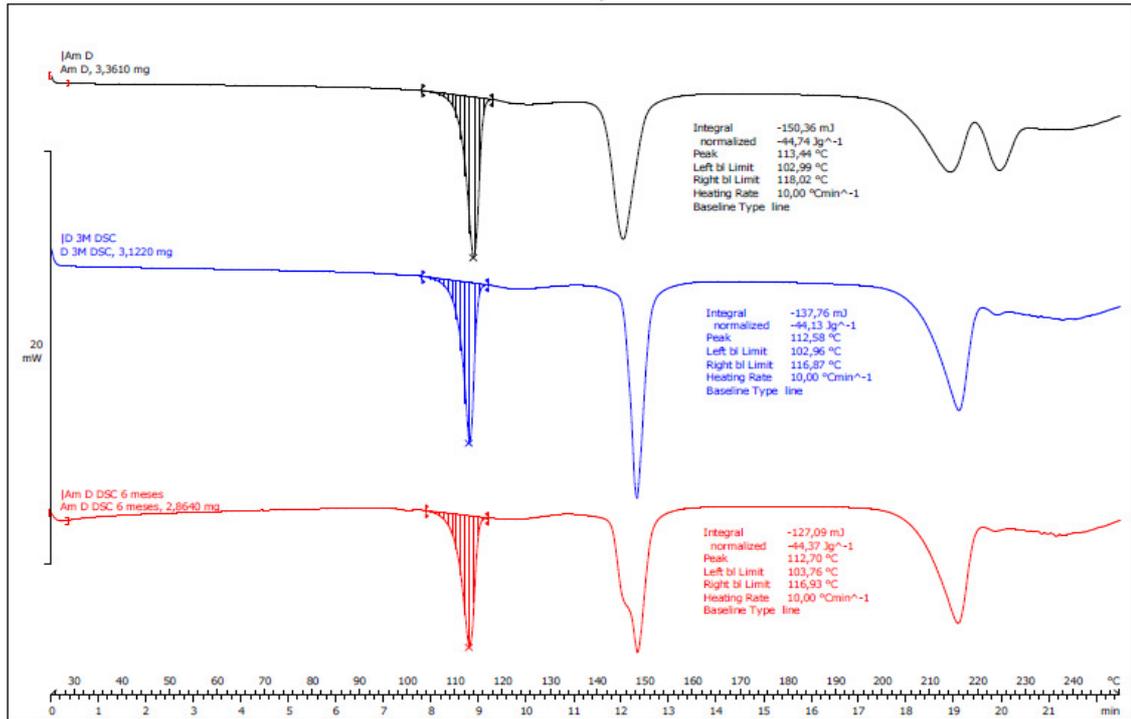


Figura 49: Curvas de DSC da mistura D (Ramipril: Lactose)

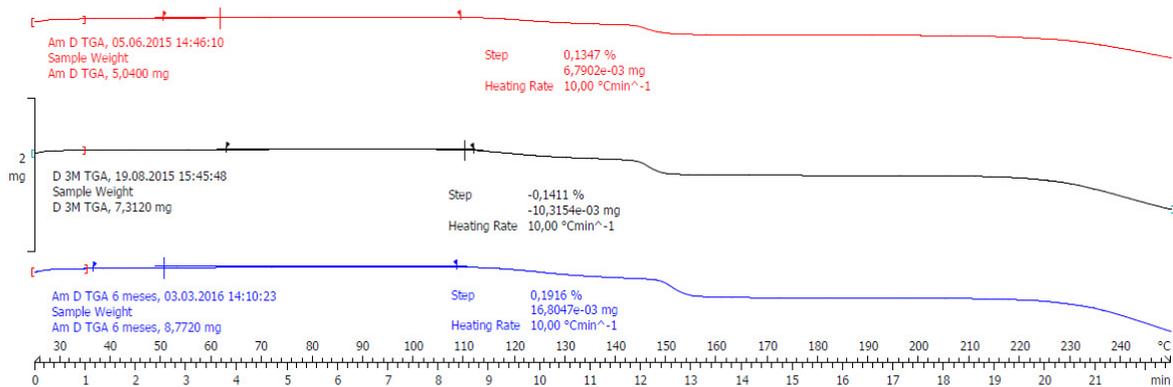


Figura 50: Curvas de TGA da mistura D (Ramipril: Lactose)

As curvas de DSC da mistura de ramipril com lactose apresentaram resultados que não sugerem interação, pois foram mantidos os eventos de fusão do ativo, de perda de água de hidratação e fusão da lactose. As entalpias de fusão do ativo apresentaram resultados próximos da metade da entalpia do pico obtido com a substância isolada. Pequenas diferenças gráficas são observadas após os 200 °C, porém isso pode estar relacionado a alguma diferença física do próprio excipiente, que pode ter diferentes níveis de hidratação, não sendo uma interação química.

Esse dado é confirmado pelos resultados de teor e impurezas de ramipril na mistura, avaliados por HPLC, que se mantiveram sem grandes alterações do início ao fim do estudo realizado, demonstrando estabilidade do ramipril junto da lactose.

Os resultados de TGA indicam pequena perda de massa até 110 °C, referente à água adsorvida e uma perda de massa mais significativa entre 110 e 150 °C referente à perda de água de hidratação da lactose somada à decomposição térmica do ramipril.

4.2.1.6 Misturas ternárias

As figuras 51 a 53 representam as curvas de DSC e TGA obtidas com a mistura ramipril: celulose: est. fum. sódio (1:1:1), que foi analisada em tempo zero e após exposição a 40 °C e 75 % UR durante 3 e 6 meses.

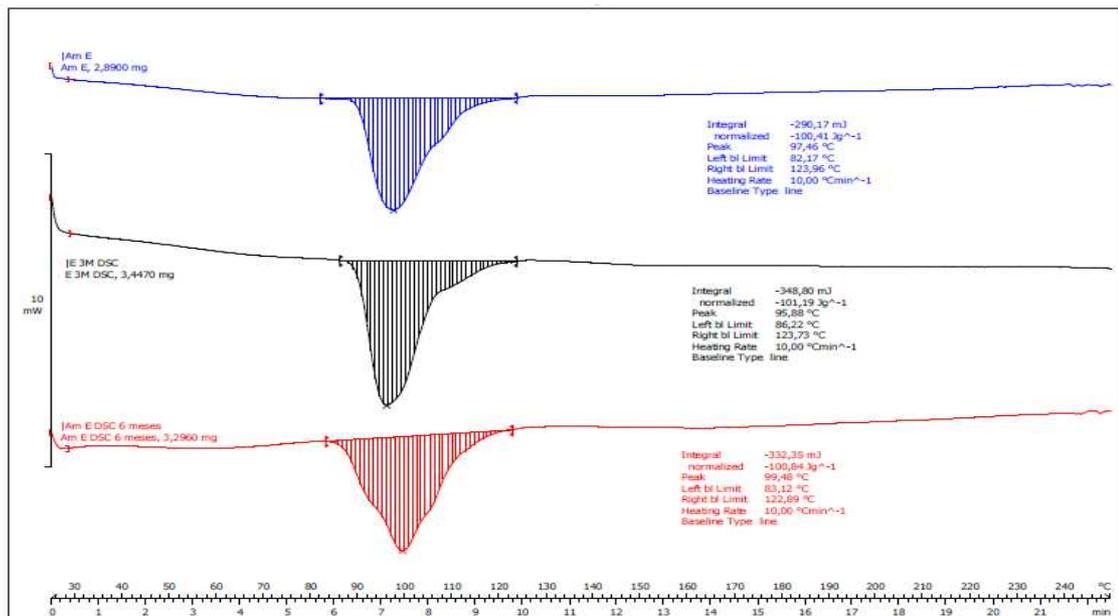


Figura 51: Curvas de DSC da mistura E (Ramipril: Celulose: Est. Fum. Sódio)

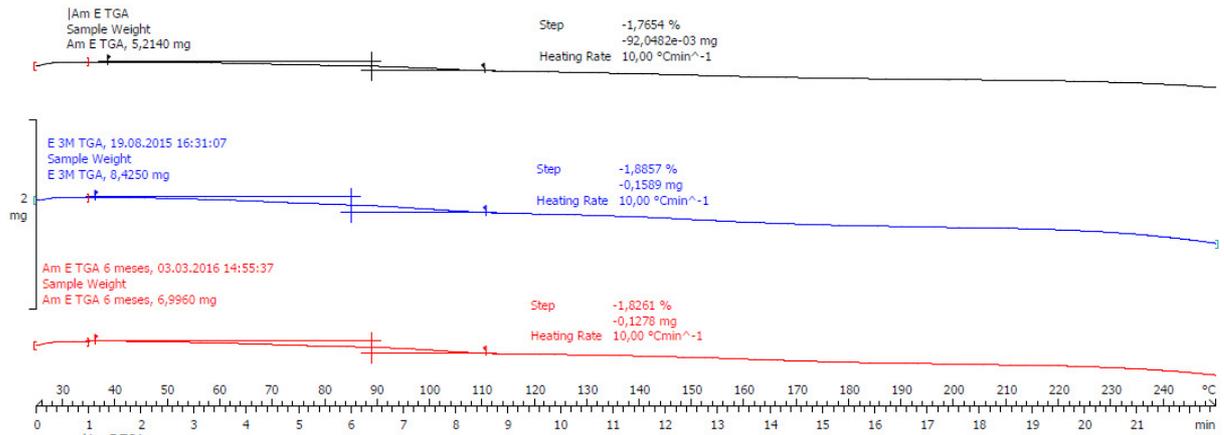


Figura 52: Curvas de TGA da mistura E (Ramipril: Celulose: Est. Fum. Sódio)

As curvas de DSC de ramipril, celulose e estearilfumarato de sódio apresentaram resultados que não sugerem interação prejudicial à formulação. Apesar do excipiente estearilfumarato de sódio ter causado deslocamento da temperatura de fusão do ativo, as entalpias dos componentes obtidas na amostra inicial e nas amostras expostas por 3 meses e 6 meses são bem semelhantes e o perfil energético apresenta-se similar e os resultados de teor e impurezas de ramipril por HPLC confirmam que não houve prejuízo ao fármaco estar em contato com os excipientes.

As curvas de DSC e TGA obtidas com a mistura Ramipril: Celulose: Est. Fum. Sódio (1:1:1), que foi analisada em tempo zero e após exposição a 40°C e 75 % UR durante 3 e 6 meses encontram-se nas figuras 53 a 54.

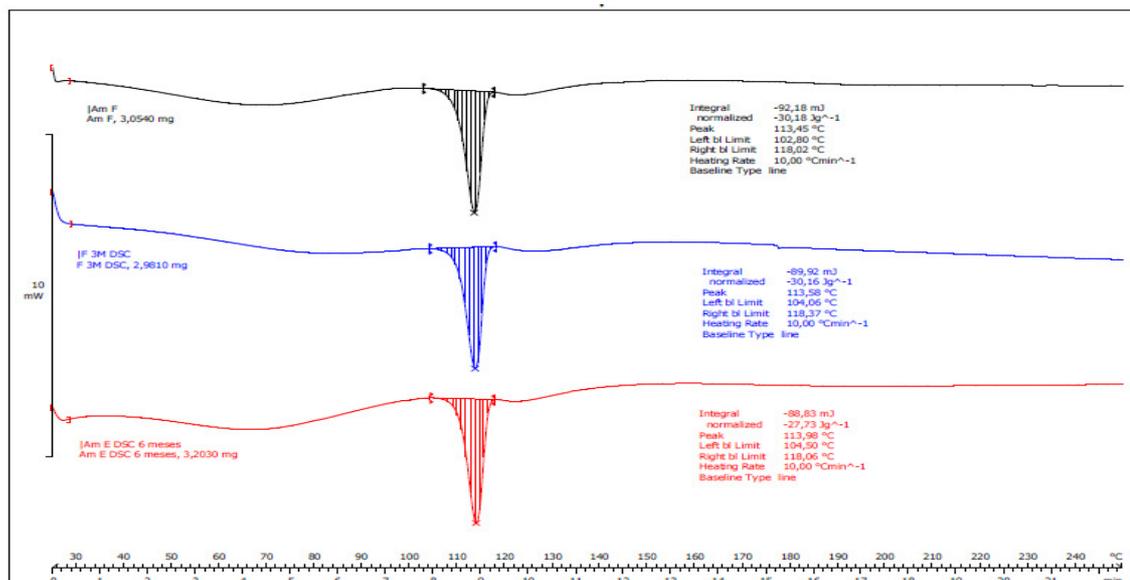


Figura 53: Curvas de DSC da mistura F (Ramipril: Celulose: HPMC)

