

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**OLMESARTANA MEDOXOMILA: VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA,
AVALIAÇÃO BIOFARMACÊUTICA E ANÁLISE POLIMÓRFICA**

LISIANE BAJERSKI

PORTO ALEGRE, 2010

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

OLMESARTANA MEDOXOMILA: VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA,
AVALIAÇÃO BIOFARMACÊUTICA E ANÁLISE POLIMÓRFICA

Tese apresentada por **Lisiane Bajerski** para
obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências
Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich

Porto Alegre, 2010

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 22 de outubro de 2010, pela Comissão Examinadora constituída por:

Prof^a. Dr^a. Ana Rita Breier

Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS)

Prof^a. Dr^a. Andrea Inês Horn Adams

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

Prof^a. Dr^a. Nádia Maria Volpato

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

B165o Bajerski, Lisiane

Olmesartana medoxomila: validação de metodologia analítica, avaliação biofarmacêutica e análise polimórfica / Lisiane Bajerski. – Porto Alegre: UFRGS, 2010. – xxv, 177 p.: il.

Tese (doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Olmesartana medoxomila. 2. Validação: métodos de análise de fármacos. 3. Cinética de dissolução. 4. Cromatografia a líquido de alta eficiência. 5. Cromatografia capilar eletrocinética micelar. 6. Polimorfismo. I. Fröhlich, Pedro Eduardo. II. Título.

CDU: 615.2.011

Bibliotecária responsável:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB 10/480

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Química Farmacêutica e Controle de Qualidade da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Dedico este trabalho a meus pais, Eduardo e Terezinha, e irmãos, Lisandra e Júlio, que sempre confiaram em mim, apoiaram meus sonhos e deram toda a base e força para enfrentar os desafios da vida.

*“Ninguém poderá jamais aperfeiçoar-se, se não tiver o mundo
como mestre. A experiência se adquire na prática.”*

(William Shakespeare)

AGRADECIMENTOS

A Deus por guiar meus caminhos;

Ao Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich pela orientação, confiança, compreensão, disponibilidade e contribuição em minha vida profissional;

À Prof.^a. Dr.^a. Ana Maria Bergold pela amizade, apoio e colaboração constante neste trabalho;

Ao Prof. Dr. Martin Steppe, do Laboratório de Controle de Qualidade, pela colaboração e a possibilidade de utilização do equipamento de eletroforese capilar;

À Prof.^a Dr.^a. Simone Gnoatto pelo auxílio na elucidação dos espectros de ressonância magnética nuclear;

Aos professores e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas;

Em especial a Clésio Soldatelli Paim pela confiança, incentivo, conhecimento compartilhado e por toda ajuda durante a realização deste trabalho;

Às minhas amigas Carol, Rochele, Andrea Adams, Ana Paula, Lia e Sirlei pela amizade e conhecimentos adquiridos;

Aos amigos do LAPPS Luís, Leonardo, César, Marcella, Andrea Pereira, Andrea Lopes, Pâmela, Tamara e Fernanda pelo carinho e parceria;

Ao amigo Marquinhos pelos momentos de alegria e apoio nas horas difíceis;

Ao CNPq, pelo apoio financeiro durante a realização deste estudo;

A todos que colaboraram de alguma maneira para a conclusão desta tese e que não foram citados.

RESUMO**OLMESARTANA MEDOXOMILA: VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA, AVALIAÇÃO BIOFARMACÊUTICA E ANÁLISE POLIMÓRFICA**

O pró-fármaco olmesartana medoxomila (OLM) é um anti-hipertensivo representante da classe dos bloqueadores seletivos dos receptores da angiotensina II (BRA). No Brasil, encontra-se disponível sob a forma de comprimidos revestidos (Benicar[®]). Foi aprovado pelo FDA em 2002. Não existe monografia disponível para este fármaco em nenhum código oficial. Desse modo, este trabalho objetivou o desenvolvimento de métodos analíticos para quantificação da OLM na substância química de referência (SQR) e forma farmacêutica, estabelecer a cinética de dissolução *in vitro* para os comprimidos revestidos deste fármaco e por fim investigar a presença de diferentes estruturas polimórficas da SQR deste anti-hipertensivo. A determinação da faixa de fusão, a espectrofotometria na região do infravermelho (IV), assim como a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C permitiram a identificação da SQR. Os métodos por espectrofotometria na região do ultravioleta (UV), cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) e cromatografia capilar eletrocínica micelar (MECC) foram utilizados para análise qualitativa do fármaco no produto acabado. A determinação quantitativa foi realizada através do desenvolvimento e validação de método indicativo da estabilidade por CLAE e MECC, avaliando-se os parâmetros descritos pelas guias de validação como: especificidade, robustez, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão. Determinou-se ainda, a intercambialidade dos mesmos, através de análise estatística por ANOVA ($p = 0,05$), e comprovou-se que ambos podem ser utilizados para análise qualitativa e quantitativa da OLM em matéria-prima e produto acabado. O teste de dissolução foi desenvolvido e validado de acordo com o guia proposto pelo USP Fórum, utilizando como meio de dissolução 900 ml de uma solução a 0,5% (p/V) de lauril sulfato de sódio pH 6,8, a $37 \pm 0,5$ °C, pás a 50 rpm e quantificação por CLAE e espectrofotometria na região do UV. A análise do teor de OLM dissolvida, realizada por ambos os métodos, não apresentou diferença estatística ($p > 0,05$). Os perfis de dissolução do Benicar[®], medicamento referência, e do Olmetec[®], outra formulação

disponível no mercado, foram considerados semelhantes, após aplicação do método modelo-independente (f_1 e f_2) e eficiência de dissolução. Avaliou-se, também, a cinética de dissolução de ambas as formulações através da aplicação de métodos modelo-dependentes. Os perfis de dissolução do Benicar[®] e Ometec[®] foram descritos pelos modelos propostos por *Hixson-Crowell* e de *ordem zero*, respectivamente. Os valores calculados para $t_{50\%}$ e $t_{80\%}$, obtidos através da aplicação da equação de *ordem zero*, foram semelhantes aos valores experimentais encontrados no perfil de dissolução de ambos os produtos. As técnicas de espectrofotometria por reflexão difusa no IV com transformada de Fourier (ATR-FTIR), difração de raios-X de pó (XRPD), calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TGA) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) permitiram a identificação de uma forma amorfa e outra polimórfica da SQR da OLM, diferentes daquela descrita na literatura. Logo, de acordo com os resultados obtidos, todos os métodos propostos podem ser utilizados para no controle de qualidade da OLM em SQR e produto acabado.

Palavras-chave: Olmesartana medoxomila, cromatografia a líquido de alta eficiência, cromatografia capilar eletrocínica micelar, cinética de dissolução, polimorfismo.

ABSTRACT**OLMESARTAN MEDOXOMIL: VALIDATION OF ANALYTICAL METHODOLOGY, BIOPHARMACEUTICAL EVALUATION, AND POLYMORPHIC ANALYSIS**

The prodrug olmesartan medoxomil (OLM) is a selective angiotensin II receptor blocker (ARB). In Brazil, it is available as coated tablets (Benicar[®]). It was approved by FDA in 2002. There is no monograph available for this drug in any official code. According to this, the main purpose of this study was to develop a quality control analytical methodology for OLM in bulk material and dosage form, to establish *in vitro* dissolution kinetic for OLM coated tablets, and to investigate the crystalline behavior of OLM bulk material. The investigation of melting range and application of techniques such as infrared spectrophotometry (IR), as well as the ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy were used to identify OLM. Ultraviolet (UV) spectrophotometry, thin-layer chromatography (TLC), high-performance liquid chromatography (LC) and micellar electrokinetic chromatography (MEKC) were used for qualitative analysis of the drug in coated tablets. The quantitative determination was carried out through the development and validation of a stability-indicating LC and MEKC methods, evaluating the parameters described in the guidelines such as: specificity, robustness, linearity, detection and quantitation limits, precision, and accuracy. The results were compared statistically by ANOVA ($p = 0.05$), and no difference was found between them for both bulk material and coated tablets. A dissolution test was developed and validated according to the guideline proposed by the USP Forum, using 900 ml of dissolution medium containing 0.5% of sodium lauryl sulfate (w/V) pH 6.8, at 37 ± 0.5 °C, paddle at 50 rpm, and quantitation by LC and UV spectrophotometry. The resulting dissolution profiles did not show statistical difference ($p > 0.05$) between methods. The dissolution profiles of Benicar[®], reference formulation, and Olmetec[®], another commercial formulation available, were considered similar, using model independent (f_1 , f_2 , and dissolution efficiency) methods. The dissolution kinetic of both formulations, using model dependent approaches, revealed that Benicar[®] followed the *Hixson-Crowell* model, while Olmetec[®] the *zero-order* model. The calculated values of $t_{50\%}$ and $t_{80\%}$, obtained from zero-order equation, were similar of experimental values found in the dissolution profile for both products. The attenuated total reflectance Fourier transformed

infrared (ATR-FTIR) spectrophotometry, along with differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetry (TG), X-ray powder diffraction (XRPD), and scanning electron microscopy (SEM) allowed to identify one amorphous and other polymorphic forms of OLM. According to the obtained results, all proposed methods could be used in the quality control of OLM bulk material and coated tablets.

Keywords: Olmesartan medoxomil, high-performance liquid chromatography, micellar electrokinetic chromatography, dissolution kinetic, polymorphism.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1** - Hidrólise da olmesartana medoxomila (Fonte: Adaptado de MA *et al.*, 2005).....4
- Figura 3.1** - Estrutura química dos fármacos da classe dos bloqueadores dos receptores AT₁ da angiotensina II (Fonte: KOIKE *et al.*, 2003)..... 14
- Figura 3.2** - Sistema renina-angiotensina adaptado de BROUSIL e BURKE, 2003. IECA: enzima conversora da angiotensina I, AT₁: angiotensina I; AT₂: angiotensina II. 16
- Figura 3.3** - Estrutura química da olmesartana medoxomila..... 17
- Figura 4.1** - Curva de aquecimento obtida por calorimetria exploratória diferencial para olmesartana medoxomila substância química de referência em atmosfera de nitrogênio e velocidade de aquecimento de 10 °C/min..... 29
- Figura 4.2** - Espectros na região do ultravioleta da olmesartana medoxomila substância química de referência diluídos em metanol (A) e acetonitrila (B), na concentração de 20 µg/ml..... 31
- Figura 4.3** - Espectros na região do ultravioleta da olmesartana medoxomila substância química de referência (A) e dos comprimidos revestidos (B), diluídos em acetonitrila, na concentração de 20 µg/ml. 31
- Figura 4.4** - Espectros na região do ultravioleta da olmesartana medoxomila substância química de referência diluídos em acetonitrila (A), NaOH 0,01M (B), NaOH 0,1M (C) e NaOH 1M (D), na concentração de 20 µg/ml..... 32
- Figura 4.5** - Espectros na região do ultravioleta da olmesartana medoxomila substância química de referência diluídos em acetonitrila (A), HCl 0,01M (B), HCl 0,1M (C) e HCl 1M (D), na concentração de 20 µg/ml..... 33
- Figura 4.6** - Espectro na região do infravermelho da olmesartana medoxomila substância química de referência.....34
- Figura 4.7** - Perfil cromatográfico da olmesartana medoxomila substância química de referência (1), olmesartana medoxomila comprimidos revestidos (2) e losartana potássica substância química de referência (3), diluídos em acetonitrila. Fase móvel: diclorometano: metanol: trietilamina (8:2:0,5; v/v/v). Detecção: luz UV 254 nm.....36
- Figura 4.8** - Cromatograma da solução da substância química de referência (a) e dos comprimidos revestidos da olmesartana medoxomila (b), na concentração de 20 µg/ml. Condições cromatográficas: coluna Phenomenex[®] RP₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5 µm); fase móvel: água: trietilamina: acetonitrila (60:0,3:40 v/v/v) pH 6,3 ajustado com ácido *orto*-fosfórico 18%; vazão: 1,2 mL/ min; volume injetado: 20 µL. 37
- Figura 4.9** - Eletroferogramas das soluções da olmesartana medoxomila substância química de referência e diclofenaco potássico padrão interno (a) e dos comprimidos

revestidos da olmesartana medoxomila e diclofenaco potássico padrão interno (b), nas concentrações de 50 µg/mL. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida (40 cm efetivos, 50 µm de diâmetro interno); eletrólito tampão borato 10mM: 5 mM de lauril sulfato de sódio pH 6,5 (95:5 v/v); voltagem 30 kV; detecção UV em 257 nm; temperatura de 25°C.....40

Figura 4.10 - Espectro de RMN ¹H da olmesartana medoxomila substância química de referência obtido em espectrômetro BRUKER (100 MHz), utilizando dimetilsulfóxido deuterado como solvente.....41

Figura 4.11 - Espectro de RMN ¹³C da olmesartana medoxomila substância química de referência obtido em espectrômetro BRUKER (400 MHz), utilizando dimetilsulfóxido deuterado como solvente.....42

Figura 5.1 - Representação do processo de separação de misturas por interação diferencial de seus componentes entre a fase móvel e fase estacionária (Fonte: NETO e NUNES, 2003). 51

Figura 5.2 - Representação da formação e sentido do fluxo eletrosmótico (ROUESSAC e ROUESSAC, 2001). 56

Figura 5.3 - Representação da formação e sentido do fluxo eletrosmótico na cromatografia capilar eletrocinética micelar (ROUESSAC e ROUESSAC, 2001). ... 57

LISTA DE TABELAS E QUADROS

- Quadro 4.1** - Freqüências de absorção das principais bandas no espectro de infravermelho da olmesartana medoxomila. 34
- Quadro 4.2** - Condições cromatográficas definidas para identificação da OLM por CLAE.....37
- Quadro 4.3** - Condições eletroforéticas definidas para identificação da OLM por MECC.....39
- Tabela 4.1** - Dados dos espectros de RMN ¹H da olmesartana medoxomila substância química de referência, obtidos em espectrômetro BRUKER (100 MHz), utilizando dimetilsulfóxido deuterado como solvente. 41
- Quadro 5.1**- Resumo dos métodos analíticos por cromatografia a líquido de alta eficiência para determinação da OLM. 54
- Tabela 8.1** - ANOVA das áreas absolutas da curva padrão da OLM, intervalo de 10 a 30 µg/ml, obtidas por CLAE, utilizando coluna Phenomenex[®] RP₁₈ (250 mm x 4 mm, 5 µm); fase móvel: água: trietilamina: acetonitrila (60: 0,3: 40 v/v/v), pH 6,3 ajustado com ácido *orto*-fosfórico 18%; vazão: 1,2 mL/ min; volume injetado: 20 µL. 175
- Tabela 8.2** - ANOVA dos resultados obtidos no teste de precisão inter-dias (*n* = 18) dos comprimidos da OLM por CLAE, utilizando coluna Phenomenex[®] RP₁₈ (250 mm x 4 mm, 5 µm); fase móvel: água: trietilamina: acetonitrila (60: 0,3: 40 v/v/v), pH 6,3 ajustado com ácido *orto*-fosfórico 18%; vazão: 1,2 mL/ min; volume injetado: 20 µL.....175
- Tabela 8.3** - ANOVA das áreas absolutas da curva padrão da OLM, intervalo de 2 a 100 µg/ml, obtidas por MECC, utilizando capilar de sílica fundida 40 cm de comprimento (40 cm efetivos, 50 µm de diâmetro interno); eletrólito tampão borato 10mM: 5 mM de lauril sulfato de sódio pH 6,5 (95:5 v/v); voltagem 30 kV; detecção UV em 257 nm; temperatura de 25°C..... 175
- Tabela 8.4** - ANOVA dos resultados obtidos na comparação entre os métodos por CLAE e MECC, para determinação da OLM. 176
- Tabela 8.5** - ANOVA das áreas absolutas da curva padrão da OLM, intervalo de 5 a 30 µg/ml, obtidas por CLAE, utilizando coluna Phenomenex[®] RP₁₈ (250 mm x 4 mm, 5 µm); fase móvel: água: trietilamina: acetonitrila (60: 0,3: 40 v/v/v), pH 6,3 ajustado com ácido *orto*-fosfórico 18%; vazão: 1,2 mL/ min; volume injetado: 20 µL. 176
- Tabela 8.6** - ANOVA dos resultados obtidos na determinação da curva padrão da OLM, intervalo de 5 a 30 µg/ml, obtidas por espectrofotometria na região do UV.. 176
- Tabela 8.7** - ANOVA dos resultados obtidos na comparação entre os métodos por CLAE e espectrofotometria na região do UV, para determinação da OLM..... 177
- Tabela 8.8** - ANOVA fator único dos resultados encontrados na eficiência de dissolução (ED%), obtidas na comparação entre os métodos por CLAE e

espectrofotometria na região do UV, para determinação da OLM nos comprimidos Benicar[®]..... 177

Tabela 8.9 - ANOVA dos resultados obtidos na robustez do método de dissolução, obtidas na comparação entre diferentes valores de pH (6,4 e 6,8) para determinação do percentual de OLM dissolvida nos comprimidos Benicar[®], por CLAE.....177

Tabela 8.10 - ANOVA dos resultados obtidos na robustez do método de dissolução, obtidas na comparação entre diferentes valores de pH (6,4 e 6,8) para determinação do percentual de OLM dissolvida nos comprimidos Benicar[®], por espectrofotometria na região do UV.....177

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|----------|--|
| ANOVA | Análise de variância; |
| ASC | Área sob a curva; |
| BCC | Bloqueadores dos canais de cálcio; |
| BRA | Bloqueadores dos receptores AT ₁ da angiotensina; |
| CCD | Cromatografia em camada delgada; |
| CIVIV | Correlação <i>in vivo</i> - <i>in vitro</i> ; |
| CLAE | Cromatografia líquida de alta eficiência; |
| CS-866 | Olmesartana medoxomila; |
| DAD | Detector de arranjo de fotodiodos; |
| DCB | Denominação comum brasileira; |
| DICL | Diclofenaco potássico; |
| DMSO-D6 | Dimetilsulfóxido deuterado; |
| DPR | Desvio padrão relativo; |
| DSC | Calorimetria exploratória diferencial; |
| EC | Eletroforese capilar; |
| ED% | Eficiência de dissolução; |
| FDA | Food and Drug Administration; |
| gl | Graus de liberdade; |
| HAS | Hipertensão arterial sistêmica; |
| ICH | International Conference on Harmonization; |
| IECA | Inibidores da enzima conversora da angiotensina I; |
| IV | Infravermelho; |
| LSS | Lauril sulfato de sódio; |
| MECC | Cromatografia capilar eletrocínica micelar; |
| OLM | Olmesartana medoxomila; |
| OMS | Organização Mundial da Saúde; |
| OL | Olmesartana; |
| XRPD | Difratometria de raio-X de pó; |
| PI | Padrão interno; |
| r | Coeficiente de correlação de Pearson; |
| FR | Fator de retenção; |
| RNH-6270 | Olmesartana; |

| | |
|-----|---|
| RMN | Ressonância magnética nuclear; |
| SCB | Sistema de classificação biofarmacêutica; |
| SQ | Soma dos quadrados; |
| SQR | Substância química de referência; |
| SRA | Sistema renina-angiotensina; |
| UV | Ultravioleta. |

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| RESUMO | XIII |
| ABSTRACT | XV |
| LISTA DE FIGURAS | XVII |
| LISTA DE TABELAS E QUADROS | XIX |
| LISTA DE ABREVIATURAS | XXI |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. OBJETIVOS | 5 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 9 |
| 3.1. ASPECTOS GERAIS | 11 |
| 3.1.1. Hipertensão arterial sistêmica (HAS)..... | 11 |
| 3.1.2. Fatores de risco..... | 11 |
| 3.1.3 Tratamento | 12 |
| 3.1.4 Bloqueadores dos receptores AT ₁ da angiotensina II (BRA)..... | 13 |
| 3.1.4.1 Mecanismo de ação..... | 15 |
| 3.1.4.2 Descrição | 16 |
| 3.1.4.3 Características químicas..... | 17 |
| 3.1.4.4 Características farmacocinéticas | 18 |
| 3.1.4.5 Indicações e eficácia..... | 18 |
| 3.1.4.6 Efeitos adversos | 19 |
| 3.2. REFERÊNCIAS | 20 |
| 4. CAPÍTULO I - Análise qualitativa da olmesartana medoxomila SQR e comprimidos revestidos | 25 |
| 4.1 INTRODUÇÃO | 27 |
| 4.2 CARACTERIZAÇÃO DA OLM | 27 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 4.2.1 | Ponto de fusão | 28 |
| 4.2.2 | Calorimetria diferencial exploratória (DSC) | 28 |
| 4.2.3 | Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) | 30 |
| 4.2.4 | Espectrofotometria na região do infravermelho (IV) | 33 |
| 4.2.5 | Cromatografia em camada delgada (CCD) | 35 |
| 4.2.6 | Cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) | 36 |
| 4.2.7 | Cromatografia capilar eletrocínética micelar (MECC) | 38 |
| 4.2.8 | Ressonância magnética nuclear (RNM) | 40 |
| 4.3 | CONCLUSÕES | 43 |
| 4.4 | REFERÊNCIA | 44 |
| 5. | CAPÍTULO II - Desenvolvimento e validação de metodologia analítica .. | 47 |
| 5.1 | INTRODUÇÃO | 49 |
| 5.2 | CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) | 51 |
| 5.3 | ELETROFORESE CAPILAR (EC) | 55 |
| 5.4 | MATERIAL E MÉTODOS | 58 |
| 5.5 | CONCLUSÃO | 59 |
| 5.6 | REFERÊNCIAS | 61 |
| | PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA – Stability-Indicating LC Determination of a New Antihypertensive, Olmesartan Medoxomil in Tablets. Chromatographia, v. 68, p. 991-996, 2008. | 65 |
| | ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO – Stability-Indicating Comparative Methods by MEKC and LC for Determination of Olmesartan Medoxomil. Journal of AOAC International, 2010. | 73 |
| 6. | CAPÍTULO III – Desenvolvimento e validação método de dissolução para os comprimidos da olmesartana medoxomila | 101 |
| 6.1 | INTRODUÇÃO | 103 |
| 6.2 | ENSAIO DE DISSOLUÇÃO | 104 |
| 6.3 | ESCOLHA DO MEIO | 106 |

| | | |
|------|---|-----|
| 6.4 | ESCOLHA DO EQUIPAMENTO E ROTAÇÃO | 107 |
| 6.5 | VALIDAÇÃO DO MÉTODO..... | 108 |
| 6.6 | ESPECIFICAÇÕES DO TESTE..... | 111 |
| 6.7 | COMPARAÇÃO ENTRE PERFIS DE DISSOLUÇÃO | 111 |
| 6.8 | MATERIAIS E MÉTODOS | 119 |
| 6.9 | CONCLUSÃO | 120 |
| 6.10 | REFERÊNCIA..... | 122 |

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA – Development and validation of a discriminating in vitro dissolution method for a poorly soluble drug, olmesartan medoxomil: comparison between commercial tablets. Journal of AAPS (American Association of Pharmaceutical Scientists), v. 11, p. 637-644, 2010..... 129

| | | |
|-----|--|-----|
| 7. | CAPÍTULO IV – Estudo das propriedades polimórficas da olmesartana medoxomila | 139 |
| 7.1 | INTRODUÇÃO | 141 |
| 7.2 | MÉTODOS DE CRISTALIZAÇÃO | 143 |
| 7.3 | MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO E DETECÇÃO DE POLIMORFOS... .. | 145 |
| 7.4 | MATERIAL E MÉTODOS | 149 |
| 7.5 | CONCLUSÃO | 149 |
| 7.6 | REFERÊNCIAS | 151 |

ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO – Solid-state characterization of olmesartan medoxomil polymorphic behavior. Journal of Pharmacy Research, 2010. 155

| | | |
|----|-------------|-----|
| 8. | ANEXO | 173 |
|----|-------------|-----|

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é considerada o principal fator de risco para problemas cardíacos, doenças renais, derrames e está fortemente associada com o aumento da mortalidade em todo o mundo (MUNTWYLLER e FOLLATH, 2001). Relatórios da Organização Mundial da Saúde (OMS) revelam que os distúrbios cardiovasculares são considerados responsáveis por 27% dos óbitos ocorridos no mundo (IV CONSELHO BRASILEIRO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2004).

Mais de um quarto da população mundial adulta é hipertensa, com uma grande tendência em aumentar para 29% até 2025, podendo alcançar 1,56 bilhões de adultos (KEARNEY *et al.*, 2005). No Brasil, essas doenças atingem cerca de 10 a 15% da população, onde os obesos (20 a 40%), diabéticos (30 a 60%), negros (30 a 50%) e idosos (30 a 50%) constituem os principais grupos de risco. Na década de 80, as doenças cardiovasculares foram as maiores causas de mortalidade em nosso país, ultrapassando outros tipos de doenças (EYE, 2005).

A utilização de bloqueadores seletivos dos receptores da angiotensina II, hormônio efetor do sistema renina-angiotensina (SRA), tem mostrado eficácia no tratamento da hipertensão e na redução da progressão de nefropatias causadas por diabetes. Em 1989, pesquisadores do laboratório Sankyo descobriram uma potente substância de longa ação bloqueadora do SRA, que somente em 1991 foi denominada de *olmesartan medoxomil*, sendo posteriormente adicionado à Denominação Comum Brasileira (DCB) sob o nome de olmesartana medoxomila (BROUSIL e BURKE, 2003; KOIKE *et al.*, 2003, BRASIL, 2006).

A olmesartana medoxomila (CS-866; OLM), aprovada pelo FDA (Food and Drugs Administration) em abril de 2002 (NORWOOD *et al.*, 2002), é um potente antagonista dos receptores da angiotensina II do subtipo 1 (AT₁). É considerada a mais nova representante da classe dos anti-hipertensivos bloqueadores seletivos do SRA. Este pró-fármaco (Figura 1.1) possui um radical éster, que é rapidamente hidrolisado após administração oral por esterases endógenas, liberando o ácido ativo, olmesartana (RNH-6270; OL) (NUSSBERGER e KOIKE, 2004).

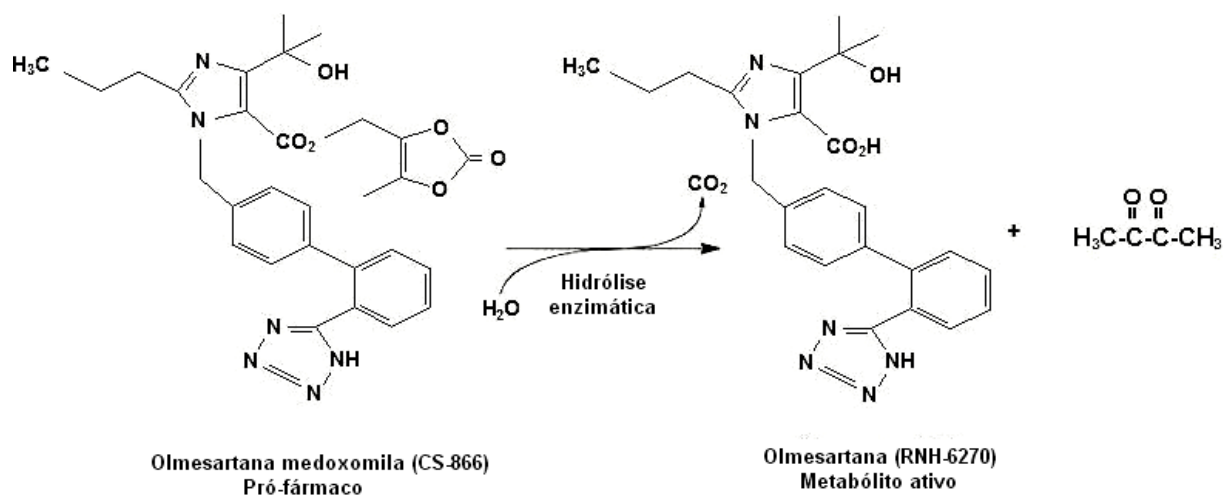


Figura 1.1 - Hidrólise da olmesartana medoxomila (Fonte: Adaptado de MA *et al.*, 2005).

Devido ao fato de tratar-se de um medicamento novo, de recente inclusão no comércio e, portanto, sem monografia descrita pelos compêndios oficiais, a OLM foi escolhida para o desenvolvimento deste trabalho. No início deste estudo havia disponível na literatura apenas metodologia analítica para determinação da OLM isolada (KOBAYASHI *et al.*, 2000; NAKAMURA *et al.*, 2005; MA *et al.*, 2005; VAIDYA *et al.*, 2007; LUI *et al.*, 2007), em associação com a hidroclorotiazida (SAGIRLI *et al.*, 2007) e com a hidroclorotiazida e irbesartana (NAJMA *et al.*, 2008), em fluidos biológicos.

Posteriormente, foram publicados trabalhos referentes à determinação da OLM em produto acabado por cromatografia a líquido de alta eficiência (RANE *et al.*, 2009; MURAKAMI *et al.*, 2008), espectrofotometria na região do ultravioleta (ÇELEBIER e ALTINOZ, 2007a) e eletroforese capilar (ÇELEBIER e ALTINOZ, 2009), e em associação com anlodipino (MEHULKUMAR *et al.*, 2009) por espectrofotometria na região do ultravioleta. Encontram-se, também, disponíveis estudos referentes ao teste de dissolução deste fármaco em associação com a hidroclorotiazida (SAGIRLI *et al.*, 2007), sem a devida validação do mesmo, assim como o ensaio de estabilidade térmica acelerada dos comprimidos revestidos, seguida do isolamento e identificação de seus produtos de degradação (MURAKAMI *et al.*, 2008).

Os métodos desenvolvidos e apresentados no presente trabalho visam, principalmente, colaborar com o controle de qualidade da OLM.

O objetivo geral deste estudo consiste em desenvolver metodologia analítica para o controle de qualidade da OLM em comprimidos e substância química de referência (SQR), estabelecer a cinética de dissolução *in vitro* para os seus comprimidos revestidos e, por fim, investigar a possibilidade da presença de polimorfos na SQR. Desse modo, para melhor visualização dos resultados obtidos, o presente trabalho encontra-se dividido em quatro capítulos, cujos objetivos específicos são:

- Caracterizar a SQR da OLM através do emprego de espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) e infravermelho (IV), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , cromatografia em camada delgada (CCD) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). Para os comprimidos revestidos, realizar sua identificação através da aplicação da CCD, espectrofotometria na região do UV e IV, cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) e cromatografia capilar eletrocínica micelar (MECC);
- Desenvolver e validar métodos para quantificação da OLM em comprimidos revestidos por CLAE e MECC e verificar a intercambialidade dos mesmos, através de análise estatística;
- Desenvolver e validar ensaio de dissolução *in vitro* para os comprimidos revestidos, utilizando as características físico-químicas da OLM, por espectrofotometria na região do UV e CLAE. Testar o método em duas diferentes formulações (Benicar[®] e Olmetec[®]), utilizando o método modelo independente (f_1 e f_2) e eficiência de dissolução (%ED), para caracterizar seus perfis de dissolução. Determinar, ainda, a cinética de dissolução através da aplicação de métodos modelo dependentes, assim como o tempo de meia-vida de dissolução ($t_{50\%}$) e tempo necessário para liberação de uma quantidade de fármaco $\geq 80\%$ da dose ($t_{80\%}$);
- Investigar o comportamento cristalino da OLM SQR através da aplicação de técnicas como espectrofotometria por reflexão difusa no IV com transformada

de Fourier (ATR-FTIR), DSC, termogravimetria (TGA), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e difratometria de raio-X de pó (XRPD).

3.1. ASPECTOS GERAIS

3.1.1. Hipertensão arterial sistêmica (HAS)

A pressão sanguínea é o resultado da multiplicação do débito cardíaco pela resistência vascular periférica. O diâmetro dos vasos afeta acentuadamente o fluxo sanguíneo. Quando há uma diminuição do diâmetro, a resistência e a pressão aumentam; no entanto quando há um aumento de calibre do vaso, ocorre uma diminuição da resistência vascular e, conseqüentemente, a pressão baixa. Portanto, a hipertensão é o resultado de um complexo desequilíbrio nos sistemas responsáveis pela manutenção não só do fluxo e volume sanguíneos satisfatório, bem como do tônus muscular (MAHAN e ESCOTT-ESTUMP, 2002).

A HAS é uma doença não-transmissível multifatorial, na qual diferentes mecanismos estão implícitos, levando ao aumento do débito cardíaco e da resistência vascular periférica (KUSCHNIR e MENDONÇA, 2007). Esta enfermidade compromete órgãos nobres do organismo sendo, portanto, considerada um grande problema de saúde pública e o mais importante fator de risco para as doenças cardiovasculares, como a doença vascular de extremidades e as insuficiências cardíaca e renal crônicas (CASTRO; MONCAU e MARCOPITO, 2007).

3.1.2. Fatores de risco

Os fatores que contribuem para o desenvolvimento da HAS podem ser genéticos e ambientais como: a obesidade (principalmente a central), consumo excessivo de álcool, fumo, sal e estresse (LESSA *et al.*, 2006). Além disso, a baixa estatura e peso ao nascer, sedentarismo, diabetes *mellitus*, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, baixo consumo de potássio e cálcio, histórico familiar e baixo nível sócio-econômico também são considerados fatores de risco (LESSA *et al.*, 2006; NEDER e BORGES, 2006; ZELLER *et al.*, 2007).

3.1.3 Tratamento

O objetivo do tratamento da HAS, em pacientes hipertensos, é reduzi-la e mantê-la em níveis inferiores a 140/90 mmHg (SHILS *et al.*, 2003; PERROTTI *et al.*, 2007). Desse modo, o controle da mesma ocorre normalmente através da forma medicamentosa e não medicamentosa, sendo comum a associação de ambas.

O tratamento não medicamentoso, que inclui as alterações do estilo de vida como abandono do tabagismo, controle do peso, redução do consumo de bebidas alcoólicas, exercício físico e redução da ingestão de sal, tem sido recomendado para o controle da pressão arterial e outras doenças crônicas (GRAVINA; GRESPAN e BORGES, 2007). Alguns autores, entretanto, questionam a eficácia das intervenções educativas na mudança do estilo de vida e, muitas vezes, preferem que o tratamento do paciente portador de HAS seja conduzido através da administração de medicamentos anti-hipertensivos.

Para Perrotti e colaboradores (2007), o tratamento farmacológico deve ser iniciado com doses baixas seguido de um aumento gradual da mesma, conforme a resposta à terapêutica. Normalmente, os fármacos mais utilizados no controle da HAS são os diuréticos, bloqueadores dos canais de cálcio (BCC), bloqueadores adrenérgicos, inibidores da enzima conversora de angiotensina I (IECA) e bloqueadores dos receptores AT₁ da angiotensina II (BRA) (MAHAN e ESCOTT-STUMP, 2002; BRAUNWALD, 1998).

Os diuréticos estão relacionados com a diminuição do volume extracelular, com isso há uma redução na resistência vascular periférica; os BCC proporcionam a redução da resistência vascular periférica através da diminuição da concentração de cálcio nas células musculares lisas vasculares; os α -bloqueadores apresentam efeito hipotensor discreto, portanto devem ser associados a outros anti-hipertensivos, pois podem induzir o surgimento de tolerância medicamentosa; os IECA inibem o SRA diminuindo as complicações cardiovasculares em pacientes de alto risco; e finalmente os BRA, classe a qual pertence a OLM, atuam através do bloqueio específico dos receptores da AT₁ da angiotensina II (V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2006).

A combinação de fármacos é freqüentemente utilizada, já que a monoterapia inicial é eficaz em apenas 40 a 50% dos casos (IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2002). As associações mais comuns são entre os diuréticos com outras classes de fármacos anti-hipertensivos e entre os BCC com β -bloqueadores, IECA ou BRA (V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2006).

3.1.4 Bloqueadores dos receptores AT₁ da angiotensina II (BRA)

No ano de 1970, desenvolveram-se peptídeos análogos à angiotensina II, que foram os primeiros bloqueadores dos receptores AT₁ deste hormônio (BRA). Estes primeiros compostos, como a salarazina, eram considerados potentes antagonistas, mas não tiveram aceitação clínica, por serem ativos apenas por via intravenosa e apresentarem atividade antagonista parcial (CARVALHO *et al.*, 2005).

Em 1982 foi descrita pela primeira vez uma série de derivados imidazólicos, não peptídicos, com comprovadas propriedades antagonistas sobre a angiotensina II. Contudo, resultados terapêuticos negativos iniciais com uma destas moléculas interrompeu seu processo de desenvolvimento. No entanto, estes vieram a ser a base do futuro desenvolvimento da losartana, o primeiro protótipo bifeniltetrazólico, não peptídico, disponível por via oral, capaz de inibir eficaz e seletivamente os receptores da angiotensina II. Sua descoberta levou ao desenvolvimento de outros compostos desta nova classe, denominada de BRA, dos quais já foram introduzidos no mercado a própria losartana, a irbesartana, a candesartana cilexetila, a tasosartana, a valsartana, a eprosartana e a telmisartana (SILVA, 1999).

Os BRA (Figura 3.1), no geral possuem biodisponibilidade oral baixa (< 50%), exceto o irbesartan (70%) e ligação às proteínas plasmáticas alta (> 90%). Grande parte destes fármacos é metabolizado pelo fígado e, por isso, deve-se ter cautela em pacientes com alteração da função hepática, especialmente para telmisartana. Na insuficiência renal crônica de leve à moderada, não há razão para ajustes de dose, entretanto, na insuficiência renal terminal, esses agentes devem ser utilizados com cuidado. Fatores como idade, etnia e sexo também parecem não interferir na eficácia desses medicamentos (CARVALHO *et al.*, 2005).

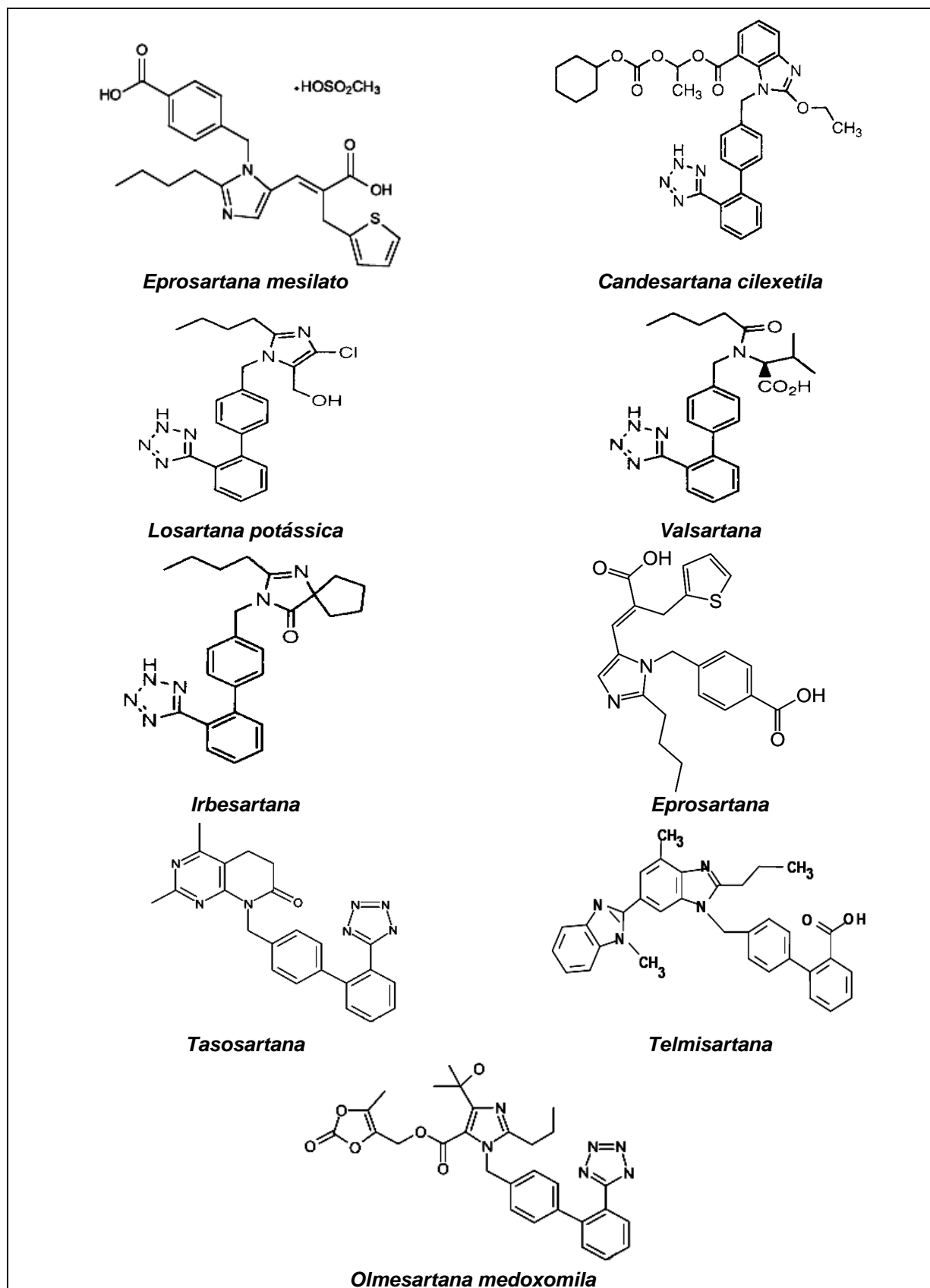


Figura 3.1 - Estrutura química dos fármacos da classe dos bloqueadores dos receptores AT₁ da angiotensina II (Fonte: KOIKE *et al.*, 2003).

Estes anti-hipertensivos são 10.000 vezes mais seletivos aos receptores AT₁ que aos AT₂, com a seguinte ordem de afinidade: candesartana > irbesartana > telmisartana = valsartana = EXP 3174 (metabólito ativo da losartana) > losartana. Os BRA inibem de maneira potente e seletiva a maioria dos efeitos da angiotensina II, entre eles: contração do músculo liso vascular; resposta pressora rápida e lenta; sede; liberação de vasopressina; secreção de aldosterona; liberação de catecolaminas adrenais; aumento da neurotransmissão noradrenérgica; aumento do tônus simpático; mudanças na função renal; hiperplasia e hipertrofia celular. Outro fator importante é o significativo aumento na atividade da renina, angiotensina I e II, observadas após o bloqueio do receptor AT₁. Admite-se que, durante o bloqueio, a angiotensina II estimule os receptores AT₂, contrabalançando os efeitos do AT₁ (CARVALHO *et al.*, 2005).

Durante os últimos seis anos, a classe dos BRA apresentou considerável expansão. A OLM, aprovada pelo FDA (Food and Drugs Administration) em abril de 2002 (NORWOOD *et al.*, 2002), é a mais nova integrante desse grupo. Seu efeito antagonista é considerado equipotente à candesartana e irbesartana, porém mais potente se comparado à losartana e valsartana (KOIKE *et al.*, 2003).

3.1.4.1 Mecanismo de ação

A angiotensina II, principal hormônio efetor do SRA, realiza importante papel na regulação do sistema cardiovascular influenciando o tônus muscular, o volume de líquidos e seu balanço eletrolítico. Sua formação ocorre através de uma cascata que começa com a produção de angiotensinogênio, uma α_2 -globulina sintetizada pelo fígado. Este é clivado nos rins por uma enzima renal, a renina, a um decapeptídeo inativo, a angiotensina I, a qual é ativada enzimaticamente à angiotensina II, principal hormônio efetor do SRA. A angiotensina II apresenta dois subtipos de receptores denominados de AT₁ e AT₂ (Figura 3.2). No entanto, a maioria das atividades fisiológicas, que contribuem para o desenvolvimento da hipertensão, como vasoconstrição, secreção de aldosterona, ativação simpática e reabsorção de sódio são atribuídas ao subtipo AT₁ (NUSSBERGER e KOIKE, 2004).