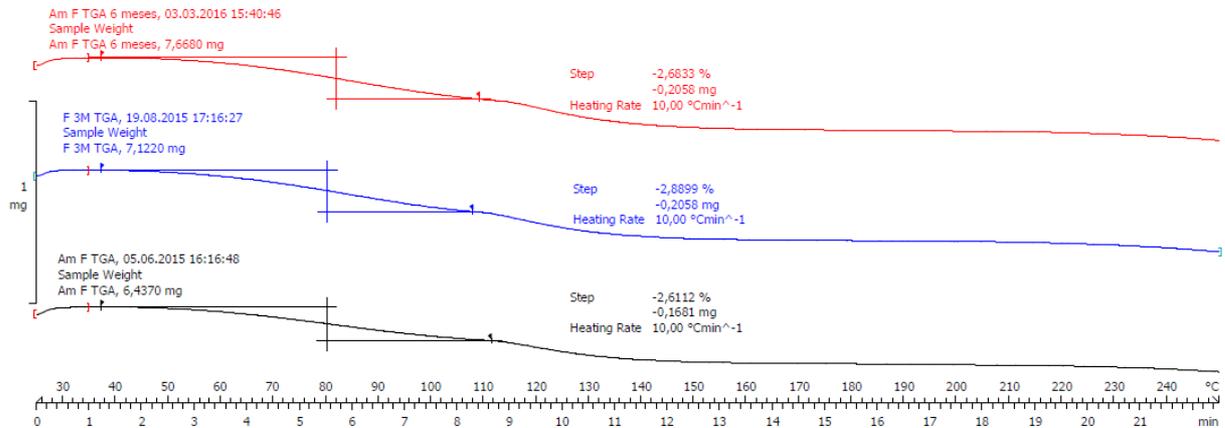


Figura 54: Curvas de TGA da mistura E (Ramipril: Celulose: Est. Fum. Sódio)

As curvas de DSC e TGA da mistura E apresentaram comportamento esperado, mantendo a fusão do ativo a 113 °C e com entalpia de aproximadamente um terço da obtida com o ramipril, e também foi possível observar um evento lento e de baixa intensidade referente à perda de água dos excipientes. As curvas de TGA mostraram-se semelhantes nas amostras inicial e expostas.

As curvas de DSC e TGA obtidas com a mistura Ramipril: CMC: Lactose (1:1:1), que foi analisada em tempo zero e após exposição a 40°C e 75 % UR durante 3 e 6 meses encontram-se nas figuras 55 a 56.

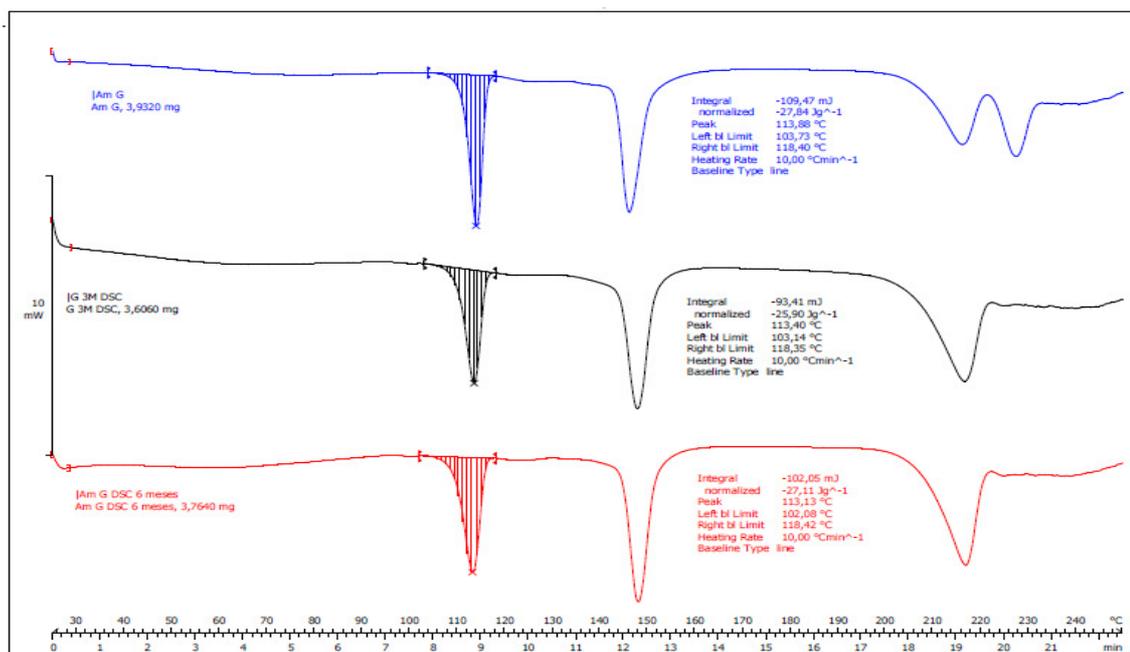


Figura 55: Curvas de DSC da mistura G (Ramipril: Celulose: Lactose)

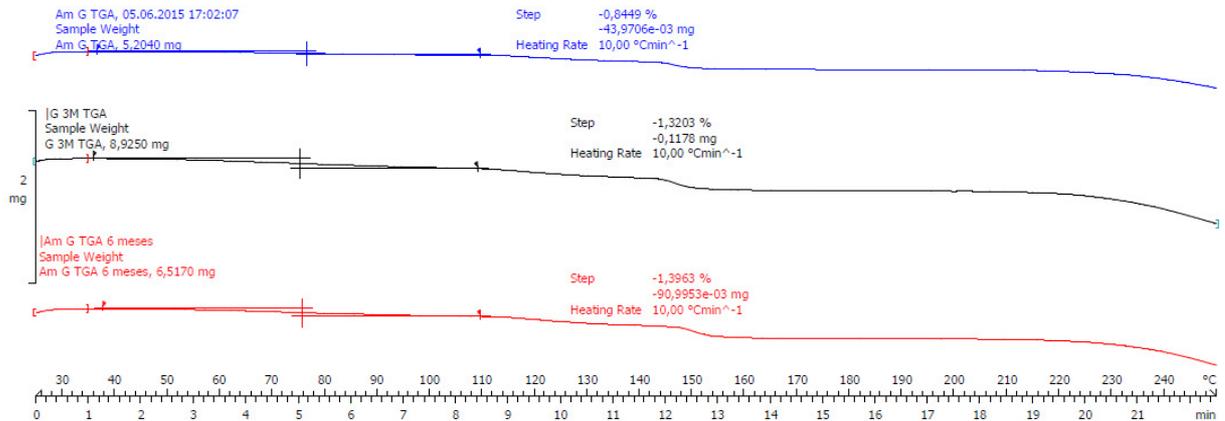


Figura 56: Curvas de TGA da mistura G (Ramipril: Celulose: Lactose)

A mistura de ramipril: celulose: lactose (1:1:1) apresentou curva de DSC indicativa de que não houve interação, mantendo a fusão do ativo a 113 °C e com entalpia de aproximadamente um terço da obtida com o ramipril. O pico de fusão da lactose também se manteve semelhante em todas as amostras estudadas. Os dados de TGA apresentaram perda de massa de água de umidade e também da água de hidratação da lactose somada à perda de massa de decomposição térmica do ativo.

A mistura Ramipril: Estearilfumarato de sódio: HPMC (1:1:1), que foi analisada em tempo zero e após exposição a 40 °C e 75 % UR durante 3 e 6 meses, apresentou as curvas de DSC e TGA conforme figuras 57 a 58.

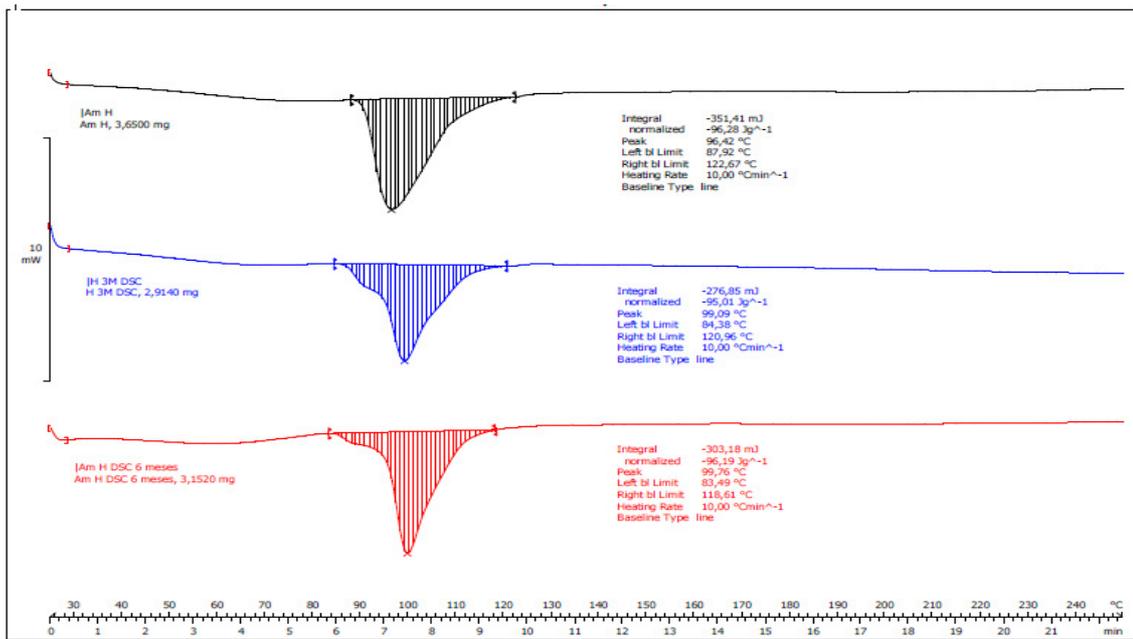


Figura 57: Curvas de DSC da mistura H (Ramipril: Est. Fum. Sódio: HPMC)

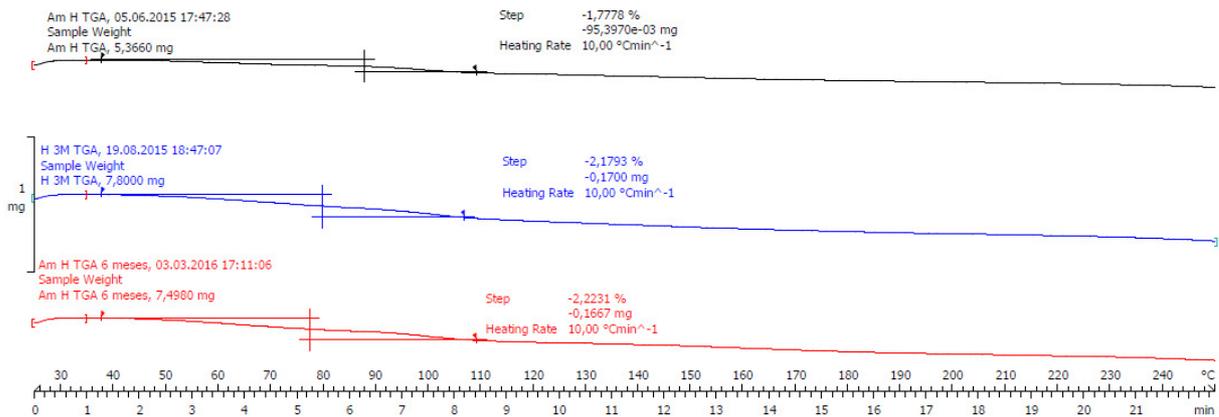


Figura 58: Curvas de TGA da mistura H (Ramipril: Est. Fum. Sódio: HPMC)

As curvas de DSC da mistura H apresentaram resultados que não sugerem interação prejudicial à formulação. Como já relatado anteriormente, o excipiente estearilfumarato de sódio provoca o deslocamento da temperatura de fusão do ativo, porém as entalpias dos componentes obtidas na amostra inicial e nas amostras expostas por 3 meses e 6 meses foram semelhantes e o perfil energético apresentou-se similar. Nos dados das curvas de TGA não se observaram diferenças entre as amostras expostas e inicial.