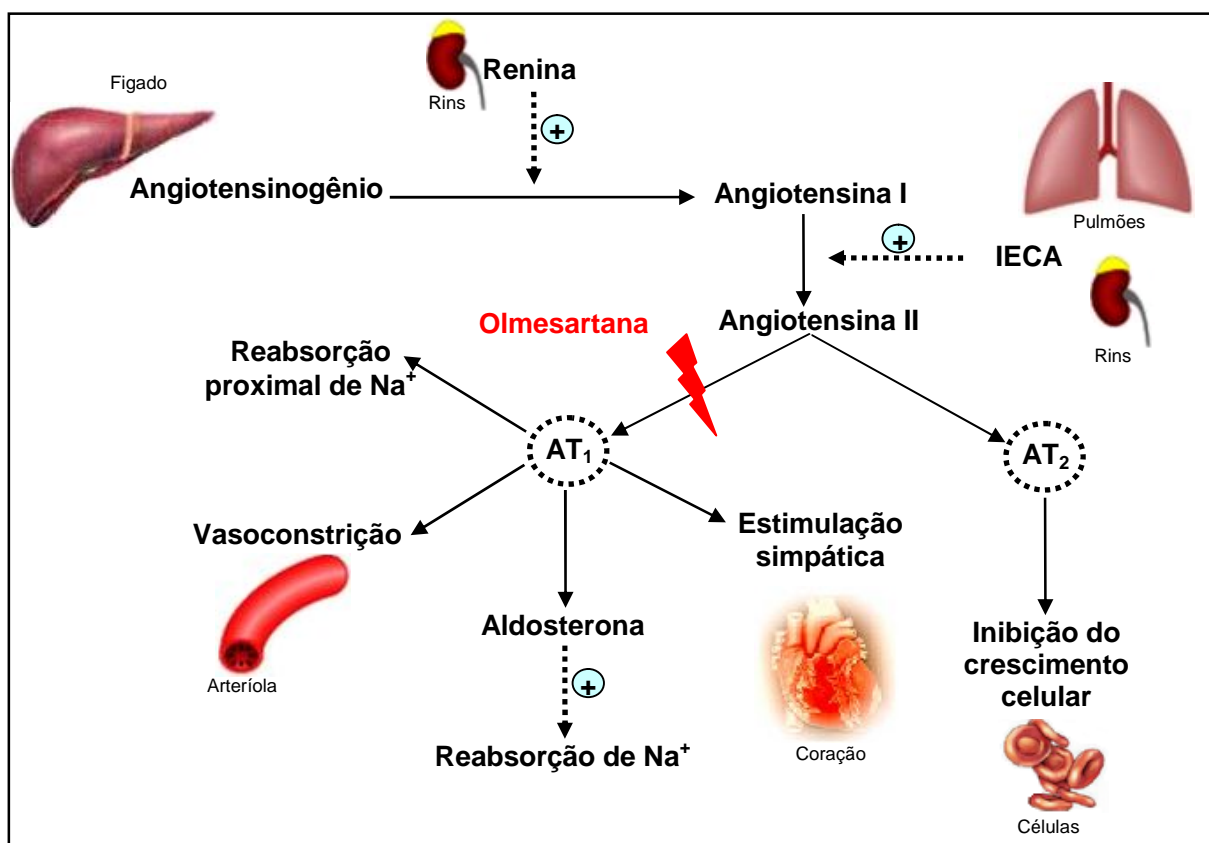


Figura 3.2 – Sistema renina-angiotensina adaptado de BROUSIL e BURKE, 2003. IECA: enzima conversora da angiotensina I, AT₁: angiotensina I; AT₂: angiotensina II.

Sendo assim, a OLM e os demais fármacos desta classe bloqueiam de modo seletivo os receptores AT₁ da angiotensina II da musculatura vascular lisa, impedindo seu efeito vasoconstritor reduzindo, desse modo, a pressão arterial (NUSSBERGER e KOIKE, 2004).

3.1.4.2 Descrição

- **Nome químico:** (5-metil-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il)metil-4-(1-hidróxi-1-metiletil) 2-propil-1-[[2'-(1H-tetrazol-5-il)-1,1-bifenil-4-il]metil]-1H-imidazol-5-carboxilato;
- **Sigla:** CS-866, OLM;
- **Fórmula molecular:** C₂₉H₃₀N₆O₆;
- **Peso molecular:** 558,59;
- **Descrição:** pó ou cristal branco a levemente amarelado;
- **Solubilidade:** insolúvel em água e pouco solúvel em metanol; alta solubilidade em soluções ácidas e alcalinas fracas, baixa solubilidade em soluções com pH entre 4,0 e 6,0;
- **pKa:** 4,3;

- **pH:** 7,8 em solução aquosa a 20°C;
- **Ponto de fusão:** 177,6 °C;
- **Formas de apresentação:** comprimidos revestidos;
- **Dosagens:** 2,5; 5; 10; 20; 40 e 80 mg;
- **Nomes comerciais:** Benicar® (Sankyo Pharma), Olmetec® (Pfizer), Openvas® (Pfizer);
- **Associações:** encontra-se em associação com a hidroclorotiazida e com o anlodipino, com os nomes comerciais de BenicarHCT® (20 mg/12,5 mg, 40 mg/12,5 mg e 40 mg/25 mg) e BenicarAnlo® (20 mg/5 mg, 40 mg/5 mg e 40 mg/10 mg), ambos produzidos pelo laboratório SankyoPharma.

3.1.4.3 Características químicas

A OLM (Figura 3.3) pertence à classe dos derivados imidazólicos, também denominada de BRA, sendo caracterizada pela presença dos grupamentos tetrazolbifenila, propila, hidroxialquila e éster, nas posições 1, 2, 4 e 5 do radical imidazolil, respectivamente. Estudos sobre a atividade estrutural destes compostos mostram que o substituinte bifenila, na posição 1, e o grupo alquila linear, na posição 2, apresentam forte afinidade à porção hidrofóbica dos receptores da angiotensina II. O substituinte tetrazolil, do grupamento bifenila, assim como a hidroxila e carboxila do anel imidazolil, conferem adicionais propriedades antagonistas a esta molécula (SONG e WHITE, 2001; MIURA *et al.*, 2006).

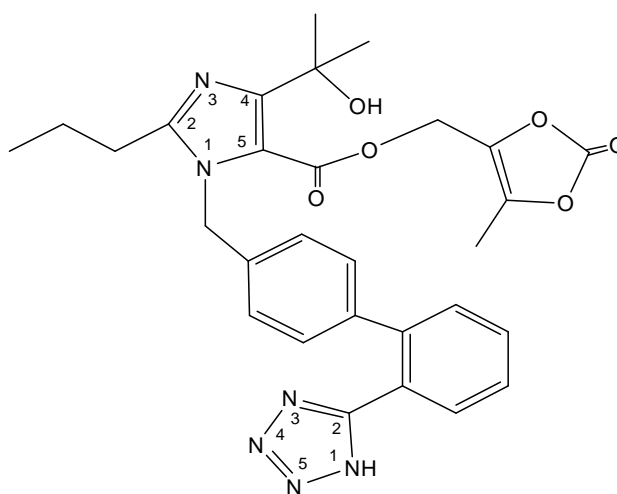


Figura 3.3 - Estrutura química da olmesartana medoxomila.

Esta molécula é caracterizada como base fraca e apresenta apenas um valor de pKa (4,3). Sua estrutura química possui seis átomos de nitrogênio, no entanto apenas um apresenta característica básica. Os nitrogênios 1 e 3 do anel imidazólico e 3, 4 e 5 do anel tetrazólico são neutros, em virtude de seus pares de elétrons contribuírem para ressonância destes anéis. Sendo assim, é provável que o nitrogênio 1 do anel tetrazólico seja o responsável pela basicidade da molécula (KOIKE *et al.*, 2003).

3.1.4.4 Características farmacocinéticas

A baixa biodisponibilidade da OL resultou na esterificação da carboxila de sua molécula, transformando-a no pró-fármaco OLM. Após administração oral, é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal e convertida durante a absorção, por esterases presentes na parede do intestino, no sangue e no fígado, a sua forma ativa, OL, a qual é subsequente excretada de forma inalterada pelas fezes (acima de 89%) e urina (10-16%). Sua biodisponibilidade oral é de 29% e a taxa de ligação às proteínas plasmáticas é de 99%. Atinge concentração máxima em 2 horas e meia-vida de eliminação entre 10 a 15 horas (LAEIS *et al.*, 2001, BRUNNER, 2002; BROUSIL e BURKE, 2003).

Este anti-hipertensivo apresenta pouca afinidade pelo citocromo P450, motivo pelo qual possui baixa interação com fármacos metabolizados pelas enzimas hepáticas. Sua farmacocinética não é alterada pela administração concomitante de digoxina, varfarina, anti-ácidos (hidróxidos de alumínio e magnésio) ou alimentos (NORWOOD *et al.*, 2002; BROUSIL e BURKE, 2003).

3.1.4.5 Indicações e eficácia

A OLM é indicada para o tratamento da HAS, nefropatia diabéticas, pós-infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca e acidente vascular cerebral, tanto na forma isolada, quanto associada à hidroclorotiazida e anlodipina (NORWOOD *et al.*, 2002; WEHLING, 2004; NUSSBERGER e KOIKE, 2004).

A dose usual recomendada é de 20 mg ao dia, no entanto, se a resposta for inadequada, esta pode ser aumentada para 40 mg, sendo que acima desta concentração não foram observados aumentos significativos na redução da pressão sanguínea (NORWOOD *et al.*, 2002). No Brasil, encontra-se indisponível para comercialização dosagem de 80 mg deste fármaco.

Em pacientes com insuficiência renal severa ou insuficiência hepática moderada, recomenda-se que o início do tratamento seja conduzido através de doses reduzidas com subsequente aumento para, no máximo, 20 mg diárias. Não é necessário ajustar a dose para pacientes com doença hepática leve ou insuficiência renal moderada (BROUSIL e BURKE, 2003).

Este anti-hipertensivo apresenta rápido início de ação, com significativa redução da pressão sanguínea após 3 semanas do início do tratamento e excelente perfil de segurança, podendo ser tolerado pelo organismo por pelo menos 2 anos (SONG e WHITE, 2001; BRUNNER, 2004).

Estudos realizados em modelos animais comprovaram a eficácia deste fármaco contra a aterosclerose, distúrbios hepáticos e nefropatias causadas pela diabetes *mellitus* (NAKAMURA *et al.*, 2005).

De acordo com Norwood e colaboradores (2002) a OLM é considerada mais eficaz que o atenolol, captopril, losartana, valsartana e irbesartana na redução da pressão arterial sistólica e diastólica. A administração combinada deste fármaco, tanto com a hidroclorotiazida, quanto com o anlodipino revelou efeito hipotensor mais satisfatório que seu uso isolado (KOIKE *et al.*, 2003; GOMES *et al.*, 2008).

3.1.4.6 Efeitos adversos

Os efeitos colaterais mais freqüentes são dores de cabeça, infecções do trato respiratório, edema facial e o mais comum deles, a tontura. Este fármaco é contra-indicado no primeiro trimestre da gravidez, uma vez que pode causar danos ao feto (SONG e WHITE, 2001; NORWOOD *et al.*, 2002).

3.2. REFERÊNCIAS

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Lista de Denominação Comum Brasileira (DCB) 2005, atualizada pela RDC nº 16. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 31 de janeiro de 2006.

BRAUNWALD, E. **Atlas de doença cardiovascular**. Porto Alegre: ArtMed, 1998.

BROUSIL, J. A.; BURKE, J. M. Olmesartan Medoxomil: An Angiotensin II-Receptor Blocker. **Clinical Therapeutics**, v. 22 (4), 2003.

BRUNNER H.R. The new oral angiotensin II antagonist olmesartan medoxomil: a concise overview. **Journal of Human Hypertension**, v. 16 (2), p. S13-S16, 2002.

CARVALHO, M. H.C.; COLAÇO, A. L.; SILVA, SALGADO, M. C. O. Aspectos farmacológicos dos inibidores da ECA e dos receptores de angiotensina II. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 12 (2), p. 97-102, 2005.

CASTRO, R. A. A.; MONCAU, J. E. C.; MARCOPITO, L. F. Prevalência de hipertensão arterial sistêmica na cidade de Formiga, MG. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 88 (3), p. 18-23, 2007.

EYE, G. V. Hipertensão. **ABC da Saúde**, p. 244-245, 2005.

GOMES, M. A. M.; FEITOSA, A. D. M.; OIGMAN, W.; RIBEIRO, J. M.; MORIGUCHI, E. H.; SARAIVA, J. F. K.; PRÉCOMA, D. B.; RIBEIRO, A. B.; AMODEO, C.; BRANDÃO, A. A. Tratamento da Hipertensão Arterial com Olmesartana Medoxomila em Escalonamento. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 91 (3), p. 185-193, 2008.

GRAVINA, C. F.; GRESPAN, S. M.; BORGES, J. L. Tratamento não-medicamentoso da hipertensão no idoso. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 14 (1), p. 33-36, 2007.

IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 9 (4), p. 387-397, 2002.

IV Conselho Brasileiro de Hipertensão Arterial. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 82, p. 1-14, 2004.

KEARNEY, P. M.; WHELTON, M.; REYNOLDS, K.; MUNTNER, P.; WHELTON, P. K.; HE, J. **Global burden of hypertension: analysis of worldwide data**. *Lancet*, v. 365 (9455), p. 217-223, 2005.

KOBAYASHI, N.; FUJIMORI, I.; WATANABE, M.; IKEDA, T. Real-Time Monitoring of Metabolic Reactions by Microdialysis in Combination with Tandem Mass Spectrometry: Hydrolysis of CS-866 in Vitro in Human and Rat Plasma, Livers, and Small Intestines. **Analytical Biochemistry**, v. 287, p. 272 -278, 2000.

KOIKE, H.; KONSE, T.; SADA, T.; IKEDA, T.; HYOGO, A.; HINMAN, D.; SAITO, H.; YANAGISAWA, H. Olmesartan Medoxomil, a Novel Potent Angiotensin II Bloker. **Annual Report Sankyo Research Laboratory**, v. 55, p. 1-19, 2003.

KUSCHNIR, M. C. C.; MENDONÇA, G. A. S. Fatores de risco associados a hipertensão arterial em adolescentes. **Jornal de Pediatria**, v. 83 (4), p. 17-23, 2007.

LAEIS, P.; PUCHLER, K.; KIRCH, W. The pharmacokinetic and metabolic profile of olmesartan medoxomil limits the risk of clinically relevant drug interaction. **Journal of Hypertension**, v.19 (1), p. S 21-32, 2001.

LESSA, I.; MAGALHÃES, L.; ARAÚJO, M. J.; ALMEIDA F. N.; AQUINO, E.; OLIVEIRA, M. M. C. Hipertensão Arterial na População Adulta de Salvador (BA) - Brasil. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.87 (6), p. 747-756, 2006.

LUI, D.; HU, P.; MATSUSHIMA, N.; LI, X.; LI, L.; JIANG, J. Quantitative determination of olmesartan in human plasma and urine by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Science**. v. 856 (1-2), p. 190-197, 2007.

MA, S.; ANRAKU, M.; IWAO, Y.; YAMASAKI, K.; KRAGH-HANSEN, U.; YAMAOTSU, N.; SHUICHI, H.; IKEDA, T.; OTAGIRI, M. Hydrolysis of angiotensin II receptor blocker prodrug olmesartan medoxomil by human albumin and identification of its catalytic active sites. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 33 (12), p. 1911-1919, 2005.

MAHAN, L. K.; ESCOTT-ESTUMP, S. E. **Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**. 10 ed. São Paulo: Roca, 2002.

MEHULKUMAR, P.; RAMESH, V.; VINAY KUMAR, V.; SRINIVAS, R.; PRAKASH, V. D. Simultaneous Spectroscopic Estimation of Amlodipine Besylate and Olmesartan Medoximil in Tablet Dosage Form. **Asian Journal of Research Chemistry**, v. 2(2), p. 127-130, 2009.

MIURA, S.; FUJINO, M.; HANZAWA, H.; KIYA, Y.; IMAIZUMI, S.; MATSUO, Y.; TOMITA, S.; UEHARA, Y.; KARNIK, S. S.; YANAGISAWA, H.; KOIKE, H.; KOMURO, I.; SAKU, K. Molecular mechanism underlying inverse antagonist of angiotensin II type 1 receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281 (81), p. 19288-19295, 2006.

MUNTWYLER, J.; FOLLATH, F. Calcium channel blocker in treatment of hypertension. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 44 (3), p. 207-216, 2001.

MURAKAMI T, KONNO H, FUKUTSU N, ONODERA M, KAWASAKI T, KUSU F. Identification of a degradation product in stressed tablets of olmesartan medoxomil by the complementary use of HPLC hyphenated techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 47, p. 553-559, 2008.

NAJMA, S.; SAEED, A. M.; SHAHID, A. S.; SHAHNAWAZ, S. Simultaneous determination of olmesartan medoxomil and irbesartan and hydrochlorothiazide in pharmaceutical formulations and human serum using high performance liquid chromatography. **Chinese Journal of Chromatography**. v. 26 (5), p. 544-549, 2008.

NAKAMURA, H.; INOUE, T.; ARAKAWA, N.; SHIMUZI, Y.; YOSHIGAE, Y.; FUJIMORI, I.; SHIMAKAWA, E.; TOYOSHI, T.; YOKOYAMA, T. Pharmacological and pharmacokinetic study in animal diabetic retinopathy models. **European Journal of Pharmacology**. v. 512, p. 239-46, 2005.

NEDER, M. M.; BORGES, A. A. N. Hipertensão arterial sistêmica no Brasil: o que avançamos no conhecimento de sua epidemiologia? **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.13 (2), p.126-133, 2006.

NORWOOD, D.; BRANCH, E.; SMITH, B.; HONEYWELL, M. Olmesartan medoxomil for hypertension: A clinical review. **P & T**, v. 27 (12), p. 611-17, 2002.

NUSSBERGER, J.; KOIKE, H. Antagonizing the Angiotensin II Subtype I Receptor: A Focus on Olmesartan Medoxomil. **Clinical Therapeutics**, v. 26 (A), 2004.

PERROTTI, T. C; CAMPOS, F. J.; UEHARA, C. A.; ALMADA, F. C. M.; MIRANDA, R. D. Tratamento farmacológico da hipertensão no idoso. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.14 (1), p. 37-41, 2007.

RANE, V. P.; PATIL, K. R.; SANGSHETTI, J. N.; YEOLE, R. D.; SHINDE, D. B. Validated Stability Indicating LC-DAD Method for determination of Olmesartan medoxomil in Tablets Exposed to Stress Conditions. **Chromatographia**, v. 69, p. 169-173, 2009.

SAGIRLI, O.; ONAL, A.; TOKER, S. E.; SENSOY, D. Simultaneous HPLC analysis of olmesartan and hydrochlorothiazide in combined tablets and in vitro dissolution studies. **Chromatographia**, v. 66, p. 213-218, 2007.

SHILS, M. E.; OLSON, J. A.; MOSHE, S.; ROSS, A. C. **Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença**. 9ª ed. São Paulo: Manole, v. 2 (76), p. 1299-1307, 2003.

SILVA, P. M. Perfil farmacológico e clínico dos Antagonistas da Angiotensina II. O porquê do seu desenvolvimento. **Revista da Faculdade de Medicina de Lisboa**, v. 4 (4), p. 7-24, 1999.

SONG, J.; WHITE, M. Olmesartan Medoxomil. **Formulary**, v. 36, p. 487-99, 2001.

VAIDYA, V. V.; ROY S. M. N.; YETAL, S. M.; JOSHI, S. S.; PAREKH, S. A. LC-MS-MS determination of olmesartan in human plasma. **Chromatographia**, v. 67, p. 147-150, 2008.

V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. Tratamento medicamentoso. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.13 (4), p. 256-312, 2006.

WEHLING, M. Can the pharmacokinetic characteristics of olmesartan medoxomil contribute to the improvement of blood pressure control? **Clinical Therapeutics**, v.26 (A), p. A21-27, 2004.

ZELLER, C. B.; NAIA, E.; REIS, H.; ARAMAYO, J.; RITT, L. E.; FRANÇA, M.; GONZAGA, C. C.; SOUSA, M. G.; PASSARELLI JR. O.; BORELLI, F. A. O.; AMODEO, C. Hipertensão arterial e órgão-alvo. A importância do tratamento. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.14 (1), p. 60-62, 2007.

4. CAPITULO I - Análise qualitativa da olmesartana medoxomila SQR e comprimidos revestidos

4.1 INTRODUÇÃO

A pureza das substâncias de referência é de fundamental importância para a validação de métodos analíticos. De acordo com o FDA, existem duas categorias de substâncias de referência: compendiais e não-compendiais. As substâncias de referência compendiais são aquelas adquiridas comercialmente de fontes como a USP (United States Pharmacopoeia) e não necessitam de caracterização posterior. As substâncias de referência não-compendiais são aquelas com elevado teor de pureza, entretanto necessitam ser cuidadosamente caracterizadas (SWARTZ e KRULL, 1998).

No controle de qualidade de formas farmacêuticas é necessária a realização de testes de identificação do fármaco, além de sua quantificação. Estes testes são realizados através de métodos instrumentais (espectrofotometria na região do UV e IV, DSC, CLAE, EC) e não instrumentais, como a CCD.

Considerando que a OLM não possui monografia farmacopéica, este estudo teve por objetivo realizar a caracterização da SQR deste fármaco através da determinação da faixa de fusão, por meio da aplicação do método do capilar e DSC, e análise dos espectros de absorção nas regiões do UV, IV e RMN de ^1H e ^{13}C . Realizou-se também a identificação da OLM em comprimidos revestidos mediante a aplicação da CCD, espectrofotometria na região do UV, CLAE e MECC.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA OLM

Utilizou-se como SQR a matéria-prima da OLM, com teor declarado de 99,30%, identificada pelo lote nº 144689-63-4, adquirido da Sequoia Research Products (Inglaterra). Durante o período de estudo foram utilizados comprimidos revestidos da OLM 20 mg, sob o nome comercial de Benicar[®] (Sankyo), lotes: 07032 e 00083/validades: 01/2009 e 03/2012.

4.2.1 Ponto de fusão

A análise do ponto de fusão é considerada uma técnica indicativa da pureza dos compostos, pois várias substâncias apresentam ponto/faixa de fusão característicos e a presença de qualquer impureza altera seu resultado. A simplicidade, rapidez e baixo custo do equipamento são algumas das vantagens da aplicação desta técnica (GIL *et al.*, 2005).

A determinação do ponto de fusão da OLM, através da aplicação do método do capilar, foi realizada em equipamento Mettler Toledo, FP 90. A amostra foi compactada em tubo capilar com diâmetro de 1 mm e 6 cm de comprimento. Aproximadamente 5 mm do capilar foram preenchidos com a amostra. O equipamento foi previamente calibrado com ácido benzóico, cujo ponto de fusão é 122,4 °C. Entre 170 °C e 180 °C o incremento da temperatura foi de 1 °C por minuto. O ensaio foi realizado em triplicata.

Na literatura (KOIKE *et al.*, 2003) o ponto de fusão relatado é 177,6 °C. O valor experimental encontrado foi 181,0 °C (DPR = 0,18%), próximo à faixa de fusão indicada no certificado de análise fornecido pelo laboratório produtor (175 – 180 °C).

4.2.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial (*DSC – differential scanning calorimetry*) é o método de análise térmica que determina as diferenças entre os fluxos de calor da amostra contra uma célula de referência, as quais estão sujeitas a um programa de temperatura controlada. É um método calorimétrico, no qual são medidas diferenças de energia (MOTHÉ e AZEVEDO, 2002).

Esta técnica é, frequentemente, preferida devido à capacidade de fornecer informações detalhadas sobre as propriedades físicas e energéticas de uma substância. A DSC fornece a temperatura de fusão com a exatidão que métodos clássicos, ocasionalmente, não permitem, além de fornecer a entalpia de fusão, indicar a pureza de uma amostra, determinando se esta sofreu alguma degradação,

decomposição ou conversão polimórfica durante o processo de fusão (CLAS *et al.*, 1999).

Considerando que muitos compostos podem cristalizar em mais de uma forma cristalina, a DSC é uma ferramenta útil para identificação dessas espécies, em algumas situações, pelo simples estudo do ponto de fusão. Por outro lado, em muitos casos, esta técnica não é capaz de diferenciar polimorfos do ruído de repetidas medidas, indicando que a ausência de diferença no ponto de fusão não indica necessariamente a ausência de efeitos polimórficos. Nos estudos de polimorfismo a DSC tem sido utilizada como método de apoio na identificação e caracterização destas formas cristalinas (CRAIG, 2006).

Para realizar o ensaio, transferiu-se, individualmente, cerca de 1 a 2 mg da OLM para o porta-amostra de alumínio com capacidade de 4 μ l, o qual foi selado e colocado no forno do calorímetro exploratório de varredura. A velocidade de aquecimento aplicada foi de 10 $^{\circ}$ C/min, dentro de uma faixa de 25 a 300 $^{\circ}$ C, empregando o N₂ como gás de arraste, a uma vazão de 50 ml/min.

As análises foram realizadas em calorímetro exploratório diferencial por fluxo de calor, Shimadzu DSC-60, dotado de controlador de fluxo para gás de purga (N₂) FC-60-A, integrador TA-60WS e software de controle e análise TA-60 versão 2.0, o qual foi previamente calibrado com zinco e índio, adotando como referência o porta-amostra vazio.

A Figura 4.1 representa a curva de aquecimento obtida por DSC para OLM SQR.

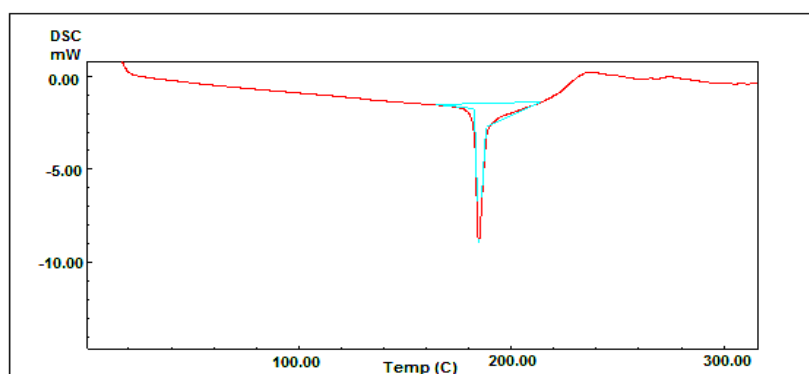


Figura 4.1 - Curva de aquecimento obtida por calorimetria exploratória diferencial para olmesartana medoxomila substância química de referência em atmosfera de nitrogênio e velocidade de aquecimento de 10 $^{\circ}$ C/min.

Observou-se na curva de DSC da OLM, representada pela Figura 4.1, apenas um evento exotérmico, com temperaturas de 182,8 °C (*onset*), 184,7 °C (*peak*) e 187,9 °C (*endset*), correspondente à fusão do fármaco. O calor de fusão envolvido na reação foi de -187,5 J/g, ou seja, seriam necessários 187,5 J para fundir 1 g da amostra.

A temperatura de fusão obtida está próxima do resultado encontrado por Koike *et al.* (2003) (180,90 °C) e com o ponto de fusão determinado pelo método do capilar. Foi observado um evento de degradação do fármaco no termograma, na faixa de fusão entre 220,0–280,0 °C. Sendo assim, a DSC pode ser considerada uma ferramenta adequada para determinar a pureza da OLM, uma vez que os resultados obtidos por esta técnica se equivalem aos encontrados pelo método do capilar.

4.2.3 Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)

A espectrofotometria na região do UV aplica-se à identificação e quantificação de fármacos, apesar de apresentar algumas limitações, pois depende da existência de grupamentos cromóforos na estrutura do composto a ser analisado, o que compromete, também, sua especificidade. Entretanto, apresenta-se como método alternativo de doseamento na ausência de equipamentos mais sofisticados, como o cromatógrafo a líquido de alta eficiência (SKOOG *et al.*, 2002).

Os máximos de absorção na região do UV foram determinados através da diluição da OLM SQR em metanol e acetonitrila, na concentração de 20 µg/ml. Os espectros foram traçados em espectrofotômetro UV/VIS Shimadzu UV-1601 PC. Foram obtidos, também, espectros de absorção molecular do fármaco na região de 200-400 nm, em meio ácido (HCl 0,01M; HCl 0,1M e HCl 1M) e alcalino (NaOH 0,01M; NaOH 0,1M e NaOH 1M). O efeito de diferentes diluentes, tanto no deslocamento, quanto na intensidade da absorção, foi avaliado individualmente para cada solução.

A Figura 4.2 representa o espectro de absorção na região do UV da OLM SQR em metanol e acetonitrila. Observou-se que a OLM apresentou dois máximos

de absorção em metanol (202 nm e 255 nm) e um em acetonitrila (257 nm), os quais podem ser atribuídos às transições eletrônicas dos cromóforos dos anéis tetrazol e bifenil de sua estrutura. Sendo assim, ambos os solventes podem ser utilizados para análise qualitativa deste fármaco.

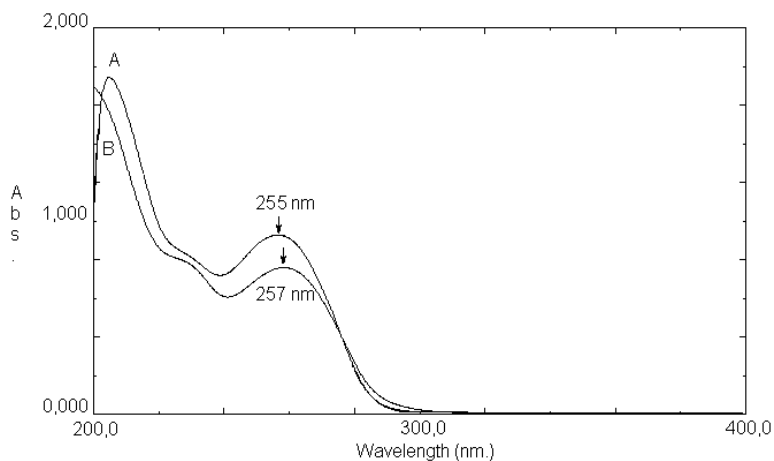


Figura 4.2 - Espectros na região do ultravioleta da olmesartana medoxomila substância química de referência diluídos em metanol (A) e acetonitrila (B), na concentração de 20 $\mu\text{g/ml}$.

A determinação da presença da OLM nos comprimidos revestidos foi realizada utilizando acetonitrila como diluente. Os espectros de absorção na região do UV da SQR e dos comprimidos revestidos da OLM, na concentração de 20 $\mu\text{g/ml}$, encontram-se representados pela Figura 4.3

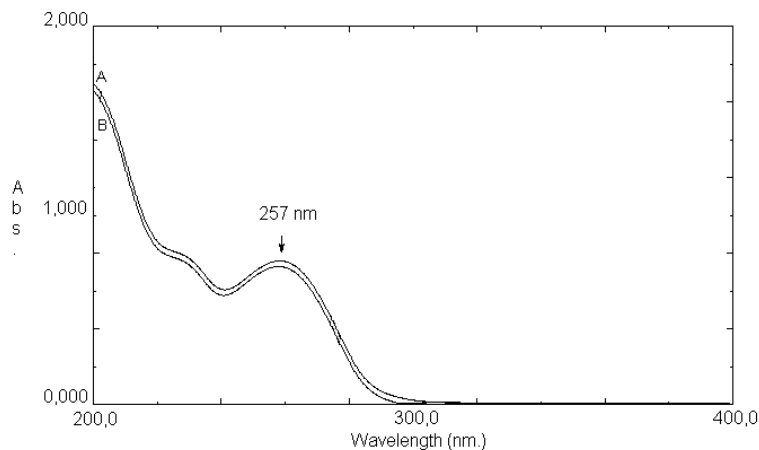


Figura 4.3 - Espectros na região do ultravioleta da olmesartana medoxomila substância química de referência (A) e dos comprimidos revestidos (B), diluídos em acetonitrila, na concentração de 20 $\mu\text{g/ml}$.

De acordo com a análise espectral, pode-se inferir que a identificação da OLM presente nos comprimidos revestidos foi positiva, uma vez que seu espectro foi semelhante ao da OLM SQR.

Os espectros da OLM SQR em NaOH 0,01M, 0,1M e 1M apresentaram efeito hiperacrômico e deslocamento hipsocrômico do seu máximo de absorção em 257 nm, quando comparada com a solução preparada em acetonitrila. Essas alterações espectrais ocorreram, provavelmente em virtude da instabilidade do fármaco em meio alcalino, ou seja, houve o rompimento da ligação éster da OLM.

A Figura 4.4 representa o espectro de absorção na região do UV da OLM SQR em acetonitrila e em NaOH 0,01M, 0,1M e 1 M.

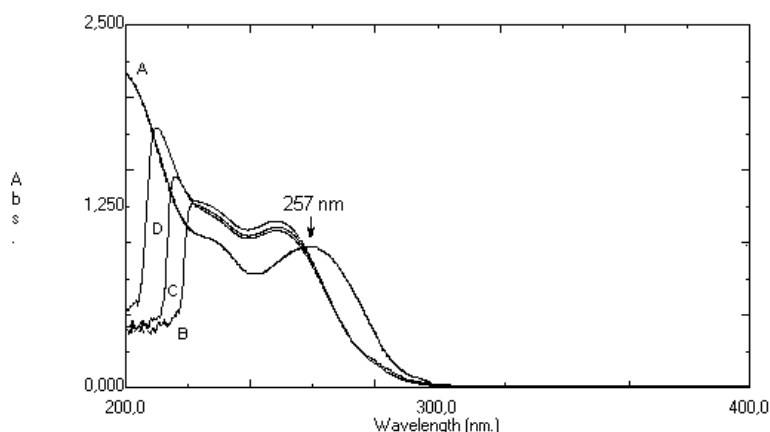


Figura 4.4 - Espectros na região do ultravioleta da olmesartana medoxomila substância química de referência diluídos em acetonitrila (A), NaOH 0,01M (B), NaOH 0,1M (C) e NaOH 1M (D), na concentração de 20 µg/ml.

O espectro da OLM SQR em HCl 0,01M apresentou acentuado efeito hipocrômico, com perda das características do seu perfil espectral em relação à solução do fármaco preparada em acetonitrila. Em HCl 0,1M o espectro do fármaco demonstrou pronunciado deslocamento hipsocrômico de seu máximo de absorção em 257 nm. Houve, também, um discreto efeito hiperacrômico da OLM em HCl 1M. Tais alterações espectrais ocorreram, provavelmente em virtude da instabilidade do fármaco em meio ácido, associado, também, à baixa solubilidade do mesmo no ácido mais diluído.

A Figura 4.5 representa o espectro de absorção na região do UV da OLM SQR em acetonitrila e em HCl 0,01M, 0,1M e 1 M.

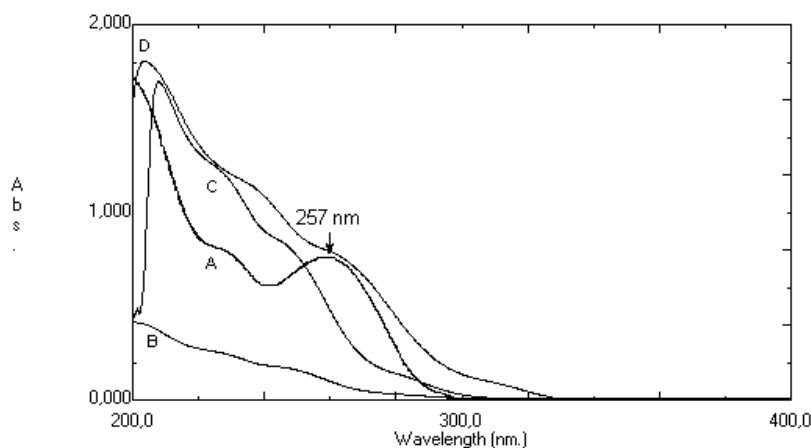


Figura 4.5 - Espectros na região do ultravioleta da olmesartana medoxomila substância química de referência diluídos em acetonitrila (A), HCl 0,01M (B), HCl 0,1M (C) e HCl 1M (D), na concentração de 20 µg/ml.

4.2.4 Espectrofotometria na região do infravermelho (IV)

A radiação no infravermelho (IV) corresponde à parte do espectro eletromagnético situada entre as regiões visível e microondas. Embora o espectro nesta região seja característico da molécula como um todo, certos grupos de átomos dão origem a bandas que ocorrem mais ou menos na mesma frequência, independentemente da estrutura da molécula. É justamente a presença destas bandas características de grupos funcionais que permite, através de um simples exame do espectro e consulta de tabelas, a identificação de estruturas (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

A partir da análise detalhada das bandas de absorção e da comparação com a SQR, é possível obter dados importantes para identificação da substância desejada. Esta técnica permite detectar a presença de impurezas nas amostras, desde que estejam presentes em quantidades significativas. A espectrofotometria na região do IV raramente é utilizada para análise quantitativa em função da complexidade do espectro obtido e da dificuldade de preparação da amostra para fins quantitativos (WATSON, 2005).

A caracterização da OLM SQR por espectrofotometria por ATR-FTIR foi realizada através da leitura direta do pó da OLM SQR pelo equipamento. As análises foram realizadas em espectrofotômetro FTIR, marca Shimadzu, modelo 8001.

Na ausência de um espectro de IV da OLM para fins de comparação, a atribuição das bandas foi efetuada considerando a região de absorção, o formato e a intensidade das mesmas. A Figura 4.6 representa o espectro de IV da OLM SQR e o Quadro 4.1 as atribuições das principais bandas de absorção deste fármaco.

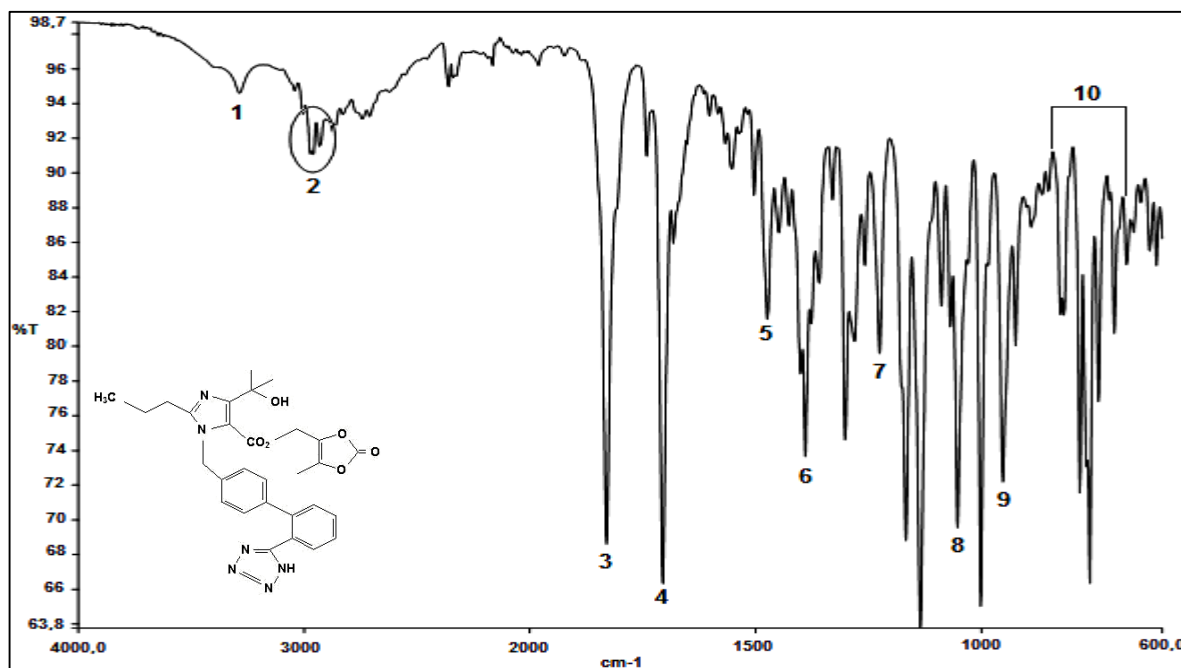


Figura 4.6 - Espectro na região do infravermelho da olmesartana medoxomila substância química de referência.

Quadro 4.1 - Frequências de absorção das principais bandas no espectro de infravermelho da olmesartana medoxomila.

| Banda | Frequência (cm ⁻¹) | Atribuição |
|-------|--------------------------------|---|
| 1 | 3285 | Deformação axial de O – H de grupamentos hidroxila |
| 2 | 2956 | Deformação axial de C – H de metila |
| | 2929 | Deformação axial de C – H de metileno |
| 4 | 1830 | Deformação axial de carbonila de grupamento éster |
| 5 | 1704 | Deformação axial de carbonila de grupamento éster cíclico |
| 6 | 1473 | Deformação angular de C – H de metila |
| 7 | 1388 | Deformação angular de C – H de metileno |
| 8 | 1224 | Deformação axial C – O |
| 9 | 1052 | Deformação axial de C – O de álcool terciário |
| 10 | 952 | Deformação angular no plano de C – H do anel tetrazólico |
| 11 | 824 a 705 | Deformação axial de C – H de anel aromático |

Fontes: NAKANISHI e SOLOMON, 1977; SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000.

4.2.5 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A CCD apresenta-se como uma importante ferramenta, através da qual é possível identificar praticamente qualquer composto. Além disso, é de fácil execução e compreensão, versátil e de baixo custo. Permite identificar o fármaco quando este é cromatografado juntamente com a substância de referência, através da comparação dos fatores de retenção (FR) obtidos. Outra aplicação da CCD diz respeito à sua capacidade de detectar a presença de impurezas e produtos de degradação na amostra (GALAGOVSKY, 2002; WATSON, 2005).

Não se encontra disponível na literatura consultada uma técnica por CCD para identificação da OLM. Sendo assim, foram realizados estudos preliminares com a combinação de alguns solventes orgânicos de grau analítico como: metanol, acetato de etila, hexano e diclorometano em diferentes combinações e proporções, com o intuito de verificar o melhor sistema eluente a ser empregado na análise.

O sistema composto por diclorometano: metanol: trietilamina (8:2:0,5; v/v/v) foi o mais adequado para análise qualitativa da OLM SQR e comprimidos revestidos. A adição da trietilamina ao sistema foi necessária para evitar o arraste das manchas.

O desenvolvimento cromatográfico foi realizado em placas cromatográficas plastificadas de sílica-gel 60 F₂₅₄ MN (Macherey-Nagel®) com 12 cm de comprimento, 4 cm de largura e 0,20 mm de espessura de camada adsorvente. As soluções da SQR e dos comprimidos da OLM, assim como da losartana potássica SQR (Galena®), anti-hipertensivo da mesma classe da OLM, utilizada para verificar a seletividade do método, foram preparadas em metanol e acetonitrila, na concentração de 2 mg/ml. As análises foram realizadas em triplicata. A revelação foi efetuada com lâmpada de UV em 254 nm.

A Figura 4.7 representa o cromatograma obtido na condição acima descrita. A semelhança das manchas e dos valores de FR obtidos ($FR_{SQR} = FR_{Cpr} = 0,77$) indicam a presença da OLM nos comprimidos. O FR obtido para a losartana potássica SQR ($FR = 0,69$) comprovou a seletividade do método, mostrando a diferenciação entre os valores.

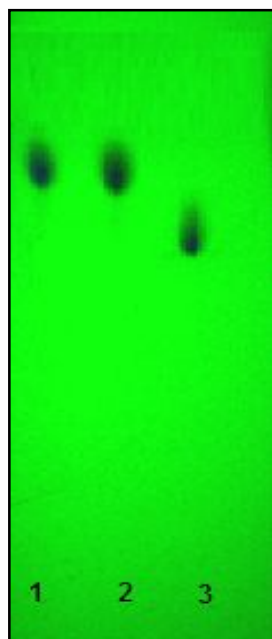


Figura 4.7 - Perfil cromatográfico da olmesartana medoxomila substância química de referência (1), olmesartana medoxomila comprimidos revestidos (2) e losartana potássica substância química de referência (3), diluídos em acetonitrila. Fase móvel: diclorometano: metanol: trietilamina (8:2:0,5; v/v/v). Detecção: luz UV 254 nm.

4.2.6 Cromatografia a líquido da alta eficiência (CLAE)

Apesar de ser um método bastante empregado em análises quantitativas, a CLAE pode ser muito útil também na identificação de fármacos, através da comparação dos tempos de retenção da amostra e da SQR, quando analisados sob as mesmas condições.

As análises de identificação por CLAE foram realizadas através da aplicação do método previamente validado em cromatógrafo a líquido Shimadzu constituído de bomba LC-10AD, detecção de arranjo de diodos (DAD) SPDM-10ADVP, controlador do sistema SLA-10ADVP, degaseificador DGU-14, injetor manual Rheodyne 7725i com alça dosadora de 20 µl. A aquisição e análise dos dados foram efetuadas através do programa CLASS-VP, versão 6.1.

As condições cromatográficas definidas para identificação da OLM por CLAE encontram-se descritas no Quadro 4.2.

Quadro 4.2 - Condições cromatográficas definidas para identificação da OLM por CLAE.

| Parâmetro | Descrição |
|-----------------|--|
| Fase móvel | Água: trietilamina: acetonitrila (60:0,3:40, V/V/V), pH 6,3 ajustado com ácido ortofosfórico 18% |
| Fluxo | 1,2 ml/min |
| Coluna | Phenomenex® C ₁₈ (250 x 4,6 mm, 4 µm) |
| Detecção | Detector de fotodiodos em 257 nm |
| Temperatura | 25 °C |
| Volume injetado | 20 µl |

As condições cromatográficas e o modo de preparo das soluções da OLM SQR e dos comprimidos revestidos (Benicar® 20 mg), na concentração de 20 µg/ml, encontram-se descritas no Capítulo II no artigo intitulado: “*Stability-indicating LC Determination of a New Antihypertensive, Olmesartan Medoxomil in Tablets*”, publicado no periódico internacional *Chromatographia*, v. 68, p. 991-996, 2008.