A mistura Ramipril: Estearilfumarato de sódio: Lactose (1:1:1), que foi analisada em tempo zero e após exposição a 40 °C e 75 % UR durante 3 e 6 meses, apresentou as curvas de DSC e TGA conforme figuras 59 a 60.

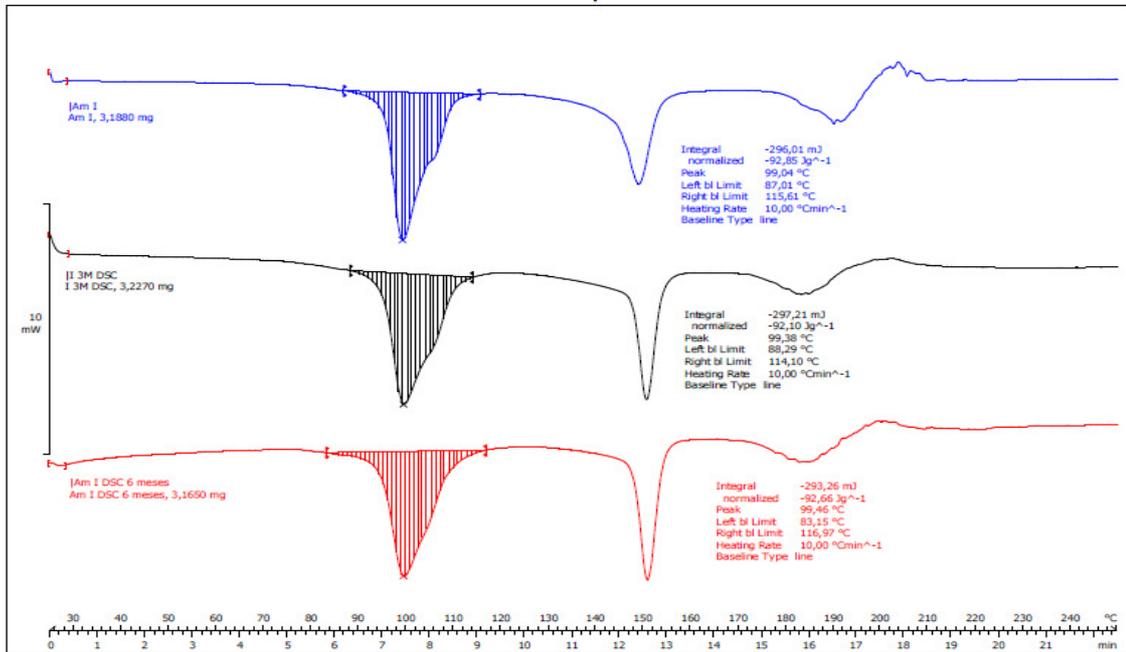


Figura 59: Curvas de DSC da mistura I (Ramipril: Est. Fum. Sódio: Lactose)

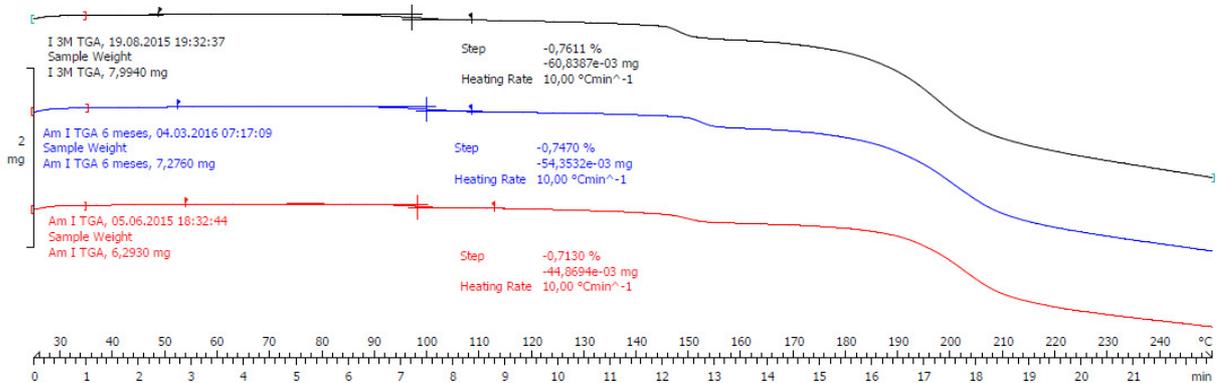


Figura 60: Curvas de TGA da mistura I (Ramipril: Est. Fum. Sódio: Lactose)

As curvas de DSC da mistura I apresentaram resultados que não sugerem interação entre fármaco e excipientes. Apesar do deslocamento da temperatura de fusão do ativo já mencionado que é causado pelo estearilfumarato de sódio, o perfil energético e a entalpia do ativo apresentam-se semelhantes na amostra inicial e nas expostas e os resultados de teor e impurezas de ramipril por HPLC demonstram que

não ocorreu degradação do ativo. As curvas de TGA também se apresentaram semelhantes do início ao fim do estudo de estabilidade por 6 meses.

As figuras 61 a 62 representam as curvas de DSC e TGA da mistura Ramipril: HPMC: Lactose (1:1:1), que foi analisada em tempo zero e após exposição a 40 °C e 75 % UR durante 3 e 6 meses.

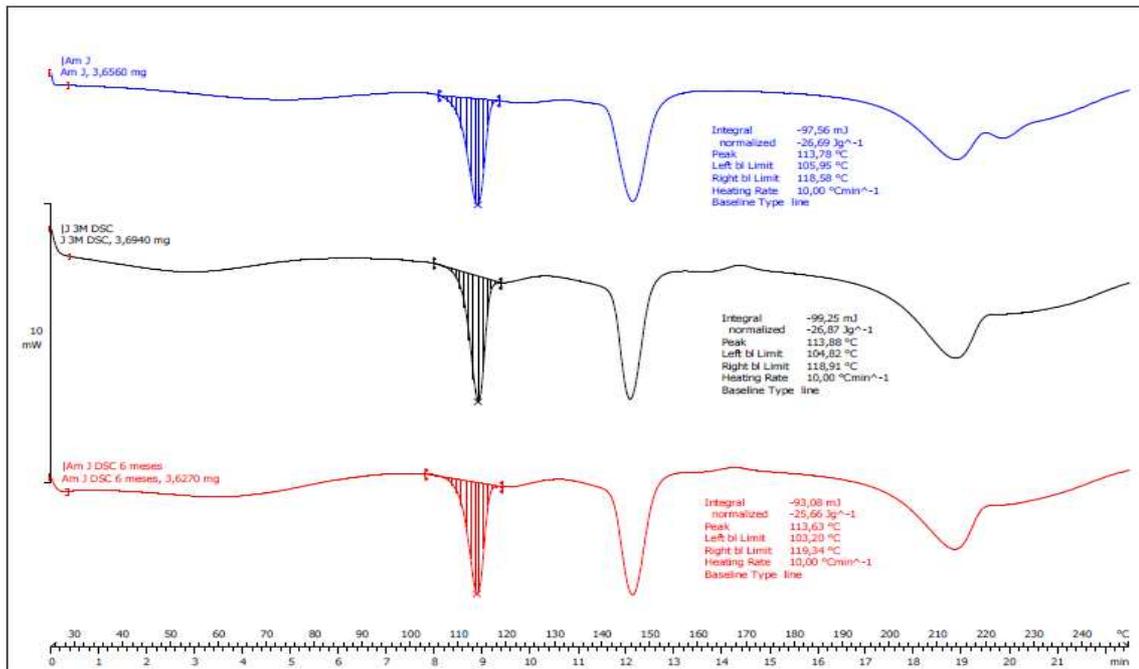


Figura 61: Curvas de DSC da mistura J (Ramipril: HPMC: Lactose)

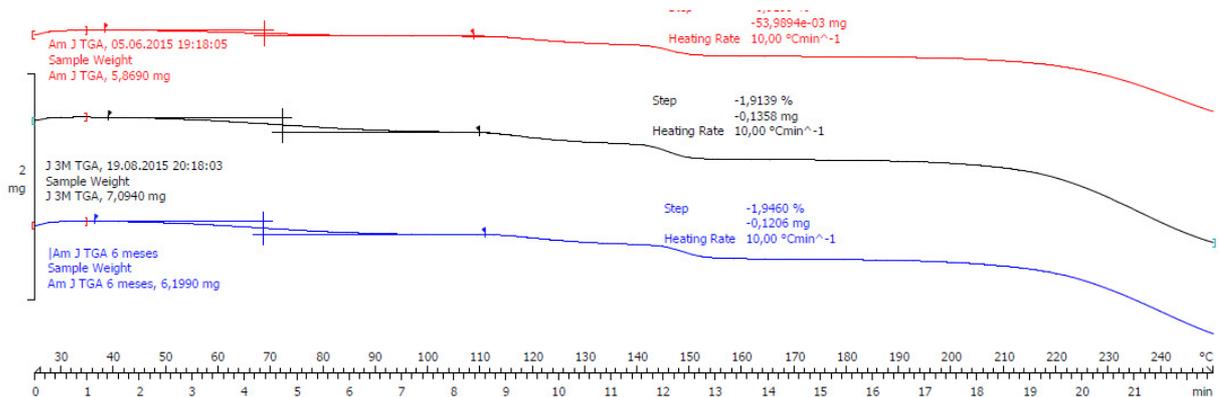


Figura 62: Curvas de TGA da mistura J (Ramipril: HPMC: Lactose)

As curvas de DSC da mistura J não indicam interação, pois a fusão do ativo manteve-se a 113 °C e com entalpia de aproximadamente um terço da obtida com o ramipril isolado. O perfil energético é o mesmo em todas as amostras. Os dados de

teor e impurezas de HPLC demonstraram estabilidade e as curvas de TGA não sofreram alterações ao longo dos seis meses de estudo.

4.2.1.7 Misturas quaternárias

A mistura Ramipril: Celulose: Est. Fum. Sódio: HPMC (1:1:1:1) que foi analisada em tempo zero e após exposição a 40 °C e 75 % UR durante 3 e 6 meses, apresentou as curvas de DSC e TGA conforme figuras 63 a 64.

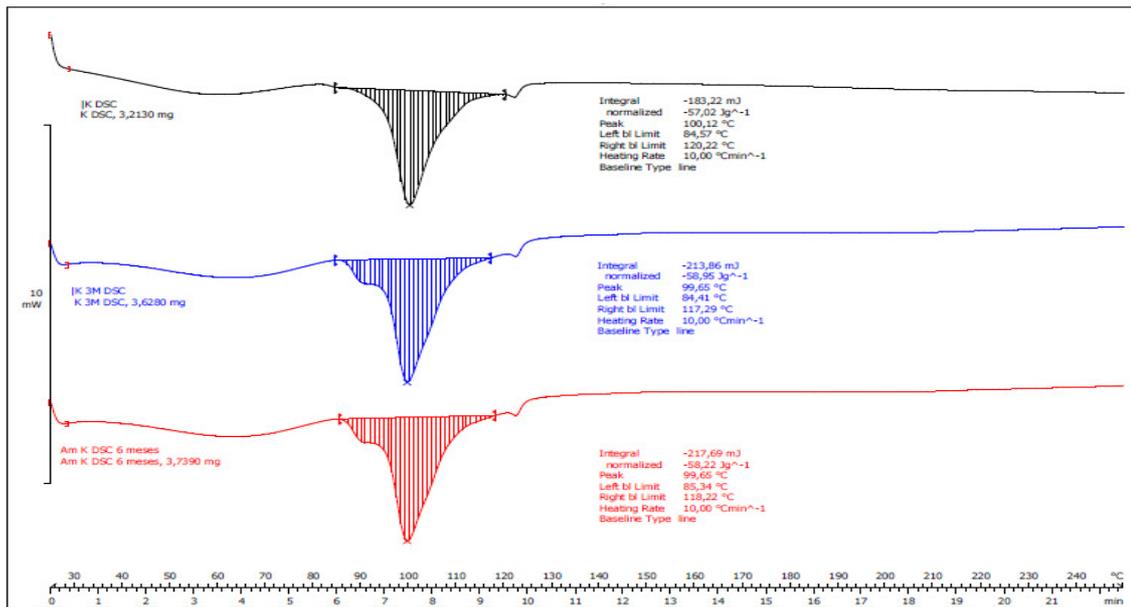


Figura 63: Curvas de DSC da mistura K (Ramipril: CMC: Est. Fum.: HPMC)