Os cromatogramas e os espectros, obtidos com detector de arranjo de diodos (DAD), das soluções OLM SQR e dos comprimidos revestidos estão representados na Figura 4.8.

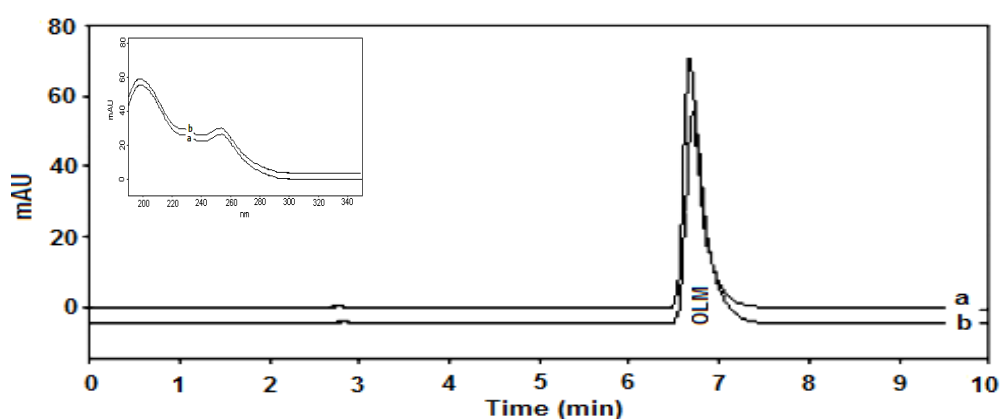


Figura 4.8 - Cromatograma da solução da substância química de referência (a) e dos comprimidos revestidos da olmesartana medoxomila (b), na concentração de 20 µg/ml. Condições cromatográficas: coluna Phenomenex® RP₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5 µm); fase móvel: água: trietilamina: acetonitrila (60:0,3:40 v/v/v) pH 6,3 ajustado com ácido *orto*-fosfórico 18%; vazão: 1,2 mL/ min; volume injetado: 20 µL.

O método por CLAE, por ser um método de separação, fornece elevada seletividade na identificação de componentes de uma amostra, garantindo a identidade de substâncias desde que haja um padrão de referência de identidade conhecida.

A análise do pico principal, tanto da OLM SQR, quanto dos comprimidos revestidos, ambos em aproximadamente em 6,8 min, representado pela Figura 4.8, revelou um percentual de 99,99% de pureza, demonstrando não haver a presença de impurezas. Pôde-se comprovar ainda, que houve uma sobreposição dos perfis dos espectros de absorção deste anti-hipertensivo na forma farmacêutica e SQR, confirmando assim a identidade dos mesmos.

4.2.7 Cromatografia capilar eletrocínética micelar (MECC)

A EC oferece ampla seletividade em combinação com alta eficiência de separação, trabalhando com pequenos volumes de amostra e tempo de análise reduzido, sendo, portanto, uma técnica alternativa e complementar à CLAE (RADHAKRISHNA *et al.*, 2003). Esta técnica é menos sensível se comparada à CLAE, mas tem como vantagens a geração de uma pequena quantidade de resíduos, bem como não requer a utilização de grandes quantidades de solventes orgânicos (CLARKE'S, 2004).

Entre os diferentes métodos eletroforéticos de separação, a MECC é considerada a técnica de escolha para análise de compostos neutros, uma vez que apresenta alto poder de separação e, principalmente, excelente poder de resolução entre compostos de estrutura química semelhante (ALTRIA *et al.*, 1996).

As análises de identificação por MECC foram realizadas em um sistema de eletroforese capilar HP³⁰CE (Agilent Technologies, Santa Clara, USA), equipado com detector de arranjo de fotodiodos em série (DAD). O programa CE ChemStation (V. A 09.01) foi utilizado para controle do sistema, aquisição e tratamento dos dados. As amostras foram injetadas hidrodinamicamente a 50 mBar por 5 s. A voltagem aplicada durante a análise foi de 30 KV, com rampa inicial de 1 KV s

As condições eletroforéticas definidas para identificação de OLM estão apresentadas no Quadro 4.3.

Quadro 4.3 - Condições eletroforéticas definidas para identificação da OLM por MECC.

| Parâmetro | Descrição |
|------------------------|---|
| Capilar | Sílica fundida 40 cm de comprimento (40 cm efetivos, 50 µm de diâmetro interno) |
| Eletrólito | Tampão borato 10mM: 5 mM de lauril sulfato de sódio pH 6,5 (95:5 V/V) |
| Tensão aplicada | 30 kV (corrente aproximada de 6 µA) |
| Detecção | Detector de fotodiodos em 257 nm |
| Injeção | Hidrodinâmica 50 mBar |
| Tempo de injeção | 5 segundos |
| Pré-condicionamento | 1,5 min NaOH 0,1M; 1,5 min água; 2 min eletrólito |
| Temperatura de análise | 25 ± 1 °C |

As condições eletroforéticas e o modo de preparo das soluções da OLM SQR, diclofenaco potássico padrão interno (DICL PI) e dos comprimidos revestidos, na concentração de 50 µg/mL, encontram-se descritas no Capítulo II, no artigo intitulado: *“Stability-indicating Comparative Methods by MEKC and LC for Determination of Olmesartan Medoxomil”*, submetido para publicação no periódico internacional *Journal of AOAC International*.

Os eletroferogramas e os espectros, obtidos com detector de arranjo de diodos em série (DAD), das soluções OLM SQR, DICL PI e dos comprimidos revestidos estão representados pela Figura 4.9.

Assim como por CLAE, a identificação da OLM através da MECC nos comprimidos foi possível pela comparação entre os tempos de migração. A similaridade dos tempos de migração (2,25 minutos para OLM e 2,65 minutos para PI) e dos espectros, obtidos por DAD, permitiram a identificação da OLM nesta forma farmacêutica.

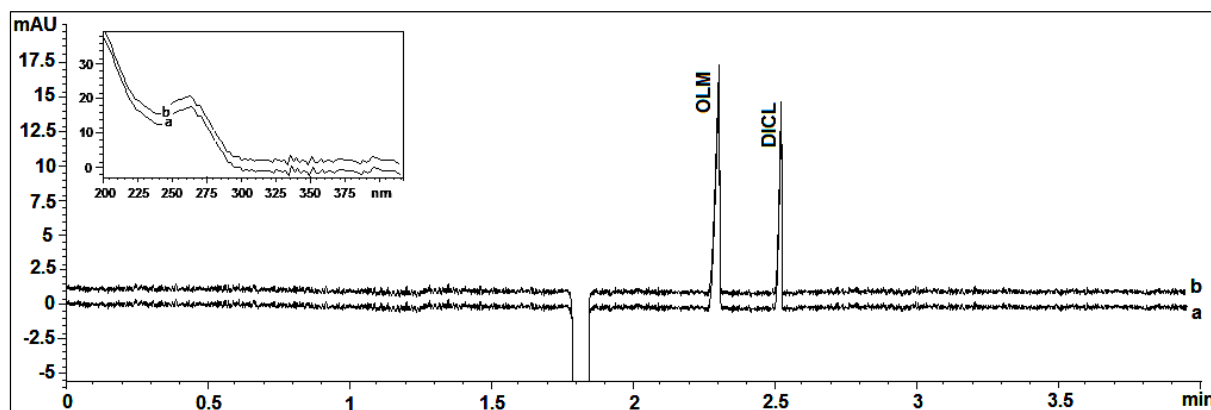


Figura 4.9 - Eletroferogramas das soluções da olmesartana medoxomila substância química de referência e diclofenaco potássico padrão interno (a) e dos comprimidos revestidos da olmesartana medoxomila e diclofenaco potássico padrão interno (b), nas concentrações de 50 µg/mL. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida (40 cm efetivos, 50 µm de diâmetro interno); eletrólito tampão borato 10mM: 5 mM de lauril sulfato de sódio pH 6,5 (95:5 v/v); voltagem 30 kV; detecção UV em 257 nm; temperatura de 25°C.

4.2.8 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Esta técnica é basicamente outra forma de espectroscopia de absorção, assim como as espectrofotometrias de IV e UV. Sob condições apropriadas, quando submetida a um campo magnético, uma amostra pode absorver radiação na região de frequência regida pelas características estruturais da amostra. A absorção é função de determinados núcleos da molécula. Um espectro de RMN é um registro gráfico das frequências dos picos de absorção contra suas intensidades (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C da OLM SQR foram realizados em equipamento Bruker, modelo DPX400 de 100 MHz para hidrogênio e 400 MHz para o carbono, utilizando dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-D6) como solvente. As análises foram realizadas pelo LabRMN, do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Na Tabela 4.1 constam os deslocamentos químicos dos hidrogênios da OLM SQR e na Figura 4.10 o espectro de RMN ^1H do composto. A numeração das posições dos hidrogênios e carbonos foi estabelecida de modo a facilitar sua identificação no espectro, não seguindo, portanto, a nomenclatura química do fármaco.

Tabela 4.1 - Dados dos espectros de RMN ^1H da olmesartana medoxomila substância química de referência, obtidos em espectrômetro BRUKER (100 MHz), utilizando dimetilsulfóxido deuterado como solvente.

| Posição (H) | Deslocamento químico (ppm) | Multiplicidade | Número (H) | Interpretação |
|-------------|----------------------------|----------------|------------|---|
| 1 | 0,854 a 0,817 | t | 3 | CH_3 – cadeia alifática |
| 22 | 1,453 | s | 6 | CH_3 – cadeia alifática ligada ao radical imidazolil |
| 2 | 1,567 a 1,513 | dd | 2 | CH_2 – cadeia alifática |
| 21 | 2,490 | s | 1 | OH – cadeia alifática |
| 28 | 2,058 e 2,040 | s | 3 | CH_3 – radical (2-oxo-1,3-dioxolen-4-ila)metila |
| 3 | 2,600 a 2,562 | t | 2 | CH_2 – cadeia alifática |
| - | - | - | - | DMSO-D6 |
| 24 | 5,024 | s | 2 | CH_2 – radical (2-oxo-1,3-dioxolen-4-ila)metila |
| 7 | 5,395 | s | 2 | CH_2 – entre radical imidazolil e difenila |
| 8 a 13 | 6,830 a 7,026 | 2d | 4 | CH, anel benzênico dissubstituído |
| 14 a 19 | 7,498 a 7,670 | 2m | 4 | CH, anel benzênico dissubstituído |

*s: simpleto; d: duplete; t: tripleto; m: multipeto.

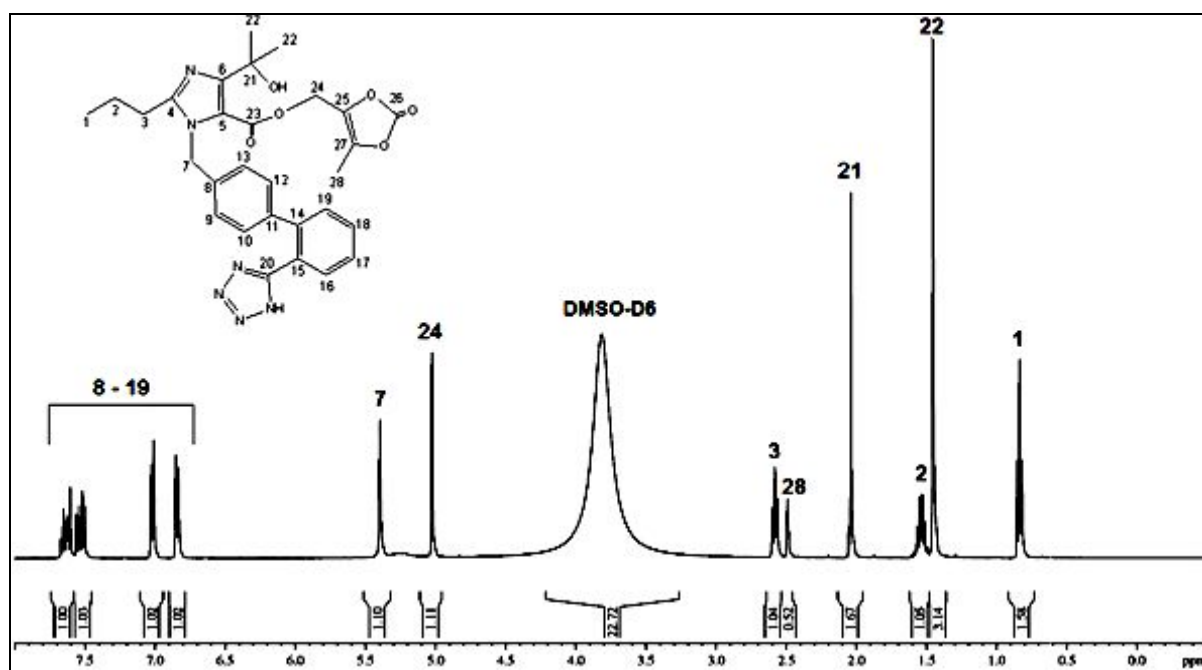


Figura 4.10 – Espectro de RMN ^1H da olmesartana medoxomila substância química de referência obtido em espectrômetro BRUKER (100 MHz), utilizando dimetilsulfóxido deuterado como solvente.

Na Tabela 4.2 constam os deslocamentos químicos dos carbonos da OLM SQR e na Figura 4.11 o espectro de RMN ^{13}C do composto.

Tabela 4.2 - Dados dos espectros de RMN ^{13}C da olmesartana medoxomila substância química de referência, obtidos em espectrômetro BRUKER (400 MHz), utilizando dimetilsulfóxido deuterado como solvente.

| Posição (C) | Deslocamento químico (ppm) | Interpretação |
|-------------|----------------------------|---|
| 1 | 8,88 | CH ₃ – cadeia alifática |
| 28 | 13,74 | CH ₃ – radical (2-oxo-1,3-dioxolen-4-ila)metila |
| 2 | 20,79 | CH ₂ – cadeia alifática |
| 3 | 28,42 | CH ₂ – cadeia alifática |
| 22 | 29,79 | CH ₃ – cadeia alifática ligada ao radical imidazolil |
| - | - | DMSO-D6 |
| 7 | 48,27 | C – entre radical imidazolil e difenila |
| 24 | 54,33 | CH ₂ – radical (2-oxo-1,3-dioxolen-4-ila)metila |
| 21 | 69,89 | C – OH cadeia alifática |
| 27 | 116,46 | C – radical (2-oxo-1,3-dioxolen-4-ila)metila |
| 25 | 123,66 | C – radical (2-oxo-1,3-dioxolen-4-ila)metila |
| 8 a 19 | 125,60 a 141,23 | C – radical bifenila |
| 5 e 6 | 151,33 | C – radical imidazolil |
| 4 | 151,92 | C – radical imidazolil ligado ao radical propila |
| 26 | 155,30 | C – radical (2-oxo-1,3-dioxolen-4-ila)metila |
| 20 | 157,59 | C – radical tetrazolil |
| 23 | 160,91 | C – radical carboxila |

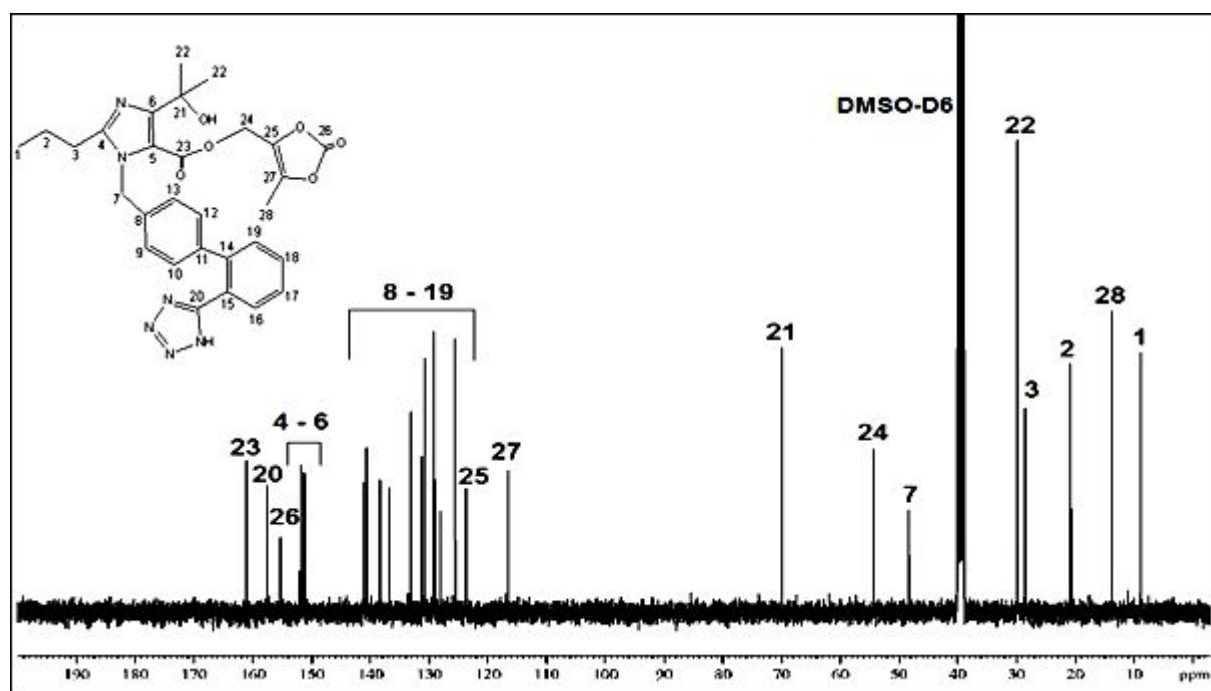


Figura 4.11 – Espectro de RMN ^{13}C da olmesartana medoxomila substância química de referência obtido em espectrômetro BRUKER (400 MHz), utilizando dimetilsulfóxido deuterado como solvente.

4.3 CONCLUSÕES

- O ponto e a faixa de fusão obtidos para OLM SQR, através da aplicação do método do capilar e DSC, respectivamente, foram próximos aos valores disponíveis na literatura (KOIKE *et al.*, 2003). Por DSC, constatou-se ainda que o fármaco apresentou um evento de degradação química, após sua fusão.
- As análises por CCD, espectrofotometria na região do UV, CLAE e MECC permitiram a identificação segura da OLM nos comprimidos revestidos;
- Os espectros obtidos por espectrofotometria na região do IV e espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C demonstraram que os sinais obtidos estão de acordo com as atribuições esperadas para a molécula da OLM;
- Os métodos utilizados para caracterização da OLM SQR mostraram-se adequados e podem ser empregados no controle de qualidade da matéria-prima e dos comprimidos revestidos deste fármaco.

4.4 REFERÊNCIA

ALTRIA, K. D. **Capillary Eletrophoresis Guidebook: Principles, Operation and Aplications. Methods in Molecular Biology.** New Gersey: Humana Press, 1996.

CLARKE`S. **Analysis of Drugs and Poisons in Pharmaceuticals Body Fluids and Postmortem Material.** 3^a ed., v. 1, Londres, 2004.

CLAS, S. D.; DALTON, C. D.; HANDCOCK, B. C. Differential scanning calorimetry: Applications in the drug development. **Pharmaceutical Science Technology Today**, v. 2 (8), p. 311-320, 1999.

CRAIG, D. Q. M. Characterization of polymorphic systems using thermal analysis. In: HILFIKER, R. (Ed.) **Polymorphism in the Pharmaceutical Industry.** Germany:Wiley-VCH, 2006.

GIL, E. S.; ORLANDO, R. M.; MATIAS, R.; SERRANO, S. H. P. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos.** Campo Grande: Editora UNIDERP, 2005.

GALAGOVSKY, L. **Cromatografía de absorción.** In: **Química orgânic, 2^a. Fundamentos teórico-práticos para el laboratorio.** 2^a ed. Buenos Aires: Eudeba, 2002.

KOIKE, H.; KONSE, T.; SADA, T.; IKEDA, T.; HYOGO, A.; HINMAN, D.; SAITO, H.; YANAGISAWA, H. Olmesartan Medoxomil, a Novel Potent Angiotensin II Bloker. **Annual Report Sankyo Research Laboratory**, v. 55, p. 1-19, 2003.

MOTHÉ, C. G.; AZEVEDO, A. D. **Análise Térmica de Materiais.** São Paulo: Editora, 2002.

NAKANISH, K.; SOLOMON, P. H. **Infrared Absorption Spectroscopy.** 2nd ed. San Francisco: Holden-Day, 1977.

RADHAKRISHNA, T.; NARASARAJU, A.; RAMAKRISHNA, M.; SATYANARAYANA, A. Simultaneous determination of montelukast and loratadine by HPLC and derivative spectrophotometric method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 31 (2), p. 359-368, 2003.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Espectroscopia no infravermelho. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000.

SKOOG, D. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, v. 2 (3), p. 12-20, 1998.

WATSON, D. G. **Pharmaceutical Analysis. A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists**. 2ª ed. Edinburgh. Elsevier Churchill Livingstone, 2005.

5.1 INTRODUÇÃO

O controle de qualidade torna-se uma ferramenta imprescindível para a indústria farmacêutica, pois a partir dele pode-se garantir um medicamento seguro e eficaz. A confiabilidade dos resultados desta prática é alcançada através da validação dos métodos analíticos (SETHI, 1999).

No desenvolvimento de métodos analíticos deve-se levar em conta que a escolha da técnica adequada depende não só de fatores como natureza do fármaco, complexidade, pureza e quantidade da amostra, como também do objetivo da análise, ou seja, qualitativa, quantitativa ou semi-quantitativa (AVENDAÑO,1993).

Os métodos analíticos utilizados nas determinações qualitativas e quantitativas, a partir da matéria-prima até as especialidades farmacêuticas, incluindo todas as fases do desenvolvimento do fármaco, desde a pesquisa até o controle de qualidade, devem ser devidamente validados (SWARTZ e KRULL,1998). O objetivo da validação de um método é demonstrar, através de estudos laboratoriais, que o procedimento analítico é adequado para o propósito pretendido (BRASIL, 2003, ICH, 2005; USP 32, 2009). Esse processo fornece evidências documentadas que asseguram a credibilidade do método para o qual é indicado.

Diretrizes referentes à validação de procedimentos analíticos encontram-se disponíveis em algumas guias (BRASIL, 2003; ICH, 2003; ICH Q2 (R1), 2005) e farmacopéias (USP 32, 2009), as quais indicam que entre os principais parâmetros a serem avaliados na validação de um método estão: especificidade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez (SWARTZ e KRULL, 1998).

- *Especificidade*: representa a capacidade do método de avaliar de forma inequívoca a substância em análise na presença de componentes que podem interferir na sua determinação, tais como excipientes, impurezas ou produtos de degradação;

- *Linearidade*: corresponde a capacidade do método de fornecer resultados proporcionais à concentração da substância em estudo, dentro de uma faixa de variação conhecida. Os resultados devem ser analisados por métodos estatísticos apropriados, como, por exemplo, o cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. A curva padrão obtida deve demonstrar o coeficiente de correlação angular (slope) e linear (intercepto) da reta, sendo estabelecida pela análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes;
- *Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)*: o LD representa a menor concentração do fármaco que o processo analítico pode diferenciar, mas não quantificar com precisão sob condições experimentais e o LQ a menor concentração da substância em análise precisamente avaliada pelo método, com exatidão e precisão aceitáveis;
- *Precisão*: corresponde ao grau de concordância entre os resultados de análises individuais, quando o método é aplicado diversas vezes em uma mesma amostra homogênea, em idênticas condições de testes. Pode ser avaliada pelo grau de repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A primeira é determinada através de várias análises, nas mesmas condições, em um curto intervalo de tempo. A precisão intermediária expressa o efeito de variações intra-laboratoriais devido a eventos diferentes como diferentes dias, analistas ou equipamentos. A reprodutibilidade refere-se ao uso do procedimento analítico em diferentes laboratórios, como parte de um estudo colaborativo. É expressa, normalmente, através do desvio padrão relativo (DPR) e pode ser avaliada através de testes estatísticos como o teste F ;
- *Exatidão*: representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência. Pode ser expressa como o percentual de resposta obtido através do ensaio de uma quantidade conhecida da substância em exame incorporada em um meio de composição definida. Este parâmetro deve ser analisado após o estabelecimento da linearidade e da especificidade, podendo ser calculada como a percentagem

de recuperação da quantidade conhecida da substância química de referência adicionada à amostra;

- *Robustez*: corresponde à capacidade de um método não ser afetado por uma pequena e deliberada modificação em seus parâmetros, como por exemplo: proporção e pH da fase móvel, temperatura, comprimento de onda, estabilidade da solução analítica, tempo de extração, entre outras.

A OLM não possui monografia descrita nos códigos oficiais, por essa razão o objetivo deste estudo foi desenvolver e validar métodos por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) e cromatografia capilar eletrocínética micelar (MECC) avaliando todos os parâmetros acima mencionados, a fim de garantir a confiabilidade dos resultados obtidos. A comparação dos métodos propostos, através da análise estatística dos resultados, também foi realizada com o intuito de verificar a intercambialidade dos mesmos.

5.2 CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes compostos em duas fases, que estão em contato íntimo. Durante a passagem da fase móvel (FM) pela fase estacionária (FE), os componentes da mistura são distribuídos entre as duas, de tal forma que cada um deles é seletivamente retido pela FE, resultando em migrações diferenciadas dos mesmos (Figura 5.1), possibilitando assim sua análise qualitativa e/ou quantitativa (CIOLA, 1998; NETO e NUNES, 2003).

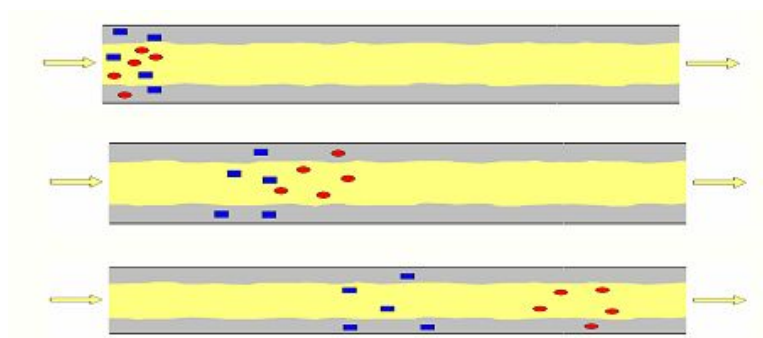


Figura 5.1 - Representação do processo de separação de misturas por interação diferencial de seus componentes entre a fase móvel e fase estacionária (Fonte: NETO e NUNES, 2003).

As técnicas cromatográficas podem ser classificadas de acordo com a FM, FE, processos de separação ou tipo de soluto. Em relação à forma física do sistema, a cromatografia pode ser subdividida em cromatografia em coluna e planar. Enquanto que a cromatografia planar se divide em cromatografia em papel, por centrifugação e em camada delgada, a cromatografia em coluna pode ser classificada em gasosa, líquida e supercrítica (CIOLA, 1998; NETO e NUNES, 2003).

A cromatografia a líquido divide-se em dois grupos: a clássica, feita em coluna de vidro, sob pressão atmosférica, e a de alta eficiência (CLAE), a qual utiliza um sistema onde a FE, seja uma superfície sólida, como uma resina de troca iônica ou um polímero poroso, encontra-se retida em uma coluna metálica, e a FM é forçada através da mesma sob altas pressões (SNYDER *et al.*, 1997).

O sucesso da separação de uma mistura por CLAE depende da escolha adequada da FM acoplada a uma FE conveniente. O processo de separação pode ser efetuado mantendo-se constante a composição da FM (eluição isocrática), ou pelo emprego de diferentes solventes, os quais diferem bastante entre si em relação à proporção e polaridade (eluição em gradiente). Sistemas envolvendo colunas apolares e FM polares são comumente conhecidos como *sistemas de fase reversa*, onde as moléculas polares são facilmente eluídas pela FM, cujo ajuste do pH atua diretamente na ionização do analito, e portanto em sua velocidade de eluição pela FE. O inverso ocorre com *sistemas de fase normal*, FM apolar e coluna polar, cuja retenção aumenta com a polaridade do mesmo (LANÇAS, 2002).

A separação dos compostos empregando a CLAE deve-se principalmente aos fenômenos que ocorrem na interfase FE/FM. Já a interação entre os componentes das amostras e essa interfase dá-se através de processos físico-químicos, que refletem na atração ou repulsão relativa destes. Esses fenômenos, em geral, são forças intermoleculares fracas do tipo Van der Waals, pontes de hidrogênio, transferências de cargas, interações iônicas, além de processos de adsorção, partição, exclusão por tamanho molecular, contra corrente, complexação, entre outros (CIOLA, 1998).

A escolha adequada do sistema de detecção é importante na determinação das mudanças de concentração ou massa dos compostos da amostra que deixa a coluna do sistema cromatográfico. A interpretação dos dados registrados pelo detector produz informações qualitativas e quantitativas sobre a amostra e seus constituintes (CIOLA, 1998).

Os detectores mais empregados em CLAE são os fotométricos, os quais se baseiam na absorvância na região do ultravioleta e visível. O detector de fluorescência, utilizado como método de detecção específico, é sensível para substâncias que apresentam fluorescência intrínseca ou podem reagir com outras, gerando um produto que apresenta esta característica. Também são utilizados detectores de índice de refração, que acompanham continuamente a diferença no índice de refração entre a FM e o efluente que sai da coluna contendo os componentes da amostra e outros detectores como o eletroquímico e o de condutividade elétrica (SKOOG *et al.*, 2002; NETO e NUNES, 2003).

Pelo exposto, a CLAE é muito utilizada em razão de sua versatilidade. A possibilidade de variação dos mecanismos de separação pela adequada escolha da coluna, fase móvel e método de detecção, permite a utilização desta técnica nas mais diversas fases de estudo de produtos farmacêuticos. Este tipo de cromatografia necessita, no entanto, de equipamentos e reagentes de maior custo, que pode ser uma limitação para alguns laboratórios de controle de qualidade de medicamentos (SKOOG, 2002).

Os métodos publicados na literatura, referentes à determinação da OLM em fluidos biológicos e em comprimidos, isolados ou em associação com outros fármacos, em geral utilizam a CLAE. Entretanto, estes diferem na constituição do sistema cromatográfico, principalmente na composição da fase móvel, tipo de coluna e detecção.

O Quadro 5.1 apresenta, resumidamente, os sistemas cromatográficos propostos por diversos autores para determinação deste fármaco.

Quadro 5.1- Resumo dos métodos analíticos por cromatografia a líquido de alta eficiência para determinação da OLM.

| Aplicação | Coluna/Temperatura | Fase móvel/Fluxo | Deteção | Autores |
|--|---|--|--|--------------------------------|
| Plasma, intestino e fígado humano | C ₁₈ ODS YMC-Pack (150 x 6,9 mm) | Tampão fosfato: Água: ACN (2,2:55:45) | UV, 254 nm | KOBAYASHI <i>et al.</i> , 2000 |
| Plasma de ratos | Shim-Pack Wax-1 (50 x 4,0 mm) | ACN:Tampão fosfato 0,05M pH 7,0 (13:87) | Fluorimetria, $\lambda_{excitação} = 260$ nm | NAKAMURA <i>et al.</i> , 2005 |
| | ODS YMC-Pack (150 x 6,0 mm) | ACN: Acetato de amônio pH 3,75 (13:87) | $\lambda_{emissão} = 370$ nm | |
| Albumina humana | ODS YMC-Pack (150 x 4,6 mm, 5 μ m) | ACN: Água: Ácido acético (40:60) | Fluorimetria, $\lambda_{excitação} = 260$ nm $\lambda_{emissão} = 370$ nm | MA <i>et al.</i> , 2005 |
| Plasma | C ₁₈ Thermo Hypurity (50 x 4,6 mm, 5 μ m) | Água: ACN: Ácido fórmico (20:80:0,1)/ 0,4 ml/min | MS | VAIDYA <i>et al.</i> , 2008 |
| Plasma e urina humana | C ₁₈ Thermo BDS Hypersil (50 x 4,6 mm, 3 μ m) 40°C | Ácido fórmico: Metanol: Água (0,5:70:30) | MS | LUI <i>et al.</i> , 2007 |
| Comprimidos OLM/HCTZ e plasma humano | Ace 5 CN (200 x 4,6 mm, 5 μ m) | Metanol: Ácido fosfórico 10 mM pH 2,5: Tea (50: 50: 0,1) | UV, 260 nm | SAGIRLI <i>et al.</i> , 2007 |
| Comprimidos OLM e HCTZ e Irbesartana e em plasma | C ₁₈ μ -Bondapack (150 x 4,6 mm, 5 μ m) | ACN: Ácido acético 0,2% (50:50)/ 1,0 ml/min | UV, 260 nm | NAJMA <i>et al.</i> , 2008 |
| Comprimidos | TSKgel ODS-100V (150 x 4,6 mm, 3 μ m) 40°C | Gradiente: Tampão fosfato 15 mM pH 3,9: ACN/ 0,8 ml/min | UV, 250 nm, MS, IV e RMN | MURAKAMI <i>et al.</i> , 2008 |
| Comprimidos e matéria-prima | C ₁₈ Ace 5 (200 x 4,6 mm, 5 μ m) | Acetato de amônio pH 5,5: ACN(70:30)/ 1,0 ml/min | UV, 235 nm | RANE <i>et al.</i> , 2009 |
| Comprimidos | C ₁₈ Inertsil-ODS-3 (250 x 4,6 mm, 5 μ m) | Tampão fosfato pH 4,0: Metanol (30:70)/ 1,0 ml/min | UV, 230 nm | TRIVEDI <i>et al.</i> , 2009 |
| Comprimidos | C ₁₈ Phenomenex (250 x 4,6 mm, 5 μ m) 35°C | Metanol: ACN: H ₂ O pH 3,5 (60:15:25)/ 1,0 ml/min | UV, 202 nm | SHARMA <i>et al.</i> , 2010 |

UV: detector de ultravioleta; MS: detector de massas; IV: detector de infravermelho; RMN: espectroscopia de ressonância magnética nuclear; ACN: acetonitrila.

Baseado nessas informações foi desenvolvido e validado método indicativo da estabilidade por CLAE para a OLM em comprimidos revestidos, buscando evitar a utilização de soluções tampão na fase móvel do sistema cromatográfico. Os resultados obtidos foram publicados no periódico internacional *Chromatographia*, v. 68, p. 991-996, 2008, intitulado: “*Stability-Indicating LC Determination of a New Antihypertensive, Olmesartan Medoxomil in Tablets*”.

5.3 ELETROFORESE CAPILAR (EC)

O termo eletroforese refere-se à migração de espécies eletricamente carregadas, quando dissolvidas ou suspensas em um eletrólito através do qual passa uma corrente elétrica. A utilização de capilares como canais de migração em eletroforese aumentaram o desempenho da separação, o qual se tornou comparável ao da CLAE. Este método é comumente conhecido como eletroforese capilar (EC) (USP 32, 2009).

Na EC é possível empregar diversos modos de separação, cada qual com seu mecanismo e seletividade característicos: eletroforese capilar de zona (CZE), cromatografia capilar electrocinética micelar (MECC), isotacoforese capilar (CITP), focalização isoelétrica capilar (CIEF), eletroforese capilar em gel (CGE) e electrocromatografia capilar (CEC).

Na ECZ o processo de separação baseia-se na migração diferenciada de compostos iônicos ou ionizáveis, sob um campo elétrico. As diferentes mobilidades dos solutos favorecem a seletividade do método. Essa mobilidade, denominada de mobilidade eletroforética (μ_e), é descrita pela Equação 5.1 e depende da carga e do tamanho do soluto, assim como da viscosidade do meio. Desse modo, conclui-se que espécies pequenas, com maior carga terão maior mobilidade em relação às espécies maiores, pouco carregadas (ALTRIA, 1996).

$$\mu_e = (q/6\pi)/\eta r \quad (5.1)$$

Onde:

μ_e : mobilidade eletroforética;

- q: carga;
- η : viscosidade da solução;
- r: raio do íon.

A sílica é considerada um dos principais revestimentos empregados na fabricação dos capilares e sua utilização é responsável por um fenômeno importante em EC, o fluxo eletrosmótico (FEO), o qual se forma pela ionização dos grupos silanóis quando em contato com solução tampão (DA SILVA, 2007; ALTRIA, 1996). Em valores de pH muito altos, estes grupos dissociam resultando em cargas negativas superficiais. Logo, estes grupos atraem íons carregados positivamente provenientes do tampão, que formam uma camada interna de cátions (camada fixa) perto da parede do capilar. Estes cátions não são suficientes para neutralizar todas as cargas negativas, assim, uma segunda camada de cátions é formada (camada móvel). Quando uma tensão é aplicada, a camada móvel é puxada no sentido do cátodo. As moléculas de água que solvatam o analito também contribuem para o deslocamento deste ao longo do capilar. Esta força, responsável pelo transporte das espécies iônicas ao longo do capilar, é denominada FEO (SANTORO *et al.*, 2000; ALTRIA, 1996), como mostra a Figura 5.2.

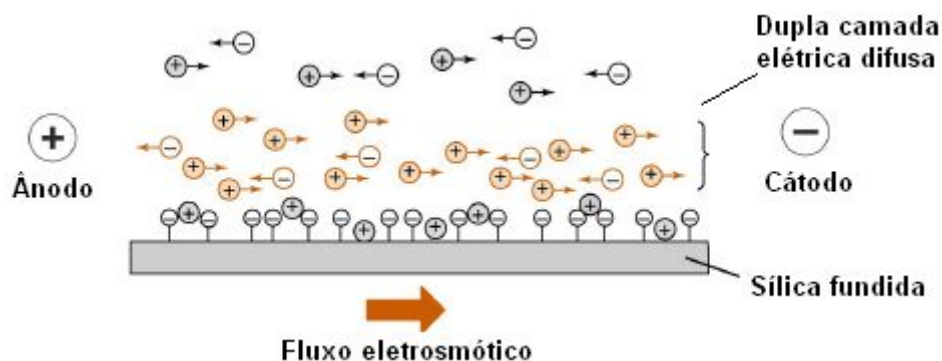


Figura 5.2 - Representação da formação e sentido do fluxo eletrosmótico (ROUESSAC e ROUESSAC, 2001).

Na ECZ não é possível a separação de diferentes compostos neutros, pois estes migram na mesma velocidade, já que não estão sob a influência do campo elétrico. Desta forma, para separá-los é necessário utilizar outra técnica de separação, como por exemplo, a MECC. Este tipo de eletroforese foi inicialmente

desenvolvido para a resolução de compostos neutros, os quais não podem ser separados usando simplesmente a ECZ (TAVARES, 1997).

As condições de separação envolvem o uso de eletrólitos contendo níveis relativamente altos de tensoativos, tal como o dodecil sulfato de sódio (SDS). Acima da concentração micelar crítica (CMC), as moléculas de tensoativo começam a agregar-se, formando micelas. A separação é baseada na partição das moléculas entre a fase micelar (pseudo fase estacionária) e o tampão aquoso. As micelas de SDS têm carga negativa e migram contra o FEO, como mostra a Figura 5.3 (TAVARES, 1997).

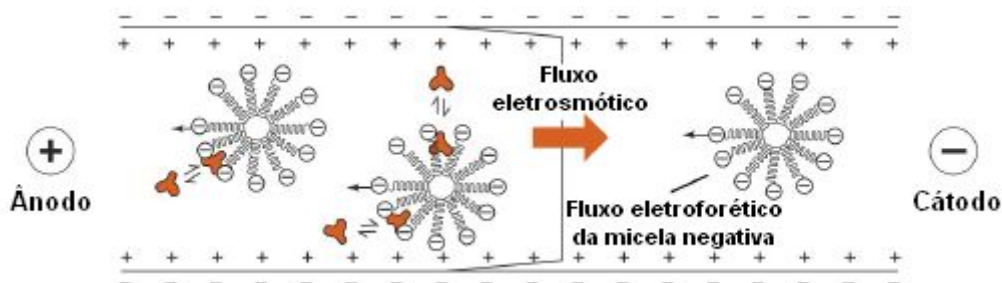


Figura 5.3 - Representação da formação e sentido do fluxo eletrosmótico na cromatografia capilar eletrocinética micelar (ROUESSAC e ROUESSAC, 2001).

Atualmente, a EC se encontra bem estabelecida como técnica analítica, não só por ser considerada uma alternativa à CLAE, mas também por apresentar características como alta eficiência de separação (tipicamente acima de 10^5 pratos teóricos), baixo consumo de amostras (nL) e reagentes (mL), tempo de análise reduzido e alto grau de automação (SANTORO, 2000). Esta técnica assume vantagens sobre a CLAE em termos de simplicidade, rapidez e custo reduzido, uma vez que problemas como alta pressão das bombas, vazamento de solventes e valores elevados das colunas são eliminados (KOVALSKI, 2005).

A quantificação da OLM em comprimidos revestidos, através de ECZ, foi descrita por Çelebier e Altinöz (2007b). O sistema eletroforético era constituído de solução tampão fosfato 50 mM; pH 6,5; temperatura de 30 °C; voltagem 30 KV; pressão hidrodinâmica de 50 mbar; tempo de injeção de 3 s; diflunisal como padrão interno e detecção em 210 nm. Nestas condições, o tempo de migração do fármaco foi de 2,32 min e o tempo total de análise de 5 min. Posteriormente, estes autores

aplicaram o mesmo método para o desenvolvimento de outros estudos relacionados à determinação da OLM associada à hidroclorotiazida em comprimidos (2007c) e análise da cinética de degradação da matéria-prima da OLM, em meio alcalino (2009).

Não há disponível na literatura trabalhos a respeito da quantificação da OLM por MECC, tão pouco método eletroforético indicativo da estabilidade para este fármaco. Dessa forma, buscou-se o desenvolvimento e validação de método indicativo da estabilidade para OLM por esta técnica, visando a comparação deste com o método cromatográfico previamente validado, buscando alternativas para o controle de qualidade da OLM em comprimidos revestidos.

A escolha desta técnica para o desenvolvimento de um método quantitativo para OLM pode ser considerada uma alternativa importante frente à ECZ, visto que na MECC é possível trabalhar com o fármaco no estado neutro, evitando assim que ocorra a degradação da OLM, que é bastante sensível às variações de pH. Sendo assim, diferentes condições experimentais relacionadas às características do fármaco (pKa) e do aparelho (tamanho e dimensão do capilar, modo e tempo de injeção, pré-condicionamento do capilar, voltagem aplicada, temperatura de análise) foram testadas.

Os resultados obtidos foram submetidos à publicação no periódico internacional *Journal of AOAC International*, intitulado: “*Stability-indicating Comparative Methods by MEKC and LC for Determination of Olmesartan Medoxomil*”.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

Material e métodos utilizados, assim como os resultados do desenvolvimento e validação dos métodos indicativos da estabilidade por CLAE e MECC, para a OLM em comprimidos revestidos, encontram-se descritos nos artigos em anexo.

5.5 CONCLUSÃO

- Os métodos indicativos da estabilidade, desenvolvidos e validados por CLAE e MECC, apresentaram especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez, ou seja, foram considerados adequados para o controle de qualidade de rotina da OLM em comprimidos revestidos, mesmo na presença de seu produto de degradação;
- O estudo preliminar da estabilidade da OLM SQR, para análise da especificidade do método por CLAE, demonstrou que esta molécula, quando exposta às condições ácida, alcalina e oxidativa, apresentou não só uma redução drástica no seu teor, como também formou seu principal produto de degradação, o qual sugere-se que seja a OL. Os ensaios realizados frente à temperatura e a radiação 352 nm, com o fármaco em solução, comprovaram que a OLM é termolábil e fotoinstável, visto que houve uma queda menos acentuada no seu teor, se comparada com as condições anteriormente testadas, mas houve também a formação do produto de degradação;
- Na determinação da especificidade do método por MECC, foram empregadas as mesmas condições de degradação forçada aplicadas em CLAE. Os resultados foram semelhantes nas etapas ácida, alcalina e oxidativa, ou seja, a OLM SQR reduziu drasticamente seu teor e formou o mesmo produto de degradação. No entanto, por esta técnica houve maior degradação do fármaco em meio ácido que em meio oxidativo, ao contrário do que foi observado por CLAE. Esta molécula também foi considerada termolábil e fotoinstável, porém, ao contrário da CLAE, não foi possível detectar, por MECC, o produto de degradação formado nestas condições;
- Por CLAE, o produto de degradação da OLM eluiu antes do fármaco, em função deste apresentar um peso molecular menor e estar mais ionizado, em função de sua natureza ácida. Houve, portanto, uma menor interação entre o produto de degradação e a fase estacionária da coluna de natureza apolar. Ao contrário do método cromatográfico, por MECC o produto de degradação

migrou depois da OLM e do padrão interno, devido ao fato deste ficar mais tempo retido pelas micelas do tensoativo e demorar mais para ser detectado;

- A análise comparativa entre os métodos propostos, por CLAE e MECC, para a determinação quantitativa da OLM em comprimidos revestidos demonstrou não haver diferença estatística significativa entre ambos ($p > 0,05$), sendo caracterizada, desse modo, a intercambialidade entre os mesmos.

5.6 REFERÊNCIAS

ALTRIA, K. D. Capillary Electrophoresis Guidebook: **Principles, Operation and Applications. Methods in Molecular Biology**. New Jersey: Humana Press, 1996.

AVENDAÑO, C. Síntesis de fármacos. Principios generales e introducción al análisis farmacêutico. In: LOPEZ, M. C. A. **Introducción a la química farmacêutica** - Madrid: Intramericana McGraw-Hill, 2003.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 jun. 2003.

ÇELEBIER, M.; ALTÍNOZ S. Determination of Olmesartan Medoxomil in Tablets by UV-Vis Spectrophotometry. **Pharmazie**, v. 62, p. 419-422, 2007a.

ÇELEBIER, M.; ALTÍNOZ S. Development of a CZE method for the determination of olmesartan medoxomil in tablets. **Chromatographia**, v. 66, p. 929-933, 2007b.

ÇELEBIER, M.; ALTÍNOZ S. Development of a Capillary Zone Electrophoresis Method for the Indirect Determination of Olmesartan Medoxomil and Determination of Hydrochlorothiazide in Synthetic Tablets. **Journal of the Faculty of Pharmacy**, v. 27 (2), p. 119-130, 2007c.

ÇELEBIER, M.; ALTÍNOZ S. Application of Capillary Electrophoresis to Investigate the Degradation Kinetic of Olmesartan Medoxomil. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28 (1), p. 108-111, 2009.

CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho – HPLC**. 1ª ed., Edgard Blucher Ltda, São Paulo, 1998.

DA SILVA, J. A. F. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**, v.30 (3), p. 2, 2007.

ICH. Harmonised Tripartite Guideline. Guideline on Stability Testing of New Drug Substance and Products Q1A(R2). In: **International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use**, 2003.

ICH. Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical methods text and methodology Q2(R1). In: **International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use**, 2005.

KOBAYASHI, N.; FUJIMORI, I.; WATANABE, M.; IKEDA, T. Real-Time Monitoring of Metabolic Reactions by Microdialysis in Combination with Tandem Mass Spectrometry: Hydrolysis of CS-866 in Vitro in Human and Rat Plasma, Livers, and Small Intestines. **Analytical Biochemistry**, v. 287, p. 272 -278, 2000.

KOVALSKI, P.; KONIECZNA, L., CHMIELEWSKA, A., OLDZKA, I., PLENIS, A., BIENIECKI, M.; LAMPARCZYK, H. Comparative evaluation between capillary electrophoresis and High-performance liquid chromatography for analysis of florfenicol in plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39 (5), p. 983-989, 2005.

LANÇAS, F. M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**, Editora Rima, 2002.

LUI, D.; HU, P.; MATSUSHIMA, N.; LI, X.; LI, L.; JIANG, J. Quantitative determination of olmesartan in human plasma and urine by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B Analytical Technology Biomedical Life Sciences**, v. 856, p. 190-197, 2007.

MA, S.; ANRAKU, M.; IWAO, Y.; YAMASAKI, K.; KRAGH-HANSEN, U.; YAMAOTSU, N.; HIRONO, S.; IKEDA, T.; OTAGIRI, M. Hydrolysis of Angiotensin II Receptor Blocker Prodrug Olmesartan Medoxomil by Human Serum Albumin and Identification of Its Catalytic Active Sites. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 33 (12), p. 1911-1919, 2005.

MURAKAMI T, KONNO H, FUKUTSU N, ONODERA M, KAWASAKI T, KUSU F. Identification of a degradation product in stressed tablets of olmesartan medoxomil by the complementary use of HPLC hyphenated techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, p. 553-559, 2008.

NAJMA, S.; SAEED, A. M.; SHAHID, A. S.; SHAHNAWAZ, S. Simultaneous determination of olmesartan medoxomil and irbesartan and hydrochlorothiazide in pharmaceutical formulations and human serum using high performance liquid chromatography. **Chinese Journal of Chromatography**, v. 26 (5), p. 544-549, 2008.

NAKAMURA H, INOUE T, ARAKAWA N, SHIMUZI Y, YOSHIGAE Y, FUJIMORI I, SHIMAKAWA E, TOYOSHI T, YOKOYAMA T. Pharmacological and pharmacokinetic study of olmesartan medoxomil in animal diabetic retinopathy models. **European Journal of Pharmacology**, v. 512, p. 239-246, 2005.

NETO, A. F. R.; NUNES, D. S. S. **Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins**. Interciência, Rio de Janeiro, 2003.

RANE, V. P.; PATIL, K. R.; SANGSHETTI, J. N.; YEOLE, R. D.; SHINDE, D. B. Validated Stability Indicating LC-DAD Method for determination of Olmesartan medoxomil in Tablets Exposed to Stress Conditions. **Chromatographia**, v. 69, p. 169-173, 2009.

ROUESSAC, F.; ROUESSAC, A. **Chemical Analysis - Modern Instrumentation and Techniques**. John Wiley & Sons, 2001.

SAGIRLI, O.; ONAL, A.; TOKER, S.E.; SENSOY, D. Simultaneous HPLC analysis of olmesartan and hydrochlorothiazide in combined tablets and in vitro dissolution studies. **Chromatographia**, v. 66, 213-218, 2007.

SANTORO, M. M. I. ; PRADO, M. S. A.; STEPPE, M.; KEDOR-HAKMANN, E. R. M. Eletroforese capilar: teoria e aplicações na análise de medicamentos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 36 (1), p. 97-110, 2000.

SETHI, P. D.; CHAREGAONKAR, P. **Identification of drugs in pharmaceutical formulations by Thin-Layer Chromatography**, second edition, CBS Publishers & Distributors, New Dehli, 1999.

SHARMA, R. N.; PANCHOLI, S. S. RP-HPLC-DAD method for determination of olmesartan medoxomil in bulk and tablets exposed to forced conditions. **Acta Pharmaceutica**, v. 60, 13-24, 2010.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de Análise Instrumental**. Tradução Ignez Caracelli *et al.* 5ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SNYDER, L.; KIRKLAND, J.; GLAJCH. **Practical HPLC Method Development**. 2nd. ed. Hoboken: John Willey & Sons, 1997.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, v. 2 (3), p. 12-20, 1998.

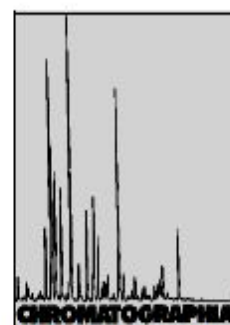
TAVARES, M. F. M. Métodos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v.20 (5), p. 493-511, 1997.

TRIVEDI, P.; KARTIKEYAN, C.; KACHAVE, R.; BHADANE, R. Stability-Indicating assay method for estimation of olmesartan medoxomil and its metabolite. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 32 (11), p. 1516-1526, 2009.

USP 32. THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA. 32th ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2009.

VAIDYA VV, ROY SMN, YETAL SM, JOSHI SS, PAREKH SA. LC-MS-MS determination of olmesartan in human plasma. **Chromatographia**, v. 67, p. 147-150, 2008.

Stability-Indicating LC Determination of a New Antihypertensive, Olmesartan Medoxomil in Tablets



CHROMATOGRAPHIA
2008, 68, 991-996

Lisiane Bajerski, Rochele C. Rossi, Carolina L. Dias, Ana M. Bergold, Pedro E. Fröhlich[✉]

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Ipiranga, 2752, Porto Alegre, RS CEP 90610-000, Brazil; E-Mail: pedroef@ufrgs.br

Received: 10 April 2008 / Revised: 23 July 2008 / Accepted: 7 August 2008
Online publication: 3 October 2008

Abstract

A stability-indicating liquid chromatographic method was developed and validated for quantitative determination of olmesartan medoxomil (OLM) in coated tablets in the presence of degradation products generated under stress conditions. An isocratic LC separation was performed using a Phenomenex RP-18 column using a mobile phase consisting of water:triethylamine:acetonitrile (60:0.3:40 v/v/v, pH adjusted to 6.3 with phosphoric acid). The flow rate was 1.2 mL min⁻¹ and the detection was achieved with a photodiode array detector set at 257 nm. The response was linear over a range of 10.0 to 30.0 µg mL⁻¹ ($r = 0.9999$). The specificity and stability-indicating capability of the method was verified subjecting the reference substance and drug product to hydrolytic, oxidative, photolytic, and thermal stress conditions. The method showed a good and consistent recovery (100.2%) with low intra- and inter-day relative standard deviation (RSD) ($\leq 1.0\%$). A considerable degradation occurred in all stress conditions and the degradation product was well resolved from the main peak. There was no interference of the excipients in the determination of the active pharmaceutical ingredient. Thus, the proposed method was found to be stability-indicating and can be used for routine analysis for quantitative determination of OLM in coated tablets without the interference of major degradation products.

Keywords

Column liquid chromatography
Stability-indicating method
Forced degradation
Validation
Olmesartan medoxomil

Introduction

Olmesartan medoxomil (OLM), (5-methyl-(2-oxo-1,3-dioxol-4-yl)methyl-4-(1-hydroxy-1-methylethyl)-2-propyl-1-[2'-(1*H*)-tetrazol-5-yl]1,1'-biphenyl(-4-yl)methyl]-1*H*-imidazole-5-carboxylate] (Fig. 1) is considered the latest angiotensin II receptor blocker approved in April 2002 by the Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of hypertension. OLM is used, either alone or in combination with other drugs, to treat high blood pressure. This antihypertensive is a prodrug that is rapidly and completely de-esterified to the active metabolite olmesartan (OL; Fig. 1) by both arylesterase and albumin during gastrointestinal absorption [1, 2].

There is no reference for determination of this drug in both bulk and dosage forms in official compendia. OLM has been determined in biological fluids using LC coupled to fluorescence and tandem mass spectrometry [2-5]. There are also reports on spectrophotometry and capillary electrophoresis for the quantitative determination of this drug in coated tablets [6, 7]. To our knowledge, there is only one LC method applied for quality control and in vitro dissolution test for OLM combined with

hydrochlorothiazide in tablets [8]. Recently, an LC hyphenated technique was used to elucidate a degradation product obtained from stress condition of OLM tablets [9]. Even though, these articles are not related to stability-indicating technique.

The international conference on harmonization (ICH) guideline Q1A (R2) requires the stress testing to be carried out to elucidate the inherent stability characteristics of active substances [10]. In the present study, attempts were made to develop and validate a rapid stability-indicating liquid chromatographic (LC) method, in compliance with ICH guidelines, USP Pharmacopoeia and FDA [11–14].

Chemical and Reagents

OLM (purity 99.3%) was purchased from Sequoia Research Products (Oxford, UK). One batch of Benicar (San-kyo Pharma, Brazil) tablets containing 20 mg of OLM was obtained from commercial sources. The excipients contained in the dosage form (cellulose microcrystalline, low substitution hypolose, lactose monohydrated, hypolose, magnesium stearate, talc, titanium dioxide, hypromellose) were all pharmaceutical grades and acquired from different distributors. LC grade acetonitrile was obtained from Tedia (Fairfield, USA). Purified water was prepared using a Milli-Q Plus (Millipore, Bedford, USA). All other reagents and chemical were analytical grade.

Instrumentations

The analysis was performed on a Shimadzu LC system (Kyoto, Japan) which consisted of a LC-10AD pump, a SPD-M10ADVP photodiode array (PDA) detector, a SLA-10ADVP system controller, a DGU-14A degasser and a Rheodyne 7725i manual injector with a 20 μ L loop. Data were acquired and processed using CLASS-VP software (version 6.1). The chromatographic separation was performed using a Phenomenex RP-18 column (250 mm \times 4.6 mm i.d., particle size 5 μ m) and the robust-

ness was verified using an Ace RP-18 column (250 mm \times 4.6 mm i.d., particle size 5 μ m), both with a guard column (4 \times 3 mm i.d.) packed with the same material. Photodegradation was carried out in a photostability UV chamber (1.0 \times 0.17 \times 0.17 m) with mirrors and equipped with an UV-A lamp (Orion, 352 nm, 30 W, 130 V) and UV cuvettes (Ultra Vette, São Paulo, Brazil) were used as a container for samples. For thermal stability studies, a dry air oven (Biomatic, Porto Alegre, Brazil) was used.

Chromatographic Conditions

The chromatographic analysis was performed isocratically at room temperature (23 ± 1 °C), using a mobile phase composed of water:triethylamine:acetonitrile (60:0.3:40 v/v/v, pH adjusted to 6.3 with phosphoric acid). This was filtered through a 0.45 μ m membrane filter (Millipore, Bedford, USA) and degassed using an ultrasonic bath. The flow rate was 1.2 mL min⁻¹ and the PDA detector was set at 257 nm. The injection volume was 20 μ L for both reference substance and drug product solutions.

Preparation of Standard and Sample Solutions

OLM reference substance was accurately weighed (10.0 mg) and dissolved in a 20 mL volumetric flask with mobile phase to produce a concentration of 500.0 μ g mL⁻¹ of analyte. This solution was diluted appropriately in the same diluent to yield a final concentration of 20.0 μ g mL⁻¹.

To prepare a sample solution, 20 units of Benicar tablets (20.0 mg of OLM) were accurately weighed and crushed to fine powder. An appropriate amount was transferred into a 20-mL volumetric flask with 10 mL of mobile phase. This flask was kept in an ultrasonic bath for 15 min. The volume was completed with the same diluent and an aliquot of 1.0 mL of this solution was diluted in a 25-mL volumetric flask to

yield a final concentration of 20.0 μ g mL⁻¹. The solutions were filtered through a 0.45 μ m membrane filter before injection.

Validation of Method

The developed chromatographic method was validated for specificity, linearity, sensitivity, precision, accuracy, robustness and system suitability, following the guidelines [11–14]. Furthermore, stability-indicating capability was determined by forced degradation conditions in accordance with ICH guidelines [10–12].

Specificity/Forced Degradation Studies

The interference from inactive ingredients was investigated through recovery studies using the standard addition method. This procedure was carried out by adding known amounts of OLM reference substance into a mixture of excipients. Their concentrations were based on the literature [15].

Further, an intentional degradation was performed. A minimum of three samples were generated for each stress condition. Blank solutions were used during the analysis and both reference substance and drug product solutions were stored at room temperature (23 ± 1 °C) to compare the results.

Solutions containing 1.0 mg mL⁻¹ of OLM were used. After the degradation period, these solutions were neutralized (if necessary) and diluted in mobile phase to achieve a concentration of 20.0 μ g mL⁻¹. For peak purity test, a PDA detector was used in scan mode (200–350 nm) and the purity factor was observed. The stress conditions were the following:

Acid and basic hydrolysis. Each solution was prepared in a mixture of 0.01 M HCl—mobile phase (70:30, v/v) and 0.01 M NaOH—mobile phase (70:30, v/v), respectively. All were protected from the light and stored at room temperature (23 ± 1 °C) during 24 h.

Oxidative degradation. Solutions were prepared in a mixture of 3% H₂O₂ and mobile phase (70:30, v/v) and were protected from light and stored at room temperature (23 ± 1 °C) for 24 h.

Thermal degradation. Reference substance in powder (dry heat) and in solution (moist heat) were exposed at 80 °C in an oven for 24 and 1 h, respectively.

Photodegradation. Reference substance in powder and in solution were placed in a glass dish and quartz cuvettes, respectively, were placed in a light chamber and exposed to UV-A radiation (352 nm) for 48 h, at room temperature (23 ± 1 °C). Control samples were protected from light with aluminum foils, placed in a light chamber and exposed concurrently.

Following the degradation period, all samples were prepared for analysis as previously described.

Linearity and Limits of Detection and Quantitation

Three calibration curves were prepared in mobile phase and analyzed in triplicate at five different OLM concentrations (10.0, 15.0, 20.0, 25.0 and 30.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$). The results were tested by ANOVA and linear regression analysis was used to obtain the equation and correlation coefficient. The limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ) were calculated using the calibration line directly. The aforementioned factors (3.3 and 10) were multiplied by the ratio from the residual standard deviation and the slope (corresponding to the standard error of slope), according to the guidelines [11–14].

Precision

The precision was determined using the parameters of repeatability (intra-day) and intermediate precision (inter-day), analyzing six sample solutions of OLM prepared at 20.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in triplicate on three different days. They were expressed as relative standard deviation (RSD) of the measurements.

Accuracy

Accuracy was calculated as the percentage of recovery by adding known amounts of OLM reference substance to sample solutions (12.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) to yield final concentrations of 18.0, 20.0 and 22.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, corresponding to 80, 100

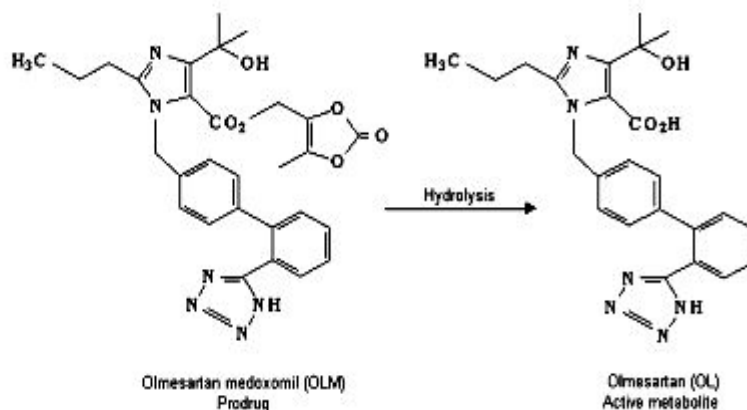


Fig. 1. Hydrolysis of olmesartan medoxomil

and 120% of the nominal analytical concentration.

Robustness

In this study, the chromatographic parameters (peak retention time, theoretical plates, tailing, capacity factor and repeatability) were evaluated using both sample and reference substance solutions (20.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) changing flow rate (1.0 and 1.4), acetonitrile concentration (38 and 42%) and pH (6.1 and 6.5) of mobile phase, column (Ace RP-18 column) and equipment (Shimadzu liquid chromatograph equipped with a SCL-10AVP system controller, LC 10AVP pump).

The stability of reference and sample solutions was also evaluated at room temperature (23 ± 1 °C) and in the refrigerator (8 ± 2 °C), during 24 and 48 h. The stability of these solutions was verified by performing the experiment and observing any change in the chromatographic pattern, comparing with freshly prepared solutions. The RSD of the assay was calculated for the study period during solution stability experiments.

Results and Discussion

Selection of Chromatographic Conditions

The chromatographic conditions were optimized to develop a stability-indicat-

ing method to separate the degradation products from the drug. During the procedure three columns (Hypersil RP-18 250 mm \times 4.6 mm i.d., particle size 5 μm ; Merck® RP-18 250 mm \times 4.6 mm i.d., particle size 5 μm ; Phenomenex RP-18 250 mm \times 4.6 mm i.d., particle size 5 μm) and different mobile phases with distinct proportions of organic solvent (acetonitrile or methanol) and water, with and without triethylamine, in two distinct pH (3.3 and 6.3) were evaluated.

The best chromatographic condition was achieved using aqueous 0.3% triethylamine (pH adjusted to 6.3 with phosphoric acid) and acetonitrile (60:40, v/v). The flow rate used was 1.2 mL min^{-1} . PDA detection was used to select the best wavelength for analysis as well as to verify peak purity during analysis. With this mobile phase, adequate results were obtained in terms of peak parameters (shape peak, selectivity, theoretical plates, symmetry, capacity factor, repeatability). A typical chromatogram obtained by the proposed method for OLM is shown in Fig. 2a.

Specificity/Degradation Behavior

The high percentage of recovery observed with sample solutions indicates that the proposed method was not affected by interferences from excipients used in the dosage form (Fig. 2a). Photodiode array detection also supported

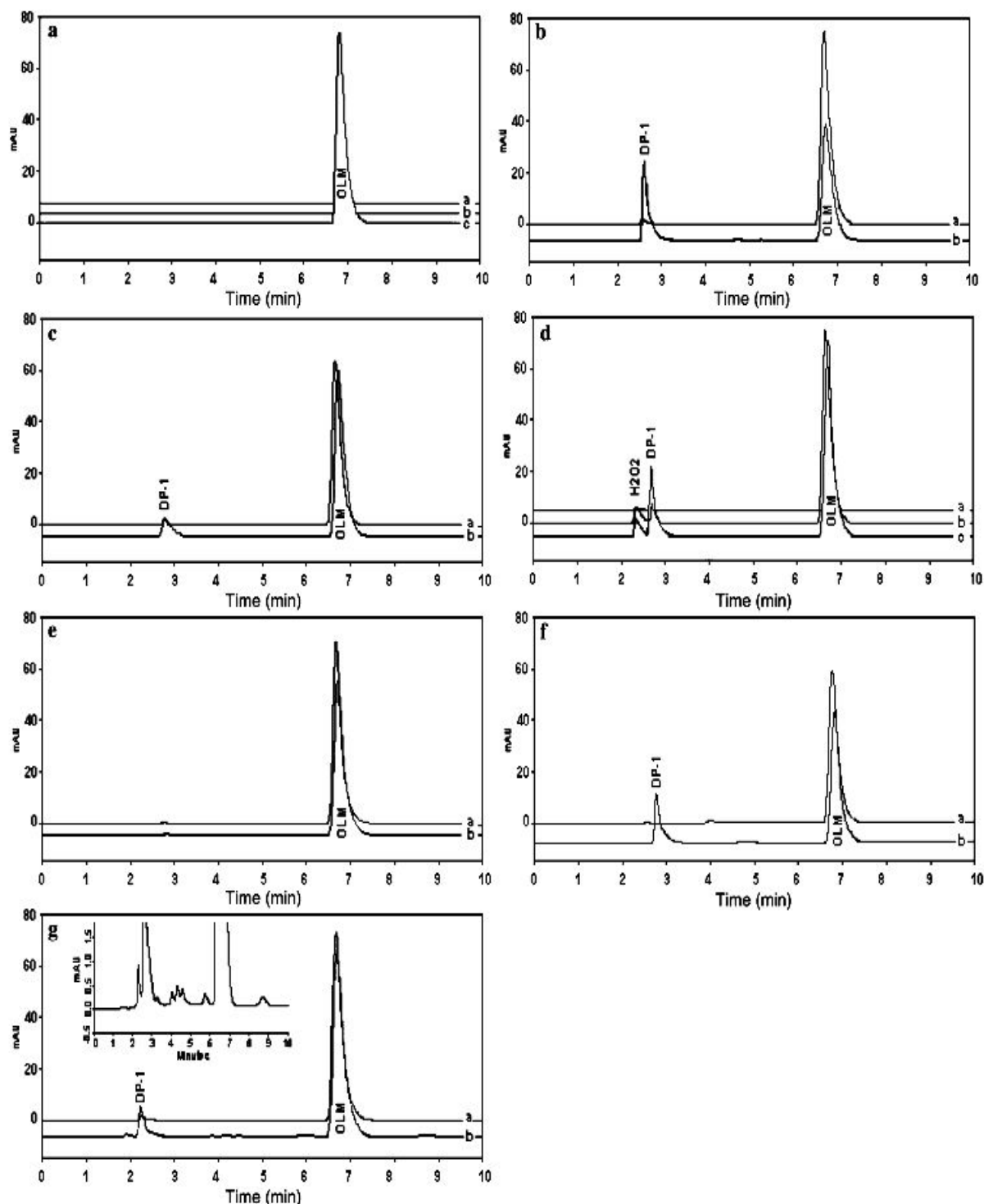


Fig. 2. a-g Chromatograms obtained from olmesartan medoxomil ($20.0 \mu\text{g mL}^{-1}$): **a** blank (*a*), placebo (*b*), reference substance (*c*); **b** acid hydrolysis 0 h (*a*) and 24 h (*b*); **c** basic hydrolysis 0 h (*a*) and 24 h (*b*); **d** oxidative degradation: 3% H_2O_2 blank (*a*), 0 h (*b*) and 24 h (*c*); **e** dry heat 0 h (*a*) and 24 h (*b*); **f** moist heat 0 h (*a*) and 1 h (*b*); **g** photodegradation 0 h (*a*) and 48 h (*b*). Chromatographic conditions: Phenomenex RP-18 column ($250 \times 4.6 \text{ mm i.d.}$, particle size $5 \mu\text{m}$); 1.2 mL^{-1} flow rate; mobile phase water:triethylamine:acetonitrile ($60:0.3:40 \text{ v/v/v}$, pH adjusted to 6.3 with phosphoric acid); UV detection at 257 nm

the specificity of the method and provided evidence of peak purity for OLM.

Forced degradation studies showed that the OLM drug product was con-

sidered more stable and reveal the same profile degradation as the OLM reference substance. The results presented in Table 1 concern the OLM reference

substance under various stress conditions.

A complete degradation occurred when 0.1 M HCl and 0.1 M NaOH

solutions were used at room temperature (23 ± 1 °C). In 0.1 M NaOH the solution became yellow instantaneously. Considering this, 0.01 M HCl and 0.01 M NaOH solutions were used and an additional peak was detected at ~ 2.70 min, in both conditions (Fig. 2b, c). The same was observed when 3% H_2O_2 was used. An third peak observed at 2.20 min could be attributed to the H_2O_2 stabilizer (phenacetin), because it was also detected in the blank solution (Fig. 2d).

No degradation of OLM reference substance was observed under dry heat condition, while a peak appeared at 2.72 min when a solution was heated (Fig. 2e, f).

Under photolytic condition a peak also emerged at 2.72 min, however other small peaks also appeared (Fig. 2g). Control samples demonstrated that the heat generated inside the light chamber did not interfere in the degradation of the drug.

Observing all the stress conditions the OLM reference substance was less stable in peroxide medium but stable when the powder was exposed to dry heat.

The peak purity indexes (Table 1) obtained for both OLM and major degradation product (2.7 min) peaks in all samples analyzed indicate that they were pure. The resolution between these two peaks was higher than 2.0. The same retention time was achieved for the main degradation product (about 2.70 min) in all stress conditions tested. Since OLM is the ester prodrug of OL, it is reasonable to think that this degradation product is OL. However, OL reference substance should be used to confirm this assumption.

Linearity and Limits of Detection (LOD) and Quantitation (LOQ)

Linearity was evaluated in the 10.0 – 30.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ range. The slope and intercept ($\pm\text{SD}$, $n = 3$) were $11,444 \pm 11,282$ and $50,716 \pm 376$, respectively, and the correlation coefficient was 0.9999. ANOVA results showed that the regression equation was linear ($F_{\text{calculated}} = 5.8 \cdot 10^4 > F_{\text{critical}} = 4.96$;

Table 1. Results of analysis of forced degradation study using proposed method

| Stress condition | Degradation (%) | Peak purity ^a |
|--------------------------------------|-----------------|--------------------------|
| Control sample | No degradation | 0.9999 |
| Acid hydrolysis (0.01 M HCl, 24 h) | 50.7 | 0.9999 |
| Basic hydrolysis (0.01 M NaOH, 24 h) | 36.3 | 0.9999 |
| Oxidation (3% H_2O_2 , 24 h) | 55.6 | 0.9999 |
| Dry heat (80 °C, 24 h) | No degradation | 0.9999 |
| Moist heat (80 °C, 1 h) | 15.0 | 0.9999 |
| Photolytic degradation (48 h) | 8.7 | 0.9999 |

^a Peak purity values in the range of 0.9990–1.0000 indicate a homogeneous peak

Table 2. Evaluation of robustness for the olmesartan medoxomil LC assay ($n = 3$)

| Parameter | R_t^b (min) | T^c (≤ 2.0) | N^d ($> 2,000$) | k^e (> 2.0) | (%) |
|-----------------------------------|---------------|----------------------|---------------------|-------------------|--------|
| Proposed method ^a | 6.98 | 1.76 | 3,019 | 2.48 | 100.18 |
| Flow rate (1.0 mL^{-1}) | 8.36 | 1.82 | 3,107 | 3.18 | 101.04 |
| Flow rate (1.4 mL^{-1}) | 6.27 | 1.72 | 3,081 | 2.10 | 101.38 |
| pH (6.1) | 6.89 | 1.76 | 3,033 | 2.45 | 97.37 |
| pH (6.5) | 6.74 | 1.78 | 2,972 | 2.37 | 96.84 |
| Acetonitrile (-5%) | 7.86 | 1.65 | 3,744 | 2.93 | 97.49 |
| Acetonitrile ($+5\%$) | 5.80 | 1.89 | 2,289 | 4.80 | 97.93 |
| Stability at 8 ± 2 °C | 7.10 | 1.73 | 3,095 | 2.55 | 101.03 |
| Stability at 23 ± 1 °C | 7.05 | 1.73 | 3,063 | 2.53 | 101.49 |
| Different column | 5.92 | 1.91 | 2,644 | 2.95 | 100.24 |
| Different equipment | 7.37 | 1.97 | 6,174 | 2.75 | 99.86 |
| %RSD | | | | | 1.78 |

^a Mobile phase with water:triethylamine:acetonitrile (60:0.3:40 v/v/v, pH adjusted to 6.3 with phosphoric acid), Phenomenex RP-18 (250×4.6 mm i.d., particle size 5 μm)

^b R_t retention time

^c T tailing factor

^d N theoretical plate number

^e k retention factor

$P = 0.05$) with no deviation from linearity ($F_{\text{calculated}} = 1.89 < F_{\text{critical}} = 3.71$; $P = 0.05$). The LOD and LOQ were 0.73 and 2.22 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively.

Precision and Accuracy

The intra-day ($n = 6$) precision, performed by assaying the samples in three different days by the same analyst, showed good results: 99.63 ± 0.83 ; 99.41 ± 1.06 and $99.02 \pm 0.96\%$ (mean \pm RSD). The RSD for inter-day precision was 0.95% ($n = 3$). The average results were equivalent ($F_{\text{calculated}} = 6.3 \cdot 10^{-1} < F_{\text{critical}} = 3.68$; $P = 0.05$).

In the accuracy test three concentrations were evaluated (18, 20 and 22 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and mean recoveries were 101.28 ± 0.18 , 100.05 ± 0.56 and $99.38 \pm 0.15\%$ (mean \pm RSD), respectively.

Robustness

The results and experimental range of the selected variables evaluated in the robustness assessment are shown in Table 2. Flow rate (from 1.0 to 1.4) and acetonitrile proportion ($\pm 5\%$) changes yielded the expected results: earlier elution with faster flow rates and higher acetonitrile concentration. Different columns and equipments resulted in changes in the retention time, tailing factor and theoretical plate number of the major peak in comparison with the proposed analytical conditions. However, no significant changes (RSD $< 2.0\%$) were observed regarding quantitation of OLM. The solutions can be considered stable up to 24 h in both temperatures tested. After 48 h an extra peak was observed. The results were: theoretical plates (from 2,289 to 6,174), retention time (from 5.80 to 8.36) and tailing factor (from 1.65 to 1.91). The area peak

RSD of five injections was 0.85%, demonstrating the injection repeatability. The values for these parameters were satisfactory in accordance with the literature [10–14]. None of these alterations caused a significant effect on the determination of this drug in coated tablets, indicating robustness or stability of the method.

Conclusion

The LC method developed and validated for quantitative determination of OLM in coated tablets was considered simple, sensitive, specific, precise, accurate and reproducible. The method uses simple reagents and minimum sample preparation procedures, encouraging its application in routine analysis.

Based on results of specificity procedure and forced degradation studies, undertaken according to the ICH guidelines, the method can be considered specific and stability-indicating, for the

reason that there was no interference of the excipients and of the degradation product formed in the determination of OLM in bulk samples. Thus, the method can be applied in stability testing of the commercially available OLM coated tablets.

References

1. Norwood D, Branch E, Smith B, Honeywell M (2002) *P&T* 27(Suppl 12):611–617
2. Laeis P, Puchler K, Kirch W (2001) *J Hypertens* 19(Suppl 1):S21–S32
3. Lui D, Hu P, Matsushima N, Li X, Li L, Jiang J (2007) *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 856:190–197. doi:10.1016/j.jchromb.2007.05.049
4. Nakamura H, Inoue T, Arakawa N, Shimuzi Y, Yoshigae Y, Fujimori I et al (2005) *Eur J Pharmacol* 512:239–246. doi:10.1016/j.ejphar.2005.02.047
5. Vaidya VV, Roy SMN, Yetal SM, Joshi SS, Parekh SA (2008) *Chromatographia* 67:147–150. doi:10.1365/s10337-007-0453-x
6. Altinoz S, Çelebier M (2007) *Pharmazie* 62:419–422
7. Çelebier M, Altinoz S (2007) *Chromatographia* 66:929–933. doi:10.1365/s10337-007-0424-2
8. Sagirli O, Onal A, Toker SE, Sensoy D (2007) *Chromatographia* 66:213–218. doi:10.1365/s10337-007-0304-9
9. Murakami T, Konno H, Fukutsu N, Onodera M, Kawasaki T, Kusu F (2008) *J Pharm Biomed Anal* 47:553–559. doi:10.1016/j.jpba.2008.02.021
10. ICH (2003) Harmonized tripartite guideline: stability testing of new drug substance and products: methodology Q1A (R2)
11. ICH (2005) Harmonized tripartite guideline: validation of analytical procedure. Text and methodology Q2(R1)
12. ICH (1996) Harmonized tripartite guideline: validation of analytical procedure: methodology Q2B, Step 4
13. The United States Pharmacopoeia (2007) 30th edn. USP Convention Inc., Rockville, USA
14. FDA (1994) Center for drug evaluation and research. Reviewer guidance: validation of chromatographic methods. Rockville
15. Rowe RC, Sheskey PJ, Welle PJ (eds) (2000) *Handbook of pharmaceutical excipients*. Washington

ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO – Stability-Indicating Comparative Methods by MEKC and LC for Determination of Olmesartan Medoxomil. Journal of AOAC International, 2010.

**Stability-indicating Comparative Methods by MEKC and LC for Determination
of Olmesartan Medoxomil**

Lisiane Bajerski.; Clésio S. Paim; Andrea G. Pereira; Carolina L. Dias.; Rocheli C.
Rossi; Vítor Todeschini; Martin Steppe; Ana Maria Bergold; Pedro E. Fröhlich

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
Av. Ipiranga, 2752, Cep: 90610-000, Porto Alegre - RS, Brazil

Corresponding author: Tel: 51 33085313 /Fax: 51 33085313

E-mail adress: lisianebajerski@yahoo.com.br (Lisiane Bajerski)

Abstract

A stability-indicating micellar capillary electrophoresis (MEKC) was developed and validated for the analysis of olmesartan medoxomil (OLM) in tablet dosage forms, using potassium diclofenac (DICL) as internal standard. The MEKC method was performed on a fused-silica capillary (40cm effective length x 50µm i.d.). The background electrolyte (BGE) consisted of 40mM borate buffer, and 40mM anionic detergent sodium dodecyl sulfate (SDS), at pH 6.5. The capillary temperature was maintained at 25°C (positive polarity) and the applied voltage was 25kV. The injection was performed using the hydrodynamic mode at 50mbar for 5s, with detection by photodiode array detector set at 257nm. The method was linear, sensitive, precise, and accurated. This is the first reported ideal stability-indicating MECK method that quantifies selectively OLM in the presence of degradation products. The proposed method was compared with the liquid chromatographic (LC) method previously validated for this drug, and statistical analysis showed no significant difference ($p > 0.05$) between the techniques.

Keywords: Olmesartan medoxomil, MEKC method, LC method, stability-indicating, comparative methods.

Introduction

The olmesartan medoxomil (OLM, Fig. 1A), is a prodrug that is rapidly and completely de-esterified to the active metabolite olmesartan (OL, Fig. 1B) by both arylesterase and albumin during gastrointestinal absorption (1-2). It is a selective angiotensin II receptor blocker which was approved by US Food and Drug Administration (FDA) in 2002 for the treatment of hypertension, either alone or in combination with other drugs. OLM is also reported to be effective in animal models of atherosclerosis, liver disorders, and diabetic nephropathy (3). This drug, practically insoluble in water and sparingly soluble in methanol, is considered a weakly basic compound ($pK_a = 4.3$), and is chemically known as 5-methyl-(2-oxo-1,3-dioxol-4-yl)methyl-4-(1-hydroxy-1-methylethyl)-2-propyl-1-[2'-(1H)-tetrazol-5yl]1,1' biphenyl(-4-yl)methyl]-1H-imidazole-5-carboxylate] (4).

An official technique for OLM quantification in solid dosage forms has not yet been described in the literature, but methods for determination of this drug isolated in biological fluids (plasma and urine), such as LC coupled to fluorescence and tandem mass spectrometry (2, 5-7), or combined with other drugs (8-9) have been related. Different LC methods for determination of this antihypertensive have been reported for the indication of OLM stability (10-13), but CE has not been used previously for this purpose. CE has many advantages over LC with respect to separation efficiency, consumption of reagents and samples, analysis time and simplicity of instrumentation (14). Nevertheless, LC is still the dominant technique in pharmaceutical analysis, but the extensive use of CE will generate complementary and alternative methods. On the other hand, the main component and structurally related degradants and impurities in pharmaceutical formulations have similar chemical properties and thus

make resolution difficult. However, the greater separation efficiency of CE makes this type of pharmaceutical analysis possible (15).

CE is actually a family of techniques, with distinct applicability toward the separation of compounds of different chemical character, size, and structural features. Among the members of the family, micellar electrokinetic chromatography (MEKC) is largely used in the analysis of neutral pharmaceuticals. In MEKC, a surfactant is added to the running buffer in a concentration higher than its critical micelle concentration, generating a pseudo stationary phase, in which solute partition takes place (16).

At the moment there is only one published CE method for OLM in coated tablets (17). This method focused on the detection limit (sensitivity) of the technique, but it was not systematically developed to have a proven stability indicating power. So, the aim of the present study was to develop and validate in light of the current ICH guidelines (18-19) a stability-indicating MEKC method for the determination of this drug in solid pharmaceutical dosage forms, establishing comparison with the validated LC method, previously validated, and contributing to the research of new alternatives with advantages for the quality control of pharmaceutical formulations.

Experimental

Chemical and Reagents

The OLM reference substance (RS) was supplied by Sequoia Research Products (Oxford, UK), and diclofenac potassium internal standard (DICK, IS) was purchased from Fracionata (São Paulo, Brazil). One batch of Benicar[®] (Sankyo Pharma, Brazil) tablets, containing 20mg of OLM per dose was obtained from commercial sources within their shelf life period. The excipients contained in the

dosage form (cellulose microcrystalline, low substitution hypromellose, lactose monohydrated, hypromellose, magnesium stearate, talc, titanium dioxide, hypromellose) were all pharmaceutical grades and acquired from different distributors.

Both SDS and analytical grade boric acid were acquired from Synth (São Paulo, Brazil). For all of the analyses, purified water was prepared using a Milli-Q Plus[®] (Millipore, Bedford, USA). All other reagents and chemicals used were of pharmaceutical or special analytical grade.

Apparatus

MEKC experiments were performed on an Agilent 3D CE apparatus (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with an autosampler, a photodiode array (PDA) detector, a temperature controlling system (4 – 60°C), and power supply able to deliver up to 30 kV. CE ChemStation software was used for instrument control, data acquisition and analysis.

The RP-LC method was carried out on a Shimadzu LC system (Kyoto, Japan) which consisted of a LC-10AD pump, a SPD-M10ADVP photodiode array (PDA) detector, a SLA-10ADVP system controller, a DGU-14A degasser and a Rheodyne[®] 7725i manual injector with a 20 µL loop. Data were acquired and processed using CLASS-VP software (version 6.1).

Photodegradation was carried out in a photostability UV chamber (1.0 x 0.17 x 0.17 m) with mirrors and equipped with an UV-A lamp (Orion[®], 352 nm, 30 W, 130 V) and UV cuvettes (Ultra Vette[®], São Paulo, Brazil) were used as a container for samples. For thermal stability studies, a dry air oven (Biomatic[®], Porto Alegre, Brazil) was used.

The Ultrabasic potentiometer (Denver Instrument, São Paulo, Brazil), was

used to determine the pH of all solutions.

Preparation of standard solutions and pharmaceutical samples

Stock solution of OLM RS ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) was prepared by weighing accurately 10 mg of this drug and dissolving in acetonitrile. Working solutions ($2 - 100 \mu\text{g mL}^{-1}$) were prepared by diluting appropriately the stock solutions with acetonitrile. To each flask was added DICL IS solution, previously prepared in methanol, in a constant aliquot of $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. The stock solution of OLM RS was prepared daily for each analysis, due to instability, and the DICL IS was stored at $8 \pm 2^\circ\text{C}$, protected from light, and daily diluted to an appropriate concentration with methanol.

Twenty units of tablets were weighed and the average weight was calculated. The samples were crushed to a fine powder and an amount of this, equivalent to 10 mg OLM from the pharmaceutical formulation, were transferred to 50 mL volumetric flask. After, the volume was adjusted with acetonitrile and sonicated by 15 min, and filtered through quantitative filter paper (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany). Aliquots of this solution were diluted to give a final concentration of $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. The solutions were filtered through a $0.22 \mu\text{m}$ membrane filter (Millipore®) before injection, and an appropriate portion was placed in a CE vial. For all quantitative determination, a constant amount of DICL ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$), previously solubilized in methanol, was added to the drug solution.

Preparation of BGE Solution

The optimized BGE aqueous solution was prepared weighing separately boric acid and SDS quantities, equivalent to 100 mM, respectively. Posterior dilutions were done with boric acid solution to obtain 10 mM final concentration. The SDS

solution was also diluted to 5 mM, using a 10 mM boric acid solution, previously prepared, such as diluent. The pH was adjusted to 6.5, by adding sodium hydroxide 0.1 N, and the volume completed to 50 mL with the same diluent. The solution was daily prepared and filtered.

Electrophoretic Procedure

Separation was carried out in to a fused-silica capillary column housed in a cartridge (40.0 cm length × 50 µm i.d., 10cm to the detector, shortway) with a detector window 100 µm × 800 µm, thermostated at 25 °C, and detection at 257 nm using a PDA detector. At the beginning of each working day, the capillary was conditioned by rinsing with 0.1 M sodium hydroxide for 30 min, water for 15 min, and finally with the buffer solution for 15 min. To achieve high migration time reproducibility between injections, the capillary was conditioned with 0.1 M sodium hydroxide (3 min), water (1 min), and a running BGE solution (3 min). Samples were injected using the hydrodynamic injection for 5 s at 50 mbar and a constant voltage of 30 kV was applied during the analysis. Since electrolysis can change the EOF and affect the migration time, efficiency and selectivity, after each three injections the running electrolyte solution was replaced by a fresh solution. CE ChemStation software (version A 09.01) was used for instrumentation control, data acquisition, and analysis.

LC Procedure

The validated isocratic LC method applied for the analysis of OLM in pharmaceutical dosage forms is described elsewhere possible (20). The elution was carried out on a Phenomenex[®] RP-18 column (250 mm x 4.6 mm i.d., particle size 5

µm) with a guard column (4 x 3 mm i.d.) packed with the same material. The mobile phase consisted water:triethylamine:acetonitrile (40:0.3:60 v/v/v, pH adjusted to 6.3 with phosphoric acid). The flow rate was 1.2 mL min⁻¹. Detection was performed at 257 nm at room temperature. The injection volume was 20 µL.

Method Validation

This method was validated using samples of pharmaceutical formulation of OLM with the label claim of 20 mg by determinations of the following parameters: specificity, linearity, LOD, LOQ, precision, accuracy, robustness, stability, and system suitability test, following the International Conference on Harmonization (ICH) guidelines (18-19).

Forced Degradation Studies

The stability-indicating capability of the method was determined by subjecting an OLM RS solution (1000 µg mL⁻¹) to accelerated degradation by acidic, basic, oxidative, thermal, and photolytic conditions to evaluate the interference in the quantitation of the drug.

Solutions for acid and basic hydrolysis study of drug substance were prepared in a mixture of 0.01 M HCl - acetonitrile (70:30 v/v) and 0.01 M NaOH - acetonitrile (70:30 v/v), respectively. Both were protected from light, and stored at room temperature (23 ± 1°C), for analysis after 24 h. The oxidative degradation was induced by storing the solution in a mixture of 3% H₂O₂ - acetonitrile (70:30 v/v), at room temperature (23 ± 1°C) for 24 h, protected from light. For thermal degradation, the reference substance in powder (dry heat) and in solution (moist heat) was exposed at 80 °C in an oven, for 24 h and 1 h, respectively. Photodegradation was

induced by placing the reference substance sample which in solution in a glass dish and quartz cuvettes, respectively, were placed in a light chamber, and exposed to UV-A radiation (352 nm) for 48 h, at room temperature. Control samples were protected from light with aluminum foil and were also placed in the light chamber and exposed concurrently.

Following the degradation period, all samples were prepared for analysis as previously described at item 2.3 and the specificity of the method was established by determining the peak purity of OLM in the degraded samples using a PDA detector.