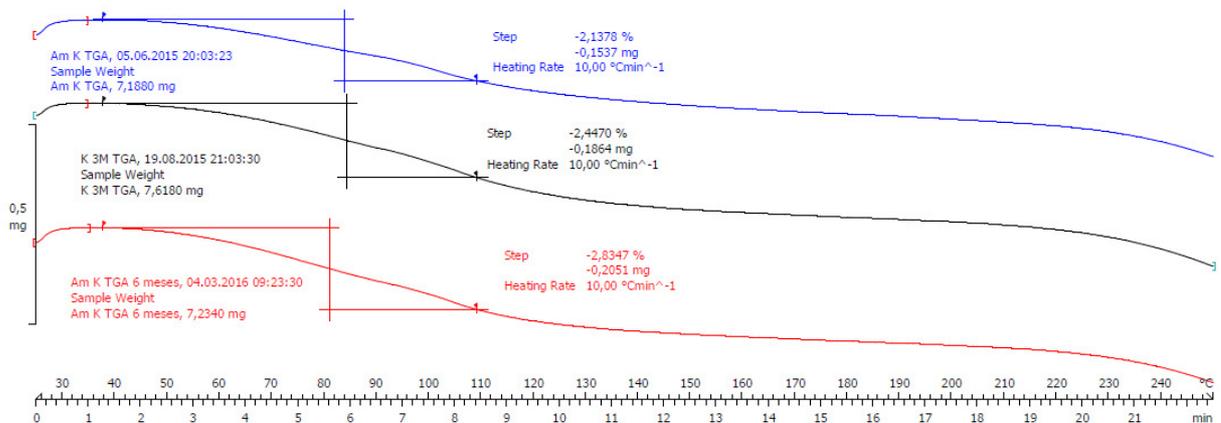


Figura 64: Curvas de TGA da mistura K (Ramipril: CMC: Est. Fum.: HPMC)

Como nas outras misturas contendo o estearilfumarato de sódio, observa-se o deslocamento da fusão do ramipril, porém não há indícios de interação entre o ativo e os excipientes ao longo do tempo. A entalpia do pico deslocado apresenta-se semelhante na amostra inicial e nas amostras expostas. Os dados de teor e impurezas de ramipril por HPLC confirmam que não houve interação, pois não se observou decaimento de teor nem aumento das impurezas.

A mistura Ramipril: CMC: Est. Fum. Sódio: Lactose (1:1:1:1) que foi analisada em tempo zero e após exposição a 40°C e 75 % UR durante 3 e 6 meses, apresentou as curvas de DSC e TGA conforme figuras 65 a 66.

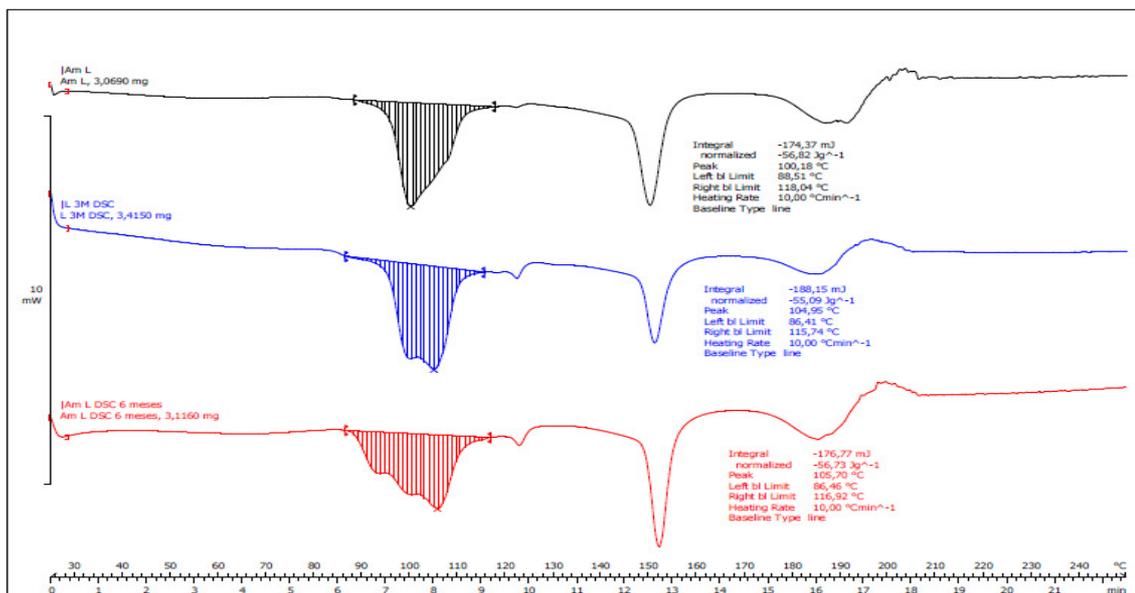


Figura 65: Curvas de DSC da mistura L (Ramipril: CMC: Est. Fum.: Lactose)

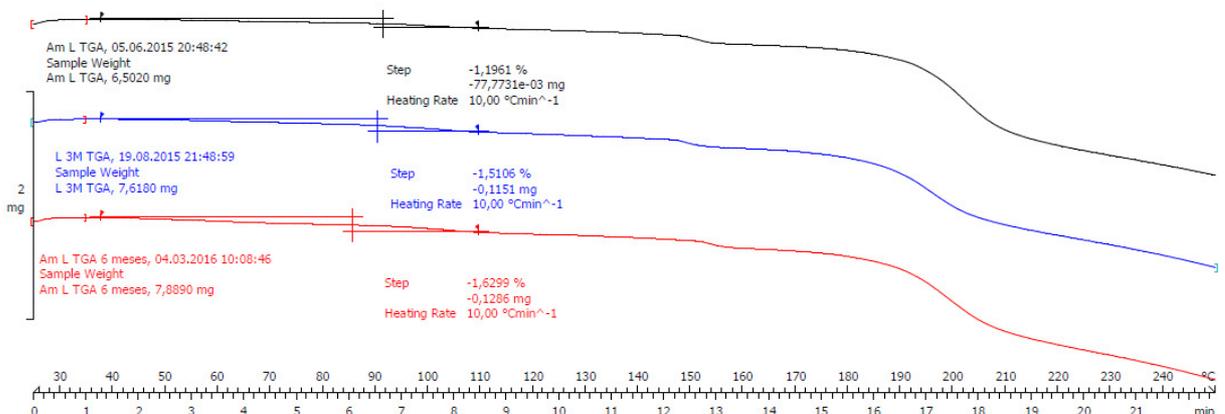


Figura 66: Curvas de TGA da mistura L (Ramipril: CMC: Est. Fum.: Lactose)

Nas curvas de DSC da mistura L observaram-se certa deformação no evento endotérmico de fusão do ativo ramipril e perda de água dos excipientes, sem alteração em suas entalpias. Conforme se pode verificar nos dados de teor e impurezas por HPLC, nenhuma alteração química significativa foi obtida com a exposição da mistura a 40 °C por seis meses, o que confirma que não há problemas em se utilizar esses excipientes em formulações sólidas contendo ramipril. Os resultados de TGA também não se observaram alterações no perfil da curva, sendo observadas três perdas de massa, a primeira até 110 °C referente à perda de água, a segunda até 160 °C que provavelmente trata-se de perda de água de hidratação junta de decomposição do ramipril e a terceira por volta de 210 °C que é a decomposição da lactose.

A mistura Ramipril: CMC: HPMC: Lactose (1:1:1:1) que foi analisada em tempo zero e após exposição a 40°C e 75 % UR durante 3 e 6 meses, apresentou as curvas de DSC e TGA conforme figuras 67 a 68.

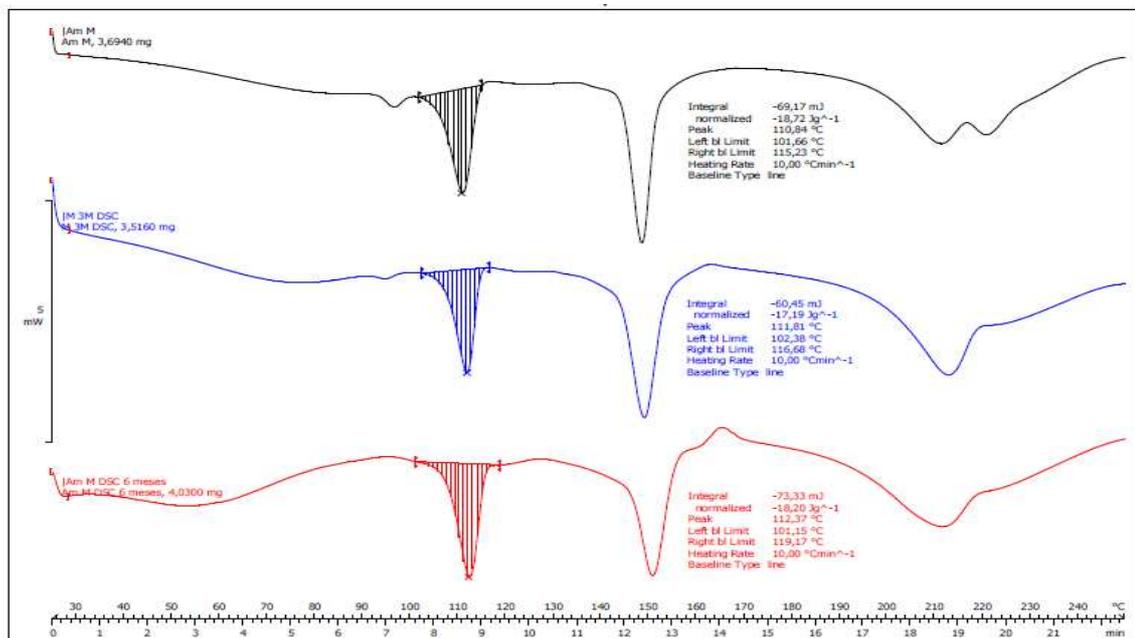


Figura 67: Curvas de DSC da mistura M (Ramipril + CMC+ HPMC + Lactose)

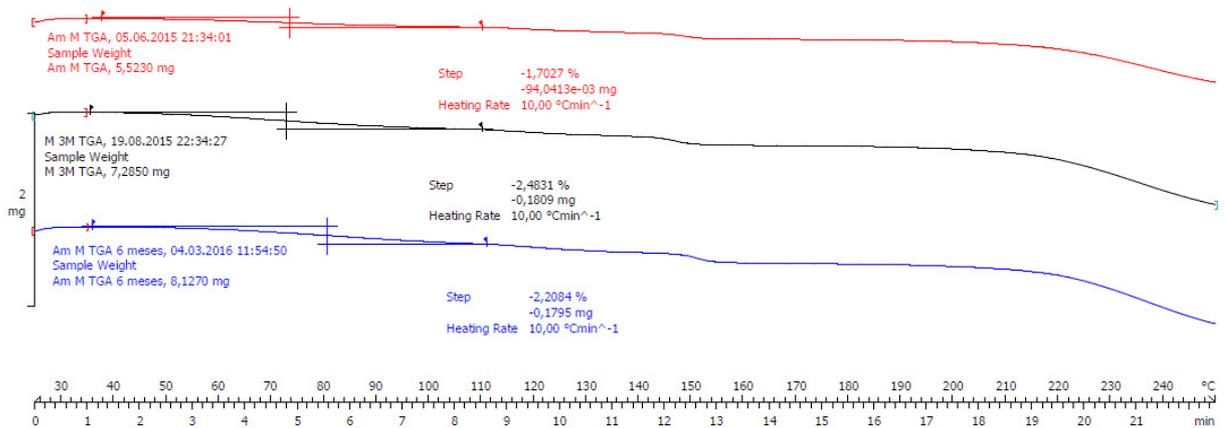


Figura 68: Curvas de TGA da mistura M (Ramipril + CMC+ HPMC + Lactose)

Não se observaram alterações no perfil energético nem na entalpia de fusão do ativo ramipril na mistura M durante o estudo. É possível observar o pico de perda de água de hidratação da lactose em ~ 150 °C e também de sua fusão em ~ 210 °C. O evento de baixa intensidade de perda de água dos excipientes até 110 °C não é notado por estarem em escalas muito baixas e por serem eventos alargados. Os resultados de teor e impurezas de ramipril também se mantiveram estáveis para a mistura M. Todos os dados indicaram que não houve interação entre o fármaco e esses excipientes.

As figuras 69 a 70 representam as curvas de DSC e TGA da mistura Ramipril: Estearilfumarato de sódio: HPMC: Lactose (1:1:1:1), que foi analisada em tempo zero e após exposição a 40 °C e 75 % UR durante 3 e 6 meses.

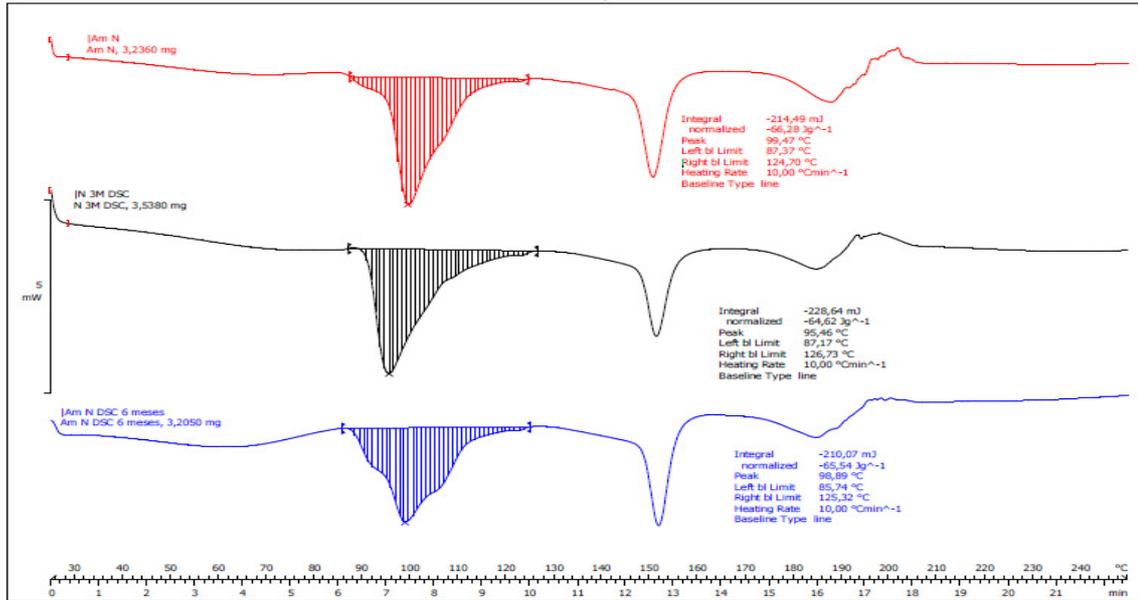


Figura 69: Curvas de DSC da mistura N (Ramipril + Est. + HPMC + Lactose)

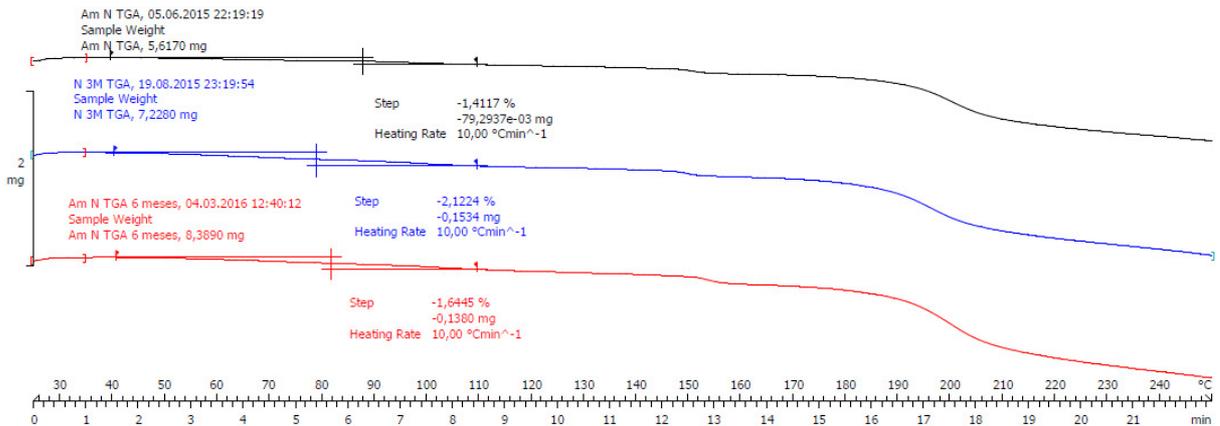


Figura 70: Curvas de TGA da mistura N (Ramipril + Est. + HPMC + Lactose)

As curvas de DSC da mistura N não indicam interação, pois apesar da fusão do ativo ter se deslocado devido à presença do estearil, a entalpia e o perfil energético mantiveram-se inalterados em todas as amostras. Observa-se o pico de perda de água da lactose por volta de 150 °C. Os dados de TGA e HPLC mantiveram-se inalterados durante o estudo de estabilidade.

4.2.1.8 Formulações completas

A mistura Ramipril: Est.: CMC: HPMC: Lactose foi preparada em concentrações usuais de uma possível formulação e foi analisada em tempo zero e após exposição a 40°C e 75 % UR durante 3 e 6 meses, apresentou as curvas de DSC e TGA conforme figuras 71 a 72.

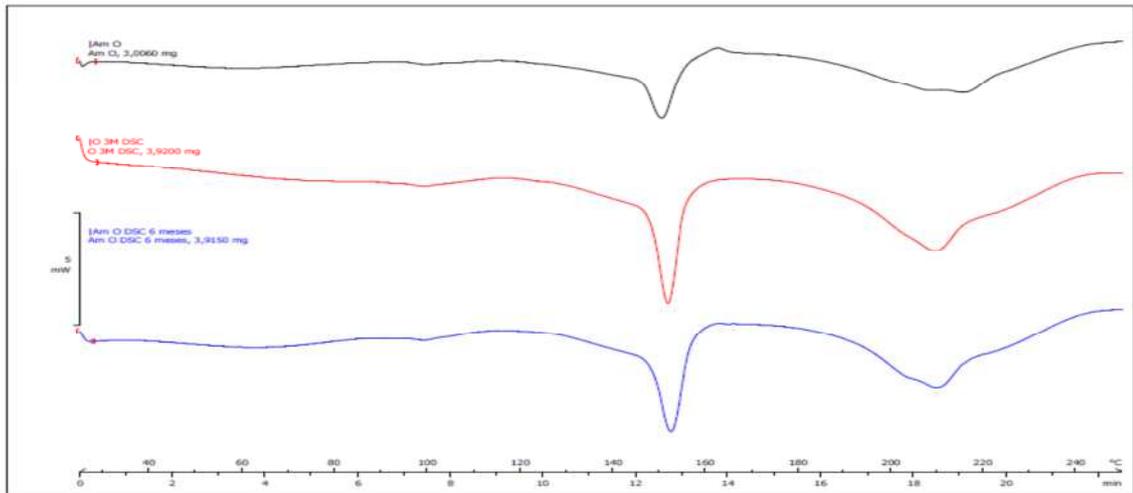


Figura 71: Curvas de DSC da mistura O (Ramipril: Est.: CMC: HPMC: Lactose)

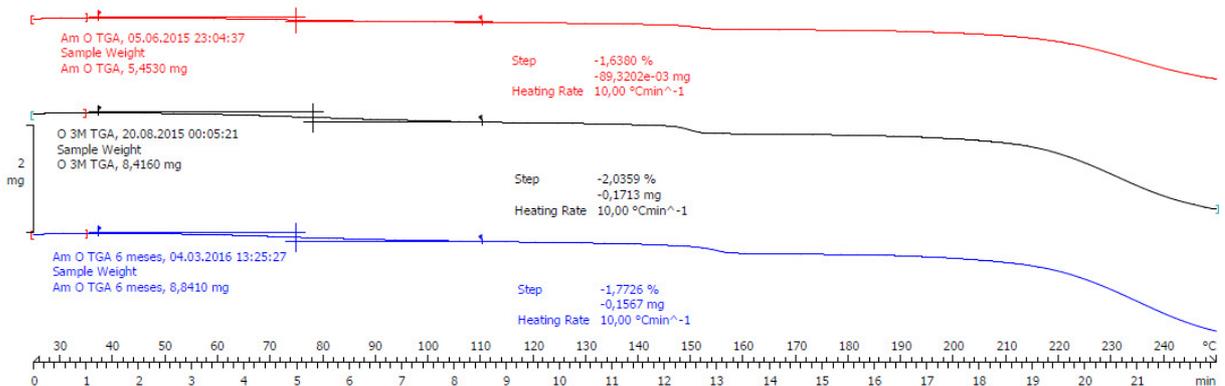


Figura 72: Curvas de TGA da mistura O (Ramipril: Est.: CMC: HPMC: Lactose)

Na formulação completa em proporção usual dos excipientes (mistura O) não foi possível observar o pico de fusão do ramipril nessa mistura, pois a quantidade de ativo é muito pequena em relação aos excipientes (~4,5%), sendo notada apenas pequena perturbação na curva por volta de 110 °C referente a esse evento. Foi possível notar o pico referente à perda de água de hidratação da lactose em cerca de 150 °C e da sua fusão em ~210 °C, pois a lactose encontra-se em concentração

considerável na mistura (~45%) por ser diluente. Se compararmos de forma geral o perfil energético da formulação manteve-se semelhante em todas as amostras, os resultados de TGA e HPLC não sofreram alterações durante o período de 6 meses, comprovando que não há interação do ativo com os excipientes avaliados.

Foi realizada mistura prévia de Ramipril com HPMC na mistura P, contendo [(Ramipril: HPMC) Est.: CMC: Lactose], e foi avaliada para verificar se essa alteração na ordem de adição do componente HPMC ocasionaria melhoria na estabilidade do produto. Essa formulação foi analisada em tempo zero e após exposição a 40 °C e 75 % UR durante 3 e 6 meses, obtendo-se as curvas de DSC e TGA conforme figuras 73 a 74.

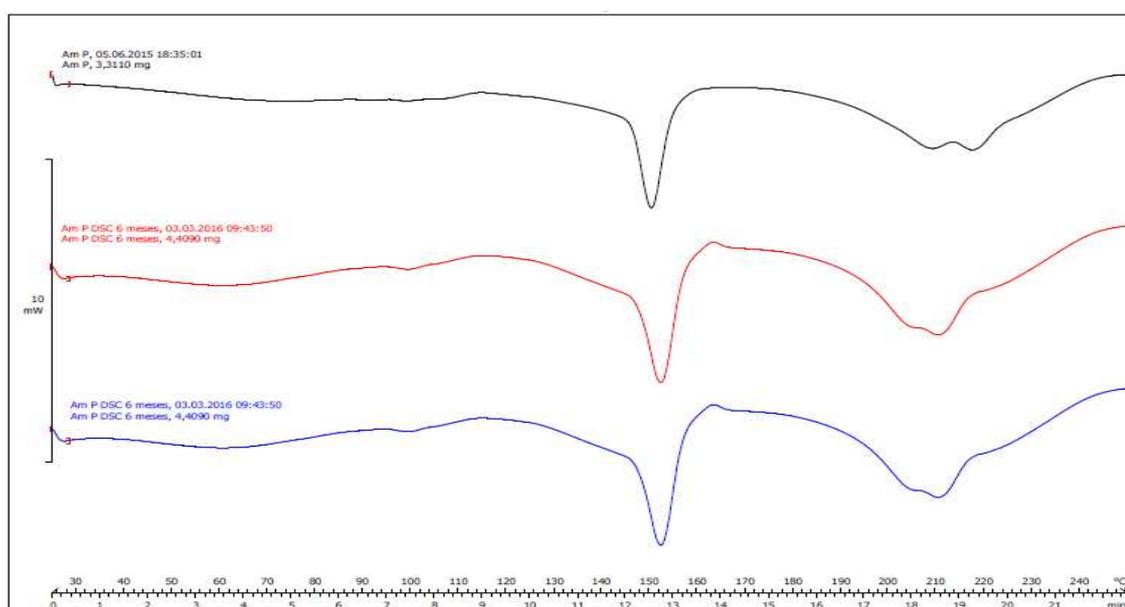


Figura 73: Curvas de DSC da mistura P [(Ram: HPMC): Est. + CMC + Lac]