Specificity

The method specificity was also investigated by observing all interferences encountered from OLM tablets excipients, cited at *Experimental Section*. Their concentration in this dosage form was based on the literature (20) and calculated in relation of its medium weight. The electropherograms of excipients placebo solution (without drugs), and OLM RS and DICL IS ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) solutions were compared to verify the probable interference of the excipients in the OLM quantitation.

Linearity and Limits of Detection (LOD) and Quantitation (LOQ)

The linearity was studied by injecting solutions in the concentration range of 2-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of OLM, and fix concentration of DICL IS ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$). RS solutions were prepared at eight concentrations (2, 5, 10, 25, 50, 75, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and injected in triplicate every day, during three consecutive days. The ratio of peak area values of OLM RS and DICL IS was computed and analyzed using linear least-squares regression parameters (correlation coefficient, slope, intercept).

The LOD and LOQ values were mathematically determined through calibration curve. The aforementioned factors (3.3 and 10) were multiplied by the ratio from the residual standard deviation and the slope, according to the guideline (18).

Precision

The precision was determined by repeatability (intra-day precision) and intermediate precision (inter-day precision) studies. Repeatability was analyzed through the preparation of six samples containing $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ of OLM tablets and DICL IS, injected in triplicate, in the same day ($n = 6$). Intermediate precision was tested of repeating the same procedure in three different days ($n = 18$) and comparing the results among them. The data precision of tablets were expressed such as the percent relative standard deviation (RSD %).

Accuracy

The accuracy of the method was evaluated by preparing a synthetic excipients representative of OLM tablets, and spiking three samples with OLM RS in the concentration levels corresponding to $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ (low), $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (medium) and $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ (high) (i.e. equivalent to 80, 100, and 120%), with fix concentration of DICL IS ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$), were prepared and analyzed. The OLM was extracted from the excipients and determined. Each solution was prepared in triplicate and injected three times. The concentrations and recoveries were calculated against the added concentration.

Stability of Solutions

Solutions of OLM RS, DICL IS, and OLM tablets were prepared according to

the item *Preparation of standard solutions and pharmaceutical samples* in solution at $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ and stored at $8 \pm 2^\circ\text{C}$ (in the refrigerator), and $25 \pm 1^\circ\text{C}$ (room temperature). The stability of these solutions was checked after 24 and 48 h and compared against freshly prepared solutions. The initial peak area was considered 100% and the recoveries in followed days were evaluated.

Robustness

Robustness of the proposed method was examined by evaluating the influence of small variations of the most important procedure variable such buffer concentration (9.5 and 10.5 mM), SDS concentration (4.5 and 5.5 mM), BGE pH solution (6.2 and 6.7), voltage (28 KV), and temperature system (23°C and 27°C). Analyses were carried out with OLM RS and DICL IS solution at $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, in triplicate. Only one parameter was changed in the experiments at a time, and the effects were studied based on RSD (%) values obtained among the parameters analyzed.

System suitability test

The system suitability test is an integrated part of the analytical method and it ascertains the suitability and effectiveness of the operating system. It was also carried out to evaluate the resolution and reproducibility of the system for the analysis to be performed, using five replicate injections of OLM RS and DICL IS solution containing $50 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Results and Discussion

To obtain the optimum capillary electrophoretic conditions, some electrolyte solutions containing sodium phosphate, potassium phosphate, sodium tetraborate, and boric acid, respectively, were investigated adding the surfactant SDS, in the pH range from 6.0 - 7.5, and best results were obtained with the borate solution.

The BGE pH solution containing 10 mM boric acid and 5 mM SDS was evaluated in the range from 6.0 - 7.5, and the pH 6.5 was selected with peak symmetry (about 1.84), since lower pHs resulted in an increase of the migration time and peak width. The best parameters such as peak symmetry (about 1.84) and resolution were obtained with BGE solution containing 10 mM boric acid and 5 mM SDS (95:5, V:V), at pH 6.5. pH values lower than 6.5 resulted in a decrease of migration time and resolution between peaks and higher than 6.5 originated a increase of migration time and peak width.

The effect of BGE concentration was studied in the range from 5 to 20 mM, with constant 5 mM SDS concentration, at pH 6.5. How the peak symmetry and the migration time increased with the increase of borate buffer concentration, the 10 mM borate solution was selected due to the low current and suitable peak parameters generated.

The influence of the SDS was also investigated in the concentration range from 5 to 50 mM, with constant 10 mM borate buffer concentration, at pH 6.5. The OLM migration time and peak symmetry increased with the increase of the concentrations, achieving better efficiency combined with short analysis time with 5 mM SDS.

The effect of the voltage was investigated from 20 to 30 kV, which showed shorter analysis time, better separation efficiencies with values up to 25 kV potential,

that showed also the best peak parameters and acceptable current (about 6.0 μA), without excessive Joule heating.

The capillary temperature was investigated within 20 and 30 $^{\circ}\text{C}$, and the temperature of 25 $^{\circ}\text{C}$ was chosen due to the short analysis time. The sample solutions were hydrodynamically injected at 50 mbar changing the injection time between 3 to 8 s, showing increased peak width and shape deformed after 5 s, thus injection time selected was 5 s.

As demonstrated, the MEKC method parameters were optimized to obtain the best peak area, resolution and symmetry, combined with short migration time, achieved with the 10 mM solution of borate buffer and 5 mM SDS at pH 6.5, with detection at 257 nm. The use of low concentrations levels of BGE and SDS contribute to higher the capillary and the equipment validity, due to the lower current generated.

The use of an IS is recommended to compensate injection errors and minor fluctuations of the migration time improving the quantitative analysis. Then, several drugs including nimesulide, losartan, hydroclortiazide, and salicylic acid were tested, however only the diclofenac potassium (Fig. 1C), a non-steroidal anti-inflammatory drug, demonstrated to be a suitable candidate with well resolved peak.

The electropherogram of OLM RS and DICL IS with migration times of 2.24 and 2.50 min, respectively, is shown in Fig. 2A.

A stability-indicating method is defined as an analytical technique that accurately quantifies the active ingredients without interference from degradation products, process impurities, excipients, or other potential impurities (22). Thus, the evaluation of stability-indicating capability and selectivity of the proposed method was done submitting the OLM RS to several forced degradation conditions.

The results proved that when this drug was submitted to acidic, basic, and oxidative conditions the electropherograms showed a significant OLM RS area decrease equivalent to 63.48%, 57.05%, and 42.12%, respectively, and one additional peak at 2.98 min, in all situations (Fig. 2B, 2C, and 2D). This drug was considered to be stable when exposed to dry heat, in solid state (Fig. 2E), but when exposed to moist heat, in solution (Fig. 2F), and photolytic condition, there was no significant area decrease in both cases, correspondingly to 8.23% and 9.49%. In the last two stress situations, any additional peak was observed due to the low method sensibility.

The peak purity indexes confirmed that there was no interference of any other substance at the OLM RS (2.24 min), DCL IS (2.50 min), and major degradation product (2.98 min) migration times, showing that they were 99.9% pure in all circumstances. Thus, it was confirmed that there was no interference of any other substance in the migration time of the drug. Besides, was verified that the OLM peak presents appropriate resolution and selectivity in relation to the degradation product formed.

In relation to diode-array spectrum (200 – 400 nm) analysis, the degradation product, obtained in all stress conditions, had the same spectrum and migration time. Thus, since the OLM is the ester prodrug of OL, it is reasonable to think that this degradation product is OL. However, OL reference substance should be used to confirm this assumption.

According to results, the proposed method can be considered stability-indicating, once it succeeded not only in separate, but also in evaluate qualitatively and quantitatively the OLM in presence of the degradation product formed.

Furthermore, the degradation studies showed that this ester prodrug is susceptible to hydrolysis and oxidation, thus, one must be careful when manipulating the drug.

The specificity of the method towards the drug was established through a determination of the purity peak of the analyte and the IS in the working standard solution using a PDA detector. No interference from formulation excipients was found, showing that the peaks were free from any coeluting peak, demonstrating that the proposed method is specific for the analysis of OLM.

The statistical parameters of the analytical curve and estimates of LOD and LOQ for both methods are represented by Table 1. The calibration curves proved to be linear over the 2 - 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ range. Linear regression of concentration versus peak area ratio plots resulted in an average of coefficient correlation (r) greater than 0.999. The validity of the assay was verified by means of analysis of variance (ANOVA), which demonstrated that the regression equation was linear ($F_{\text{calculated}} = 1.6 \cdot 10^3 > F_{\text{critical}} = 4.96; p = 0.05$) with no deviation from linearity ($F_{\text{calculated}} = 6.0 \cdot 10^{-2} < F_{\text{critical}} = 3.71; p = 0.05$).

The LOD and LOQ were estimated to be 2.47 and 7.49 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively, indicating a suitable sensitivity of the method.

The results of precision are summarized in Table 2. The low RSD (%) obtained for the repeatability (< 2.0%) and intermediate precision (1.69 %) for tablets, showed the good precision of the MEKC method.

The accuracy results for tablets showed good recovery and are listed in Table 2. Accuracy OLM results, at three levels by the standard addition technique, range from 98.41 to 101.52%, with RSD lower than 2.0%. These values showed the good accuracy of the proposed method.

The results of variables experimental range evaluated were within the acceptable deviation (RSD < 2.0%). There were non-significant changes of the migration time and peak area ratios, and the electropherogram pattern compared to the optimized conditions, indicated that the proposed method is robust under the conditions tested.

The stability of OLM RS, DICL IS, and OLM tablets solution in acetonitrile was determined by monitoring the peak area ratio of these solutions over a period of two days. The results showed that the peak area RSD (%) was lower than 2.0%, and no significant degradation was observed within 24 h, in both temperatures tested. After 48 h an extra peak was observed.

The results obtained in system suitability test were satisfactory in accordance with the literature (23) and ensure that the MEKC system generates trustful results. The parameters tested were within the acceptable range (RSD < 2.0%), indicating that the method is suitable for the analysis intended.

The MEKC method validated in this paper was applied in parallel with the LC method developed previously by our group. The results obtained from both methods were compared statistically by ANOVA, using F -test (Table 4), and does not reveal significant difference between the experimental values obtained for coated tablets by MEKC and LC methods. The calculated F -value for tablets ($F_{calculated} = 2.13$) was found to be less than the critical F -value ($F_{critical} = 7.71$), at 5% of significance level. This fact points out that MEKC can be used as an alternative method to LC to quantify OLM tablets with a high degree of reliability.

Conclusion

The proposed MEKC method can be considered a stability indicating, due to the capability to detect the OLM in presence of its degradation product, originating results as good as the LC method. Therefore, the proposed method was successfully applied such as an alternative tool for the quantitative analysis of OLM in pharmaceutical dosage form, representing an improvement for the quality control, and also contributing to assure the therapeutic efficacy of the drug.

Acknowledgment

The authors wish to thank CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for the support.

References

- (1) Norwood, D., Branch, E., Smith, B., Honeywell, M. (2002) *P & T*. **27**, 611.
- (2) Laeis, P., Puchler, K., & Kirch, W. (2001) *J. of Hypertens. Suppl.* **19**, S 21.
- (3) Sagirli, O., Onal, A., Toker, S.E., Sensoy, D. (2007) *Chromatographia* **66**, 213.
- (4) Koike, H., Konse, T., Sada, T., Ikeda, T., Hyogo, A., Hinman, D., Saito, H., Yanagisawa, H. (2003) *Olmesartan Medoxomil, a novel potent angiotensin II bloker. Annual Report Sankyo Research Laboratories*, pp. 55.
- (5) Lui, D., Hu, P., Matsushima, N., Li, X., Li, L., Jiang, J. (2007) *J. Chromatogr. B* **856**, 190.
- (6) Nakamura, H., Inoue, T., Arakawa, N., Shimuzi, Y., Yoshigae, Y., Fujimori, I., Shimakawa, E., Toyoshi, T., Yokoyama, T. (2005) *Eur. J Pharmacol.* **512**, 239.
- (7) Vaidya, V.V., Roy, S.M.N., Yetal, S.M., Joshi, S.S., Parekh, S.A. (2008) *Chromatographia* **67**, 147.
- (8) Sagirli, O., Onal, A., Toker, S.E., Sensoy, D. (2007) *Chromatographia* **66**, 213.
- (9) Najma, S., Saeed, A.M., Shahid, A.S., Shahnawaz, S. (2008) *Chin. J. Chromatogr.* **26**, 544.
- (10) Murakami, T., Konno, H., Fukutsu, N., Onodera, M., Kawasaki, T., Kusu, F. (2008) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **47**, 553.
- (11) Rane, V.P., Patil, K.R., Sangshetti, J.N., Yeole, R.D., Shinde, D. (2009) *Chromatographia* **69**, 169.
- (12) Trivedi, P., Kartikeyan, C., Kachave, R., Bhadane, R. (2009) *J. Liquid Chromatogr & Rel. Technol.* **32**, 1516.
- (13) Sharma, N.R., & Pancholi, S.S. (2010) *Acta Pharm.* **60**, 13.

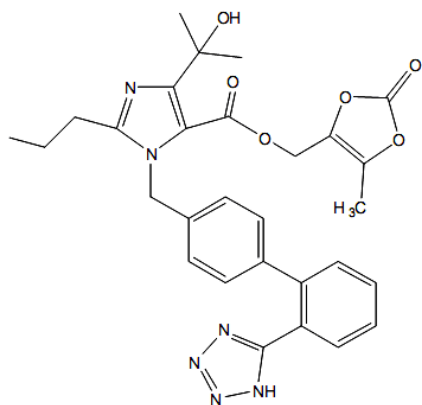
-
- (14) Currell, G. (2000) in *Analytical instrumentation, performance characteristics and quality, Analytical Techniques in the Sciences*, Wiley (Eds), New York, NY, 172.
- (15) Altria, K.D., & Rogan, M.M. (2006) in *Introduction to Quantitative Applications of Capillary Electrophoresis in Pharmaceutical Analysis*, Vol. VI, Beckman (Eds), Fullerton, USA.
- (16) Altria, K.D. (1993) *J. Chromatogr.*, 245.
- (17) Çelebier, M., & Altınoz, S. (2007) *Chromatographia* **66**, 929.
- (18) International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH Steering Committee (2005) *Stability Testing of New Drugs Substance and Products Q1A(R2)*, Geneva, Switzerland.
- (19) International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH Steering Committee (1996) *Validation of Analytical Procedures: Methodology Q2B*, Geneva, Switzerland.
- (20) Bajerski, L., Rossi, R.C., Dias, C.L., Fröhlich, P.E., Bergold, A.M. (2008) *Chromatographia*, **68**, 991-996.
- (21) Rowe, R.C., Sheskey, P.J., & Welle, P.J. (2000) in *Handbook of pharmaceutical excipients*, R.C. Rowe, P.J. Sheskey, & P.J. Welle (Eds), Washington.
- (22) Alsante, K.M., Ando, A., Brown, R., Ensing, J., Hatajik, T.D., Kong, W., Tsuda, Y. (2007) *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**, 29.
- (23) *The United States Pharmacopoeia* (2009) 32th Ed. United States Pharmacopoeia Convention, Inc., Rockville, MD.

Figure Legends

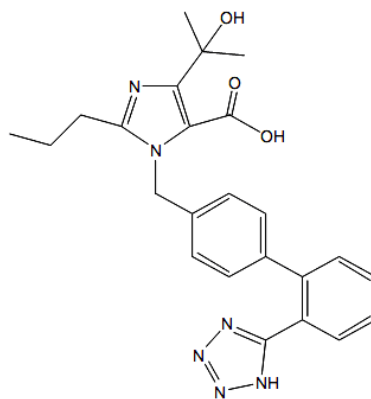
Fig. 1 - Chemical structure of olmesartan medoxomil (A), olmesartan (B), and diclofenac potassium (C).

Fig. 2 A-G - Typical MEKC electropherograms of: (A) OLM reference substance solution ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$): peak = 1; DICL internal standard: peak = 2; and after degradation under: (B) acid hydrolysis 24 h: peak 3 = degradation form; (C) alkaline hydrolysis 24 h: peak 3 = degradation form; (D) oxidative stress 24 h: peak 3 = degradation form; (E) dry heat stress 24 h; (F) moist heat stress 1 h; (G) photolytic stress 48 h. Electrophoretic conditions: 10 mM boric acid: 5 mM SDS (95:5; v/v) pH 6.5; fused-silica capillary column (40.0 cm length \times 50 μm i.d.); hydrodynamic injection time of 5 s at pressure 0.5 psi; separation voltage 30 kV; and column temperature 25 °C with detection at 257 nm using PDA detector.

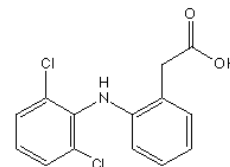
Fig. 1 –



**Olmesartan medoxomil
(ester produg)
(A)**



**Olmesartan
(free carboxylic form)
(B)**



**Diclofenac potassium
(C)**

Fig. 2 –

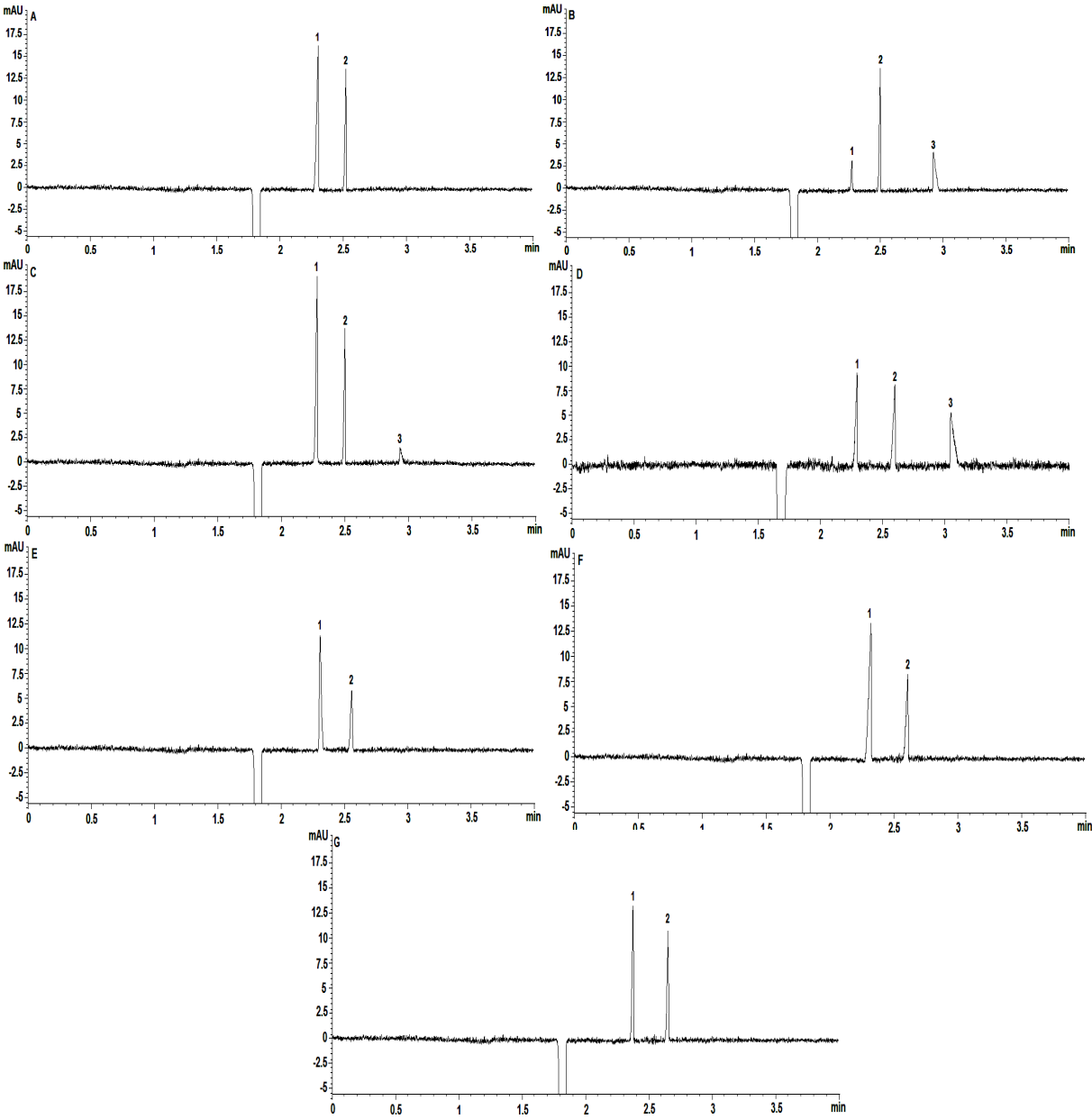


Table 1 – Validation parameters evaluated for MEKC and LC methods.

| Validation parameter | MEKC method | LC method |
|---------------------------------------|--------------------|------------------|
| Linearity | | |
| Range ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | 2 - 100 | 10 – 30 |
| Intercept | 0.0323 | 11444 |
| Slope | 0.0443 | 50716 |
| Correlation coefficient | 0.999 | 0.999 |
| LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | 2.47 | 0.73 |
| LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | 7.49 | 2.22 |
| Precision | | |
| Repeatability % ($n = 6$) | 100.96 | 99.39 |
| RSD % ^b | 1.89 | 1.40 |
| Intermediate precision % ($n = 18$) | 101.06 | 99.41 |
| RSD % ^b | 1.60 | 1.44 |
| Accuracy | | |
| Mean recovery % ($n = 9$) | 100.02 | 100.24 |
| RSD % ^b | 1.38 | 0.96 |

^b Relative standard deviation.

Table 2 – Results of the system suitability test.

| Parameter | OLM (RS)^a | DICL (IS)^a |
|---|---------------------------------|---------------------------------|
| Theoretical plates | 88014 | - |
| Tailing factor | 1.84 | 1.13 |
| Resolution | 10.49 | - |
| Migration time (min) | 2.24 (RSD ^b = 1.82%) | 2.50 (RSD ^b = 1.50%) |
| The peak area ratio of OLM to DICL (Injection repeatability) | 1.67 (RSD = 0.93%) | |

^a Mean of five replicates.

^b Relative standard deviation.

Table 3 – MEKC conditions and investigated range during robustness testing.

| Variable | Range investigated | Benicar (%)^a |
|---------------------------|---------------------------|--------------------------------|
| Buffer pH | 6.3 | 99.89 |
| | 6.7 | 97.22 |
| Buffer concentration (mM) | 9.5 | 97.65 |
| | 10.5 | 97.84 |
| SDS concentration (mM) | 4.5 | 100.78 |
| | 5.5 | 98.99 |
| Temperature (°C) | 23 | 98.91 |
| | 27 | 100.35 |
| Voltage (kV) | 28 | 99.41 |
| Solution stability | 8 ± 2 °C (24 h) | 99.86 |
| | 23 ± 2 °C (24 h) | 97.38 |
| Normal conditions | - | 99.18 |

^a Each value is the mean of three analysis.

Table 4 – Comparison between the MEKC and LC methods in an assay of pharmaceutical formulations.

| Sample | Theoretical amount/mg per tablets | Experimental amount | | | | | |
|--------|---|---------------------|--------|-------------------|-----------------|--------|-------------------|
| | | MEKC ^a | | | LC ^a | | |
| | | mg | % | RSD% ^b | mg | % | RSD% ^b |
| 1 | 20 | 20.23 | 101.18 | 0.60 | 19.88 | 99.39 | 1.40 |
| 2 | 20 | 20.12 | 100.63 | 1.88 | 19.76 | 98.80 | 1.81 |
| 3 | 20 | 20.38 | 101.91 | 1.40 | 20.31 | 101.54 | 1.85 |

^a Each value is the mean of 6 analysis.

^b Relative standard deviation.

6.1 INTRODUÇÃO

A dissolução de um medicamento pode ser definida como o fenômeno em que um fármaco no estado sólido, libera-se de sua forma farmacêutica de administração e entra em solução. Uma vez solubilizado, este se encontra pronto para ser absorvido pelo organismo (AMIDON *et al.*, 1995; KASIM *et al.*, 2003). No Brasil, os ensaios de dissolução passaram a ser exigidos para o registro de medicamentos, a partir de 1999, com a introdução dos medicamentos genéricos (MARCOLONGO, 2003).

O ensaio de dissolução é um requisito considerado fundamental na indústria farmacêutica por assegurar a qualidade das formas farmacêuticas sólidas de uso oral. Desse modo, é utilizado para garantir a qualidade lote a lote, estabelecer correlações *in vitro/in vivo* (CIVIV), orientar o desenvolvimento de novas formulações e assegurar a uniformidade da qualidade e do desempenho do medicamento, mesmo após algumas modificações. Permite, ainda, a otimização de formas farmacêuticas, não somente na fase de desenvolvimento e monitoramento dos processos de fabricação, mas também durante os estudos de estabilidade (SKOUG *et al.*, 1996; DRESSMAN *et al.*, 1998; ADAMS *et al.*, 2001; BRASIL, 2002).

Na literatura encontra-se disponível teste de dissolução para os comprimidos de OLM associados à hidroclorotiazida, com determinação cromatográfica da porcentagem de substância ativa liberada (SAGIRLI *et al.*, 2007). As condições selecionadas para o teste foram: equipamento 2 (pás), rotação de 50 rpm e tampão fosfato de potássio monobásico pH 6,8 (900 mL) como meio de dissolução. Para o desenvolvimento do ensaio, os autores não relataram a utilização dos parâmetros de validação estabelecidos pelos compêndios oficiais para validação do mesmo (USP 32, 2009; PHAMACOPEIAL FORUM, 2004).

Face ao exposto, este capítulo apresenta o teste de dissolução, desenvolvido e validado considerando as características físico-químicas da OLM, para avaliar a porcentagem dissolvida deste fármaco em comprimidos revestidos. O teor de substância ativa liberada foi avaliado através da aplicação de métodos quantitativos

por CLAE e espectrofotometria na região do UV, previamente validados. A comparação entre os perfis de dissolução, através dos fatores f_1 (diferença), f_2 (semelhança) e eficiência de dissolução dos medicamentos Benicar[®] (Sankyo) e Olmetec[®] (Pfizer), também foi avaliada, assim como a determinação da cinética de dissolução de ambas as formulações por meio da aplicação dos métodos modelo dependentes.

6.2 ENSAIO DE DISSOLUÇÃO

A extensão de absorção do fármaco depende da velocidade com que o processo de dissolução ocorre, ou seja, pode-se estabelecer uma relação direta entre a dissolução e a eficácia clínica do produto farmacêutico, uma vez que, para difundir-se entre os líquidos do trato gastrointestinal e atravessar as membranas biológicas, o fármaco deve apresentar-se dissolvido (ABDOU, 1995).

Dados de dissolução *in vitro* são de limitado valor se não houver alguma informação disponível sobre sua relevância, quando em comparação com a performance *in vivo* da formulação, especialmente sua biodisponibilidade. Assim, os testes *in vitro* devem ser validados por uma correlação com o perfil de concentração plasmática do fármaco, para que estes possam ser considerados um instrumento significativo de controle de qualidade, sendo úteis como ferramentas para o desenvolvimento de formulações e um indicativo do perfil de biodisponibilidade do mesmo (DRESSMAN *et al.*, 1998; LOBENBERG *et al.*, 2000; FDA, 1997a).

O conhecimento da solubilidade e permeabilidade gastrointestinal dos fármacos torna-se de grande valia, uma vez que estes parâmetros controlam a taxa e a extensão da absorção. Baseados nessas propriedades Amidon e colaboradores (1995) propuseram o sistema de classificação biofarmacêutica (SCB), que além de fornecer bases para ajustar as especificações de dissolução, pode prever quando uma CIVIV pode ser obtida com sucesso. De acordo com o SCB os fármacos podem ser divididos em quatro classes (AMIDON *et al.*, 1995; FDA, 1997a; DRESSMAN *et al.*, 1998; LOBENBERG *et al.*, 2000; DRESSMAN e KRÄMER, 2005):

- Classe I: alta solubilidade (AS) e alta permeabilidade (AP);

- Classe II: baixa solubilidade (BS) e alta permeabilidade (AP);
- Classe III: alta solubilidade (AS) e baixa permeabilidade (BP);
- Classe IV: baixa solubilidade (BS) e baixa permeabilidade (BP).

A CIVIV é esperada quando a dissolução é a etapa limitante da absorção do fármaco na circulação, ou seja, para aqueles com baixa solubilidade. Por essa razão, se o fármaco é altamente permeável e a dissolução é a etapa limitante da absorção (classe II), é muito provável o desenvolvimento de uma CIVIV (AMIDON *et al.*, 1995; FDA, 2000; ROHRS, 2001). Porém, para fármacos da classe IV, além da dissolução do fármaco, a permeabilidade também é uma etapa limitante de absorção, e conseqüentemente, uma CIVIV torna-se limitada ou não é esperada (AMIDON *et al.*, 1995).

Segundo Kasim e colaboradores (2004) um fármaco é dito de alta solubilidade, quando a relação dose/solubilidade em água for \leq a 1 e de alta permeabilidade, quando o mesmo apresentam valores de log P (coeficiente de partição octanol/água) \geq a 1,72. Considera-se, ainda, que na falta de evidências de instabilidade no trato gastrointestinal (TGI), um fármaco será de alta permeabilidade, quando a extensão de sua absorção for maior que 90% da dose intravenosa administrada (LINDENBERG *et al.*; 2004). Portanto, conforme os dados de solubilidade fornecidos por KOIKE e colaboradores (2003) são necessários 110000 ml de água para solubilizar 1g de OLM. Sendo assim, este fármaco, na dose de 40 mg, pode ser considerado de baixa solubilidade, uma vez que o valor desta relação é de 4400. Pode-se inferir, também, com base no valor de log P = 1,00 e biodisponibilidade de 29%, que a OLM possui baixa permeabilidade.

Apesar de não estar disponível na literatura a classificação da OLM no SCB, pode-se sugerir que esta pertence à classe IV, uma vez que apresenta baixa solubilidade e permeabilidade (KOIKE *et al.*, 2003; WEHLING, 2004). Dessa forma, de acordo com Amidon e colaboradores (1995), a CIVIV torna-se limitada ou não é esperada. Entretanto, é possível utilizar dados da biodisponibilidade *in vivo* para seleção das melhores condições para o teste de dissolução, sendo este aplicado como um método de controle de qualidade do desempenho do produto (SIRISUTH e EDDINGTON, 2004).

Segundo Marques e Brown (2002), são vários os desafios no desenvolvimento e validação de métodos de dissolução, devido à variabilidade intrínseca dos mesmos e de fatores que podem afetar o processo de dissolução. Dessa forma, um controle cuidadoso das condições experimentais é necessário para reduzir a variabilidade teste a teste, garantir sua confiabilidade e reprodutibilidade, a fim de assegurar que pequenas alterações na formulação ou no processo de produção sejam detectadas (MARQUES e BROWN, 2002; FORTUNATO, 2005).

Logo, o primeiro passo para o desenvolvimento de um teste de dissolução é a compilação de dados referentes às propriedades físico-químicas do fármaco em questão (MARQUES e BROWN, 2002; MARCOLONGO, 2003; FORTUNATO, 2005). Idealmente, as condições nas quais o ensaio de dissolução deveria ser conduzido, seriam aquelas que mimetizassem as fisiológicas. Entretanto, constatou-se que não há necessidade rigorosa de identidade ao ambiente do TGI, uma vez que as condições físico-químicas do fármaco, fatores relacionados ao pH, estabilidade do mesmo no meio de dissolução e condições *sink* podem predominar na escolha das condições (FDA, 1997a; PHARMACOPEIAL FORUM, 2004).

6.3 ESCOLHA DO MEIO

O conhecimento sobre as propriedades físico-químicas, como a solubilidade em função do pH, assim como o SCB do fármaco são importantes na escolha do meio de dissolução. Neste sistema o fármaco é considerado altamente solúvel quando a dosagem mais alta se dissolve em 250 ml de água na faixa de pH entre 1,0 e 6,8 a 37°C, ou seja, quando o resultado, em volume, da relação dose/solubilidade for menor que 250 ml (FDA, 1997a; FDA, 2000; BRASIL, 2003; LINDENBERG *et al.*, 2004; MENDONZA *et al.*, 2005).

A composição do meio de dissolução deveria ser biorrelevante, ou seja, próxima àquela que existe *in vivo*. A escolha do meio ideal para ensaios de rotina deve estar relacionada com a capacidade discriminativa, estabilidade do fármaco no mesmo e, quando possível, relevância do desempenho *in vivo-in vitro*. Por essa razão, o pH do meio de dissolução deve estar dentro da faixa fisiológica de pH de 1,0 a 6,8, para formas farmacêuticas de liberação imediata, e de 1,0 a 7,2-7,5, para

formas farmacêuticas de liberação modificada. É interessante verificar o valor do pH do meio, antes e após o término do teste, com o intuito de verificar se a capacidade tamponante do mesmo foi adequada (USP 32, 2009; FDA, 2000; NOORY *et al.*, 2000; BROWN *et al.*, 2004; PARK e CHOI, 2006).

Durante o processo de seleção do meio de dissolução, o emprego da água como tal deve ser evitado, pois esta não é biorrelevante, tão pouco apresenta capacidade tamponante. No entanto, sua utilização justifica-se desde que apresente resultados mais discriminativos. Para fármacos pouco solúveis, como é o caso da OLM, a adição de tensoativos pode ser necessária, desde que em baixas concentrações. Entre os meios de dissolução mais utilizados para o desenvolvimento de um teste de dissolução encontram-se: HCl 0,1 e 0,01 M; tampão acetato 0,05 M, pH entre 4,1 a 5,5; tampão fosfato 0,05 M, pH entre 5,8 a 8,0; soluções contendo tensoativos (polissorbatos, lauril sulfato de sódio, óxido de lauril dimetil amina, cetrimida, sais biliares); ácidos e tampões combinados com tensoativos; fluidos gástrico e intestinal simulados com e sem enzimas (NOORY *et al.*, 2000; BROWN *et al.*, 2004; PARK e CHOI, 2006).

O volume do meio de dissolução a ser utilizado no teste depende da condição *sink*, que pode ser definida como a quantidade de solvente não inferior a 3 vezes o volume de meio necessário para obter a solução saturada do fármaco. Entretanto, anteriormente, exigia-se um volume de 5 a 10 vezes o volume necessário para saturação, para manutenção das condições *sink* (MARQUES e BROWN, 2002). Essa condição deve ser mantida para evitar que a velocidade de dissolução seja influenciada, artificialmente, pela aproximação da saturação durante a realização do teste. Também, devido às condições *sink* obtidas naturalmente *in vivo*, os estudos para determinar as taxas de dissolução *in vitro* devem ser conduzidos obedecendo a esse parâmetro (MARQUES e BROWN, 2002; MARCOLONGO, 2003).

6.4 ESCOLHA DO EQUIPAMENTO E ROTAÇÃO

A escolha do equipamento e rotação deve basear-se na capacidade desta permitir, não somente a manutenção das condições *sink*, mas também na obtenção de resultados consistentes, além de admitir algum grau de automação do sistema.

Normalmente, utilizam-se as pás (equipamento 2) para comprimidos e cestas (equipamento 1) para cápsulas, com velocidades de agitação entre 50 a 75 rpm e 50 a 100 rpm, respectivamente. Velocidades de rotação fora destas faixas, não excedendo a 150 rpm, podem ser utilizadas, desde que devidamente justificadas, uma vez que estas devem permitir a liberação adequada do fármaco, não acelerando nem retardando o processo de dissolução (MARQUES e BROWN, 2002; FDA, 1997a).

6.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

O ICH Q2 (R1) (2005) estabelece que, os métodos analíticos utilizados para quantificar o teor de substância ativa liberada durante o teste de dissolução devem ser validados segundo os parâmetros de especificidade, linearidade, exatidão e precisão. Os itens de robustez e estabilidade das soluções no meio devem ser avaliados durante o desenvolvimento do método. Por essa razão, métodos como a CLAE, em função de sua versatilidade e possibilidade de automação, e a espectrofotometria na região do UV, devido sua simplicidade e rapidez, são os mais utilizados para este fim (FORTUNATO, 2005).

➤ Especificidade/ interferência do placebo:

A interferência dos excipientes no método quantitativo deve ser demonstrada através do preparo de um placebo contendo todos os adjuvantes, na mesma proporção do produto acabado, sem adição do fármaco. As amostras são analisadas utilizando o equipamento e o meio de dissolução especificado no método, por no mínimo 1 hora a 150 rpm. A porcentagem de interferência é calculada através da comparação com a solução padrão correspondente a 100% da dose que está sendo avaliada e não deve ser superior a 2%. Caso a interferência exceda este valor, o uso de alternativas como: a aplicação da espectrofotometria de derivada, fator de correção ou a inativação dos excipientes com o uso de compostos químicos gerando um produto não interferente, podem ser utilizados (MARQUES e BROWN, 2002; MARCOLONGO, 2003).

➤ **Faixa de linearidade:**

A linearidade do teste de dissolução deve ser avaliada considerando o perfil de dissolução e não a tolerância ou critério de aprovação do produto. A faixa do teste é estabelecida utilizando cinco concentrações diferentes dentro dos limites de $\pm 20\%$ da menor concentração até $\pm 20\%$ da maior concentração, que podem ser obtidas no perfil de dissolução. O uso de solventes orgânicos para facilitar a solubilidade do fármaco é permitido, desde que não ultrapasse 5% (v/v) na solução final. A linearidade do método é analisada através da aplicação de programas de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, e análise estatística, através da análise de variância (ANOVA) (MARQUES e BROWN, 2002; MARCOLONGO, 2003).

➤ **Exatidão:**

A exatidão, ou porcentagem de recuperação, é avaliada considerando o perfil de dissolução do produto. Em geral, são utilizadas três concentrações dentro da faixa de $\pm 20\%$ da menor até $\pm 20\%$ da maior concentração que podem ser obtidas no perfil de dissolução. Todos os componentes da formulação devem ser utilizados na mesma proporção em que se encontram no produto acabado. Caso o padrão apresente baixa solubilidade no meio de dissolução, proceder conforme o item descrito para faixa de linearidade. A recuperação deve estar entre 95% a 105% das quantidades pesadas (MARQUES e BROWN, 2002; MARCOLONGO, 2003).

➤ **Precisão:**

O parâmetro da precisão do método de dissolução deve ser avaliado através da repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade é analisada a partir do cálculo do desvio padrão relativo, obtido durante a análise de replicatas do teste de dissolução, por um mesmo analista. Já a precisão intermediária pode ser avaliada através da comparação dos perfis de dissolução obtidos por diferentes analistas, em diferentes dias, e, se possível, em diferentes equipamentos. O critério de aceitação deste parâmetro pode ser característico do produto. Vale lembrar que, as mesmas

soluções empregadas no teste de recuperação podem ser utilizadas para avaliar a precisão do método (MARQUES e BROWN, 2002; MARCOLONGO, 2003).

➤ **Robustez:**

A robustez do método deve ser avaliada, a fim de verificar o impacto de pequenas, mas deliberadas mudanças nas condições do mesmo. Este parâmetro deve ser investigado durante a etapa de desenvolvimento do teste de dissolução através de variações na composição do meio de dissolução (pH, concentração de tampão e/ou tensoativo, volume), temperatura da cuba, rotação do equipamento, entre outros. Pode, ainda, ser analisado através de modificações na composição da fase móvel, fluxo, temperatura da coluna, diferentes equipamentos e colunas (PHARMACOPEIAL FORUM, 2004).

➤ **Estabilidade:**

A determinação da estabilidade do fármaco no meio de dissolução e no solvente utilizado para realizar as diluições é importante para verificar se o mesmo mantém-se estável durante o tempo de análise. A faixa aceitável para estabilidade das soluções é de 98 – 102% dentro do período de análise estipulado (USP 32, 2009).

➤ **Interferência dos filtros:**

A avaliação das características dos filtros é realizada com o intuito de verificar não somente se há adsorção do fármaco pelos filtros, mas também se os mesmos liberaram partículas de material para solução analisada. Este parâmetro é avaliado comparando os resultados obtidos com a solução padrão filtrada, centrifugada e não tratada. Para que o filtro possa ser utilizado, os resultados obtidos com a solução padrão filtrada devem ser próximos, entre 98 – 102%, da concentração inicial da solução padrão não tratada e da solução da amostra centrifugada (MARQUES e BROWN, 2002).

6.6 ESPECIFICAÇÕES DO TESTE

Três categorias de ensaios de dissolução para medicamentos de liberação imediata podem ser descritas: dissolução de ponto único, dissolução de dois pontos e perfil de dissolução.

O ensaio de dissolução de um único ponto corresponde a um teste de controle de qualidade de rotina para medicamentos contendo fármacos altamente solúveis. Neste caso, um teste de dissolução de um único ponto (60 minutos ou menos) que demonstre a dissolução de, no mínimo, 85% de substância ativa é suficiente para garantir o controle da uniformidade lote a lote (SKOUG *et al.*, 1996; DRESSMAN *et al.*, 1998; ADAMS *et al.*, 2001; BRASIL, 2002).

O ensaio de dissolução de dois pontos é empregado para caracterizar a qualidade do medicamento e como um teste de controle de qualidade de rotina para certos tipos de medicamentos, como por exemplo, fármacos pouco solúveis em água. Para formulações contendo fármacos pouco solúveis em água, que se dissolvem lentamente, recomenda-se um ensaio de dissolução de dois pontos, ou seja, um a 15 minutos e outro em 30, 45 ou 60 minutos, para assegurar 85% de dissolução, ou um perfil de dissolução (SKOUG *et al.*, 1996; DRESSMAN *et al.*, 1998; ADAMS *et al.*, 2001; BRASIL, 2002).

A avaliação do perfil de dissolução permite visualizar como a dissolução ocorre em função do tempo e, desta forma, é mais conclusiva em relação à dissolução de um único ponto (PHARMACOPEIAL FORUM, 2004). Este tipo de ensaio tem sido empregado como ferramenta no desenvolvimento de formulações, uma vez que evidencia diferenças na dissolução causadas por fatores ligados ao fármaco, aos excipientes e à técnica de fabricação empregada (STORPIRTIS *et al.*, 1998).

6.7 COMPARAÇÃO ENTRE PERFIS DE DISSOLUÇÃO

O perfil de dissolução relaciona a porcentagem de fármaco dissolvido em função do tempo e é aplicado para avaliar e comparar a cinética de dissolução de

produtos farmacêuticos. A determinação da cinética de dissolução permite melhores conclusões a respeito do processo de dissolução de uma formulação por descrever a velocidade deste processo e os pontos nos quais podem ocorrer mudanças significativas da dissolução (POLLI *et al.*, 1996; SKOUG *et al.*, 1996; DRESSMAN *et al.*, 1998; STORPIRTIS, 1999; ADAMS *et al.*, 2001; BRASIL, 2002).

A seleção criteriosa das condições de ensaio deve ser orientada no sentido de obter o máximo poder discriminativo do teste, ressaltar sua capacidade de detecção de eventuais desvios dos padrões de qualidade, inicialmente propostos, e distinguir mudanças significativas na composição ou no processo de produção (MANADAS *et al.*, 2002; USP 32, 2009). Um perfil de dissolução adequado apresenta 100% de liberação do fármaco entre 45 e 60 minutos para produtos de liberação imediata, ou seja, perfis com liberação do fármaco muito rápida não demonstram poder discriminativo (FORTUNATO, 2005).

A avaliação de perfis de dissolução é útil para selecionar formulações durante o processo de desenvolvimento farmacotécnico, avaliar a estabilidade, otimizar formulações, analisar o efeito de determinadas alterações realizadas em produtos já em comercialização, como ferramenta de controle lote a lote e também, para estabelecer a semelhança entre uma formulação genérica e seu produto de referência (ADAMS, 2001; MOORE, 1996).

Na maioria dos casos há uma comparação de um lote de referência com um lote teste. No teste de dissolução, a porcentagem de fármaco dissolvido é medida em determinados tempos de coleta. Entretanto, a avaliação de vários pontos, ou seja, do perfil de dissolução, é mais conclusiva em relação à dissolução em um único ponto (ADAMS, 2001). A comparação de perfis de dissolução entre o produto referência e teste, realizado antes da condução do estudo de bioequivalência, atua como um indicativo do comportamento semelhante dos produtos, mas não garante que os mesmos sejam bioequivalentes (BRASIL, 2004).

Assim, embora afirmações definitivas a cerca da absorção de fármacos só possa ser feita a partir de um estudo clínico, a avaliação do perfil de dissolução

representa uma técnica relativamente rápida e de baixo custo para prever o desempenho *in vivo* de um produto farmacêutico (MOORE e FLANNER, 1996).

Vários métodos têm sido propostos para avaliação comparativa entre perfis de dissolução. Estes podem ser classificados em:

➤ **ANOVA:**

Os modelos baseados na análise de variância (ANOVA) utilizam os dados de dissolução na sua forma original ou como uma transformação simples, e sua análise é capaz de mostrar diferenças estatísticas de nível (tamanho) e formato (paralelismo) (YUKSEL *et al.*, 2000; ADAMS, 2001). De modo geral, acredita-se que o método estatístico baseado neste modelo, apesar de ter aplicação mais complexa, fornece os melhores resultados (SATHE, 1996; YUKSEL *et al.*, 2000; ADAMS, 2001).

➤ **Modelo independente:**

Destacam-se os testes combinados como os fatores f_1 (fator de diferença) e f_2 (fator de similaridade), que comparam diretamente a diferença entre a porcentagem de fármaco dissolvida, em função do tempo, para os produtos teste e referência. É considerado o método de mais fácil aplicação e interpretação, razões pelas quais levaram vários órgãos regulatórios, como FDA e ANVISA, a adotá-los, especificamente, como indicativo da semelhança entre perfis de dissolução (MOORE, 1996).

O fator de diferença f_1 é definido pela equação 6.1:

$$f_1 = \left\{ \left[\sum_{t=1}^n (R_t - T_t) \right] / \left[\sum_{t=1}^n R_t \right] \right\} \times 100 \quad (6.1)$$

Onde:

R_t = porcentagem de fármaco dissolvido do produto de referência no tempo t ;

T_t = porcentagem de fármaco dissolvido do produto teste no tempo t ;
 n = número de coletas.

Essa equação pode ser considerada uma perturbação da fórmula de erro relativo. Ela aproxima o erro percentual das duas curvas. O erro é 0 quando os perfis entre referência e teste são idênticos e aumenta proporcionalmente com a diferença entre os perfis (MOORE, 1996). Valores de f_1 entre 0 e 15 indicam semelhança entre os perfis.

O fator de semelhança f_2 é definido pela equação 6.2:

$$f_2 = 50 \log \{ [1 + (1/n) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2]^{-0,5} \times 100 \} \quad (6.2)$$

Onde:

R_t = porcentagem de fármaco dissolvido do produto de referência no tempo t ;
 T_t = porcentagem de fármaco dissolvido do produto teste no tempo t ;
 n = número de coletas.

Essa equação é uma transformação logarítmica da soma do quadrado do erro. O resultado é 100 quando as curvas são idênticas e diminui, podendo chegar a 0, conforme a diferença entre os perfis aumenta (MOORE, 1996). Dois perfis serão considerados semelhantes caso o valor de f_2 obtido não for inferior a 50. Quando se altera a porcentagem aceita para a diferença de, por exemplo, 2% o valor mínimo de f_2 é 83, enquanto que para uma diferença de 20%, o mínimo é 36 (SHAH, 1998).

Para melhor aplicação deste modelo é importante considerar:

- doze unidades de cada produto;
- no mínimo cinco pontos de coleta;
- a inclusão de apenas um ponto acima de 85% de dissolução, para ambos os produtos;

- o uso de médias, cujos coeficientes de variação para os primeiros pontos (15 minutos, por exemplo) não devam exceder 20% e para os demais 10%;
- nos casos em que a dissolução for muito rápida, apresentando valor igual ou superior a 85% de fármaco dissolvido em 15 minutos, os fatores f_1 e f_2 perdem seu poder discriminativo e, portanto, não é necessário calculá-los (BRASIL, 2004).

➤ **Modelo dependente:**

Baseia-se em funções matemáticas distintas que, após seleção de uma função adequada, permitem a avaliação dos perfis em relação aos parâmetros derivados dos modelos aplicados. Os exemplos mais comuns encontrados na literatura são: ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Hixson-Crowell, Korsmeyers-Peppas, quadrático, Weibull, entre outros (POLLI, 1996; O'HARA *et al.*, 1998).

(1) Cinética de zero ordem:

As formas farmacêuticas que seguem este perfil liberam a mesma quantidade de fármaco por unidade de tempo, constituindo-se como uma das melhores formas de veicular fármacos para liberação controlada (VARELAS, 1995). Este modelo pode ser expresso, de um modo simples, pela equação 6.3:

$$Q_t = Q_0 + K_0 t \quad (6.3)$$

Onde:

Q_t : quantidade de fármaco liberada no tempo t ;

Q_0 : quantidade inicial de fármaco na solução (na maioria das vezes, $Q_0 = 0$);

K_0 : a constante de liberação de ordem zero.

(2) Cinética de primeira ordem:

As formas farmacêuticas que seguem este perfil liberam uma quantidade de fármaco proporcional à quantidade restante no seu interior, por unidade de tempo, de modo que a quantidade de fármaco liberada vai diminuindo (MULYE e TURCO, 1995). Este modelo pode ser expresso pela equação 6.4:

$$\ln Q_t = \ln Q_0 + K_1 t \quad (6.4)$$

ou em logaritmos decimais através da equação 6.5:

$$\log Q_t = \log Q_0 + K_1 t / 2,303 \quad (6.5)$$

Onde:

Q_t : quantidade de fármaco liberada no tempo t ;

Q_0 : quantidade inicial de fármaco na solução (na maioria das vezes, $Q_0 = 0$);

K_1 : a constante de liberação de primeira ordem.

(3) Modelo de Higuchi:

Este modelo descrever a liberação de fármacos, a partir de diversas formas farmacêuticas de liberação modificada, como um processo de difusão baseado na Lei de Fick, dependente da raiz quadrada do tempo. De modo geral, podemos resumir este modelo à equação 6.6:

$$Q_0 = K_H t^{1/2} \quad (6.6)$$

Onde:

Q_0 : quantidade inicial de fármaco na solução;

K_H : constante de liberação de Higuchi;

$t^{1/2}$: raiz quadrada do tempo t .

(4) Modelo de Hixson-Crowell:

Aplica-se aos comprimidos em que a dissolução decorre em planos paralelos à superfície, cujas dimensões do mesmo diminuem proporcionalmente, de modo que a geometria inicial se mantém durante todo o tempo. Hixson e Crowell (1931), reconhecendo que a área de uma partícula regular é proporcional à raiz cúbica do seu volume, descreveram um modelo que pode ser descrito pela equação 6.7:

$$Q_0^{1/3} - Q_t^{1/3} = K_s t \quad (6.7)$$

Onde:

Q_0 : quantidade inicial de fármaco na solução;

Q_t : quantidade de fármaco liberada no tempo t ;

K_s : uma constante que incorpora a relação superfície/volume.

(5) Modelo de Korsmeyers-Peppas:

Foi desenvolvido por Korsmeyers e Peppas para analisar a liberação de formas farmacêuticas poliméricas, quando o mecanismo de liberação não é bem conhecido ou quando o mesmo estiver envolvido em mais de um tipo de liberação (Korsmeyer, Peppas, 1981; Korsmeyer *et al.*, 1983). Neste modelo, a relação entre a velocidade de liberação e o tempo é representada pela equação 6.8:

$$M_t/M_\infty = K t^n + b \quad (6.8)$$

Onde:

M_t/M_∞ : fração do fármaco liberada ao longo do tempo t ;

K : constante de liberação;

n : expoente de liberação;

b : liberação inicial rápida.

Peppas (1985) usou o valor de n para caracterizar os diferentes mecanismos de liberação, tendo chegado a valores de $n = 0,5$ para a difusão (modelo de Fick) e valores de n mais elevados entre 0,5 e 1,0 num sistema plano, para a transferência de massa, segundo um modelo não-Fickiano. No caso de cilindros (comprimidos) n é 0,45, em vez de 0,5, e 0,89 em vez de 1,0.

Modelos que se fundamentam em estudos da cinética de dissolução possibilitam conclusões a respeito do processo de dissolução de uma determinada formulação, uma vez que permitem conhecer: a velocidade do processo; a quantidade máxima dissolvida e pontos nos quais podem ocorrer mudanças significativas da dissolução (O'HARA *et al.*, 1998; POLLI *et al.*, 1996; MOORE E FLANNER, 1996). Nesse tipo de análise, avalia-se a quantidade de fármaco dissolvida em diferentes intervalos de tempo, obtendo-se um perfil definido por tempo *versus* porcentagem de fármaco dissolvida. Vários parâmetros cinéticos podem ser descritos a partir desta relação, tais como: constante de velocidade de dissolução (k); meia-vida de dissolução ($t_{50\%}$) e quantidade dissolvida em determinado tempo (Q_t) (O'HARA *et al.*, 1998; POLLI *et al.*, 1996; CID, 1981).

As equações 6.9 e 6.10 representam a meia-vida de dissolução para os modelos de zero e primeira ordem, respectivamente:

$$t_{50\%} = Q_{\infty}/2 \times K_0 \quad (6.9)$$

$$t_{50\%} = 0,693/K \quad (6.10)$$

Onde:

$t_{50\%}$: tempo de meia-vida de dissolução;

Q_{∞} : quantidade de fármaco dissolvida no infinito;

K : constante de liberação.

➤ **Eficiência de dissolução:**

Além dos modelos cinéticos traçados a partir do perfil de dissolução, a eficiência de dissolução (ED%), sugerida inicialmente por Khan e Rhodes (1975), pode ser incluída como um importante parâmetro de cinética de dissolução. Este termo pode ser definido como a avaliação integral comparativa da área sob a curva (ASC) do perfil de dissolução em relação a área representada pelo tempo total de ensaio. A ED% permite a comparação mais fidedigna entre dois produtos. Além disso, este parâmetro está relacionado com a quantidade real de fármaco que se encontra dissolvida no meio e, desta forma, pode-se ter um melhor prognóstico dos resultados *in vivo* (SKOUG *et al.*, 1997; OFOEFULE *et al.*, 2001).

O uso da ED%, com o propósito de comparação entre as formulações, tem sido defendido por alguns autores, uma vez que a biodisponibilidade é também determinada pelo cálculo da ASC. Vale salientar que, embora os fatores f_1 e f_2 sejam adotados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como critérios de aceitação entre produtos (BRASIL, 2004), a ED% é capaz de apresentar diferenças entre formulações que não sejam detectadas somente por esses fatores (SERRA e STORPIRTIS, 2007). Sendo assim a ED% pode ser expressa pela equação 6.11:

$$ED\% = \frac{ASC_{(0 - T \text{ minutos})}}{ASC_{TR}} \times 100 \quad (6.11)$$

Onde:

ED%: eficiência de dissolução;

ASC: área sob a curva no tempo decorrido de ensaio;

ASC_{TR}: área total do retângulo;

6.8 MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e métodos, assim como os resultados do desenvolvimento e validação do método de dissolução, comparação dos perfis e cinética de dissolução

dos comprimidos revestidos da OLM encontram-se descritos no artigo: *“Development and validation of a discriminating in vitro dissolution method for a poorly soluble drug, olmesartan medoxomil: comparison between commercial tablets”*, publicado no periódico internacional *American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS)*, v. 11, p. 637-644, 2010.

6.9 CONCLUSÃO

- Em função da OLM ser considerada um fármaco de classe IV, segundo o SCB, não foi possível estabelecer uma CIVIV. Desse modo, o método de dissolução foi desenvolvido e validado visando apenas o controle de qualidade dos comprimidos do fármaco em estudo;
- O rótulo e a bula do produto mencionam que a OLM encontra-se na forma de comprimidos revestidos. Sendo assim, os testes de dissolução deveriam ser conduzidos, segundo os compêndios oficiais, em dois estágios, um ácido e um tampão. No entanto, durante o desenvolvimento do teste observou-se que o fármaco liberou mais que 10% na etapa ácida, indicando, assim, que o revestimento especificado pelo fabricante objetiva-se a mascarar as características organolépticas do produto e não ao seu local de dissolução no TGI;
- Foram realizados testes preliminares de dissolução, em três cubas, com seis diferentes meios de dissolução e constatou-se que o meio mais adequado, ou seja, aquele em que havia mais de 85% de fármaco dissolvido em 45 minutos de teste foi uma solução de LSS 0,5% (p/V) pH 6,8. Também foi testado o meio tampão fosfato de potássio pH 6,8, conforme sugestão de Sagirli e colaboradores (2007); no entanto este demonstrou ser menos discriminativo em relação aos meios contendo diferentes concentrações de LSS. Portanto, a condição eleita para realização do teste e perfil de dissolução da OLM foi 900 ml de uma solução a 0,5% (p/V) de LSS pH 6,8 como meio de dissolução, a $37 \pm 0,5$ °C, equipamento 2 (pás) e rotação de 50 rpm;

- O método de dissolução, desenvolvido e validado por CLAE e por espectrofotometria na região do UV, para determinação da quantidade dissolvida da OLM em uma solução a 0,5% (p/V) de LSS pH 6,8, cumpriu com os parâmetros exigidos para validação de métodos analíticos e pode ser, portanto, utilizados para o controle de qualidade de rotina dos comprimidos revestidos deste fármaco;
- A análise estatística comparativa dos métodos de quantificação por CLAE e espectrofotometria na região do UV demonstrou não haver diferença significativa entre ambos, sendo considerados equivalentes para análise da OLM dissolvida.
- A comparação entre os perfis de dissolução através da aplicação dos fatores de diferença (f_1), semelhança (f_2) e eficiência de dissolução (ED%) comprovou que houve semelhança entre os comprimidos dos medicamentos referência Benicar[®] e Olmetec[®], outra formulação disponível no mercado;
- Constatou-se, através da análise dos resultados obtidos pela aplicação dos modelos matemáticos propostos, que as duas formulações da OLM apresentaram cinéticas de dissolução distintas, ou seja, o Benicar[®] segue o modelo de Hixson-Crowell e o Olmetec[®] o de zero ordem;
- Os valores calculados de $t_{50\%}$ (meia-vida de dissolução) e $t_{80\%}$ (tempo necessário para liberar 80% de fármaco), obtidos a partir da aplicação da equação de zero ordem, foram semelhantes aos valores experimentais obtidos nos perfis de dissolução para o Benicar[®] e Olmetec[®].

6.10 REFERÊNCIA

ABDOU, H. M. **Dissolution em Remington`s pharmaceutical sciences 19th**, Easton: Mack, p. 593-604, 1995.

ADAMS, E.; COOMANS, D.; SMEYERS-VERBEKE, J.; MASSART, D. L. Application of linear mixed models to the evaluation of dissolution profiles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 226, p. 107-125, 2001.

AMIDON, G.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V.; CRISON, J. A Theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12 (3), p. 413-420, 1995.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE n° 484, de 19 de março de 2002. Guia para ensaios de dissolução para formas farmacêuticas sólidas de liberação imediata (FFSLI). **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 mar. 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE n° 140, de 29 de maio de 2003. Estabelece regras das bulas de medicamentos para pacientes e para profissionais de saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 jun. 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE n° 310, de 01 de setembro de 2004. Guia para realização do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução. **Diário Oficial da União**, Brasília, 03 set. 2004.

BROWN, C. K.; CHOKSHI, H. P.; NICKERSON, B.; REED, R. A.; ROHRS, B. R.; SHAH, P. J. Acceptable analytical practices for dissolution testing of poorly soluble compounds. **Pharmaceutical Technologies**, p. 56-65, 2004.

CID, E. C. **Cinética de dissolución de medicamentos**. Washington: Organización de los Estados Americanos, p. 102, 1981.

DRESSMAN, J. B.; AMIDON, G. L.; REPPAS, C.; SHAH, V. P. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. **Pharmaceutical Research**, v. 15 (1), p. 11-22, 1998.

DRESSMAN, J. B. Dissolution Testing of Immediate Released Products and its Application to Forecasting In Vivo Performance In: DRESSMAN, J. B. and DRESSMAN, J. B.; KRÄMER, J. **Pharmaceutical Dissolution Testing**. Boca Raton: Taylor & Francis, p. 419, 2005.

FDA. Guidance for Industry: Dissolution Testing for Intermediate Release Solid Oral Dosage Forms. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). **Food and Drug Administration**, August, 1997a.

FDA. Guidance for Industry. Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms. Center for Drug Evaluation and Research. **Food and Drug Administration**, 1997b.

FDA. Guidance for Industry: Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate release solid oral dosage forms containing certain active moieties/active ingredients, based on Biopharmaceutics classification. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), **Food and Drug Administration**, 2000.

FORTUNATO, D. Dissolution method .development for immediate release solid oral dosage forms. **Dissolution Technologies**, v. 12 (3), p. 12-14, 2005.

HIXSOM, A. W.; CROWELL, J. H. Dependence of reaction velocity upon surface and agitation. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 23, p. 923-931, 1931.

ICH. Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical methods text and methodology Q2 (R1). In: **International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use**, 2005.

KHAN, K. A.; RHODES, C. T. The concept of dissolution efficiency. **Journal of Pharmaceutical Pharmacology**, v. 27, p. 47-49, 1975.

KASIM, N. A.; WHITEHOUSE, M.; RAMACHANDRAM, C.; BERMEJO, M.; LENNERNÄS, H.; HUSSAIN, A. J.; JUNGINGER, H. E.; STAVISHANSKY, S. A.; MIDHA, K. K.; SHAH, V. P.; AMIDON, G. L. Molecular Properties of WHO Essential Drugs and Provisional Biopharmaceutical Classification. **Molecular Pharmaceutics**, v. 1 (1), p. 85 -96, 2004.

KOIKE, H.; KONSE, T.; SADA, T.; IKEDA, T.; HYOGO, A.; HINMAN, D.; SAITO, H.; YANAGISAWA, H. Olmesartan Medoxomil, a Novel Potent Angiotensin II Bloker. **Annual Report Sankyo Research Laboratory**, v. 55, p. 1-19, 2003.

LINDENBERG, M.; KOOP, S.; DRESSMAN, J. B. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization model list of essential medicines according to the biopharmaceutics classification system. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, p.1-14, 2004.

LENNERNÄS, H. **Oral Drug Administration Prediction and Assessment**. New York: Marcel Dekker, Cap. 10, p. 155-175, 2000.

LÖBENBERG, R., KRÄMER, J., SHAH, V. P., AMIDON, G. L., DRESSMAN, J. B., Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: dissolution behavior of glibenclamide, **Pharmaceutical Research**, v. 17 (4), p. 439-444, 2000.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A. Dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, p. 375-399, 2002.

MARCOLONGO, R. **Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica**. 2003. 117f. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MARQUES, M.; BROWN, W. Desenvolvimento e validação de métodos de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais. **Revista Analytica**, v. 1, p. 48-51, 2002.

MOORE, J. W.; FLANNER, H. H. Mathematical comparison of dissolution profiles. **Pharmaceutical. Technology**. New York, v. 20 (6), p. 64-74, 1996.

MULYE, N. V.; TURCO, S. J. A simple model based on first order kinetics to explain release of highly water soluble drugs from porous dicalcium phosphate dehydrate matrices. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 52, p. 236-241, 1995.

NOORY, C.; TRAN, N.; OUDERKIRK, L.; SHAH, V. Steps for development of dissolution test for sparingly water-soluble drug products. **Dissolution Technologies**, v. 7 (1), p. 16-21, 2000.

O'HARA, T.; DUNNE, A.; BUTLER, J.; DEVANE, J. A review of methods used to compare profile data. **Pharmaceutical Sciences and Technology Today**, v. 1 (5), p. 214-223, 1998.

OFOEFULE, S. I.; UDEOGARANYA, P. O; OKONTA, J. M. Prediction of in vivo bioavailability of six brands of ciprofloxacin film coated tablets using the concept dissolution efficiency (DE). **Bulletin Chemical Farmacy**, v. 140 (3), p. 187-191, 2001.

PARK, S. H.; CHOI, H. K. The effects of surfactants on the dissolution profile of poorly water-soluble acidic drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 321, p. 35-41, 2006.

PHAMACOPEIAL FORUM: <1092> **The Dissolution Procedure: Development and Validation**, v. 10 (1), p. 351-365, 2004.

POLLI, J. E.; REKHI, G. S.; SHAH, V. P. Methods to compare dissolution profile. **Drug Information Journal**, v. 30, p. 1113-1120, 1996.

ROHRS, B. Dissolution method development for poorly soluble compounds. **Dissolution Technologies**, 2001.

SAGIRLI, O.; ONAL, A.; TOKER, S. E.; SENSOY, D. Simultaneous HPLC analysis of olmesartan and hydrochlorothiazide in combined tablets and in vitro dissolution studies. **Chromatographia**, v. 66, p. 213-18, 2007.

SATHE, P. M.; TSONG, Y.; SHAH, V. P. In vitro dissolution profile comparison: statistics and analysis, model dependent approach. **Pharmaceutical Research**, v. 13 (2), p. 1799-1803, 1996.

SERRA, C. H. R.; STORPIRTIS, S. Comparação de perfis de dissolução de cefalexina através de estudos de cinética e eficiência de dissolução (ED%). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43 (1), p. 79-88, 2007.

SHAH, V. P.; TSONG, Y.; SATHE, P.; LIU, J. P. In vitro dissolution profile comparison – statistics and analysis of the similarity factor f_2 . **Pharmaceutical Research**, v. 15 (6), p. 889-896, 1998.

SIRISUTH, N.; EDDINGTON, N. In vitro-in vivo correlation: Definitions and Regulatory Guidance. **International Journal of Generic Drugs**. Disponível em: <<http://www.locomusa.com>> Acessado em maio/2004.

SKOUG, J. W.; HALSTEAD, J. W.; THEIS, J. E.; FREEMAN, D. T.; FAGAM, B. R. **Pharmaceutical Technology**, v. 20, p. 58-72, 1996.

SKOUG, J. W.; HALSTEAD, G. W.; THEIS, D. L.; FREEMAN, J. E.; FAGAM, D. T.; ROHRS, B. R. Roteiro para desenvolvimento e validação do teste de dissolução em formas farmacêuticas sólidas para uso oral. **Pharmaceutical Technology**, v.1, p. 34-43, 1997.

STORPIRTIS, S. **Biofarmacotécnica: Fundamentos de biodisponibilidade, bioequivalência, dissolução e intercambialidade de medicamentos genéricos**. São Paulo: [s.n.], p. 78, 1999.

STORPIRTIS, S.; RODRIGUES, D. *In vitro* evaluation of dissolution properties and degradation products of omeprazole in enteric-coated pellets. **Drug development Industrial Pharmaceutical**, v. 24 (11), p. 1101-1107, 1998.

USP 32. The dissolution procedure: development and validation. Second supplement USP-NF <1092>. **The United States Pharmacopoeia**. 32th. Ed. Rockville: United States Pharmacopoeia Convention, 2009.

VARELAS, C. G.; DIXSON, D. G.; CAROL, S. Zero-order release from biphasic polymer hydrogels. **Journal of Control Release**, v. 82, p. 282-286, 1992.

WEHLING, M. Can the pharmacokinetic characteristics of olmesartan medoxomil contribute to the improvement of blood pressure control? **Clinical Therapeutics**, v. 26 (A), p. A21-27, 2004.

YUKSEL, N.; KANIK, A. E.; BAYKARA, T. Comparison of in vitro dissolution profiles by ANOVA-based, model dependent and independent methods. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 209, p. 57-67, 2000.

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA – Development and validation of a discriminating in vitro dissolution method for a poorly soluble drug, olmesartan medoxomil: comparison between commercial tablets. AAPS (American Association of Pharmaceutical Scientists), v. 11, p. 637-644, 2010.

Research Article

Development and Validation of a Discriminating *In Vitro* Dissolution Method for a Poorly Soluble Drug, Olmesartan Medoxomil: Comparison Between Commercial Tablets

Lisiane Bajerski,^{1,2} Rochele Cassanta Rossi,¹ Carolina Lupi Dias,¹
Ana Maria Bergold,¹ and Pedro Eduardo Fröhlich¹

Received 5 August 2009; accepted 9 March 2010

Abstract. A dissolution test for tablets containing 40 mg of olmesartan medoxomil (OLM) was developed and validated using both LC-UV and UV methods. After evaluation of the *sink* condition, dissolution medium, and stability of the drug, the method was validated using USP apparatus 2, 50 rpm rotation speed, and 900 ml of deaerated H₂O + 0.5% sodium lauryl sulfate (*w/v*) at pH6.8 (adjusted with 18% phosphoric acid) as the dissolution medium. The model-independent method using difference factor (f_1) and similarity factor (f_2), model-dependent method, and dissolution efficiency were employed to compare dissolution profiles. The kinetic parameters of drug release were also investigated. The obtained results provided adequate dissolution profiles. The developed dissolution test was validated according to international guidelines. Since there is no monograph for this drug in tablets, the dissolution method presented here can be used as a quality control test for OLM in this dosage form, especially in a batch to batch evaluation.

KEY WORDS: dissolution kinetic; dissolution test; LC-UV method; olmesartan medoxomil; UV method.

INTRODUCTION

Dissolution testing has emerged in the pharmaceutical field as a very important tool to characterize drug product performance. The significance of this test is based on the fact that the rate and extent of drug absorption depend on its dissolution from the dosage form. Therefore, dissolution test is used not only for quality control of the final dosage form, but also to assess several stages of formulation. Moreover, when an *in vitro/in vivo* correlation is demonstrated, dissolution can be used as a surrogate test to predict the *in vivo* bioavailability of pharmaceutical formulations (1).

The interest in the *in vitro* dissolution of poorly soluble drugs has increased over the years due to the fact that this class of drugs is more likely to present a meaningful correlation between dissolution and absorption (2). Difficulties are usually encountered in selecting a dissolution medium of acceptable volume and composition that also presents a good discriminating power (3,4).

Olmесartan medoxomil (OLM; 5-methyl-(2-oxo-1,3-dioxol-4-yl)methyl-4-(1-hydroxy-1-methylethyl)-2-propyl-1-[2'-(1H)-tetrazol-5-yl]1,1'-biphenyl-(4-yl)methyl]-1H-imidazole-5-carboxylate; Fig. 1) is a prodrug that is rapidly and completely hydrolyzed to the active metabolite olmesartan (OL; Fig. 1) by both arylesterase and albumin during gastrointestinal absorp-

tion (5). It is a selective angiotensin II receptor blocker which was approved by the US Food and Drug Administration (FDA) in 2002 for the treatment of hypertension, either alone or in combination with other drugs. OLM is also reported to be effective in animal models of atherosclerosis, liver disorders, and diabetic nephropathy (6). This drug is considered a weakly basic compound ($pK_a=4.3$), highly lipophilic, and with an oral bioavailability of about 29% (7), being classified as class IV, according to the Biopharmaceutical Classification System where its dissolution is the rate-limiting step for absorption (8). A dissolution method for OLM associated with hydrochlorothiazide in tablets was previously reported in the literature (6); however, the method described was not validated according to the parameters established by the official compendium.

In this context, the purpose of the present study is to develop and validate a dissolution test for OLM in tablets, based on its physicochemical characteristics. Additionally, the method was tested in two different formulations (Benicar® and Olmetec®) using both model-independent method and dissolution efficiency (%DE) approaches to characterize their dissolution profiles. The kinetics dissolution was determined using model-dependent methods. The parameters such as dissolution rate constant (k), time to promote the dissolution half-life ($t_{50\%}$), and time for release drug amount $\geq 80\%$ ($t_{80\%}$) were also evaluated.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

OLM reference substance (assigned purity 99.3%) was purchased from Sequoia Research Products® (Oxford, UK).

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Ipiranga, 2752, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

² To whom correspondence should be addressed. (e-mail: lisianebajerski@yahoo.com.br)

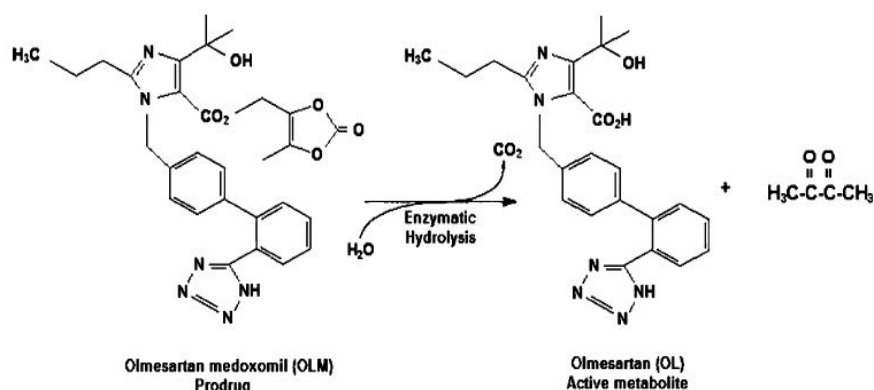


Fig. 1. Chemical structure of OLM and its active metabolite OL.

Benicar[®] (Sankyo Pharma, Brazil) and Olmetec[®] (Pfizer, Brazil) tablets containing 40 mg of OLM were obtained from commercial sources. Sodium lauryl sulfate (SLS) was obtained from Synth (São Paulo, Brazil). The excipients used to simulate those found in the dosage forms (cellulose microcrystalline, low-substitution hyprolose, lactose monohydrated, hyprolose, magnesium stearate, talc, titanium dioxide, hypromellose) were all of pharmaceutical grade and acquired from different distributors. LC-grade acetonitrile was obtained from Tedia[®] (Fairfield, USA). Purified water (Milli-Q Plus, Millipore[®], MA, USA) was used throughout the analysis. All other reagents and solvents used for the preparation of buffer solutions were of analytical grade. The 0.1 and 0.01 M HCl and monobasic potassium phosphate USP buffers (pH6.8 and 7.5) were prepared as described in USP 32 (11).

Instrumentation

The development and validation of the dissolution test was performed using a VANKEL[®] VK 8000 dissolution autosampling station consisting of a VK-type bidirectional peristaltic pump, VK 750D digitally controlled heater/circulator, VK 7010 multibath ($n=8$) dissolution testing station with automated sampling manifold.

Chromatographic analysis was carried out using a Shimadzu LC system (Kyoto, Japan) which consisted of a LC-10AD pump, a SLA-10ADVP system controller, a SPD-10A (SPM-20A in the selectivity test) detector, a DGU-14A degasser, and a Rheodyne[®] 7725i manual injector with a 20- μ l loop. Data integration was performed using the CLASS-VP software (version 6.1).

A UV-Vis spectrophotometer (UV-160A, Shimadzu) using 1.0 cm quartz cells and SPECTRA MANAGER software was used for all absorbance measurements.

An Ultrabasic potentiometer (Denver, Colorado, USA) was used to determine the pH of all solutions. A Thornton T50 ultrasonic bath (Metler-Toledo, Bedford, MA) was used for deaeration.

Three filters were evaluated for sample filtration: Millipore[®] (nylon membrane, 0.45 μ m), Framex[®] (quantitative filter, 25 μ m), and Vankel[®] (qualitative filter, 10 μ m).

Analytical Conditions

A previously developed stability-indicating LC-UV method (9) was used to determine the percentage of OLM

released. As described earlier, a Phenomenex[®] RP-18 column (250 \times 4.6 mm, 5 μ m) and UV detection at 257 nm were used. The mobile phase was composed of water/triethylamine/acetonitrile (60:0.3:40 v/v/v, pH adjusted to 6.3, with 18% phosphoric acid), previously filtered through a 0.45- μ m membrane (Millipore[®], Bedford, USA). The flow rate was 1.2 ml min⁻¹ at room temperature (23 \pm 2 $^{\circ}$ C) and the injection volume was 20 μ l. The run time was set to 10 min. For the specificity and stability studies, a SPD-M10ADVP photodiode array (PDA) detector was used.

The same samples analyzed by LC-UV were also analyzed by the UV method ($\lambda=257$ nm) in order to compare the results using the dissolution medium as blank.

Tablets Analysis

The content analysis and dose uniformity test of Benicar[®] and Olmetec[®] tablets were carried out by the LC method previously validated (9) and described in the "Materials and Methods" section.

For content determination, 20 U of each formulation were ground and an amount equivalent to 10 mg of OLM was transferred to 20 ml volumetric flask containing 10 ml of acetonitrile. Then the flasks were sonicated for 15 min and the volume was completed with the same solvent. After filtration with qualitative filter, aliquots of 1 ml of the solutions were transferred to 25 ml volumetric flasks and diluted with the dissolution medium to obtain the final concentration of 20 μ g ml⁻¹. The analysis was performed in triplicate.

The dose uniformity test was evaluated after analysis of ten individual units of both formulations. Each tablet, previously ground, was transferred to 100 ml volumetric flask containing 50 ml of acetonitrile, which was kept in the ultrasonic bath for 30 min, and the volume was completed with the same solvent. After filtration with qualitative filter, aliquots of 1 ml of the solutions were transferred to 20 ml volumetric flasks and diluted with the dissolution medium to obtain the final concentration of 20 μ g ml⁻¹.

All solutions were filtered in a 0.45- μ m nylon membrane before the chromatographic analysis.

Determination of Sink Conditions

OLM is a prodrug with pH-dependent solubility. In both acid and alkaline solutions, its solubility is high (pH1.2 and

In Vitro Dissolution Method for Olmesartan Medoxomil

8.0) and it reaches its lower solubility in the pH range of 4.0 to 6.0 at 20°C (7). The *sink* conditions were determined in 0.1 M HCl, 0.01 M HCl, pH6.8 and 7.5 USP buffered solutions. Different concentrations of SLS (0.5%, 1.0%, and 1.5% (w/v)) in the dissolution medium were also evaluated due to the low solubility of this drug. Vessels ($n=3$) containing 250 ml of medium were preheated in a thermostatically controlled water bath at $37\pm 0.5^\circ\text{C}$, before adding an excess of OLM reference substance (approximately 40 mg). The suspensions were gently agitated. Aliquots of 10 ml were removed from each vessel after 1 and 2 h and filtered. An aliquot of 2.5 ml was transferred into 20 ml volumetric flask, diluted with the mobile phase, and analyzed by LC-UV methods.

Dissolution Test Conditions

Dissolution testing of tablets was performed in compliance with USP 32 (11) using a paddle (USP apparatus 2) and 900 ml of dissolution medium preheated at $37\pm 0.5^\circ\text{C}$. The rotation speed selection was done based on the recommended range (50–75 rpm) for apparatus 2 and the usual values for tablets (10,11). Samples were withdrawn at 15, 30, 45, 60, and 120 min for early validation work. After dissolution optimization, aliquots were withdrawn at 10, 15, 30, 45, 60, and 120 min. Automatic sampling was performed using 8 ml aliquots and these solutions were immediately filtered through 10 μm filters connected into the equipment. The percentage of drug dissolved was determined using both LC-UV and UV methods.

The reference substance solution was prepared using an amount of powder equivalent to 11.1 mg of OLM that was transferred to a 50-ml volumetric flask with acetonitrile (222.2 $\mu\text{g ml}^{-1}$). An aliquot of 1.0 ml of this solution was transferred to a 10-ml volumetric flask and diluted with dissolution medium, obtaining the final concentration of 22.2 $\mu\text{g ml}^{-1}$. The solution was filtered in a 0.45- μm membrane filter before analysis.

Dissolution Method Validation

In order to demonstrate that the method was adequate for dissolution test purposes, it was validated using both LC-UV and UV methods, evaluating stability, specificity, linearity, accuracy, precision, robustness, and filter suitability according to USP 32 (11) and ICH guidelines (10,12,13).

Standard and Sample Solution Stability

The stability of OLM in the dissolution medium was evaluated using reference substance and samples. The solutions were submitted to dissolution test in H₂O containing 0.5% of SLS (w/v) at pH6.8, corrected with 18% phosphoric acid, at $37\pm 0.5^\circ\text{C}$, 50 rpm, for 2 h. After this, both solutions were evaluated in 0 h at room temperature ($23\pm 1^\circ\text{C}$), and after 15 and 24 h, at room and refrigerator ($8\pm 2^\circ\text{C}$) temperatures. During this test, solutions were protected from light. The assay was performed in triplicate. All the results were within 98–102% of the initial value and no degradation product was observed.

Specificity

Specificity was evaluated by preparing a placebo based on the commercial tablets in their usual concentration. An amount equivalent to that contained in one tablet was transferred to vessels with 900 ml of medium, at $37\pm 0.5^\circ\text{C}$, and stirred for 1 h at 150 rpm, using USP apparatus 2. Aliquots of this solution were filtered prior to analysis. The concentrations of the excipients, listed in the “Materials and Methods” section, were based on the literature (14).

Linearity

Aliquots of a stock solution containing 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of OLM reference substance, prepared in acetonitrile, were transferred to 25 ml volumetric flasks and diluted with the dissolution medium to final concentrations of 5, 10, 15, 20, 25, and 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$, for LC-UV and UV analysis. The solutions were analyzed in triplicate every day, during three consecutive days. The linearity was evaluated by linear regression analysis, which was calculated by the least square regression method and analysis of variance (ANOVA).

Accuracy/Precision

Accuracy of the method was evaluated by the recovery test of known amounts of OLM reference substance added to the placebo. A stock solution containing 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ was prepared in acetonitrile. Aliquots of 8, 10, and 12 ml of this solution were added to a vessel containing the medium for a final volume of 900 ml, preheated at $37\pm 0.5^\circ\text{C}$, and rotated for 1 h at 150 rpm. The final concentrations were 17.7, 22.2, and 26.6 $\mu\text{g ml}^{-1}$, corresponding respectively to 80%, 100%, and 120% of the nominal assay concentration. The analyses were done in triplicate, in different days. Placebo samples were prepared in the same way described in the specificity test.

The same solutions used in the accuracy test were analyzed in order to evaluate the precision of the method. Repeatability (intraday) and intermediate precision (inter-

Table I. Equation Descriptions for the Application of Dependent and Independent Models

| Model | Equation |
|--------------------|---|
| Dependent | |
| Zero-order | $Q_t = Q_0 - k_0 \times t$ |
| First-order | $\ln Q_t = \ln Q_0 - k_1 \times t$ |
| Higuchi | $Q_0 = k_H \times t^{1/2}$ |
| Hixson-Crowell | $Q_0^{1/3} - Q_t^{1/3} = k_{HC} \times t$ |
| Korsmeyer-Peppas | $Q/Q_0 = k_K \times t^n$ |
| Independent | |
| Difference factor | $f_1 = \{[\sum_{i=1}^n R_i - T_i] / [\sum_{i=1}^n R_i]\} \times 100$ |
| Similarity factor | $f_2 = 50 \times \log \left\{ \left[1 + (1/n) \sum_{i=1}^n (R_i - T_i)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\}$ |

Q_t , amount of drug released in time t , Q_0 , amount of drug released at infinite time t , Q_0 initial amount of drug in the tablet, k_0 , k_1 , k_H , k_{HC} , k_K release rate constants, R dissolution measurements of reference, T dissolution measurements of test, n release exponent (indicative of drug release mechanism)

Table II. Solubility of OLM Reference Substance at Different Dissolutions Media (40 mg OLM Bulk in 250 ml of Medium)

| Medium | Solubility (%) | |
|-----------------------------------|----------------|------|
| | 1 h | 2 h |
| 0.1 M HCl (pH1.2) | 58.4 | 63.5 |
| 0.01 M HCl (pH1.8) | 15.7 | 45.2 |
| USP pH6.8 buffer | 34.7 | 38.5 |
| USP pH7.5 buffer | 59.4 | 62.8 |
| H ₂ O + 0.5% SLS pH6.8 | 43.9 | 73.3 |
| H ₂ O + 1.0% SLS pH6.8 | 53.3 | 76.2 |
| H ₂ O + 1.5% SLS pH6.8 | 78.5 | 97.5 |

day) were evaluated based on the relative standard deviation (RSD) of the results.

Robustness

Robustness was evaluated during development by making small, but deliberate, changes to the method's parameters. The release of OLM tablets in different pH values of the dissolution medium (6.4 and 6.8) was evaluated.

Filter Suitability

The filter evaluation is necessary to determine its adequacy and to verify that it does not adsorb the drug and that it removes insoluble excipients that may otherwise cause high background or turbidity (10). The reference substance and sample solutions were prepared in dissolution medium with a final concentration of 22.2 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

The sample solutions were prepared using a placebo, like that described in the specificity test, and transferred to the vessel that was gently rotated for 1 h at $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Four aliquots of 10 ml were withdrawn at the same point and submitted to one of the following procedures: centrifugation for 5 min at 3,000 rpm or filtration with a qualitative, quantitative, and nylon filters.

For a filter to be acceptable for use, the results must be within the 98–102% range (10,15).

Applied Methods to Compare Dissolution Profiles

The dissolution profiles were compared using a model-independent method and dissolution efficiency (%DE).

When comparing dissolution profiles, FDA guidance recommend approaches such as the model-independent method, based on the calculation of difference (f_1) and similarity (f_2) factors, which is currently applied (Table I). The f_1 factor measures the percent error between two curves over all time points. The f_2 factor is a logarithmic transformation of the sum-squared error of differences between the test and the reference products over all time points. Two dissolution profiles are considered to be similar if f_1 has a value between 0 and 15 and if f_2 has a value between 50 and 100 (16,17).

The dissolution efficiency (%DE) was calculated from the values obtained in the area under curve (AUC) of the dissolution profile, up to 120 min, applying the trapezoidal method (16). The %DE was determined considering the rectangle total area (AUC_{RT}) defined by ordinate (100% of dissolution) and abscise (120 min).

To analyze the variance among the average values of %DE obtained from Benicar® and Olmetec®, both determined by LC-UV and UV methods, the ANOVA was applied.

Evaluation of Release Kinetic

To evaluate OLM release kinetics, five mathematical models were applied: zero-order, first-order, Higuchi, Hixon-Croweel, and Korsmeyers–Peppas equations, which are presented in Table I (16,17).

The suitability of models to experimental data was evaluated using the software MicroMath Scientist 3.0 (Micro-math, EUA), based on the model selection criteria (MSC).

The curves were constructed by applying the kinetic models listed, considering only the ascendant points of drug released (0 to 30 min).

Other parameters were used to characterize the drug release profile such as dissolution half-life ($t_{50\%}$), which corresponds to the time necessary to release 50% of the drug from the pharmaceutical dosage form, and the sampling time for $\geq 80\%$ of drug dissolution ($t_{80\%}$). Frequently, pharmacopias use this parameter as an acceptance limit for the dissolution test (18).

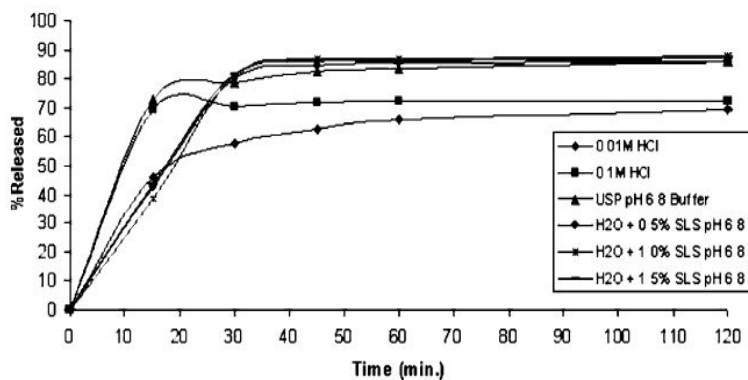


Fig. 2. Dissolution profiles of Benicar® tablets ($n=3$) using 0.1 M HCl, 0.01 M HCl, H₂O + 0.5% SLS pH6.8, H₂O + 1.0% SLS pH6.8, H₂O + 1.5% SLS pH6.8, and USP pH6.8 buffer at $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$, USP apparatus 2 at 50 rpm, analyzed by LC-UV method

In Vitro Dissolution Method for Olmesartan Medoxomil

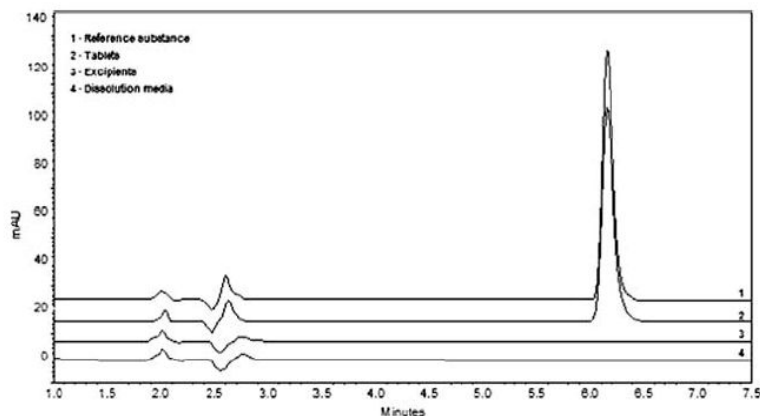


Fig. 3. Specificity test for OLM before dissolution in H₂O + 0.5% SLS pH6.8 at 37±0.5°C and apparatus 2 at 150 rpm, analyzed by the LC-UV method

RESULTS AND DISCUSSION

Tablets Analysis

The OLM content in tablets by the LC method for Benicar[®] and Olmetec[®] was 99.1±1.1% and 98.9±0.5%, respectively.

In relation to the uniformity test, the analyses for both Benicar[®] (100.7±4.4%) and Olmetec[®] (95.7±1.5%) were carried out using the general specifications of USP 32 (11).

According to these analyses, the tablets were considered appropriate for the dissolution tests.

Determination of Sink Conditions and Dissolution Conditions

For poorly soluble drugs, medium selection for dissolution tests is an important step in method validation due to the difficulty to achieve *sink* condition (19), which is defined as the volume of medium at least three times greater than that required to dissolve the dose of the drug being tested (10). Among the media tested, *sink* condition was observed only in H₂O with 1.5% SLS (*w/v*) and pH6.8 (Table II). However, media that fail to provide these conditions may be acceptable, if they prove to be more discriminating (10,11,20). The use of aqueous solutions containing a percentage of surfactant is suggested for poorly soluble compounds (10,20,21). The media tested were: 0.1 M HCl (pH1.2); 0.01 M HCl (pH 1.8); USP pH6.8 buffer; H₂O + 0.5% SLS (*w/v*) pH6.8; H₂O + 1.0% SLS (*w/v*) pH6.8; and H₂O + 1.5% SLS (*w/v*) pH6.8 (Fig. 2). USP pH7.5 buffer medium was not used because preliminary tests showed the formation of degradation products. Dissolution tests were performed using USP apparatus 2 at a rotation speed of 50 rpm at 37±0.5°C.

The use of surfactants in the dissolution medium composition for sparingly aqueous-soluble drugs products is physiologically relevant, because it can better simulate the environment of the gastrointestinal tract than a medium containing other solvents than water (4,8). Shah *et al.* recommend the use of the lowest amount of surfactant necessary to achieve 75–80% of drug release in a reasonable amount of time (60–90 min) (22).

Reference Substance and Sample Solution Stability

The stability test of the reference substance stock solution and samples demonstrated that OLM was stable in the test conditions for up to 15 h (considering the analysis time for routine quality control and dissolution profiles determination) at refrigerator temperature (8±2°C). After 15 h at room temperature (23±2°C), a decrease in OLM concentration above 2% was observed.

Specificity

The specificity of the dissolution test by the LC-UV method demonstrated no interference of excipients, using a PDA detector (Fig. 3). The same analysis was done using the UV method. The results obtained suggest that the UV method could also be used for the quantitation of OLM, once the formulation excipients had no interference at 257 nm (Fig. 4).

Linearity

Both LC-UV and UV methods showed good linearity at the concentration range of 5–30 µg ml⁻¹. Correlation coefficients were closer to 1.0000 (>0.9999) for both

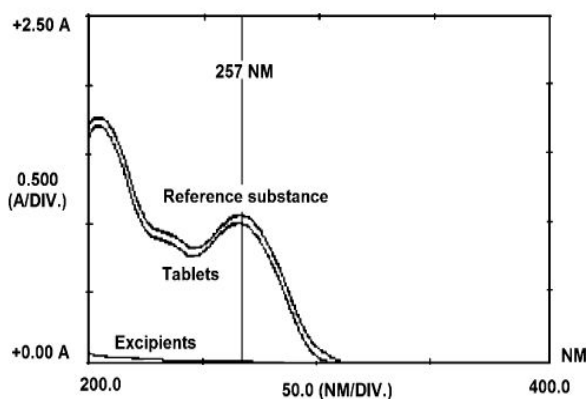


Fig. 4. UV spectrum of OLM before dissolution in H₂O + 0.5% SLS pH6.8 at 37±0.5°C and apparatus 2 at 150 rpm

Table III. Accuracy Results for OLM (Percent Recovery) by LC-UV and UV Methods

| Sample | | Concentration (%) | | | | | |
|---------------|---|--------------------------|-------|--------------------------|-------|--------------------------|-------|
| | | 17.7 µg ml ⁻¹ | | 22.2 µg ml ⁻¹ | | 26.6 µg ml ⁻¹ | |
| | | LC-UV | UV | LC-UV | UV | LC-UV | UV |
| Day1 | 1 | 95.9 | 101.4 | 95.7 | 102.0 | 99.3 | 103.4 |
| | 2 | 98.2 | 104.9 | 98.3 | 104.0 | 100.1 | 104.6 |
| | 3 | 97.1 | 102.7 | 98.6 | 104.4 | 99.0 | 103.7 |
| Day2 | 1 | 96.5 | 103.0 | 96.9 | 102.1 | 100.8 | 104.3 |
| | 2 | 96.3 | 101.3 | 96.5 | 102.0 | 100.3 | 104.3 |
| | 3 | 96.0 | 100.4 | 97.0 | 103.0 | 99.4 | 103.7 |
| Average (n=6) | | 96.7 | 102.3 | 97.1 | 102.9 | 99.8 | 104.0 |
| Percent RSD | | 0.9 | 1.5 | 1.1 | 1.0 | 0.7 | 0.4 |

RSD relative standard deviation

methods. The slopes and intercepts obtained were 42,568 and 1,656 for LC-UV and 0.0434 and 0.0058 for UV, respectively. The analysis by ANOVA showed significant linear regression ($p < 0.05$) and no significant deviation from linearity ($p > 0.05$). These data indicate that both methods are linear for OLM.

Accuracy and Precision

The accuracy was demonstrated by the recovery of known amounts of OLM to the dissolution vessels. Percentage recoveries from 95% to 105% are recommended for this test (10,11). The accuracies of the methods were considered adequate (Table III). Interday and intraday precisions were evaluated at three different concentration levels (17.7, 22.2, and 26.6 µg ml⁻¹) in 2 days. The low RSD ($\leq 2\%$) demonstrate the good precision of both methods. The results are presented in Table IV.

Robustness

In the evaluation of method robustness, the influence of different pH values (6.4 and 6.8) was tested and the results (data not shown), analyzed by ANOVA, showed no significant difference among the OLM released from Benicar[®] by LC-UV ($F_{\text{calculated}} = 3.7 \times 10^{-1} < F_{\text{critical}} = 5.12$; $p > 0.05$) and UV ($F_{\text{calculated}} = 6.1 \times 10^{-1} < F_{\text{critical}} = 5.12$; $p > 0.05$) methods. These data demonstrated that the dissolution method is robust.

Filter Suitability

The results obtained from filtered and centrifuged solutions of reference substance and sample solutions by both methods showed average recoveries within 98–102%. These data demonstrate that the filters did not interfere in the results of analysis.

LC-UV Versus UV Quantitation and Dissolution Profiles Comparison

The *in vitro* dissolution profiles of Benicar[®] and Olmetec[®] are shown in Fig. 5. Each data point represents a mean of 12 measurements for each product. The RSD are in accordance with the literature, $\geq 20\%$ for the first data point and then $\leq 10\%$ (10,11).

The percentage of drug dissolved, until 120 min, for both drug products were similar between them, as well as between the methods (Benicar[®]: LC-UV method, $93.1 \pm 1.8\%$ and UV method, $93.8 \pm 4.4\%$; Olmetec[®]: LC-UV method, $95.6 \pm 1.3\%$ and UV method, $94.3 \pm 2.2\%$).

The statistical investigation by ANOVA showed that both methods, LC-UV and UV, can be used to evaluate the percentage of drug released of OLM in tablets ($F_{\text{calculated}} = 8.0 \times 10^{-4} < F_{\text{critical}} = 4.84$; $p > 0.05$).

Since Benicar[®] is the reference brand, the difference (f_1) and similarity (f_2) factors were calculated between Benicar[®] and Olmetec[®]. According to the FDA guidance (23), for the

Table IV. Precision Results for OLM by LC-UV and UV Methods

| Day | Concentration (µg ml ⁻¹) | Intraday (µg ml ⁻¹) (±RSD) | | Interday (µg ml ⁻¹) (±RSD) | |
|-----|--------------------------------------|--|----------|--|----------|
| | | LC-UV | UV | LC-UV | UV |
| 1 | 17.7 | 17.9±1.2 | 18.2±1.7 | 17.1±0.9 | 18.1±1.5 |
| 2 | | 17.0±0.2 | 17.9±1.3 | | |
| 1 | 22.2 | 21.4±1.6 | 22.9±1.2 | 21.5±1.1 | 22.8±1.0 |
| 2 | | 21.5±0.3 | 22.7±0.5 | | |
| 1 | 26.6 | 26.4±0.6 | 27.6±0.6 | 26.5±0.7 | 27.6±0.4 |
| 2 | | 26.6±0.7 | 27.6±0.3 | | |

RSD relative standard deviation

In Vitro Dissolution Method for Olmesartan Medoxomil

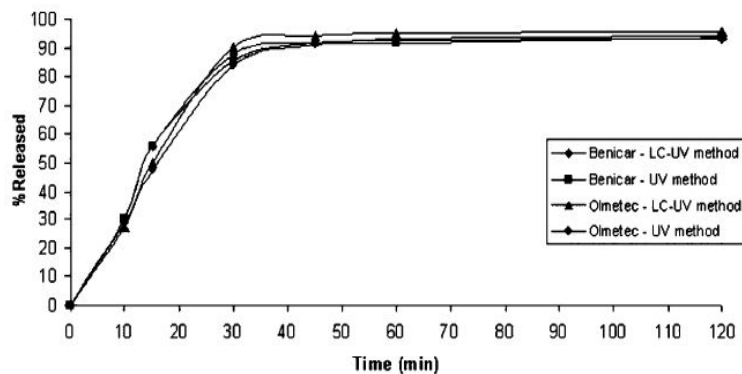


Fig. 5. Dissolution profiles of Benicar® and Olmetec® tablets ($n=12$) using $H_2O + 0.5\%$ SLS pH6.8 at $37\pm 0.5^\circ C$, USP apparatus 2 at 50 rpm, analyzed by the LC-UV and UV methods

calculus of these parameters, only one point in the dissolution profile, after 85% of the drug is released, should be used. Therefore, this percentage for Benicar® was reached at 30 min (88.1% LC-UV and 85.3% UV) and for Olmetec® at 30 min (90.2% LC-UV) and 45 min (91.1% UV). The results of f_1 and f_2 were 5.4 and 62.6 for LC-UV and 5.1 and 93.7 for UV, respectively, showing that profiles were similar.

In order to evaluate the suitability of both methods with respect to each formulation, they were also analyzed using f_1 and f_2 . For Benicar®, using LC-UV results as a reference, f_1 and f_2 were 1.3 and 97.4, respectively, and for Olmetec®, f_1 and f_2 were 5.9 and 93.7, respectively. These results demonstrate that both methods could be used to access the dissolution data for these formulations.

In accordance with the similarity results, the %DE data also showed no significant differences between the dissolution profiles of Benicar® (87.0±1.2% LC-UV and 84.3±3.2% UV) and Olmetec® (86.0±1.3% LC-UV and 84.9±1.7% UV; $F_{calculated}=8.9 \times 10^{-1} < F_{critical}=2.0$; $p > 0.05$).

Kinetics of Drug Release

Dissolution profiles (LC-UV method) were used to evaluate the kinetics of drug release. The slope (k), determination coefficient (R^2), and MSC are presented in Table V. Considering these values, obtained by mathematical modeling (MicroMath Scientist®), distinct release mechanisms were found for Benicar® (Hixson–Crowell) and Olmetec® (zero-order).

The Hixson–Crowell model assumes that the drug release mechanism from the dosage form is a function of the cube root of the unreleased drug fraction with time. So, the geometric tablet shape diminishes proportionally over time, assuming that the release rate is limited by the dissolution rate of drug particles (16). The zero-order model describes the systems where the drug release rate is independent of its concentration (16).

The zero-order model, which also described the data adequately, was used to calculate $t_{50\%}$ and $t_{80\%}$ (Table V). The results revealed that both formulations showed similar values for $t_{50\%}$, while $t_{80\%}$ values confirmed that more than 80% of OLM in both formulations was released. Thus, these results are in accordance with the data obtained in the

dissolution profile for Benicar® and Olmetec® by both methods.

CONCLUSION

A dissolution test was developed and validated for OLM tablets, according to the USP 32 (11) and ICH guideline (10,12,13). Final conditions are 900 ml of $H_2O + 0.5\%$ SLS (w/v) at pH6.8 as dissolution medium, at $37\pm 0.5^\circ C$, and USP apparatus 2 at 50 rpm. The percentage of drug dissolved was determined by the LC-UV and UV methods, and the results showed no significant difference ($p > 0.05$), when applied to two drug products. Dissolution profiles were evaluated using model-independent approaches and dissolution efficiency (%DE). Difference (f_1) and similarity (f_2) factors, as well as %DE, showed similar profiles for Benicar® and Olmetec®, when analyzed by both methods. Kinetics of drug release was

Table V. Kinetic Parameters for Different Release Models of OLM in Tablets Analyzed by LC-UV Method

| Dissolution model | Benicar® | Olmetec® |
|-------------------------|----------|----------|
| Zero-order k_0 | 3.0832 | 3.0433 |
| R^2 | 0.9742 | 0.9927 |
| MSC | 3.1587 | 4.4273 |
| First-order k_1 | 0.0523 | 0.0493 |
| R^2 | 0.9529 | 0.9285 |
| MSC | 2.5573 | 2.1393 |
| Higuchi k_H | 14.4125 | 14.1377 |
| R^2 | 0.9219 | 0.8894 |
| MSC | 2.0498 | 1.7023 |
| Hixson–Crowell k_{HC} | 0.0696 | 0.0663 |
| R^2 | 0.9756 | 0.9592 |
| MSC | 3.2171 | 2.6998 |
| Korsmeyers–Peppas k_K | 0.0501 | 0.0322 |
| n | 0.8466 | 0.9820 |
| R^2 | 0.9844 | 0.9928 |
| MSC | 3.1634 | 3.9442 |
| $t_{50\%}$ (min) | 15.1 | 15.7 |
| $t_{80\%}$ (min) | 25.9 | 26.3 |

k_0 , k_1 , k_H , k_{HC} , k_K release rate constants, MSC model selection criteria, n release exponent (indicative of drug release mechanism), $t_{50\%}$ dissolution half-life (zero-order kinetics), $t_{80\%}$ time to release 80% of the drug (zero-order kinetics)

better described by the Hixson–Crowell model, for Benicar[®], and the zero-order model, for Olmetec[®]. The kinetic parameters ($t_{50\%}$ and $t_{80\%}$) estimated by the zero-order model revealed that both formulations showed similar performance. Considering this, the proposed methods could be used as a routine quality control test, since there is no fully validated available method for OLM in tablets.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge the Conselho Nacional de Pesquisa, Brazil for the financial support.

REFERENCES

1. Ansari M, Kazemipour M, Talebnia J. The development and validation of a dissolution method for clomipramine solid dosage forms. *Dissol Technol.* 2004;11:16–24.
2. Abdou HM. Remington: the science and practice of pharmacy. In: Gennaro AR, editors. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000. p. 654–66
3. Löbenberg R, Krämer J, Shah MP, Amidon GL, Dressman JB. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: dissolution behavior of glibenclamide. *Pharm Res.* 2000;17:439–44.
4. Shah VP, Konecny JJ, Everett RL, McCullough B, Noorizadeh AC, Skelly JP. *In vitro* dissolution profile of water-insoluble drug dosage forms in the presence of solubilizers. *Pharm Res.* 1989;6:612–8.
5. Yoshihara K, Gao Y, Shiga H, Wada R, Hisaoka M. Population pharmacokinetics of olmesartan following oral administration of its prodrug, olmesartan medoxomil in healthy volunteers and hypertensive patients. *Clin Pharmacokinet.* 2005;44:1324–9.
6. Sagirli O, Onal A, Toker SE, Sensoy D. Simultaneous HPLC analysis of olmesartan and hydrochlorothiazide in combined tablets and *in vitro* dissolution studies. *Chromatographia.* 2007;66:213–8. doi:10.1365/s10337-007-0304-9.
7. Koike H, Konse T, Sada T, Ikeda T, Hyogo A, Hinman D *et al.* Olmesartan medoxomil, a novel potent angiotensin II blocker. *Annu Rep Sankyo Res Lab.* 2003;55:1–91.
8. Amidon GL, Lennernas H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharm Res.* 1995;12:413–20.
9. Bajerski L, Rossi RC, Dias CL, Fröhlich PE, Bergold AM. Stability-indicating LC determination of a new antihypertensive, olmesartan medoxomil in tablets. *Chromatographia.* 2008;68:991–6. doi:10.1365/s10337-008-0811-3.
10. Pharmacopeial Forum. Pharmacopeial previews. 2004; 30:351–63.
11. Pharmacopeia US. USP 32 NF 27. Rockville: USP; 2009.
12. International Conference on Harmonisation (ICH). ICH harmonized tripartite guideline: validation of analytical procedure Q2A; 1994.
13. International Conference on Harmonisation (ICH). ICH harmonized tripartite guideline: validation of analytical procedure Q2B; 1994.
14. Rowe RC, Sheskey PJ, Welle PJ. Handbook of pharmaceutical excipients. In: Rowe RC, Sheskey PJ, Welle PJ, editors. Washington; 2000.
15. Marques MRC, Brown W. Desenvolvimento e validação de métodos de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais. *Analytica.* 2002;1:48–51.
16. Costa PJC. Avaliação *in vitro* da bioequivalência de formulações farmacêuticas. *Braz J Pharm Sci.* 2002;38:141–53.
17. Ferraz HG, Consiglieri VO, Storpirtis S. Avaliação da cinética de dissolução de ampicilina em comprimidos comercializados no Brasil. *Braz J Pharm Sci.* 1998;34:93–109.
18. Costa P, Lobo JMS. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur J Pharm Sci.* 2001;13:123–33.
19. Khan MZI. Dissolution testing for sustained or controlled release oral dosage forms and correlation with *in vivo* data: challenges and opportunities. *Int J Pharm.* 1996;140:131–43.
20. Brown CK, Chokshi HP, Nicholson B, Reed RA, Rohrs BR, Shah PA. Acceptable analytical practices of dissolution testing of poorly soluble compounds. *Pharm Technol.* 2004; 56–65.
21. Rohrs BR. Dissolution method development for poorly soluble compounds. *Dissol Technol.* 2001;8:1–5.
22. Swanepoel E, Liebenberg W, Devarakonda B, Villiers MM. Developing a discriminating dissolution test for three mebendazole polymorphs based on solubility differences. *Pharmazie.* 2003;58:117–21.
23. Food and Drugs Administration (FDA). FDA guidance for industry: dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms. Rockville: FDA; 1997.

7. CAPÍTULO IV – Estudo das propriedades polimórficas da olmesartana medoxomila

7.1 INTRODUÇÃO

Os materiais farmacêuticos sólidos podem ocorrer como substâncias cristalinas puras de estrutura identificável e definida. Alguns princípios ativos que existem na forma cristalina são capazes de formar diferentes tipos de cristais, dependendo das condições (temperatura, solvente, tempo) sob as quais a recristalização é induzida. Essa propriedade pela qual uma única substância química pode existir em mais de uma forma cristalina é denominada de polimorfismo (SHARGEL e YU, 2005; ANSEL *et al.*, 2000). Vale ressaltar que diferenças morfológicas ou macroscópicas nos cristais não revelam, necessariamente, a ocorrência de polimorfismo, uma vez que estas alterações podem ser geradas por diferentes direções no crescimento do cristal durante o processo de recristalização (GIRON, 1995; BOTTOM, 1999).

As formas polimórficas apresentam algumas propriedades físicas e físico-químicas diferentes como: ponto de fusão e sublimação, condutividade, volume, densidade, viscosidade, dureza e forma cristalina, cor, índice de refração, solubilidade, higroscopicidade, reações no estado sólido, estabilidade e perfil de dissolução (GIRON, 1995; BOTTOM, 1999; AULTON, 2005). Sob condições de temperatura e pressão definidas, apenas uma das possíveis formas polimórficas de uma substância pura é estável, sendo as outras formas denominadas de metaestáveis, ou seja, formas que se transformam, a diferentes velocidades, na forma estável (AULTON, 2005).

A presença de polimorfismo em compostos farmacêuticos pode ter um impacto direto sobre a qualidade e desempenho de fármacos, tais como a estabilidade, a dissolução e a biodisponibilidade do medicamento. O inesperado aparecimento ou desaparecimento de uma forma polimórfica pode produzir sérias conseqüências, resultando em um atraso no desenvolvimento de um produto e na interrupção de sua produção comercial (RAW *et al.*, 2004).

Além das formas polimórficas, alguns materiais farmacêuticos sólidos podem ocorrer tanto na forma não cristalina ou amorfa, quanto na forma pseudopolimórfica.

A forma amorfa de um composto apresenta maior solubilidade em relação à forma cristalina correspondente, uma vez que a estrutura cristalina é mais rígida e termodinamicamente mais estável. Por essa razão, formas amorfas de um fármaco demonstram velocidade de dissolução maior em relação a sua cristalina (SHARGEL e YU, 2005).

Já a expressão pseudopolimorfismo se aplica a hidratos e solvatos obtidos numa cristalização e referem-se ao fato de que algumas moléculas de solvente podem estar presentes na estrutura cristalina de uma substância, interferindo em sua cristalização (MORRIS, 1999; BECKMAN, 2003). Se a molécula solvatante for a água, isto é, se um hidrato for formado, a interação entre a substância e a água, que ocorre na fase cristalina, reduz a quantidade de energia liberada quando o hidrato sólido dissolve-se em água. Conseqüentemente, cristais hidratados tendem a exibir uma solubilidade aquosa inferior à de suas formas não hidratadas. Quando outros solventes, que não a água, estiverem presentes no retículo cristalino, a substância é denominada de solvato. De modo geral, é indesejável utilizar solvatos para fins farmacêuticos, dado que a presença de vapores orgânicos pode ser vista como impureza desnecessária no produto (AUTON, 2005).

Com o intuito de investigar o potencial de obtenção de formas polimórficas da OLM, Koike e colaboradores (2003) desenvolveram um estudo recristalizando a matéria-prima da OLM em diferentes solventes. Os resultados avaliados por espectrofotometria na região do IV, DSC, TGA e XRPD foram muito semelhantes. Análises realizadas após trituração, aquecimento e acondicionamento das amostras em distintas condições de umidade, por quatro semanas, também não revelaram diferenças em relação às amostras preparadas inicialmente. Em 2006, Kumar e colaboradores patentearam um estudo sobre o processo de preparação do polimorfo da OLM, designado *Forma G*. Esta forma cristalina foi obtida através do preparo de soluções do fármaco em diferentes solventes contendo grupamentos nitrila (acetonitrila, propionitrila e mistura de ambas), álcoois de 1 a 12 átomos de carbono (metanol, etanol, isopropanol, butanol, terc-butanol e mistura de ambos) e mistura de ambos (2:30, v:v), em temperatura adequada. Os resultados foram avaliados através da aplicação de técnicas termoanalíticas (DSC e TGA) e por XRPD.

A presença de dados na literatura sobre a caracterização das propriedades polimórficas de uma substância, não inviabiliza a realização de novos estudos sobre as mesmas. Logo, dentro deste contexto, o presente capítulo apresenta os resultados obtidos com a recristalização da SQR da OLM utilizando diferentes solventes orgânicos e temperaturas. As diferentes amostras encontradas foram caracterizadas utilizando diferentes técnicas analíticas como: espectrofotometria por ATR-FTIR, XRPD, DSC, TGA e MEV.

7.2 MÉTODOS DE CRISTALIZAÇÃO

No processo de síntese de fármacos, em geral, a sequência de eventos segue a seguinte ordem: síntese, purificação, cristalização, secagem, cisalhamento e estocagem do fármaco (GIRON, 1998). Durante esses processos as características físico-químicas dos fármacos serão determinadas, bem como possíveis contaminantes e resíduos de solventes e substâncias relacionadas à síntese do mesmo. Dentre as etapas citadas, existe a possibilidade de ocorrência de transformações polimórficas durante a fase de cristalização, secagem e estocagem do fármaco (GIRON e GORDBRONN, 1997; GIRON 1998; TOSCANI, 1998; GIRON *et al.*, 2002).

Os cristais são obtidos por meio da indução de alterações do estado líquido para o estado sólido, existindo dois métodos para isso. O primeiro deles consiste no resfriamento da amostra fundida abaixo do seu ponto de fusão. O outro método consiste em promover uma alteração no sistema de uma solução da substância de tal forma que leve à obtenção de um sólido. À temperatura e pressão determinadas, todo e qualquer soluto dissolve-se em qualquer líquido até uma determinada quantidade máxima, obtendo-se uma solução saturada. Para formar cristais a partir de uma solução é necessário atingir uma situação na qual exista mais soluto presente do que aquele que pode ser dissolvido, a uma temperatura específica. Por fim, isso resultará na formação de um sólido em equilíbrio com a solução saturada. Assim, para fazer com que o sólido precipite a partir de uma solução saturada pode-se proceder segundo umas das seguintes formas (AUTON, 2005):

- Remoção de líquido por meio de evaporação;

- Resfriamento da solução, uma vez que a maioria das substâncias torna-se menos solúvel com a diminuição da temperatura;
- Adição de outro líquido miscível com a solução, no qual o soluto tenha baixa solubilidade.

Os processos pelos quais os cristais formam-se são denominados de nucleação e crescimento. Nucleação é a formação de uma pequena massa sobre a qual o cristal pode aumentar, enquanto que crescimento refere-se à adição de mais moléculas do soluto, no sítio de nucleação. Três tipos de comportamento podem ser reconhecidos como dependentes da nucleação e da taxa de crescimento cristalino: (a) a forma mais estável cristaliza preferencialmente em qualquer concentração, (b) a forma menos estável cristaliza somente em altas concentrações ou (c) a forma menos estável cristaliza em concentrações intermediárias (THREFALL, 2000).

Para conseguir a nucleação e o crescimento, é necessário ter uma solução saturada, ou seja, uma solução na qual a quantidade de soluto dissolvida exceda sua solubilidade verdadeira. As soluções saturadas não são termodinamicamente estáveis e, sob esta circunstância, o sistema tenderá ao equilíbrio retornando à condição de verdadeira solubilidade, vindo o soluto a precipitar. Porém, em algumas situações o processo de nucleação pode ser lento. Quando as condições de cristalização são alteradas de alguma forma, é possível que as moléculas passem a formar cristais com um padrão de arranjo estrutural diferente do obtido sob as condições originais do processo. Esta alteração de condições pode significar um solvente diferente, modificação na agitação ou a presença de diferentes tipos de impurezas (VLACK, 1970).

Alguns sistemas levam a obtenção de um sólido que se apresenta como uma mistura de forma cristalina e forma amorfa. Nestes casos, a quantificação da fração cristalina na mistura, denominada de grau de cristalinidade, é um fator importante a ser controlado, especialmente pela possibilidade da ocorrência de polimorfismo e pseudopolimorfismo em um mesmo sistema. O grau de cristalinidade de um fármaco pode ser estabelecido por métodos como DSC e XRPD. Estes dois métodos são capazes de detectar alterações nas formas cristalinas, apontando a presença de

formas polimórficas, metaestáveis ou parcelas amorfas do fármaco (BAUER-BRANDL, 1996; SHEKUNOV e YORK, 2000).

7.3 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO E DETECÇÃO DE POLIMORFOS

Diferentes métodos analíticos são utilizados para identificar e caracterizar a forma cristalina do fármaco durante as várias etapas do seu desenvolvimento entre eles destacam-se: a espectrofotometria na região do IV, a cristalografia, a análise térmica, a microscopia, os estudos de solubilidade e ressonância magnética nuclear.

Neste trabalho foram empregadas as seguintes técnicas:

➤ **Espectrofotometria na região do IV**

Esta técnica baseia-se na exposição da amostra a uma radiação eletromagnética de comprimento de onda na região do IV, mensurando a absorção desta radiação pela molécula em análise. Esta absorção resulta de modificações na energia vibracional da molécula em um determinado momento dipolar, o que permite identificar o tipo de ligação presente (SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002).

A transformada de Fourier (FTIR) utiliza-se do mesmo princípio da espectroscopia em IV tradicional diferenciando-se apenas no domínio onde o espectro é mensurado. Esta técnica é uma função matemática que converte o domínio do tempo para o domínio da frequência. Dentro do campo das ciências farmacêuticas, tem grande aplicação no controle de qualidade de fármacos, já que esta metodologia permite identificar moléculas com uma boa margem de segurança, uma vez que o resultado é único para cada substância existente, à exceção dos isômeros ópticos, que apresentam os mesmos espectros (USP 32, 2009).

Uma das vantagens desta técnica é a possibilidade de fornecer espectros a partir de dois modos distintos, transmissão ou reflexão, os quais estão relacionados com a forma de incidência da radiação IV sobre a amostra. Na espectrofotometria por ATR-FTIR, o feixe de IV é focado sobre uma pequena área da amostra. Como a substância é analisada na forma de pó, não é necessária compressão do analito com KBr, evitando, desse modo, a indução de possíveis transições polimórficas que

podem ocorrer durante a compressão do mesmo para obtenção da pastilha (SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002).

Ao contrário da análise por IV convencional, que não apresenta uma boa capacidade de detecção de algumas transformações, mostrando registros bem semelhantes, a espectrofotometria por ATR-FTIR torna-se útil para a caracterização de polimorfos e hidratos, pois as ligações normais de hidrogênio (vibrações O-H, N-H ou C=O), frequentemente diferem entre as formas das estruturas cristalinas e os grupos funcionais envolvidos (KALINKOVA, 1999; BUGAY, 2001).

Normalmente, a espectrofotometria na região do IV antecede a técnica de XRPD. As alterações observadas nos espectros como o surgimento de novas bandas, ampliação ou alterações na intensidade ou posição das bandas, observadas em relação ao espectro original devem ser associadas com as alterações nos difratogramas obtidos em condições semelhantes (KALINKOVA, 1999).

➤ **Cristalografia: Difração de raios-x de pó (XRPD)**

A XRPD baseia-se na propriedade intrínseca de cada cristal em desviar, em um ângulo específico, a direção dos raios-X emitidos sobre ele. O ângulo de desvio da radiação é único para cada forma do cristal, permitindo assim caracterizá-lo (SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002). A notação matemática deste desvio é descrita pela Lei de Bragg definida pela equação 7.1.

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \text{sen } \theta \quad (7.1)$$

Onde:

n = número inteiro;

d = distância entre planos paralelos;

λ = comprimento de onda do raio-x;

θ = ângulo de incidência.

Os difratogramas gerados são característicos e distintos para cada substância, os quais são formados por um conjunto de linhas ou picos, apresentando diferentes intensidades e posições (distâncias interplanares “ d ”). Para uma dada substância, as posições dos picos são essencialmente fixas e características. A intensidade pode variar um pouco entre diferentes amostras, dependendo do método de preparação da amostra e condições instrumentais. Com o intuito de identificação de fases cristalinas, deve-se avaliar principalmente as posições dos picos, considerando semi-qualitativamente as intensidades, devido à orientação preferencial (BRITTAİN, 2001).

A difratometria de raios-x é um método rápido e eficiente de avaliar se uma amostra se encontra no estado amorfo ou cristalino. Permite identificar as fases cristalinas presentes numa amostra e às vezes é o único meio de determinar, entre possíveis polimorfos de uma substância, a forma predominante, como é o caso do grafite e do diamante, por exemplo. A comprovação da formação de solvatos também é uma possibilidade do método (BLEICHER e SASAKI, 2000).

➤ **Microscopia**

Na maioria das vezes os polimorfos diferem na morfologia do cristal (hábito cristalino), sendo este um importante critério de análise preliminar para monitoração de cristalização. As formas dos cristais de polimorfos podem ser observadas por microscópio óptico (MO) ou eletrônico de varredura (EM), e quando combinados com outros métodos analíticos, podem fornecer a diferenciação entre as formas cristalinas (RODRIGUEZ-SPONG *et al.*, 2004).

Ambos os microscópios têm uso comum para caracterização de polimorfos e solvatos. Embora o MO seja mais limitado (trabalha até 600X), em relação ao MEV (trabalha até 90000X e fornece imagens com elevado grau de informação em três dimensões), os dois são complementares e muito úteis durante os estágios iniciais de desenvolvimento do fármaco (BRITTAİN, 1999).

➤ **Técnicas termoanalíticas**

A aplicação de técnicas termoanalíticas na caracterização de fármacos, aliada a outras técnicas, vem tornando-se um importante instrumento nos estudos de pré-formulação e controle de qualidade da indústria farmacêutica. Entre essas técnicas destacam-se a calorimetria exploratória diferencial (DSC) e a análise termogravimétrica (TGA), que fornecem informações como: pureza de amostras, fusão, dessolvatação, recristalizações, transições no estado sólido, interações, cinética de decomposição e presença de componentes voláteis (FORD e TIMMINS, 1989).

A DSC determina a diferença de energia fornecida à substância em análise e um material de referência, em função da temperatura, enquanto estas são submetidas a uma programação controlada de temperatura. Esta técnica é aplicada nas investigações de mudanças termodinâmicas que ocorram durante o aquecimento da substância (BRITAIN, 1999).

Na avaliação de substâncias que apresentam diferentes formas cristalinas é possível determinar a mudança de estrutura cristalina, as temperaturas de fusão e dessolvatação, que aparecem em sinais endotérmicos e exotérmicos na curva de DSC. Permite ainda a discriminação entre os sistemas polimórficos como monotropismos ou enantiotropismos e auxilia na previsão e análise para a descoberta de hidratos e solvatos. Estudos de sorção/dessorção também podem ser avaliados por esta técnica provendo maiores detalhes para a caracterização de estruturas polimórficas (GIRON, 1995; BRITAIN, 1999).

A TGA mede a perda ou ganho de massa em função da temperatura aplicada sendo restrita às transições que envolvem tanto ganho, quanto perda de massa. É muito usada na análise de processos de dessolvatação e decomposição de substâncias. Estudos de comparação de estabilidade das estruturas cristalinas, também podem ser avaliados por esta técnica, pois em geral, quanto mais alta for a temperatura de decomposição de um determinado composto, maior será a sua estabilidade à temperatura ambiente. É um método útil, também, para quantificação de conteúdo volátil de um sólido, podendo ser usada como técnica para

quantificação de umidade e distinção entre as formas solvatadas e anidras de um determinado composto (BRITAIN, 1999).

7.4 MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais e os métodos utilizados para análise das características polimórficas obtidas para as amostras da SQR da OLM submetidas às diferentes condições de recristalização encontram-se descritos no artigo: “*Solid-state Characterization of Olmesartan Medoxomil Polymorphic Behavior*”, submetido para publicação no periódico internacional *Journal of Pharmacy Research*.

7.5 CONCLUSÃO

- Os diferentes procedimentos de recristalização da SQR da OLM permitiram a obtenção de uma forma amorfa (Amostra XI) e outra polimórfica (Amostra XIII), as quais puderam ser comprovadas através do conjunto de técnicas de caracterização empregadas;
- A espectrofotometria por ATR-FTIR possibilitou a seleção das amostras recristalizadas da SQR da OLM, obtidas através dos dois processos propostos, com espectros distintos ao do fármaco não recristalizado;
- Através da aplicação das técnicas termoanalíticas, como DSC, foi possível constatar que as Amostras II, XI e XIII apresentaram diferentes pontos de fusão em relação à OLM SQR. Observou-se, também, que as Amostras XI e XIII apresentaram eventos térmicos exotérmicos referentes à evaporação do solvente de recristalização utilizado, sugerindo, desse modo, que ambas poderiam ser estruturas pseudopolimórficas (solvatos). No entanto, foi possível esclarecer, por TGA, que as Amostras XI e XIII tratavam-se de uma estrutura solvatada e outra não solvatada, respectivamente;
- Demonstrou-se, por meio da aplicação da MEV, que ocorreram diferenças morfológicas e macroscópicas das Amostras II, XI e XIII em relação à SQR do fármaco em questão;

- O emprego da XRPD, como técnica de referência na caracterização de compostos cristalinos, foi fundamental para confirmar a descoberta das duas estruturas obtidas: a amorfa (Amostra XI), que havia sido considerada um solvato por TGA, e a polimórfica (Amostra XIII), cuja estrutura cristalina foi diferente da descrita na literatura por Kumar e colaboradores (2006);
- Por fim, os resultados obtidos demonstraram que, com exceção da XRPD, torna-se necessário a utilização de um conjunto de técnicas específicas para assegurar a ocorrência de espécies polimórficas da OLM.

7.6 REFERÊNCIAS

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, J. L. V. **Farmacotécnica: Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 6ª Ed. São Paulo: Premier, 2000.

AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. Trad. George G. O. Porto Alegre, Ed. Artemed, 2005.

BAUER-BRANDL, A. Polymorphic transition of cimetidine during manufacture of solid dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 140, p. 195-206, 1996.

BECKMAN, W. Crystallization of Pharmaceutical Compounds-Polymorphs, Pseudo-Polymorphs and Particle Formation. **Engineering Life Science**, v. 3, p. 113-120, 2003.

BLEICHER, L.; SASAKI, J. M. **Introdução à difração de raios-x em cristais**. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, p. 1-20, 2000.

BOTTOM, R. The role of modulated temperature differential scanning calorimetry in the characterization drug molecule exhibiting polymorphic and glass forming tendencies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 192, p. 47-53, 1999.

BRITAIN, H.G. Difração de Raio-X: Aplicações Farmacêuticas da Difração de Raio-X em Pós. **Pharmaceutical Technology**, v. 5 (3), p. 22-30, 2001.

BRITAIN, H.G. Structural Aspects of Polymorphism. In: **Polymorphism in Pharmaceutical Solids**. New York. Marcel Dekker. v. 95 (3), p. 73-124, 1999.

BUGAY, D.E. Characterization of the solid-state: spectroscopic techniques. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, p. 43-65, 2001.

FORD, J. L.; TIMMINS, P. **Pharmaceutical thermal analysis: technique and application**. New York: Willey Interscience, 1989.

GIRON, D. Thermal analysis and calorimetric methods in the characterization of polymorphs and solvates. **Thermochimica Acta**, v. 248, p. 1-59, 1995.

GIRON, D. Contribution of thermal methods and related techniques to the rational development of pharmaceuticals. **Pharmaceutical Sciences and Technology**, v. 1, p.191-199, 1998.

GIRON, D.; GOLDBRONN, C.; MUTZ, M.; PFEFFER, S.; PIECHON, P.; SCHWAB, P. Solid state characterizations of pharmaceutical hydrates. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 68, p. 453-465, 2002.

KALINKOVA, G. N. Infrared spectroscopy in pharmacy. **Vibrational spectroscopy**, v. 19, p.307-320, 1999.

MORRIS, K. R. Structural Aspects of Hydrates and Solvates. In: BRITAIN, H.G. **Polymorphism in Pharmaceutical Solids**. New York. Marcel Dekker, Inc., 1999.

RAW, A. S.; FURNESS, M. S.; GILL, D. S.; ADAMS, R. C.; HOLCOMBE, F. O.; YU, L. X. Regulatory considerations of pharmaceutical solid polymorphism in Abbreviated New Drug Applications (ANDAs). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 26, p.397-414, 2004.

RODRÍGUES-SPONG, B.; PRICE, C. P.; JAYASANKAR, A.; MARZGER, A. J.; RODRÍGUEZ-HORNEDO, N. General principles of pharmaceutical solid polymorphism: a supermolecular perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Londres, v. 56, p. 241-274, 2004.

SHARGEL, L.; YU, A. B. C. **Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics**. 3.ed. London: Prentice-Hall International, 1993.

SHEKUNOV, B. Y.; YORK, P. Crystallization process in pharmaceutical technology and drug delivery design. **Journal of Crystal Growth**, v. 211, p. 122-136, 2000.

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

TOSCANI, S. An up-to-date approach to drug polymorphism. **Thermochimica Acta**, v. 321, p. 73-79, 1998.

USP 32. **The United States Pharmacopoeia**. 32th ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2009.

VLACK, V. H. L. Reações no estado sólido. In: **Princípios de Ciência dos Materiais**. São Paulo, Ed. Edgard Blucher Ltda, 1970.

Solid-state characterization of olmesartan medoxomil polymorphic behavior

Lisiane Bajerski*, Ana Paula Cappa Silva, Rochele Cassanta Rossi, Carolina Lupi
Dias, Ana Maria Bergold, Pedro Eduardo Fröhlich

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
Av. Ipiranga, 2752, Cep: 90610-000, Porto Alegre - RS, Brasil

*Corresponding author: Tel: +55 51 33085313; Fax: +55 51 33085313
E-mail adress: lisianebajerski@yahoo.com.br

ABSTRACT

Full characterization of polymorphic content of bulk drug chemicals has become increasingly important in the pharmaceutical industry. A multitude of analytical techniques are commonly used in this process. In this context, the feasibility of the attenuated total reflectance Fourier transformed infrared (ATR-FTIR) spectrophotometry, along with differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetry (TG), X-ray powder diffraction (XRPD), and scanning electron microscopy (SEM) were applied to investigate the presence of polymorphism in olmesartan medoxomil bulk product. Different solvents and cooling rates of recrystallization originated two new structures distinct from the one used and described in the literature.

Keywords: olmesartan medoxomil, solid-state characterization, polymorphism, recrystallization.

INTRODUCTION

Polymorphism is defined as the ability of a substance to exist in different crystalline phases or forms that have different arrangements and/or conformations of the molecule in the crystal lattice^[1]. As a consequence, the polymorphic solids have different chemical and physical properties with biopharmaceutical effects in the dissolution rates and/or bioavailability^[2]. Therefore the physical characterization of the solid state of a drug has become an extremely important area in pharmaceuticals and has been the subject of many studies involving different analytical methods^[3].

The pharmaceutical solids are mostly small organic molecules that form molecular crystals which are held together by weak inter- and intra-molecular forces (mainly, hydrogen bonds and Van der Waals attractions). The different structural forms of these materials occur due to the diverse dispositions that their constituent molecules can adopt in the solid state. The formation of different crystalline forms can also be induced by the incorporation of water (hydrates) and organic solvents (solvates) in their structures. Some active ingredients with long, "flexible" molecules may be difficult to crystallize and tend to produce amorphous materials during precipitation. Also, they can exhibit partial order between that of a crystalline phase and an amorphous state^[4,5].

Olmesartan medoxomil (OLM, Fig. 1) is considered the latest angiotensin II receptor blocker, approved in 2002 by the Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of hypertension. OLM is also reported to be effective in animal models of atherosclerosis, liver disorders, and diabetic nephropathy^[6]. It is used, either alone or in combination with other drugs, to treat high blood pressure. To improve the solubility and bioavailability, this drug was formulated as a prodrug, which is rapidly and completely hydrolyzed to the active metabolite olmesartan (OL), by both arylesterase and albumin during gastrointestinal absorption^[7,8]

This antihypertensive, chemically known as (5-methyl-(2-oxo-1,3-dioxol-4-yl)methyl-4-(1-hydroxy-1-methylethyl)-2-propyl-1-[2'-(1H)-tetrazol-5yl]1,1' biphenyl(-4-yl)methyl]-1H-imidazole-5-carboxylate] is a white to yellowish white non-hygroscopic powder or crystalline, which is considered a weakly basic compound ($pK_a = 4.3$), practically insoluble in water and sparingly soluble in methanol. Its solubility is high in fairly acidic and alkaline solutions, and it is low in the pH range from 4.0 to 6.0^[9].

To investigate the potential for polymorphic forms Koike *et al.* (2003) developed a research where samples of OLM were recrystallised using a variety of solvents (acetone, methanol, ethanol, acetonitrile, ethyl acetate, and dichloromethane). The resulting infra-red (IR) spectra, DSC thermograms, and XRPD diffratograms were very similar. No polymorphic changes were observed following grinding (using a mortar and pestle), heating and/or exposure over 4 weeks to high humidity (70°C, 40°C/31% relative humidity (RH); 75% RH, and 70°C/75% RH). The same conjuncts of techniques were used to investigate some crystal behavior alterations, and the results does not detected changes from those prepared initially.

However, Kumar *et al* (2006) described a patented process for the preparation of a novel crystalline polymorph of OLM, designed Form G, which was obtained preparing a drug solution in one or more solvents selected from the group containing nitrile, alcohol, and mixtures thereof at a suitable temperature.

According to this, the purpose of this study was to re-examine the presence of crystalline forms of OLM samples prepared by recrystallization from different organic solvents, using distinct cooling rates. For solid-state characterization, analytical techniques such as ATR-FTIR spectroscopy, DSC, TG, XRPD, and SEM were used.

MATERIAL AND METHODS

Samples recrystallization process

OLM reference substance (RS, purity 99.3%), purchased from Sequoia Research Products (Oxford, UK), was exposed to different conditions, applying analytical grade solvents according to conditions described below:

- Process I: an amount equivalent to 50 mg of OLM RS was dissolved in 10 ml of methanol, acetonitrile, and a mixture of methanol and acetonitrile (5:5, v:v), respectively, in volumetric flask. The solvents were pre-heated at 40±1°C for previous solubilization. After stirring for 60 min, at room temperature (23±1°C), the insoluble material was removed by filtration and each filtrate was submitted to the recrystallization process which was carried out by slow (room temperature and refrigeration at 8±2°C) and rapid evaporation (40±1°C). After drying at 40±1°C in vacuum stove, during 60 min, the resulting solid was removed and weighted.

- Process II: 50 mg of OLM RS was dissolved in 10 ml of methanol in graduated becker, which the content was stirred during 60 minutes, at constant temperature ($40\pm 1^\circ\text{C}$). Following, the insoluble material was removed by filtration and each filtrate was submitted to the recrystallization process, which was carried out by slow (room temperature and refrigeration at $8\pm 2^\circ\text{C}$), rapid evaporation ($40\pm 1^\circ\text{C}$ and cooled under a stream of nitrogen).

The conditions are summarized in Table 1.

ATR-FTIR

Spectra were recorded on a Perkin-Elmer Mod. 1600 FT-IR spectrophotometer, equipped with a deuterium triglycine sulfate (DTGS) detector. Data was recorded from 4000 to 600 cm^{-1} and the number of scans per spectrum was set to 20. The samples were analyzed directly in the attenuated total reflectance (ATR) mode (Pike Miracle ATR Accessory, Perkin-Elmer). This technique avoids polymorphic transitions possibly induced by the grinding and compression used to obtain a KBr pellet.

Thermal analysis

The DSC analysis was carried out using a Shimadzu DSC-60 calorimeter, equipped with purge gas flux control (N_2) FC-60-A, integrator TA-60WS and control analysis software TA-60 version 2.0, operating at a temperature range of 25 - 300°C . Approximately 2 mg of samples were weighed in an aluminum pan and scanned at a heating rate of $10^\circ\text{C min}^{-1}$, under synthetic air atmosphere (50 mL min^{-1}). The DSC equipment was preliminarily calibrated with an indium reference standard.

The TG curves were obtained with a TA Instruments Universal Analysis 2000 thermobalance, using platinum crucibles. Approximately, 3 mg of samples were measured from 25 to 600°C at a heating rate of $10^\circ\text{C min}^{-1}$, under synthetic air atmosphere (50 mL min^{-1}). The decomposition was monitored as a function of temperature and weight loss. The equipment was preliminarily calibrated with a calcium oxalate reference standard.

XRPD

Crystals were characterized by XRPD obtained with a Siemens diffractometer model D5000, with a $\text{CuK}\alpha$ radiation ($\lambda = 1.5418\text{ \AA}$). This instrument is equipped with a secondary graphite monochromator and a scintillation detector, and it was operated

at 40 kV and 25 mA. A fixed scatter slit of 0.2° and a 1 mm receiving slit were used. The data were registered in the interval of $5 - 40^\circ$ (2θ), in steps of 0.02° with a counting time of 10 s/step.

SEM

The photomicrographs of samples were taken with a Phillips scanning electron microscope, model XL30. Samples were mounted on metal stubs using double-sided adhesive tape, vacuum-coated with platinum (350 \AA) in a Polaron E 5000 sputter coating unit and directly analyzed by SEM (1000x), with excitation voltage of 10 kV.

RESULTS AND DISCUSSION

ATR-FTIR

The ATR-FTIR spectroscopy was applied in this study because it is the most suitable technique of the non-destructive spectroscopic methods. This technique has become an attractive method in the quantitative analysis of pharmaceutical solids, since the materials are not subjected to thermal or mechanical energy during sample preparation, therefore preventing solid-state transformations^[10].

ATR-FTIR spectra of Samples III, V, VI and IX showed no expressive changes in the characteristic bands monitored: 3285 cm^{-1} ($-\text{OH}$ group), $2956 - 2929 \text{ cm}^{-1}$ (aliphatic groups), 1830 cm^{-1} ($-\text{COOH}$ ester moiety), 1704 cm^{-1} ($-\text{COOH}$ cyclic ester moiety), and $824 - 704 \text{ cm}^{-1}$ ($-\text{CH}$ aromatic).

ATR-FTIR spectra of Samples I, II, IV, VII, VIII, X, XI, and XII were similar among them, but slightly different from OLM RS reference spectrum. Their characteristic bands are evident at $1704 - 1680 \text{ cm}^{-1}$; 1328 cm^{-1} ; $1301 - 1257 \text{ cm}^{-1}$; $1068 - 1053 \text{ cm}^{-1}$; $824 - 816 \text{ cm}^{-1}$; and $781 - 759 \text{ cm}^{-1}$.

Spectrum of Sample XIII showed some differences in relation to OLM RS and the others.

The three different patterns obtained are presented in Fig. 2.

Thermal analysis

Solvates (and hydrated) are distinguish from polymorphs forms by combination of DSC and TG techniques, which are applied to distinguish the desolvation process^[11].

Even though, thermal analysis be it a widely applied techniques in drug polymorphism studies, it does not provide sufficient evidence for the existence of polymorphism by itself, thus is essential to apply other techniques to analyze this phenomenon correctly^[11].

The DSC curves analysis (Fig. 3) showed that all OLM RS recrystallized samples, except Sample XI, showed two well-defined thermal events, one exothermic peak, corresponding to the fusion of drug, followed by the other endothermic peaks, representing the decomposition process in the range of $T_{\text{peak}}=225.00^{\circ}\text{C}$, for all samples.

In addition to this, the melting points values (Table 2) of OLM RS and Samples II, XI, and XIII were different from that reported in the literature for OLM Form G ($T_{\text{peak}}=105.23^{\circ}\text{C}$)^[13]. OLM RS and Sample II showed one exothermic event, while both Samples XI and XIII presented two exothermic peaks at 63.95 - 68.40 - 72.46 $^{\circ}\text{C}$ (onset/peak/endset), and 93.54–110.20–120.98 $^{\circ}\text{C}$ (onset/peak/endset), respectively, related to the loss of methanol recrystallization solvent. The second exothermic peak was referent to melting point of both samples.

The high melting point and fusion energy of OLM RS and Sample II indicate that they were more thermodynamically stable in that temperature region than the Samples XI and XIII. A decrease in the exothermic enthalpy of Sample XI indicates a reduction in the crystallinity of the sample, which is characteristic of amorphous compound^[12].

The TG analysis was used to confirm that Sample XI is a solvate, due to a presence of one thermal event at range of 47.17–78.84 $^{\circ}\text{C}$ (onset/endset), relative to the loss of methanol molecule (2.46% weight decrease), in the temperature region of $T_{\text{peak}}=69.05^{\circ}\text{C}$, which correspond, approximately, to the DSC temperature peak around $T_{\text{peak}}=68.40^{\circ}\text{C}$. However, the Sample XIII was considered a non-solvate, since was not observed a loss of mass in the temperature range of methanol boiling heat (64.70–148.40 $^{\circ}\text{C}$).

The TG curves of OLM RS and the recrystallized Samples are presented in Fig. 4 and the TG data are in Table 3.

XRPD

The XRPD is one of the most direct and widely used techniques to identify morphological differences in crystalline powders, because different polymorphs have different molecular arrangement in the crystal lattice^[14].

Based on ATR-FTIR results, Samples II, XI, and XIII were analyzed and the results were compared with OLM RS. The diffractograms are represented at Fig. 5 and the results of 2θ angle, d -distances, and relative intensities (I/I_0) obtained are at Table 4.

The Sample II XRPD showed almost the same 2θ angle and d -distances in relation of OLM RS XRPD profile, however the peak intensities were not the same from the pattern due to the different amount of powder used in the analysis.

The investigation of Sample XI XRPD confirmed that this is an amorphous form.

In relation of Sample XIII XRPD was observed some peaks which are indicative of a different pattern. This Sample showed 2θ angle differences at 0-5.0° and 10.0-30.0° regions, and was characterized by the presence of five peaks at 4.5°, 13.5°, 15.5°, 17.8°, and 26.9°, that are not present in the OLM SQR and Sample II. In addition to this, in the 2θ angle range of 5.0-10.0°, the peak correspond to 8.3°, that is characteristic at OLM RS and Sample II, disappear at Sample XIII.

Kumar *et al.* (2006) described one crystal form, called Form G, obtained by recrystallization of OLM RS from methanol, at 40°C, and cooled to induce recrystallization. The completed process is described in U.S. Pat. No. 5.616.599 and U.S. Patent Application Publication No.2006/0069141. The characteristic peaks obtained for Form G were at 2θ of 4.5°, 13.4°, 16.8°, 17.7° and/or 23.1°.

According to USP 32 (2009)^[19], the scattering angle of the ten strongest reflections should be within ± 0.20 degree and its relative intensities should be at most 20% is possible consider that the samples (sample and pattern) are identical. Thus, Sample XIII can be considered another OLM polymorphic form, since its 2θ angle peaks referent to 7.2°, 11.7°, 12.7°, 14.5°, 15.0°, 20.7°, and 27.6° do not coincide with 2θ angle of Form G.

SEM

Morphological and crystal habit of Samples II, XI, and XIII were studied by SEM and compared with OLM RS (Fig. 6). Visual inspection of the obtained crystal forms revealed different behavior concerning morphology, crystal habit and particle size.

During the crystallization of a substance, external factors can lead to the formation of a special crystalline habit regardless the fact that a compound presents the same internal structure. The factors involved are rate of cooling and speed of solution agitation, degree of supersaturation, nature of crystallizing solvent and presence of impurities^[15-18]. These variables can affect crystal growth and consequently crystalline habit, influencing crystal properties such as particle size, form, purity, imperfections in the structure, and consequently thermodynamical and mechanical properties of the crystal can be modified^[15,17]. Hence, in order to obtain a unique crystal form, the standardization of the crystallization conditions is required^[15].

CONCLUSION

New crystalline form of OLM was obtained, different from that reported by Kumar *et al.* (2006), when submitted to different recrystallization conditions.

The different cooling rate of recrystallization originated two different structures: amorphous (Sample XI), by slow cooling under refrigeration ($8\pm 2^\circ\text{C}$), and polymorphic (Sample XIII), by rapidly cooling under a stream of nitrogen, both obtained by Process II.

The ATR-FTIR spectroscopy, XRPD, thermal analysis, and SEM enabled us to identify and characterize Samples XI and XIII of OLM in solid-state, due to the differences in their unique vibrational peaks, 2θ values, melting points, and distinct crystal shape and size, respectively.

These differences in the recrystallized samples obtained must be carefully evaluated, since they can impact not only in the dissolution rate and bioavailability of the drug, but also in the manufacturing, since compressibility, fluidity, and stability of polymorphs are expected to be different.

ACKNOWLEDGMENT

We acknowledge CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa - Brasil) for financial support.

REFERENCES

1. Britain H, Physical Characterization of Pharmaceutical Solids, ed. by Marcel D, New York, 1995.
2. Vippagunta SR, Brittain HG, Grant DJW, Adv Drug Deliv Rev, 2001, 48: 3-26.
3. Bugay D, Adv Drug Deliv Rev, 2001, 48: 43-65.
4. Henck JO, Griesser UJ, Burger A, Pharm Ind, 1997, 59-165.
5. Stahly JP, Polymorphism in the Pharmaceutical Industry, ed. by Hilfiker R., Germany, 2006.
6. Sagirli O, Onal A, Toker SE, Sensoy D, Chromatographia, 2007, 66: 213-218.
7. Norwood D, Branch E, Smith B, Honeywell M, P & T, 2002, 27(12): 611-617.
8. Laeis P, Puchler K, Kirch W, J of Hypertens, 2001, 19: 21-32.
9. Koike H, Konse T, Sada T, Ikeda T, Hyogo A, Hinman D, Saito H, Yanagisawa H, Annual Report Sankyo Research Laboratories, 2003, 55, 1-91.
10. Stephenson GA, Forbes RA, Reutzel-Edens SM, Adv Drug Deliv, 2001, 48: 67-90.
11. Giannelline V, Bambagiotti-Albert M, Bartolucci G, Bruni B, Coran SA, Constantino F, J Pharm Biomed Anal, 2005, 39: 444-454.
12. Vippagunta SR, Brittain HU, Grant DJW, Adv Drug Deliv Rev, 2001, 48: 3-26.
13. Kumar BVS, Khairne K, Airoli GBP, Thane NSCP, Vashi SBB, United States Patent Application Publication 2006/0281800 A1, : <http://www.freshpatents.com>, Google Web, 23 may, 2009.
14. Wu LS, Gerard C, Hussain MA, Pharm Res, 1993, 1793-1795.
15. Haleblian JK, J Pharm Sci, 1975, 64: 1269-1288.
16. Berkovitch-Yellin Z, J Am Chem Soc, 1985, 107: 8239-8253.
17. Shekunov BY, York P, J Cryst Growth, 2000, 211: 122-136.
18. Tiwary AK, Drug Dev Ind Pharm, 2001, 27: 699-709.
19. USP, The United States Pharmacopoeia 32th, 2009, Rockville, MD.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1 - Chemical structure of OLM.

Fig. 2 - Comparative ATR-FTIR spectra of OLM RS (1); pattern 1, obtained for Samples I, II, IV, VII, VIII, X, XI, and XII (2); pattern 2, obtained for Samples III, V, VI and IX (3), and pattern 3, obtained for Sample XIII (4).

Fig. 3 - DSC profiles of OLM RS (1) and Samples II (2); XI (3); and XIII (4).

Fig. 4 - TG/DTG curves of OLM RS and Samples II, XI, and XIII.

Fig. 5 - XRPD patterns of OLM RS, Samples II, XI, and XIII.

Fig. 6 - MEV of OLM RS (A), Samples II (B), XI (C), and XIII (D) obtained at magnification of 1000x.

Fig. 1 -

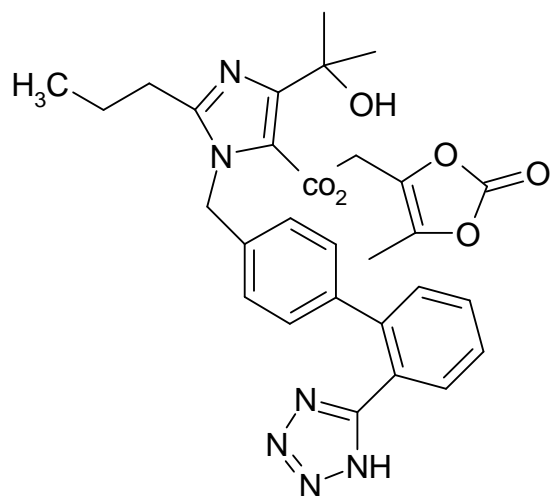


Fig. 2 -

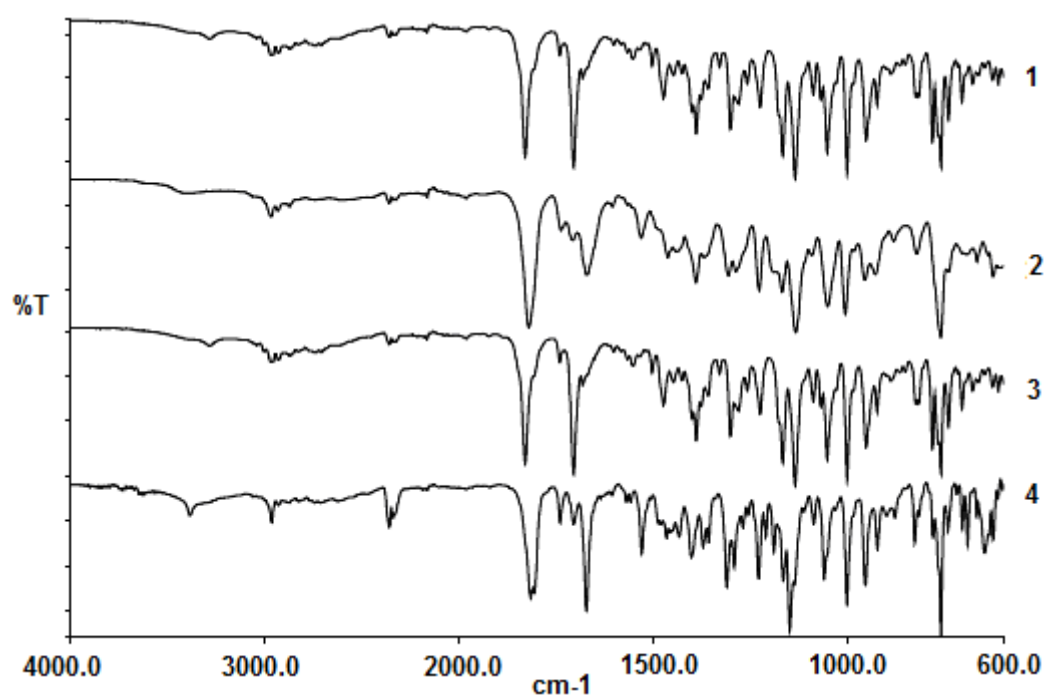


Fig. 3-

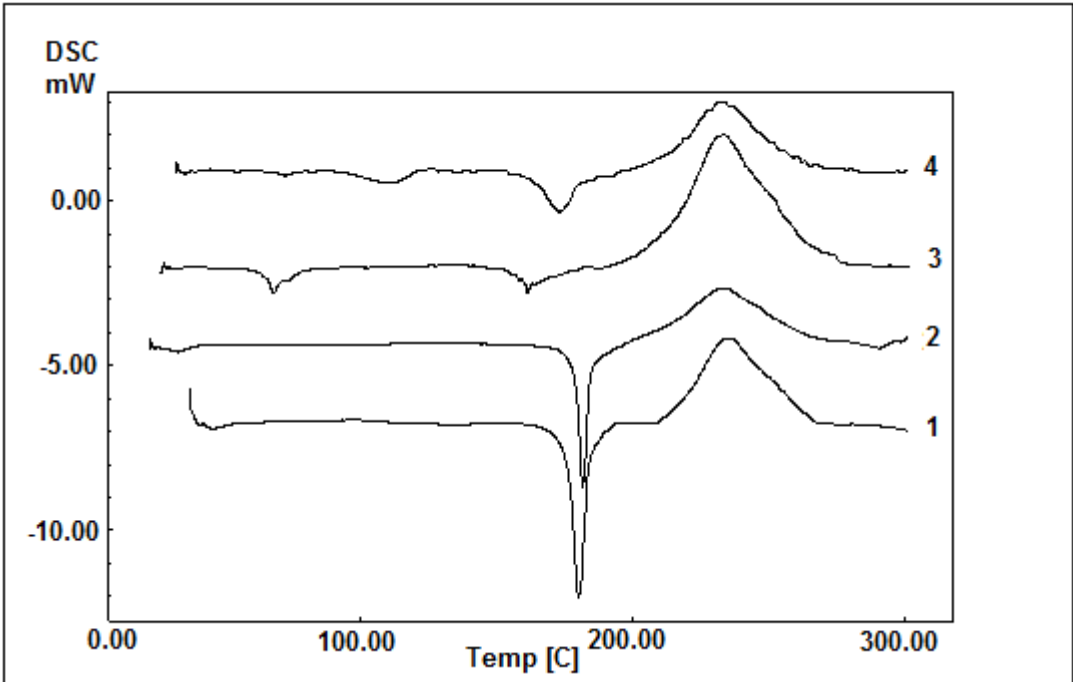


Fig. 4-

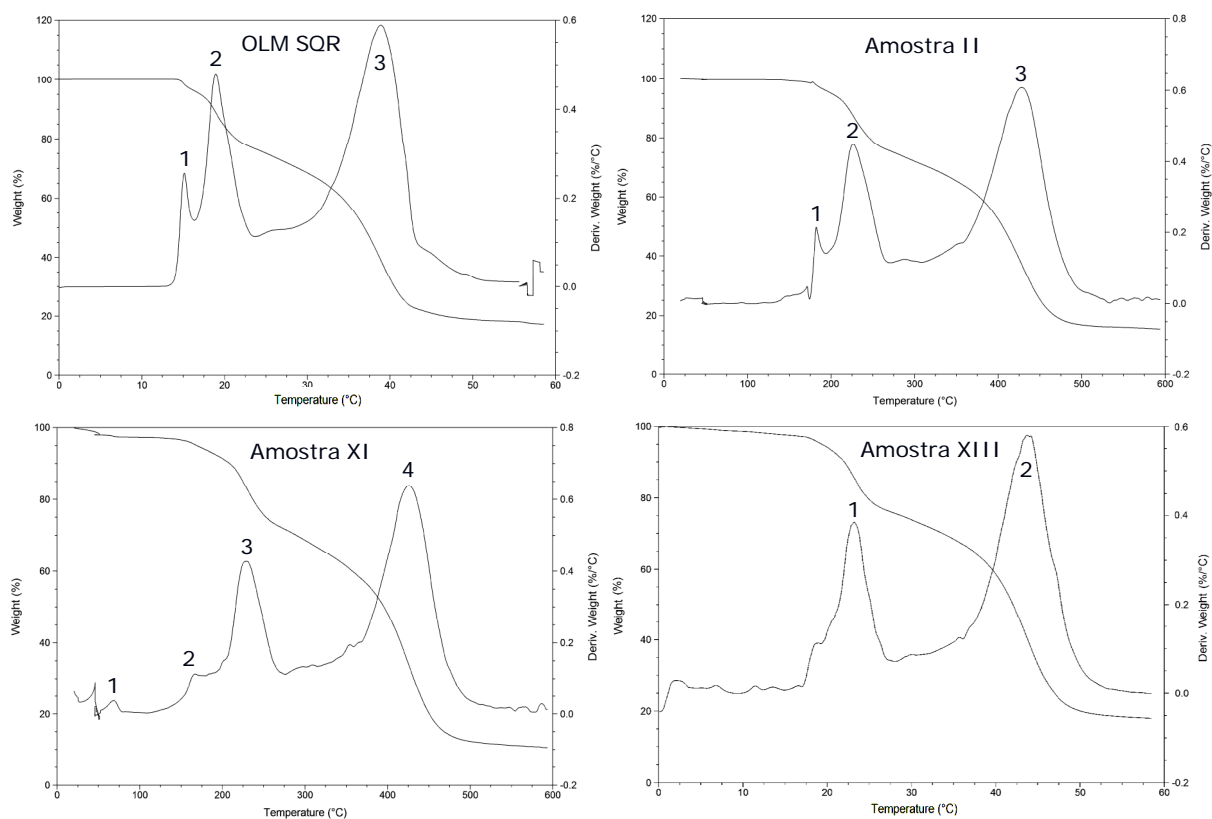


Fig. 5 -

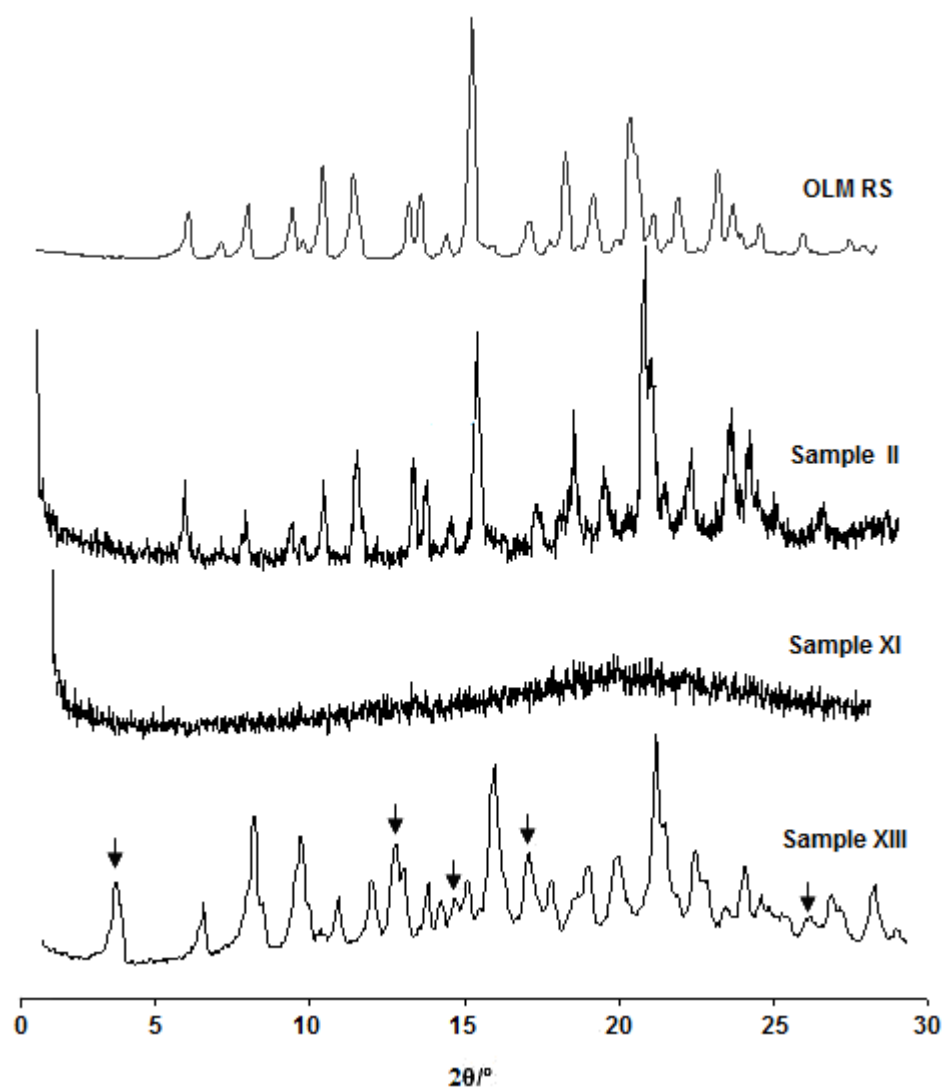


Fig. 6 -

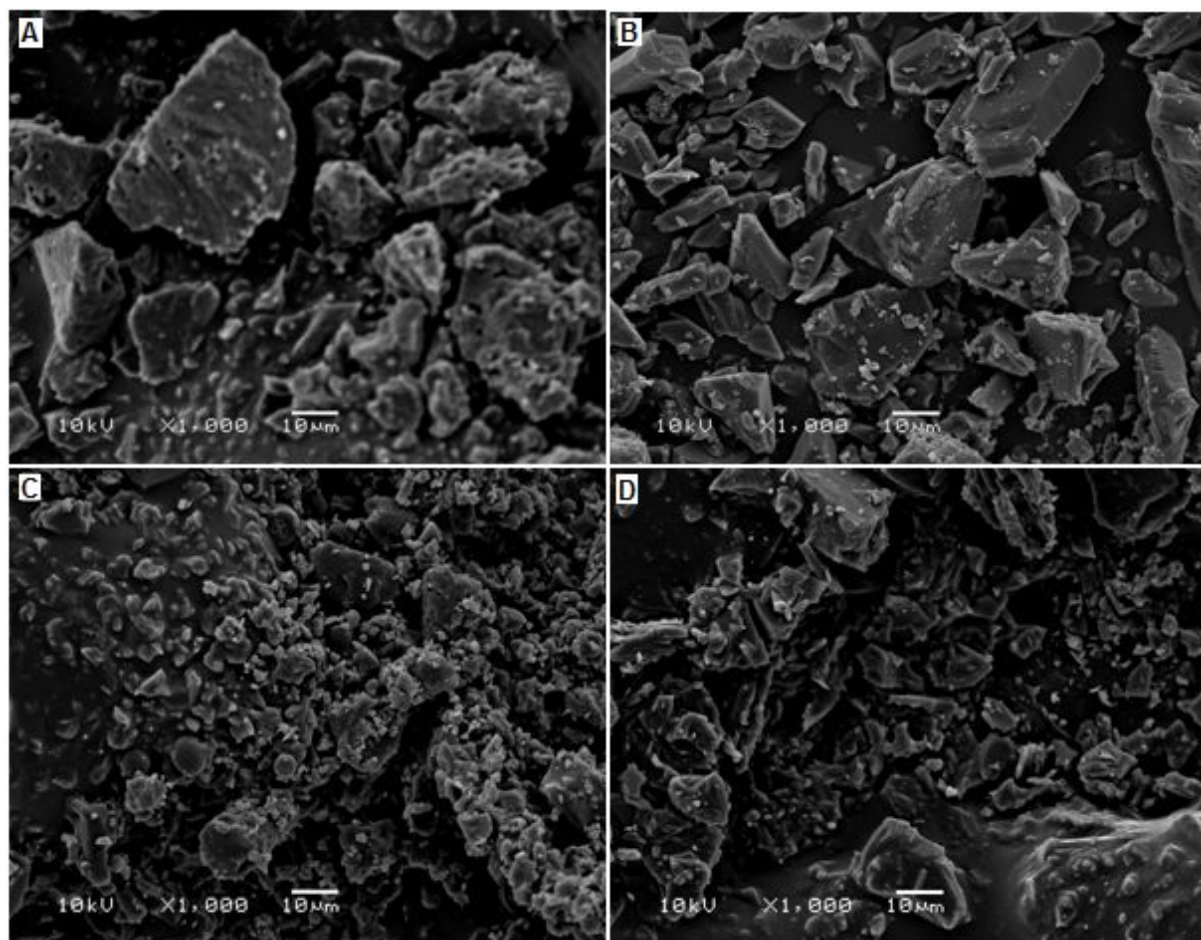


Table 1 - Recrystallization processes of OLM RS.

| Sample | Solvent | Recrystallization temperature (°C) | |
|------------|---------|------------------------------------|-------------------------------|
| Process I | I | 23±1°C | |
| | II | Methanol | 8±2°C |
| | III | | 40±1°C |
| | IV | | 23±1°C |
| | V | Acetonitrile | 8±2°C |
| | VI | | 40±1°C |
| | VII | | 23±1°C |
| | VIII | Methanol:Acetonitrile (5:5, v:v) | 8±2°C |
| | IX | | 40±1°C |
| Process II | X | 23±1°C | |
| | XI | Methanol | 8±2°C |
| | XII | | 40±1°C |
| | XIII | | N ₂ gas atmosphere |

Table 2 - DSC data of OLM RS and the recrystallized forms.

| Sample | ΔH (J/g) | Peak$^{\circ}C$ | T$^{\circ}C$ onset | T$^{\circ}C$ endset |
|---------------|------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| OLM RS | -106.68 | 180.33 | 176.36 | 184.22 |
| II | -94.30 | 181.67 | 179.01 | 184.11 |
| XI | -27.97 | 161.46 | 151.28 | 160.07 |
| XIII | -46.90 | 173.13 | 163.30 | 179.42 |

Table 3- TG data of OLM RS and the recrystallized samples.

| Sample | Thermal events | Temperature Range(°C) | Loss(%) |
|---------------|-----------------------|------------------------------|----------------|
| OLM RS | 1 | 180.10 – 210.90 | 1.74 |
| | 2 | 210.90 – 278.76 | 11.54 |
| | 3 | 330.65 – 479.90 | 62.77 |
| II | 1 | 173.97 – 194.02 | 2.19 |
| | 2 | 194.02 – 270.76 | 12.44 |
| | 3 | 310.16 – 532.08 | 62.90 |
| XI | 1 | 47.17 – 78.84 | 2.46 |
| | 2 | 112.81 – 179.03 | 4.70 |
| | 3 | 179.03 – 276.92 | 16.32 |
| | 4 | 346.60 – 527.99 | 66.38 |
| XIII | 1 | 160.61 – 274.62 | 14.36 |
| | 2 | 352.93 – 534.90 | 60.23 |

Table 4 - XRPD data for *d*-distances and relative intensities (*I/I*_o) of OLM RS, Samples II, and XIII, and Form G.

| OLM SR | | | Sample II | | | Sample XIII | | | Form G | | |
|----------------|--------------|-----------------------------|----------------|--------------|-----------------------------|----------------|--------------|-----------------------------|----------------|--------------|-----------------------------|
| 2 θ (°) | <i>d</i> (Å) | <i>I/I</i> _o (%) | 2 θ (°) | <i>d</i> (Å) | <i>I/I</i> _o (%) | 2 θ (°) | <i>d</i> (Å) | <i>I/I</i> _o (%) | 2 θ (°) | <i>d</i> (Å) | <i>I/I</i> _o (%) |
| - | - | - | - | - | - | 4.50 | 19.62 | 53.15 | 4.59 | 19.23 | 28.14 |
| 7.20 | 12.26 | 31.01 | 7.24 | 12.20 | 74 | 7.25 | 12.18 | 20.23 | - | - | - |
| 8.30 | 10.64 | 11.45 | 8.34 | 10.59 | 24 | - | - | - | - | - | - |
| 9.15 | 9.65 | 36.56 | 9.16 | 9.64 | 53 | 8.90 | 9.92 | 42.60 | 8.75 | 10.09 | 24.98 |
| 10.65 | 8.30 | 34.26 | 10.66 | 8.29 | 38 | 10.40 | 8.50 | 37.47 | 10.38 | 8.51 | 48.50 |
| 11.65 | 7.59 | 60.18 | 11.66 | 7.58 | 80 | 11.75 | 7.52 | 20.16 | - | - | - |
| 12.65 | 6.99 | 55.26 | 12.70 | 6.96 | 105 | 12.75 | 6.91 | 25.42 | - | - | - |
| - | - | - | - | - | - | 13.50 | 6.55 | 33.97 | 13.31 | 6.64 | 58.67 |
| 14.50 | 6.10 | 38.18 | 14.56 | 6.07 | 90 | 14.55 | 6.08 | 25.36 | - | - | - |
| 14.90 | 5.94 | 42.58 | 14.96 | 5.91 | 71 | 15.00 | 5.90 | 19.85 | - | - | - |
| - | - | - | - | - | - | 15.50 | 5.71 | 20.27 | 15.65 | 5.65 | 18.14 |
| 15.80 | 5.60 | 16.61 | 15.76 | 5.61 | 44 | 15.85 | 5.58 | 25.48 | 16.13 | 5.49 | 27.37 |
| 16.60 | 5.33 | 15.40 | 16.56 | 5.34 | 202 | 16.65 | 5.32 | 56.34 | 16.75 | 5.28 | 62.76 |
| - | - | - | - | - | - | 17.80 | 4.97 | 33.08 | 17.72 | 5.00 | 60.02 |
| 18.55 | 4.77 | 25.07 | 18.56 | 4.77 | 52 | 18.55 | 4.77 | 25.07 | 18.43 | 4.81 | 40.96 |
| 19.75 | 4.49 | 68.70 | 19.66 | 4.51 | 121 | 19.75 | 4.49 | 29.55 | 19.27 | 4.60 | 22.90 |
| 20.70 | 4.28 | 40.88 | 20.56 | 4.05 | 248 | 20.55 | 4.27 | 32.00 | 20.48 | 4.33 | 30.81 |
| 21.90 | 4.05 | 91.28 | 21.88 | 4.05 | 248 | 21.90 | 4.05 | 65.52 | 21.73 | 4.08 | 21.60 |
| 22.65 | 3.92 | 28.52 | 22.54 | 3.94 | 75 | - | - | - | - | - | - |
| 23.45 | 3.79 | 39.68 | 23.44 | 3.79 | 98 | 23.25 | 3.82 | 31.73 | 23.12 | 3.84 | 100.0 |
| 24.80 | 3.58 | 55.34 | 24.74 | 3.59 | 119 | 24.85 | 3.58 | 27.10 | 24.81 | 3.58 | 21.09 |
| 25.30 | 3.51 | 36.36 | 25.22 | 3.52 | 93 | 25.30 | 3.51 | 22.25 | - | - | - |
| - | - | - | - | - | - | 26.95 | 3.30 | 16.28 | - | - | - |
| 27.60 | 3.22 | 18.28 | 27.66 | 3.22 | 62 | 27.60 | 3.22 | 22.43 | 28.57 | 3.12 | 25.97 |
| 29.20 | 3.05 | 12.64 | 29.66 | 3.01 | 56 | 29.00 | 3.07 | 24.86 | 28.96 | 3.08 | 42.00 |

Tabela 8.1 - ANOVA das áreas absolutas da curva padrão da OLM, intervalo de 10 a 30 µg/ml, obtidas por CLAE, utilizando coluna Phenomenex® RP₁₈ (250 mm x 4 mm, 5 µm); fase móvel: água: trietilamina: acetonitrila (60: 0,3: 40 v/v/v), pH 6,3 ajustado com ácido *orto*-fosfórico 18%; vazão: 1,2 mL/ min; volume injetado: 20 µL.

| Fontes de variação | GL | SQ | Variância | F _{calculado} | F _{crítico} |
|-----------------------|----|-------------------------|-------------------------|------------------------|----------------------|
| ENTRE | 4 | 1,93 . 10 ¹² | 4,82 . 10 ¹¹ | 1,45 . 10 ⁴ | 3,48* |
| Regressão linear | 1 | 1,93 . 10 ¹² | 1,93 . 10 ¹² | 5,82 . 10 ⁴ | 4,96* |
| Desvio de linearidade | 3 | 1,88 . 10 ⁸ | 6,26 . 10 ⁷ | 1,89 | 3,71** |
| DENTRO | 10 | 3,31 . 10 ⁸ | 3,31 . 10 ⁷ | | |
| Variação total | 14 | 1,93 . 10 ¹² | 1,38 . 10 ¹¹ | | |

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; *significativo para $p < 0,05$; **não significativo para $p > 0,05$.

Tabela 8.2 - ANOVA dos resultados obtidos no teste de precisão inter-dias ($n = 18$) dos comprimidos da OLM por CLAE, utilizando coluna Phenomenex® RP₁₈ (250 mm x 4 mm, 5 µm); fase móvel: água: trietilamina: acetonitrila (60: 0,3: 40 v/v/v), pH 6,3 ajustado com ácido *orto*-fosfórico 18%; vazão: 1,2 mL/ min; volume injetado: 20 µL.

| Fontes de variação | GL | SQ | Variância | F _{calculado} | F _{crítico} |
|--------------------|----|------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------|
| ENTRE | 2 | 1,16 | 5,80 . 10 ⁻¹ | 6,30 . 10 ⁻¹ | 3,68* |
| DENTRO | 15 | 1,37 . 10 ¹ | 9,10 . 10 ⁻¹ | | |
| Variação Total | 17 | 1,48 . 10 ¹ | 8,70 . 10 ⁻¹ | | |

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; *não significativo para $p > 0,05$.

Tabela 8.3 - ANOVA das áreas absolutas da curva padrão da OLM, intervalo de 2 a 100 µg/ml, obtidas por MECC, utilizando capilar de sílica fundida 40 cm de comprimento (40 cm efetivos, 50 µm de diâmetro interno); eletrólito tampão borato 10mM: 5 mM de lauril sulfato de sódio pH 6,5 (95:5 v/v); voltagem 30 kV; detecção UV em 257 nm; temperatura de 25°C.

| Fontes de variação | GL | SQ | Variância | F _{calculado} | F _{crítico} |
|-----------------------|----|-------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------|
| ENTRE | 6 | 2,72 . 10 ¹ | 4,53 | 2,75 . 10 ² | 3,48* |
| Regressão linear | 1 | 2,72 . 10 ¹ | 2,72 . 10 ¹ | 1,65 . 10 ³ | 4,96* |
| Desvio de linearidade | 5 | 5,20 . 10 ⁻³ | 1,00 . 10 ⁻³ | 6,00 . 10 ⁻² | 3,71** |
| DENTRO | 14 | 2,30 . 10 ⁻¹ | 1,65 . 10 ⁻² | | |
| Variação total | 20 | 2,74 . 10 ¹ | 1,37 | | |

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; *significativo para $p < 0,05$; **não significativo para $p > 0,05$.

Tabela 8.4 - ANOVA dos resultados obtidos na comparação entre os métodos por CLAE e MECC, para determinação da OLM.

| Fontes de variação | GL | SQ | Variância | $F_{\text{calculado}}$ | $F_{\text{crítico}}$ |
|--------------------|----|------|-----------|------------------------|----------------------|
| ENTRE | 1 | 2,65 | 2,65 | 2,13 | 7,71* |
| DENTRO | 4 | 4,98 | 1,25 | | |
| Variação Total | 5 | 7,64 | 1,53 | | |

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; *não significativo para $p > 0,05$.

Tabela 8.5 - ANOVA das áreas absolutas da curva padrão da OLM, intervalo de 5 a 30 $\mu\text{g/ml}$, obtidas por CLAE, utilizando coluna Phenomenex[®] RP₁₈ (250 mm x 4 mm, 5 μm); fase móvel: água: trietilamina: acetonitrila (60: 0,3: 40 v/v/v), pH 6,3 ajustado com ácido *orto*-fosfórico 18%; vazão: 1,2 mL/ min; volume injetado: 20 μL .

| Fontes de variação | GL | SQ | Variância | $F_{\text{calculado}}$ | $F_{\text{crítico}}$ |
|-----------------------|----|----------------------|----------------------|------------------------|----------------------|
| ENTRE | 5 | $2,38 \cdot 10^{12}$ | $4,75 \cdot 10^{11}$ | $4,07 \cdot 10^3$ | 3,11* |
| Regressão linear | 1 | $2,38 \cdot 10^{12}$ | $2,38 \cdot 10^{12}$ | $2,03 \cdot 10^4$ | 4,75* |
| Desvio de linearidade | 4 | $1,04 \cdot 10^7$ | $2,59 \cdot 10^6$ | $2,22 \cdot 10^{-2}$ | 3,26** |
| DENTRO | 12 | $1,40 \cdot 10^9$ | $1,17 \cdot 10^8$ | | |
| Variação total | 17 | $2,38 \cdot 10^{12}$ | $1,40 \cdot 10^{11}$ | | |

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; *significativo para $p < 0,05$; **não significativo para $p > 0,05$.

Tabela 8.6 - ANOVA dos resultados obtidos na determinação da curva padrão da OLM, intervalo de 5 a 30 $\mu\text{g/ml}$, obtidas por espectrofotometria na região do UV.

| Fontes de variação | GL | SQ | Variância | $F_{\text{calculado}}$ | $F_{\text{crítico}}$ |
|-----------------------|----|----------------------|----------------------|------------------------|----------------------|
| ENTRE | 5 | 2,47 | $4,90 \cdot 10^{-1}$ | $2,61 \cdot 10^4$ | 3,11* |
| Regressão linear | 1 | 2,47 | 2,47 | $1,30 \cdot 10^5$ | 4,75* |
| Desvio de linearidade | 4 | $8,40 \cdot 10^{-5}$ | $2,10 \cdot 10^{-5}$ | 1,10 | 3,26** |
| DENTRO | 12 | $2,28 \cdot 10^{-4}$ | $1,90 \cdot 10^{-5}$ | | |
| Variação total | 17 | 2,47 | $1,40 \cdot 10^{-1}$ | | |

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; *significativo para $p < 0,05$; **não significativo para $p > 0,05$.

Tabela 8.7 - ANOVA dos resultados obtidos na comparação entre os métodos por CLAE e espectrofotometria na região do UV, para determinação da OLM.

| Fontes de variação | GL | SQ | Variância | $F_{\text{calculado}}$ | $F_{\text{crítico}}$ |
|--------------------|----|-------------------|-------------------|------------------------|----------------------|
| ENTRE | 3 | $1,82 \cdot 10^1$ | 6,08 | $8,41 \cdot 10^{-3}$ | 4,84* |
| DENTRO | 21 | $1,51 \cdot 10^4$ | $7,22 \cdot 10^2$ | | |
| Varição Total | 24 | $1,52 \cdot 10^4$ | $6,32 \cdot 10^2$ | | |

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; * não significativo para $p > 0,05$.

Tabela 8.8 - ANOVA fator único dos resultados encontrados na eficiência de dissolução (ED%), obtidas na comparação entre os métodos por CLAE e espectrofotometria na região do UV, para determinação da OLM nos comprimidos Benicar[®].

| Fontes de variação | GL | SQ | Variância | $F_{\text{calculado}}$ | $F_{\text{crítico}}$ |
|--------------------|----|-------------------|-----------|------------------------|----------------------|
| ENTRE | 11 | $3,94 \cdot 10^1$ | 3,58 | $8,90 \cdot 10^{-1}$ | 2,07* |
| DENTRO | 36 | $1,44 \cdot 10^2$ | 4,00 | | |
| Varição Total | 47 | $1,83 \cdot 10^2$ | 3,90 | | |

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; * não significativo para $p > 0,05$.

Tabela 8.9 - ANOVA dos resultados obtidos na robustez do método de dissolução, obtidas na comparação entre diferentes valores de pH (6,4 e 6,8) para determinação do percentual de OLM dissolvida nos comprimidos Benicar[®], por CLAE.

| Fontes de variação | GL | SQ | Variância | $F_{\text{calculado}}$ | $F_{\text{crítico}}$ |
|--------------------|----|-------------------|-------------------|------------------------|----------------------|
| ENTRE | 1 | $7,78 \cdot 10^1$ | $7,78 \cdot 10^1$ | $3,70 \cdot 10^{-1}$ | 5,12* |
| DENTRO | 8 | $1,81 \cdot 10^3$ | $2,26 \cdot 10^2$ | | |
| Varição Total | 9 | $1,89 \cdot 10^3$ | $2,09 \cdot 10^2$ | | |

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; * não significativo para $p > 0,05$.

Tabela 8.10 - ANOVA dos resultados obtidos na robustez do método de dissolução, obtidas na comparação entre diferentes valores de pH (6,4 e 6,8) para determinação do percentual de OLM dissolvida nos comprimidos Benicar[®], por espectrofotometria na região do UV.

| Fontes de variação | GL | SQ | Variância | $F_{\text{calculado}}$ | $F_{\text{crítico}}$ |
|--------------------|----|-------------------|-------------------|------------------------|----------------------|
| ENTRE | 1 | $1,28 \cdot 10^2$ | $1,28 \cdot 10^2$ | $6,10 \cdot 10^{-1}$ | 5,12* |
| DENTRO | 8 | $1,77 \cdot 10^3$ | $2,21 \cdot 10^2$ | | |
| Varição Total | 9 | $1,89 \cdot 10^3$ | $2,10 \cdot 10^2$ | | |

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; * não significativo para $p > 0,05$.