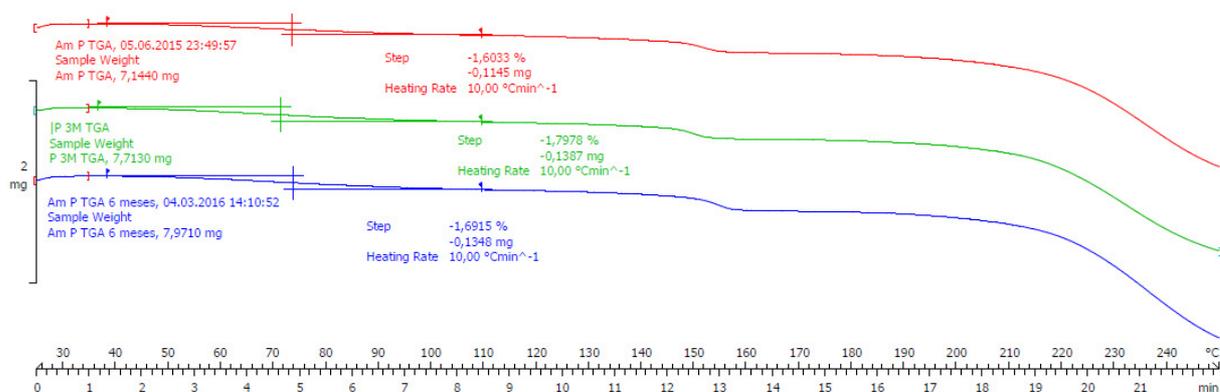


Figura 74: Curvas de TGA da mistura P [(Ram: HPMC): Est. + CMC + Lac]

Foi avaliada a formulação completa, semelhante a mistura O, porém misturando-se previamente o ramipril com HPMC, para verificar se esse contato mais íntimo do ativo com esse excipiente melhoraria a estabilidade da formulação. De forma geral o perfil energético da formulação manteve-se semelhante ao da mistura O e os resultados de teor e impurezas por HPLC não apresentaram melhora em relação à mistura sem promover o contato prévio de HPMC e ramipril.

A estabilização citada por WILSON (2006) se dá por processo de *spray-dryer* que ocasiona um revestimento mais uniforme das partículas do fármaco, sendo obtida melhora na estabilidade da formulação.

Para se desafiar o processo de fabricação e verificar o impacto da mistura prévia do HPMC com ramipril, mesmo sem utilizar o *spray-dryer*, seria interessante realizar a compressão da mistura, que pode ocasionar aquecimento devido ao atrito mecânico, levando ao aumento de impurezas, especialmente a impureza D.

Diante dos resultados obtidos, foi possível confirmar dados da literatura de que o ramipril é um fármaco sensível à temperatura elevada, sendo que seu principal produto de degradação é o ramiprildicetopiperazina (Impureza D da EP). Em meio alcalino o fármaco demonstrou grande susceptibilidade a se degradar, e em condições ácidas ele degrada com menor intensidade, formando principalmente o ramiprilato por via de hidrólise. A oxidação ocasionou a formação de pequena quantidade de ramiprilato, impureza K e impureza A, além de outros compostos desconhecidos.

Nos estudos realizados, foi possível observar que a metodologia descrita na farmacopeia britânica é adequada para quantificar teor e substâncias relacionadas simultaneamente, sem a necessidade de preparo de amostra diferente para quantificação de teor. Essa descoberta possibilita ganho de tempo e economia de insumos laboratoriais, como solventes, reagentes, além de minimizar os danos causados ao meio ambiente.

No estudo de estabilidade era esperado que fosse observado aumento significativo desse marcador de degradação, formando devido à temperatura de 40 °C por 6 meses, porém não ocorreu deliberado aumento desse composto e a

formulação mostrou-se estável, semelhante nas formulações com e sem a realização da mistura prévia com HPMC.

Será necessário estudo posterior, com exposição à temperatura mais elevada (60 °C por exemplo), para avaliação se apenas misturando fisicamente o HPMC e ramipril é possível obter melhoria na estabilidade do fármaco nas formulações.

Os excipientes em alguns casos representam a maior parte da formulação, e quando se trata de ativos susceptíveis à degradação térmica, como o ramipril, é importante que apresentem adequada compressibilidade, possibilitando a compressão direta da mistura, sem que seja necessário o processo de granulação via úmida e o aquecimento da formulação para posterior secagem do granulado.

5. CONCLUSÃO

A seletividade do método foi desafiada no teste de degradação forçada, em que foi comprovada a capacidade do método de separar os produtos de degradação formados nas condições de estresse, e também através da avaliação das soluções padrão dos compostos conhecidos (farmacopeicos), que foram injetados separadamente e também misturas com o ativo, placebo e amostra. Todos os resultados obtidos demonstram que o método é indicativo de estabilidade e é capaz de quantificar todas as impurezas potenciais do produto com as formulações estudadas.

A avaliação das misturas de ativo e excipientes expostas por seis meses no estudo de pré-formulação possibilitou concluir que o ativo ramipril não interage com os excipientes Celulose Microcristalina, Lactose, HPMC, Estearil fumarato de sódio, sendo esses materiais adequados para formulações sólidas contendo Ramipril.

Não foi observada queda de teor significativa nem aumento de impurezas que compromettesse a qualidade do produto, comparando as amostras expostas à amostra inicial. Nos dados obtidos pela análise térmica, foram observadas curvas de DSC condizentes com o estimado para as misturas, sem grandes alterações no perfil energético e na entalpia de fusão do ativo, mantendo as devidas proporções, não havendo indícios que nos leve a contraindicar o uso de nenhum desses coadjuvantes da formulação de ramipril comprimidos.

Levando em consideração as particularidades do fármaco ramipril, recomenda-se o uso de embalagens primárias que não propaguem calor com facilidade, sendo evitado o alumínio e outros metais que conduzem com facilidade a energia. É importante considerar que o material de embalagem para formulações com Ramipril precisa ser de baixa permeabilidade, resistente à umidade, sendo recomendados plásticos de alta densidade e baixa porosidade, impedindo que a formulação seja exposta à hidrólise.

Não foi possível obter nenhum ganho de estabilidade da formulação realizando a mistura prévia de HPMC com o IFA Ramipril, pois a formulação sem realizar mistura prévia com o excipiente não apresentou degradação maior que a formulação em que se realizou esse contato mais íntimo do ativo com o excipiente. Para avaliar o possível efeito estabilizador, teríamos que promover um estresse maior à formulação, realizando o processo de compressão e à exposição à temperaturas mais elevadas, para que a Impureza D aumentasse significativamente e pudéssemos comparar os resultados com maior visibilidade da melhoria de estabilidade. Com os resultados obtidos não se observou melhoria com a mistura prévia física dos componentes, isso pode indicar que somente com o processo de *spray-dryer* ocorre efetivo recobrimento das partículas do ativo resultando em melhor estabilidade do ramipril.

Este trabalho possibilitou desenvolver o conhecimento em análise térmica e interpretação dos dados obtidos, que são de alta complexidade, e comprovou-se que muitas vezes a avaliação dos resultados depende de dados obtidos por técnicas complementares, que podem ser por infravermelho, HPLC, entre outras técnicas, pois somente a avaliação visual das curvas de DSC e TGA podem levar a resultados equivocados. A avaliação de teor e impurezas foi fundamental para confiabilidade dos resultados apresentados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS

1. FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, International Conference Harmonization (ICH Quality Systems Approach to Pharmaceutical CGMP Regulations Rockville, October, 2006.
2. LAWRENCE X., KOPCHA, M. The future of pharmaceutical quality and the path to get there, International Journal of Pharmaceutics, Volume 528, Issues 1–2, 7 Ago 2017, p. 354-359.
3. HAMBURG, M. Blog do US Food and Drug Administration (FDA), Website: <<https://blogs.fda.gov/fdavoice/index.php/2012/02/50-years-after-thalidomide-why-regulation-matters/>>, acesso em 05/11/2014.
4. LAGACE, M., GRAVELLE, L., DI MASO, M. E MCCLINTOCK, Developing a Discriminating Dissolution Procedure for a Dual Active Pharmaceutical Product with Unique Solubility Characteristics, Dissolution Technologies, p. 13-17, Fev 2004
5. BHARATE, S.S., BHARATE, S.B., BAJAJ A.N., Incompatibilities of Pharmaceutical Excipients with Active Pharmaceutical Ingredients: A Comprehensive Review, Journal of Excipients and Food Chemicals, v. 1, n. 3, p. 3-26, dez. 2010.
6. BEREUTER L., BROWN D, MOE D., Patente WO2008019109 A2, Stabilization of lorazepam, Ago 2007.
7. SAHITYA G., KRISHNAMOORTHY B., MUTHUKUMARAN M., Importance of preformulation studies in designing formulations for sustained release dosage forms, International Journal of Pharmacy and Technology 4(4):2311-2331 · Jan 2012.
8. WHITWORTH, J.A.; "2003 World Health Organization (WHO) / International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension." Journal of Hypertension, 2003.
9. BRUNTON, L. L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, B.C.; As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman , 12^a edição, editora AMGH, 2012.
10. WILSON, E. S.; BEASLEY, M.W.; Stabilized Ramipril Compositions, US 2006/0134213 A1, 2006.

11. BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução, assuntos de interesse: listas de medicamentos de referência, site <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home/medicamentos>>, acesso em 20/06/2015.
12. BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução, assuntos de interesse: Medicamentos Genéricos, site <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Medicamentos/Assunto+de+Interesse/Medicamentos+genericos/Medicamento+Generico>>, acesso em 15/10/2015.
13. FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, International Conference Harmonization (ICH). Guidance for industry Q3a (R2): Impurities In New Drug Substances Q3a(R2), Rockville, October, 2006.
14. WILSON, E. S.; BEASLEY, M.W.; Stabilized Ramipril Compositions, US 2006/0134213 A1, 2006.
15. DIEGO, M.; GODOY, G.; MENNICKENT, S.; OLIVARES, M.; GODOY, R; Stress degradation studies of ramipril by a validated stability-indicating liquid chromatographic method, J. Chil. Chem. Soc., 55, N° 4 (2010)
16. HANYSOVÁ, L.; VÁCLAVKOVÁ, M.; DOHNAL, J.; KLIMES, J.; Stability of ramipril in the solvents of different pH, J Pharm Biomed Anal. 2005 Apr 29;37(5):1179-83.
17. B. HOGAN, M. WILLIAMS, A. IDICULLA, T. VEYSOGLU, E. PARENTE, A forced degradation study of ramipril in Altace® capsules, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 23, 637, (2000).
18. SHETGIRI, N.P.; PATIL, S.; MUKHERJEE, R.; ANWWARI, A.; RAKHE, A.; BHURE, S.; Synthesis and Structural Elucidation of Impurities in Ramipril Tablets, Spectroscopy on line, 2008.
19. SHI-YING DAI, SHI-TINGQIU, WEIWU, CHUN-MEIFUN, Development and validation of an RP-HPLC method for simultaneous determination of Ramipril and Amlodipine in tablets, Journal of Pharmaceutical Analysis 2013; 3 (6) : 440–446
20. BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 1, de 29 de julho de 2005. Guia para a realização de estudos de estabilidade. Website:<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/legis/0105_re_comentada.pdf> Acesso em: 30 de março de 2015.

21. BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 53, de 4 de dezembro de 2015. Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semi-sintéticas, classificados como novos, genéricos e similares. Website: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/legis/01_05_re_come ntada.pdf>. Acesso em: 30 de março de 2015.
22. BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública nº 68, de 29 de agosto de 2014. Determina a publicação do guia regulatório para obtenção do perfil de degradação, e identificação e qualificação de produtos de degradação. Website: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/11674 b00455047269157d7aa67d7913d/Consulta+P%C3%BAblica+n%C2%B0+68+SU MED.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 21 de dezembro de 2015.
23. BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003, Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Website: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c67 35/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+vali da%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3 %ADticos.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 21 de dezembro de 2015.
24. BRASIL, ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Bulário eletrônico, website: <http://portal.anvisa.gov.br/bulario-eletronico1>, acesso em maio de 2015.
25. HRAKOVSKY, J.; TENENGAUZER, R.; Stable Pharmaceutical Compositions of 2-Aza-Bicyclo [3.3.0]-Octane-3-Carboxylic Acid Derivatives, US 2008/0058404 A1, 2008.
26. SHERMAN, B. C.; A solid pharmaceutical composition for oral administration that comprises a mixture of ramipril With lactose hydrate, US 2005/0169981 A1, 2005.
27. AGUIAR, M. R. M. P.; GEMAL, A. L.; GIL, R. A. S. S.; Caracterização de polimorfismo em fármacos por ressonância magnética nuclear no estado sólido, Quím. Nova vol.22 n.4, São Paulo, 1999.
28. AKSU, B; MATAS, M.; CEVHER, E.; OZSOY, Y.; GUNERI, T.; YORK, P.; Quality by design approach for tablet formulations containing spray coated ramipril by using artificial intelligence techniques, International Journal of Drug Delivery 4 (2012) 59-69

29. ASCHAR, G. D., OLIVEIRA, L., ROSA, P.C.P.; The Degradations Routes of Ramipril and Its Products. American Journal of Pharm Tech Research, volume 5, 2015.
30. COLLINS, C.H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P.S.; Introdução a métodos cromatográficos. 5^a ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1993.
31. DEGANI, A. L. G; VIEIRA, P. C.; Atualidades em Química, Cromatografia: um breve ensaio, Química Nova Na Escola, Cromatografia N° 7, maio, 1998.
32. SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. Introduction to modern liquid chromatography. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons, Inc. 2010.
33. MALDANER, L.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, Quím. Nova vol.33 no.7 São Paulo 2010.
34. ROSA, P.C.P.; SILVA, C.R.; AIROLDI, C.; JARDIM, I.C.S.F; Preparação, Avaliação e Aplicação da Coluna C8 com grupo polar uréia na separação de compostos farmacêuticos por CLAE-FR, 30^a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010.
35. BROWN, M. E.; Introduction to Thermal Analysis, Techniques and Applications, 2nd ed., London: Kluwer Academic Publishers, 2001.
36. SILVA, R.C., CAVALHEIRO, C.C.S., CAVALHEIRO, E.T.G, Estudo de fotodegradação e de pureza do Ramipril utilizando a calorimetria exploratória diferencial, 31^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.
37. ARAUJO, G.L.B., HONDA, A.M., MATOS, J.R., Estudo do comportamento térmico de ramipril e das interações com excipientes, 30^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – SBQ, 2007.
38. USP 38, United States Pharmacopeia, NF33, 38 ed., <1086> Impurities in Drug Substances and Drug Products, Rockville, 2015.
39. BP 2015, British Pharmacopeia online, Monografia para Ramipril comprimidos. Website: www.pharmacopoeia.co.uk/bp2014. Acesso em 20 de março de 2015.
40. USP 38, United States Pharmacopeia, NF33, 38 ed., <621> Chromatography, Rockville, 2015.
41. VALCARCEL, M., Princípios da Química Analítica, Editora FAP Unifesp, 2012.
42. PAGANO, M.; GRAUVREAU, K.; Princípios de Bioestatística, 2^a. Edição, editora Cengage Learning, 2004.

43. WILSON, E. S.; BEASLEY, M. W.; Stabilized Ramipril compositions and methods of making, US 2006/0134213 A1, United States, 2006.
44. DESAI, S.R.; SHAIKH, M.M.; DHARWADKAR, S.R.; Preformulation of compatibility studies of etamsylate and fluconazole drugs with lactose by DSC, Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2003.
45. LILTORP K., GORM L.T., WILLUMSEN B., HOLM, R., Solid state compatibility studies with tablet excipients using non thermal methods. J Pharm Biomed Anal 2011.
46. LIRA, A.M.; ARAUJO, A.A.S.; BASÍLIO, I.D.J.; SANTOS, B.L.L.; SANTANA, A.M.; MACEDO, R.O.; Compatibility studies of lapachol with pharmaceutical excipients for the development of topical formulations, Thermochemica Acta, 2007;
47. NARANG, A. S.; RAO, V. M.; RAGHAVAN, K. S., Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory and Practice, Excipient Compatibility, 125-145p, Elsevier, 2009.
48. ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J.; QUINN, M.E.; Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6 ed., Londres, 2015.
49. FIGUEIREDO, L.P., Análise de excipientes em comprimidos de fármacos comercializados, Dissertação de Mestrado em Nanociências e Materiais Avançados da Universidade Federal do ABC, 2012.
50. SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). Advanced Drug Delivery Reviews, Supplement, n. 0, p. 163-174, 2012.
51. DEBENEDETTI, P. G.; STILLINGER (2001). Supercooled liquids and the glass transition. Nature [S.l.: s.n.] 410 (6825): 259–267.

ANEXOS

Anexo 1: Cálculos de parâmetros cromatográficos

Fator de Capacidade (K')

$$K' = \frac{Rt}{V_0} - 1,0$$

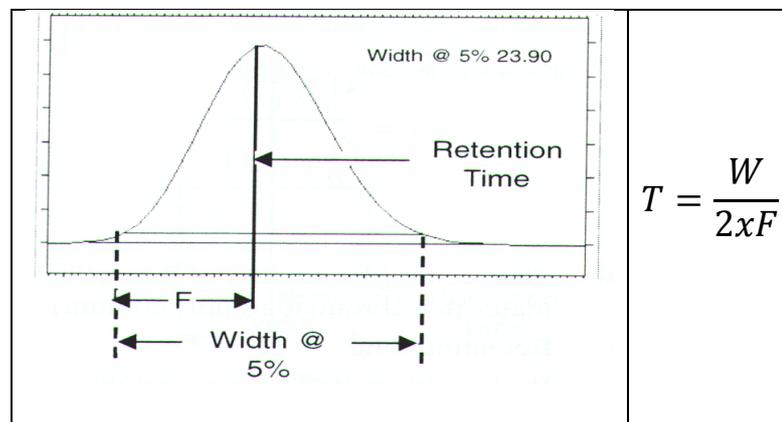
Onde:

K' = Fator de Capacidade;

Rt = Tempo de retenção;

V_0 = Tempo do volume de retardamento (void volume time).

Fator de Assimetria (USP Tailing (T))



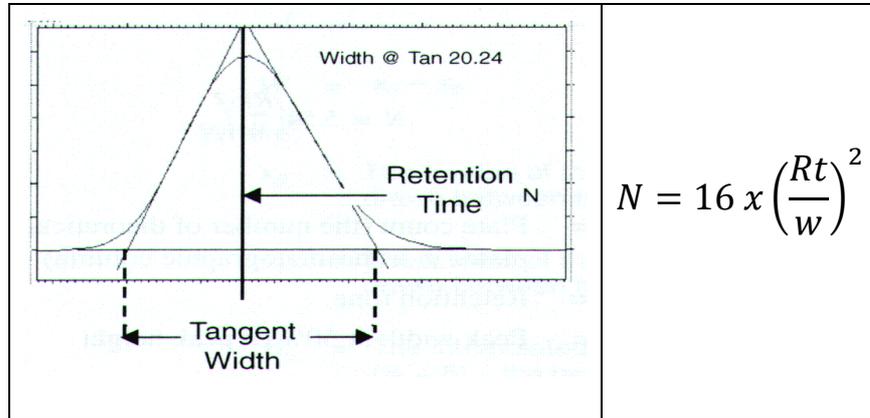
Onde:

T = Fator de assimetria;

W = Largura do pico a 5% da altura;

F = Tempo do início da largura do pico a 5% de altura até o tempo de retenção (Rt).

Número de Pratos (USP Plate Count (N))



$$N = 16 x \left(\frac{Rt}{w} \right)^2$$

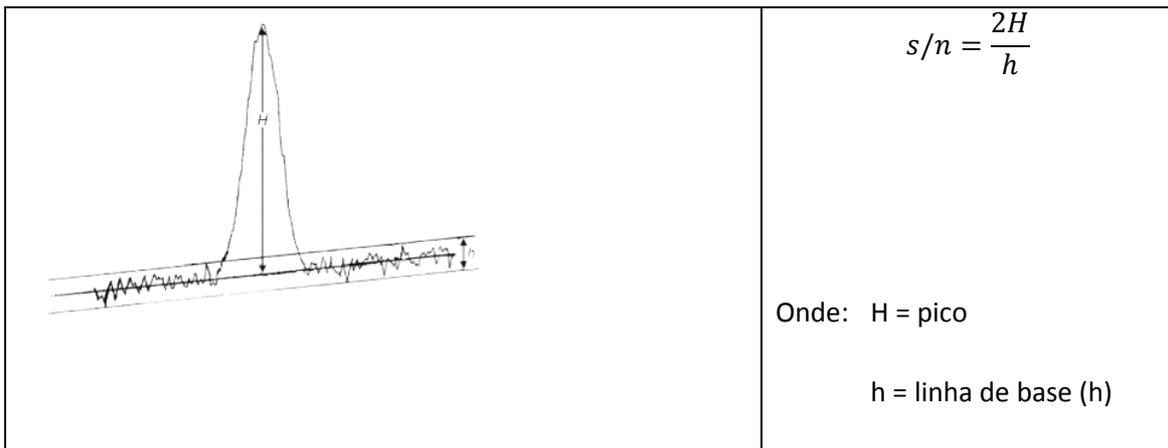
Onde:

N = número de pratos;

Rt = Tempo de retenção;

W = Largura do pico na linha de base, determinada pela tangente do pico.

Razão Sinal Ruído (S/N)



Onde: H = pico

h = linha de base (h)

Recuperação do Check

$$Rec \% = \frac{APdCh}{APd} x \frac{mPd}{mPdCh} x 100$$

Onde:

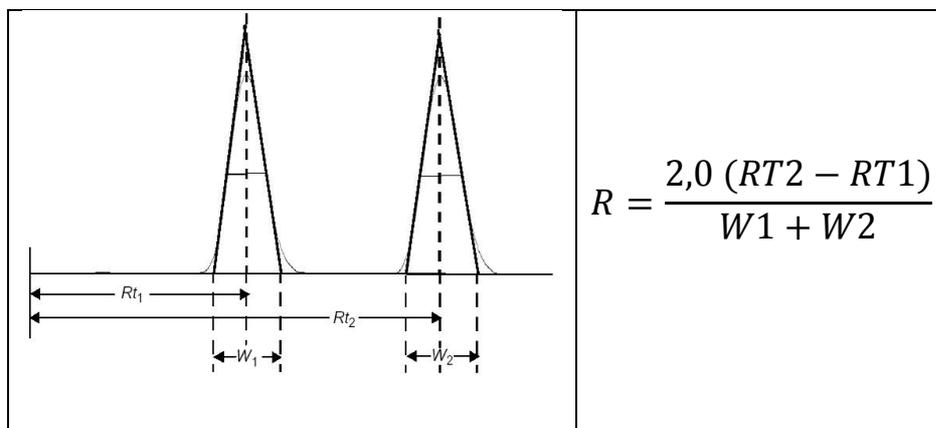
APdCh = área obtida com a solução padrão check;

APd = média das áreas obtidas com a solução padrão;

mPd = massa do padrão (mg);

m PdCh = massa do padrão check (mg);

Resolução



Onde:

R = Resolução;

RT1 = Tempo de retenção do primeiro pico;

RT2 = Tempo de retenção do segundo pico;

W1+W2 = Soma da largura da tangente dos picos.

Anexo 2: Tratamento estatístico da Linearidade

Curva de calibração (Modelo linear)

Modelo:	
$Y = a + b \cdot X$	
Intersecção (a):	Inclinação (b);
$a = \frac{\sum x_i^2 \cdot \sum y_i - \sum x_i \cdot \sum x_i \cdot y_i}{n \cdot \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}$	$b = \frac{n \cdot \sum x_i \cdot y_i - \sum x_i \cdot \sum y_i}{n \cdot \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}$
Coefficiente de Correlação (r):	
$r = \frac{\sum x_i \cdot y_i - n \cdot \bar{x} \cdot \bar{y}}{\sqrt{(\sum x_i^2 - n \cdot \bar{x}^2) \cdot (\sum y_i^2 - n \cdot \bar{y}^2)}}$	

Intervalo de Confiança (IC):

IC para o coeficiente linear	IC para o coeficiente angular
$a \pm t_{n-2} * (\text{erro padrão de } a)$	$b \pm t_{n-2} * (\text{erro padrão de } b)$
$\text{Erro padrão de } a = s \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{N * S_{xx}}}$	$\text{Erro padrão de } b = \frac{s}{\sqrt{S_{xx}}}$
Onde:	
$S_{xx} = \sum (x_i - \bar{x})^2$	$s = \sqrt{\frac{SQ_r}{N - 2}}$

Anexo 3: Tabelas comparativas para teste F e teste T.

Tabela F (5% de significância)

v1 ↗	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	15	20	24	25	30	
v2 ↓																		
1	161.45	199.50	215.71	224.58	230.16	233.99	236.77	238.88	240.54	241.88	242.98	243.90	245.95	248.02	249.05	249.26	250.10	
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.40	19.41	19.43	19.45	19.45	19.46	19.46	
3	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.76	8.74	8.70	8.66	8.64	8.63	8.62	
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96	5.94	5.91	5.86	5.80	5.77	5.77	5.75	
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.70	4.68	4.62	4.56	4.53	4.52	4.50	
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.03	4.00	3.94	3.87	3.84	3.83	3.81	
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.60	3.57	3.51	3.44	3.41	3.40	3.38	
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.31	3.28	3.22	3.15	3.12	3.11	3.08	
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.10	3.07	3.01	2.94	2.90	2.89	2.86	
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.94	2.91	2.85	2.77	2.74	2.73	2.70	
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.82	2.79	2.72	2.65	2.61	2.60	2.57	
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75	2.72	2.69	2.62	2.54	2.51	2.50	2.47	
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.63	2.60	2.53	2.46	2.42	2.41	2.38	
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60	2.57	2.53	2.46	2.39	2.35	2.34	2.31	
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.51	2.48	2.40	2.33	2.29	2.28	2.25	
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.46	2.42	2.35	2.28	2.24	2.23	2.19	
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.41	2.38	2.31	2.23	2.19	2.18	2.15	
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.37	2.34	2.27	2.19	2.15	2.14	2.11	
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	2.34	2.31	2.23	2.16	2.11	2.11	2.07	
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.31	2.28	2.20	2.12	2.08	2.07	2.04	
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32	2.28	2.25	2.18	2.10	2.05	2.05	2.01	
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30	2.26	2.23	2.15	2.07	2.03	2.02	1.98	
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32	2.27	2.22	2.20	2.13	2.05	2.01	2.00	1.96	
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.25	2.22	2.18	2.11	2.03	1.98	1.97	1.94	
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	2.24	2.20	2.16	2.09	2.01	1.96	1.96	1.92	
26	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27	2.22	2.18	2.15	2.07	1.99	1.95	1.94	1.90	
27	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25	2.20	2.17	2.13	2.06	1.97	1.93	1.92	1.88	
28	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24	2.19	2.15	2.12	2.04	1.96	1.91	1.91	1.87	
29	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22	2.18	2.14	2.10	2.03	1.94	1.90	1.89	1.85	
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.13	2.09	2.01	1.93	1.89	1.88	1.84	
35	4.12	3.27	2.87	2.64	2.49	2.37	2.29	2.22	2.16	2.11	2.07	2.04	1.96	1.88	1.83	1.82	1.79	
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.08	2.04	2.00	1.92	1.84	1.79	1.78	1.74	

Tabela teste de t

Tabela A.6
Valores de t_α segundo os graus de liberdade e o valor de α

Graus de liberdade	10%	α 5%	1%
1	6,31	12,71	63,66
2	2,92	4,30	9,92
3	2,35	3,18	5,84
4	2,13	2,78	4,60
5	2,02	2,57	4,03
6	1,94	2,45	3,71
7	1,90	2,36	3,50
8	1,86	2,31	3,36
9	1,83	2,26	3,25
10	1,81	2,23	3,17
11	1,80	2,20	3,11
12	1,78	2,18	3,06
13	1,77	2,16	3,01
14	1,76	2,14	2,98
15	1,75	2,13	2,95
16	1,75	2,12	2,92
17	1,74	2,11	2,90
18	1,73	2,10	2,88
19	1,73	2,09	2,86
20	1,73	2,09	2,84
21	1,72	2,08	2,83
22	1,72	2,07	2,82
23	1,71	2,07	2,81
24	1,71	2,06	2,80
25	1,71	2,06	2,79
26	1,71	2,06	2,78
27	1,70	2,05	2,77
28	1,70	2,05	2,76
29	1,70	2,04	2,76
30	1,70	2,04	2,75
40	1,68	2,02	2,70
60	1,67	2,00	2,66
120	1,66	1,98	2,62
∞	1,64	1,96	2,58

Anexo 4: Certificados dos padrões de referência

Ramipril USP lote R019T0

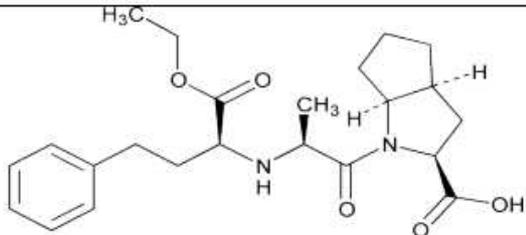


Certificate

RAMIPRIL

((2S,3aS,6aS)-1-[(S)-N-[(S)-1-Carboxy-3-phenylpropyl]alanyl]octahydrocyclopenta[b]pyrrole-2-carboxylic acid, 1-ethyl ester)

USP Catalog No.:	1598303
USP Lot No.:	R019T0

	CAS No.	87333-19-5
	Molecular Formula	C ₂₃ H ₃₂ N ₂ O ₅
	Molecular Weight	416.51



LABEL TEXT

For use with specific USP compendial tests.
Not for use as a drug. See SDS prior to use
at www.usp.com/ids.



Lot: R019T0

USP REFERENCE STANDARD

RAMIPRIL 125 mg

Danger! May damage fertility or the unborn child. May cause damage to organs (cardiovascular system) through prolonged or repeated exposure.



Do not dry. For quantitative applications, use a value of 0.996 mg of ramipril per mg of material on the as is basis. Keep container tightly closed. Protect from light. Store in a refrigerator.

USP, 12601 Twinbrook Pkwy, Rockville, MD, +1-301-881-0666
CAT No.1598303 Material mfd. in Germany

Obtain special instructions before use. Do not handle until all safety precautions have been read and understood. Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection. If exposed or concerned: Get medical advice/attention. Store locked up. Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.

Jeri L. Joth
Quality Assurance

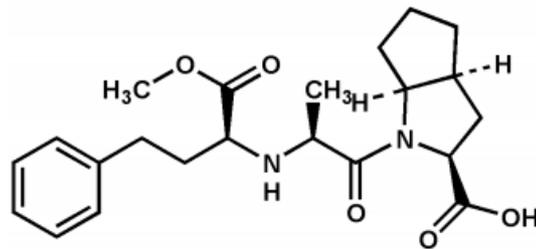
Ramipril CRA USP lote G0H441



U.S. Pharmacopeia
The Standard of Quality™

USP Certificate

Ramipril Related Compound A LOT G0H441



Molecular Formula

 $C_{22}H_{30}N_2O_5$

Molecular Weight

402.48

CAS Number

108313-11-7

LABEL TEXT

USP REFERENCE STANDARD
RAMIPRIL RELATED COMPOUND A 30 mg
 ((2S,3aS,6aS)-1-[(S)-1-(methoxycarbonyl)-3-phenylpropylamino]-1-oxopropyl]-octahydrocyclopenta[b]pyrrole-2-carboxylic acid)

Warning! Suspected of damaging fertility or the unborn child. May cause damage to organs (cardiovascular system) through prolonged or repeated exposure.

Do not dry. Keep container tightly closed. Protect from light. Store in a refrigerator.

USP, 12601 Twinbrook Pkwy, Rockville, MD, +1-301-881-0866
 CAT No. 1598314 Material mfgd in Germany
Intentionally over-labeled for GHS compliance

For use with individual USP components only. Not for use as a drug. See SDS prior to use at www.usp.org/eds.

Obtain special instructions before use. Do not handle until all safety precautions have been read and understood. Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection if exposed or concerned. Get medical advice/attention. Store locked up. Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.

USP certifies that the USP Reference Standards Committee, in accordance with their rules and procedures, determined that this USP Reference Standard lot is suitable to assess compliance with the monograph standards for which it is specified. The critical characteristics of this lot are usually determined independently in three or more laboratories, including USP, government, academic, and industrial collaborators.

Jeri L. Joth

QA Director

Ramipril CRD USP lote R002S0



Certificate

RAMIPRIL RELATED COMPOUND D

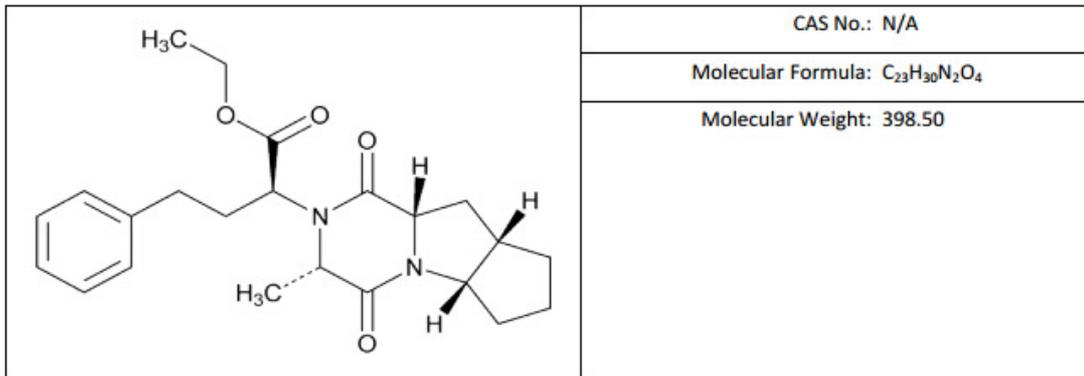
(Ethyl (S)-2-((3S,5aS,8aS,9aS)-3-methyl-1,4-dioxodecahydro-2H-cyclopenta[4,5]pyrrolo[1,2-a]pyrazin-2-yl)-4-phenylbutanoate)

Or

(Ramipril Diketopiperazine)

USP Catalog No.: 1598347

USP Lot No.: R002S0



LABEL TEXT

For use with specified USP compendial tests.
Not for use as a drug. See SDS prior to use at
www.usp.org/ids.

USP REFERENCE STANDARD

RAMIPRIL RELATED COMPOUND D 20 mg

(Ethyl (S)-2-((3S,5aS,8aS,9aS)-3-methyl-1,4-dioxodecahydro-2H-cyclopenta[4,5]pyrrolo[1,2-a]pyrazin-2-yl)-4-phenylbutanoate)

(Ramipril Diketopiperazine)

Do not dry. Keep container tightly closed. Protect from light. Store in a refrigerator.

USP, 12601 Twinbrook Pkwy, Rockville, MD, +1-301-881-0666
CAT. NO. 1598347 Material mfd. in Germany

LOT: R002S0



Jeri L. Joth

Quality Assurance

Anexo 5: Declarações de autoria e de bioética e segurança



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
 INSTITUTO DE BIOLOGIA
 Universidade Estadual de Campinas
 Caixa Postal 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brasil
 Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado, intitulada "**ESTUDO DE PRÉ-FORMULAÇÃO DE RAMIPRIL COMPRIMIDOS, VALIDAÇÃO PARCIAL DE METODOLOGIA, AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE FÁRMACO E EXCIPIENTES E ELUCIDAÇÃO DAS VIAS DE DEGRADAÇÃO**", desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: _____

Nome do(a) aluno(a): Guilherme Davi Aschar

Assinatura: _____

Nome do(a) orientadô(r): Dr. Paulo César Pires Rosa

Prof. DR. Paulo César Pires Rosa
 Matrícula 304741
 Faculdade de Ciências Farmacêuticas
 UNICAMP

Data: 16/08/2017

Declaração

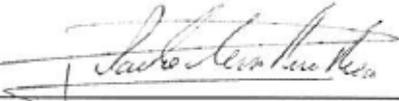
As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **ESTUDO DE PRÉ-FORMULAÇÃO DE RAMIPRIL COMPRIMIDOS, VALIDAÇÃO PARCIAL DE METODOLOGIA, AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE FÁRMACO E EXCIPIENTES E ELUCIDAÇÃO DAS VIAS DE DEGRADAÇÃO**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 16/08/2017

Assinatura : 

Nome do(a) autor(a): **Guilherme Davi Aschar**

RG n.º 159218

Assinatura : 

Nome do(a) orientador(a): **Dr. Paulo César Pires Rosa**

RG n.º 304741

Prof. DR. Paulo César Pires Rosa
Matrícula 304741
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNICAMP