



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CAMPUS MACAÉ**



**CURSO DE FARMÁCIA**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA  
ESPECTROFOTOMÉTRICA NO ULTRAVIOLETA POR CALIBRAÇÃO  
MULTIVARIADA PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE DELAPRIL E  
INDAPAMIDA EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS**

**REGIANE MARIA GONÇALVES DE AMORIM E CERQUEIRA LEITE**

Macaé-RJ  
Dezembro/2014

REGIANE MARIA GONÇALVES DE AMORIM E CERQUEIRA LEITE

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA  
ESPECTROFOTOMÉTRICA NO ULTRAVIOLETA POR CALIBRAÇÃO  
MULTIVARIADA PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE DELAPRIL E  
INDAPAMIDA EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS**

Monografia apresentada ao  
Curso de Farmácia da  
Universidade Federal do Rio de  
Janeiro – Campus Macaé, como  
um dos requisitos para obtenção  
do título de farmacêutico.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Vítor Todeschini.

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Thiago Barth.

Macaé-RJ  
Dezembro/2014

L533 Leite, Regiane Maria Gonçalves de Amorim e Cerqueira.

Desenvolvimento e validação de metodologia espectrofotométrica no ultravioleta por calibração multivariada para determinação simultânea de delapril e indapamida em formulações farmacêuticas /Regiane Maria Gonçalves de Amorim e Cerqueira Leite. - Macaé: [s. n.], 2014.  
68 f. : il.

Orientadores: Vítor Todeschini  
Thiago Barth

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro. Campus Macaé - Macaé, 2014.  
Bibliografia: f. 55-65.

1. Calibração multivariada. 2. Delapril. 3. Espectrofotometria no ultravioleta. 4. Indapamida. 5. Validação. I. Todeschini, Vítor. II. Barth, Thiago. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Campus Macaé. IV. Título.

CDD 615.71

## **AGRADECIMENTOS**

Acima de tudo, agradeço a Deus pelo dom da vida e tudo o que me proporciona conhecer neste caminho. Sou imensamente grata por sua presença constante, manifestada muitas vezes pela existência de pessoas maravilhosas ao longo deste percurso.

Aos meus queridos pais pelo amor incondicional de toda a vida. Ao meu irmão, pelo exemplo, motivação e amor de sempre. Ao meu esposo pelo carinho, companheirismo, apoio e amor ao longo dos anos.

Às pessoas queridas que tive oportunidade de conviver neste tempo de graduação. Especialmente, à Tathyanna e à Jéssica pela amizade sincera.

Ao prof. Thiago pela confiança e suporte, sem o qual não teria conhecido, iniciado e desenvolvido este trabalho.

Ao prof. Vítor pela oportunidade, confiança, apoio, incentivo, amizade, compreensão, dedicação e empenho na realização deste trabalho.

Ao prof. Daniel pela atenção, pelos conselhos e suporte no decorrer deste trabalho.

Ao prof. Maximiliano pela colaboração e apoio.

À colega Fernanda pelos auxílios no laboratório.

À FAPERJ e ao CNPq pelo suporte financeiro.

Por fim, agradeço a todos que participaram da minha formação e aos que, mesmo não citados, contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não  
é senão uma gota de água no mar.  
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.*  
(Madre Teresa de Calcutá)

## RESUMO

A combinação entre o delapril (DEL), um inibidor da enzima conversora de angiotensina e a indapamida (IND), um diurético inibidor da reabsorção de sódio, produz um efeito anti-hipertensivo sinérgico, apresentando-se como uma importante alternativa farmacológica no tratamento e controle da hipertensão arterial. No presente estudo foi desenvolvido e validado um método analítico por espectrofotometria no ultravioleta (UV) para a determinação simultânea de DEL e IND em formulações farmacêuticas. Durante o desenvolvimento metodológico foi observada a sobreposição entre os espectros de absorção no UV dos fármacos, comprometendo a seletividade do método e inviabilizando a determinação simultânea dos mesmos através da espectrofotometria direta. Assim, a otimização voltou-se à aplicação de ferramentas que empregam cálculos matemáticos para análise multicomponente, especialmente a calibração multivariada. Uma vez selecionados o solvente e concentrações de trabalho mais adequados em relação às respostas analíticas, o método teve o seu desenho experimental delineado com o auxílio do software Minitab® 17.0. O ensaio foi aleatorizado, sendo analisadas 25 soluções contendo combinações das concentrações das substâncias químicas de referência de DEL em 0, 36, 60, 84 e 108 µg/mL e de IND em 0, 3, 5, 7 e 9 µg/mL. As leituras das absorbâncias foram realizadas nos comprimentos de onda de 222, 225, 228, 240, 243 e 246 nm, contemplando as regiões de melhor intensidade espectral para ambos os fármacos. O tratamento estatístico dos dados revelou-se satisfatório para a análise multicomponente, sendo os resultados mais adequados obtidos em 225 e 243 nm para DEL e IND, respectivamente. O método foi validado avaliando-se os parâmetros preconizados internacionalmente, tais como a especificidade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez. Dessa forma, o método proposto mostrou-se simples, de baixo custo, eficiente e confiável para análise quantitativa simultânea de DEL e IND em comprimidos, apresentando-se como uma alternativa aos métodos separativos e contribuindo para o aprimoramento do controle da qualidade de produtos farmacêuticos.

**Palavras-chave:** Calibração multivariada. Delapril. Espectrofotometria no ultravioleta. Indapamida. Validação.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1-</b> Estrutura molecular do delapril.....	19
<b>FIGURA 2-</b> Estrutura molecular da indapamida.....	20
<b>FIGURA 3-</b> Espectros do delapril em diferentes sistemas de solvente.....	41
<b>FIGURA 4-</b> Espectros da indapamida em diferentes sistemas de solvente.....	42
<b>FIGURA 5-</b> Sobreposição dos espectros de absorção no UV de delapril e indapamida .....	42
<b>FIGURA 6-</b> Gráfico normal de resíduos por regressão PLS ( <i>Partial Least Squares</i> ) em 225nm .....	46
<b>FIGURA 7-</b> Gráfico normal de resíduos por regressão PLS ( <i>Partial Least Squares</i> ) em 243nm. ....	46
<b>FIGURA 8-</b> Sobreposição dos espectros de uma solução do placebo contaminado com Substâncias Químicas de Referência (SQR) de delapril (DEL) (60 µg/mL) e indapamida (DEL) (5µg/mL) com outra solução contendo somente as SQR de DEL (60 µg/mL) e IND (5µg/mL) .....	48
<b>FIGURA 9-</b> Gráfico da linearidade do delapril.....	49
<b>FIGURA 10-</b> Gráfico da linearidade da indapamida.....	50
<b>FIGURA 11-</b> Gráfico do teor percentual obtido para precisão intradia e interdia (n=18). .....	52
<b>FIGURA 12-</b> Sobreposição dos espectros de absorção do padrões de delapril (60 µg/mL) e indapamida (5 µg/mL) na zero ordem (a); primeira ordem (b); segunda ordem (c).....	55

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1-</b> Classificação da Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS).....	16
<b>TABELA 2-</b> Classificação dos testes analíticos, de acordo com a sua finalidade.....	28
<b>TABELA 3-</b> Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.....	28
<b>TABELA 4-</b> Limites percentuais do teor do analito para o intervalo de linearidade de métodos analíticos.....	31
<b>TABELA 5-</b> Fatores a considerar na avaliação da robustez do método analítico. ....	35
<b>TABELA 6-</b> Relação dos volumes de solução estoque das substâncias químicas de referência (SQR) necessários para a diluição e preparo das diferentes soluções de DEL e IND. ....	38
<b>TABELA 7-</b> Excipientes presentes na formulação e seus respectivos percentuais utilizados no preparo da solução placebo. ....	39
<b>TABELA 8-</b> Soluções das SQR preparadas para o delineamento do método pela calibração multivariada.....	44
<b>TABELA 9-</b> Resultados das leituras de absorvância de cada solução envolvida no delineamento do método analítico, em diferentes comprimentos de onda.....	45
<b>TABELA 10-</b> Resultados obtidos para a construção de curva de calibração.....	49
<b>TABELA 11-</b> Resultados obtidos no ensaio para verificação da exatidão. ....	51
<b>TABELA 12-</b> Resultados obtidos nos ensaios de precisão do método.....	52
<b>TABELA 13-</b> Tabela contendo os resultados para o doseamento de DEL obtidos no ensaio de robustez. ....	53
<b>TABELA 14-</b> Tabela contendo os resultados para o doseamento de IND obtidos no ensaio da robustez.....	53

## LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BP	<i>British Pharmacopoeia</i>
DEL	Delapril
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DPR	Desvio Padrão Relativo
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
EP	<i>European Pharmacopoeia</i>
HA	Hipertensão Arterial
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
ICH	<i>International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i>
IND	Indapamida
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IV	Infravermelho
MAN	Manidipino
MLR	<i>Multiple Linear Regression</i>
PA	Pressão Arterial
P.A.	Para Análise
PCR	<i>Principal Component Regression</i>
PER	Perindopril
PLS	<i>Partial Least Squares</i>
$r$	Coefficiente de Correlação
$r^2$	Coefficiente de Determinação
SQR	Substância Química de Referência
USP	<i>United States Pharmacopoeia</i>
UV	Ultravioleta
WHO	<i>World Health Organization</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	11
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	14
2.1	Objetivo geral	14
2.2	Objetivos específicos	14
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	15
3.1	Hipertensão arterial sistêmica (HAS)	15
3.2	Tratamento da HAS	17
3.3	Delapril (DEL)	18
3.4	Indapamida (IND)	19
3.5	Associação entre DEL e IND	20
3.6	Métodos analíticos para avaliação de fármacos	21
3.7	Métodos espectrofotométricos	22
3.8	Métodos analíticos envolvendo DEL e IND	24
3.9	Análise multicomponente	25
3.9.1	Calibração multivariada	26
3.10	Validação de métodos analíticos	27
3.10.1	Especificidade	29
3.10.2	Linearidade	29
3.10.3	Limite de detecção	30
3.10.4	Limite de quantificação	32
3.10.5	Exatidão	32
3.10.6	Precisão	33
3.10.7	Robustez	34
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	36

<b>4.1</b>	<b>MATERIAIS</b> .....	36
4.1.1	Substâncias químicas de referência (SQR) .....	36
4.1.2	Produtos farmacêuticos.....	36
4.1.3	Solventes, materiais de consumo e vidrarias .....	36
4.1.4	Equipamentos .....	36
4.1.4.1	Espectrofotômetro .....	37
4.1.4.2	Balança analítica .....	37
4.1.4.3	Banho ultrassônico .....	37
4.1.4.4	Pipetador motorizado.....	37
<b>4.2</b>	<b>MÉTODOS</b> .....	38
4.2.1	Preparo das soluções estoques das SQR.....	38
4.2.2	Preparo das soluções das amostras dos comprimidos .....	39
4.2.3	Preparo da solução do placebo.....	39
4.2.4	Espectrofotometria no UV .....	40
4.2.5	Delineamento experimental.....	40
4.2.6	Validação .....	40
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	41
<b>5.1</b>	<b>DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO</b> .....	41
5.1.1	Escolha dos solventes.....	41
5.1.2	Espectros de absorção no UV de DEL e IND.....	42
5.1.3	Calibração multivariada.....	43
<b>5.2</b>	<b>VALIDAÇÃO</b> .....	47
5.2.1	Especificidade .....	47
5.2.2	Linearidade .....	48
5.2.3	Limite de detecção e de quantificação .....	50
5.2.4	Exatidão .....	50
5.2.5	Precisão .....	51

5.2.6 Robustez.....	53
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>54</b>
<b>7 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>55</b>
REFERÊNCIAS.....	55
ANEXO A- Texto da bula do DELAPRIDE®.....	67

## 1 INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é a doença cardiovascular mais frequente na população e a sua prevalência aumenta com o avançar da idade. Sabe-se que cerca de 35% da população a partir de 40 anos e aproximadamente 50% das pessoas entre 60 e 69 anos são hipertensas, sendo a prevalência ainda maior depois dos 70 anos (BRASIL, 2006, 2012; CHOBANIAN *et al.*, 2003; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2010). E esses números apresentam-se crescentes, com o aparecimento cada vez mais precoce da patologia. A HAS é também considerada um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de doença coronariana, assim como de acidentes vasculares cerebrais, apresentando-se como uma das mais importantes causas de morbidade e mortalidade universais. Em vista disso, a HAS é considerada um grave problema de saúde pública no Brasil e no mundo (BOING; BOING, 2007; BRASIL, 2006, 2012; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2010).

Estudos clínicos acerca do tratamento da HAS utilizam tanto a farmacoterapia promovida por um medicamento isolado, ou seja, a monoterapia, como também pelo uso de associações de medicamentos, as terapias combinadas. Como a maior parte dos portadores da HAS não alcança os resultados desejados através da utilização da monoterapia, há uma tendência à utilização de terapias combinadas (BROWN *et al.*, 2003; CIRCELLI *et al.* 2012; CREMONESI *et al.*, 2002; ESCOBAR; BARRIOS, 2009; EUROPEAN SOCIETY OF HYPERTENSION, 2003; HUTT *et al.* 1994; KOHLMANN JR *et al.*, 2006; LEONETTI, 1997; NOGUEIRA, 2003; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2010).

A associação de dois ou mais fármacos é uma prática bastante frequente, uma vez que pode otimizar o tratamento e melhorar a adesão do paciente à terapia prescrita. Atualmente, várias associações de medicamentos estão disponíveis para o tratamento da HAS. Dentre estas estão as associações de ramipril e anlodipino (NAPRIX A<sup>®</sup>, Libbs), manidipino e delapril (HIPERTIL<sup>®</sup>, Farmalab Chiesi), enalapril e hidroclorotiazida (CO-RENITEC<sup>®</sup>, Merck, Sharp & Dome), ramipril e hidroclorotiazida (TRIA TEC D<sup>®</sup>, Sanofi), captopril e hidroclorotiazida (LOPRIL D<sup>®</sup>, Bristol), enalapril e

anlodipino (ATMOS<sup>®</sup>, Eurofarma), alisquireno e hidroclorotiazida (RASILEZ<sup>®</sup> HCT, Novartis), anlodipino e valsartana (Diovan Amlo<sup>®</sup>, Novartis), entre outras. Há também a associação de delapril (DEL) e indapamida (IND) (DELAPRIDE<sup>®</sup>, Chiesi) que em estudos clínicos apresentou segurança, eficácia e tolerabilidade; além de ter mostrado ser mais eficiente na redução e na manutenção da pressão arterial (PA) que outras associações (CAVALIERI; CREMONESI, 2007; CIRCELLI *et al.*, 2012; CREMONESI *et al.*, 2002, 2003; LEONETTI, 1997; ROSEI; RIZZONI, 2003).

Com a produção de novas associações de fármacos de interesse terapêutico, tal como DEL e IND, surge também a necessidade de atender a requisitos regulamentares e cumprir com especificações que garantam a sua qualidade, segurança e eficácia (LA ROCA *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2006). Para tal, o desenvolvimento e a validação de métodos que atendam às exigências das aplicações analíticas e assegure a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados torna-se imprescindível (BRASIL, 2003; ICH, 2005). Por outro lado, a quantificação de uma substância, na presença de excipientes e associações de princípios ativos, pode ser um trabalho complexo, normalmente utilizando técnicas cromatográficas demoradas e dispendiosas (CORDEIRO, 2006; PARISOTTO *et al.*, 2005; VALENTE; AUGUSTO, 2000).

As características favoráveis apresentadas pelas técnicas espectrofotométricas, tais como rapidez, baixo custo, sensibilidade e versatilidade, fazem com que sejam utilizadas em inúmeras aplicações analíticas de rotina. Todavia, a análise de fármacos em medicamentos é frequentemente comprometida pela interferência espectral provocada por outros componentes da formulação, o que geralmente traz limitações à aplicabilidade destas técnicas. Neste sentido, a utilização de ferramentas analíticas, tais como a calibração multivariada e a espectrofotometria derivada, podem contornar este inconveniente; viabilizando a determinação simultânea de fármacos, mesmo em condições de severa sobreposição dos espectros (CORDEIRO *et al.*, 2008; CORRER *et al.*, 2005; FERREIRA *et al.*, 1999).

Considerando que a HAS atinge grande parcela da população mundial e devido ao grande impacto médico, social e econômico que envolve seu tratamento, é essencial possuir métodos analíticos de domínio público para a avaliação da qualidade destes medicamentos. Destaca-se que não foram encontrados métodos de análise simultânea de DEL e IND em compêndios oficiais, assim como na literatura

consultada para avaliações qualitativas e quantitativas em produto acabado e em matérias-primas.

Pretende-se, através deste trabalho, otimizar e validar método espectrofotométrico para determinação simultânea de DEL e IND em comprimidos, buscando-se condições analíticas menos drásticas em relação ao equipamento e ao meio ambiente. Assim, o desenvolvimento de métodos espectrofotométricos com pouca produção de resíduos e com baixa toxicidade, associados à calibração multivariada, poderiam atender a esses propósitos, justificando a realização deste trabalho.

Por essas razões, entende-se que este estudo contribuirá para o domínio tecnológico e científico, aprimorando a área de controle da qualidade e garantindo a segurança e a eficácia terapêutica dos produtos farmacêuticos disponibilizados para a população.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Este trabalho tem como objetivo geral o desenvolvimento e a validação de metodologia espectrofotométrica no ultravioleta (UV) para a determinação simultânea de DEL e IND em formas farmacêuticas.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Desenvolvimento de método espectrofotométrico por UV utilizando a ferramenta de calibração multivariada por PLS (*Partial Least Squares*), a partir de misturas de padrões de DEL e IND;
- Validação da metodologia desenvolvida segundo guias nacionais e internacionalmente aceitos;
- Aplicação da metodologia à análise dos produtos farmacêuticos contendo a associação de DEL e IND;
- Avaliação da aplicabilidade da ferramenta espectrofotométrica derivada na análise simultânea DEL e IND;
- Minimizar a produção de resíduos e proporcionar aos resíduos gerados um encaminhamento seguro, visando à preservação da saúde pública, dos recursos naturais e do meio ambiente.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS)

A HAS pode ser definida como a elevação sustentada da pressão arterial (PA) sistêmica. Está frequentemente associada a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo (coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos) e a alterações metabólicas, com consequente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não-fatais (BRASIL, 2006; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2010).

A HAS é a doença vascular mais prevalente no mundo e o principal fator de risco para as doenças cerebrovasculares, doenças isquêmicas do coração e para a carga global de doenças em homens e mulheres de todas as idades. No ano 2000, foi estimada uma prevalência mundial em torno de 26%. Considerando apenas o aumento populacional e a composição etária, estima-se que em 2025 este percentual será aumentado para 29%, o que equivale a aproximadamente 1,56 bilhão de pessoas afetadas. Cabe destacar que, na América Latina, a HAS afeta mais de um terço da população (KEARNEY, 2004; MOREIRA, 2013; TOCCI *et al.*, 2007; WHO, 2011).

No Brasil, cerca de 30 milhões de pessoas são hipertensas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2010), gerando um custo anual estimado de US\$ 398,9 milhões para o seu tratamento no sistema público de saúde (SUS), representando 1,43% de seus gastos totais, o que demonstra um grande impacto econômico para o país (DIB *et al.*, 2010).

Neste contexto, a HAS apresenta-se como um dos mais importantes problemas de saúde pública, sendo geralmente diagnosticada pela detecção de níveis elevados e sustentados de PA através da medida casual. Recomenda-se que sejam realizadas pelo menos três medidas da PA, sendo considerado hipertenso o paciente com PA sistólica igual ou superior a 140 mmHg e PA diastólica maior que 90 mmHg (BRASIL, 2006; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2010).

Os limites definidos e a classificação da PA foram determinados a partir de estudos estatísticos populacionais, pela Organização Mundial de Saúde e pelo

consenso da comunidade científica especializada, com revisões periódicas. Assim, os critérios para diagnóstico e classificação dos indivíduos acima de 18 anos, de acordo com os níveis tensionais obedecem à VI Diretrizes Brasileira de Hipertensão Arterial (2010), conforme a Tabela 1:

**TABELA 1**– Classificação da Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS).

<b>CLASSIFICAÇÃO</b>	<b>PA SISTÓLICA (mmHg)</b>	<b>PA DIASTÓLICA (mmHg)</b>
Ótima	< 120	< 80
Normal	< 130	< 85
Limítrofe	130-139	85-89
Hipertensão Estágio 1	140-159	90-99
Hipertensão Estágio 2	160-179	100-109
Hipertensão Estágio 3	≥ 180	≥ 110
Hipertensão Sistólica Isolada	≥ 140	< 90

Fonte: SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2010.

Uma vez caracterizado o quadro de HAS, dependendo dos fatores desencadeantes, a patologia pode ser classificada como primária ou secundária. Na hipertensão arterial (HA) primária não há uma causa específica para o aparecimento da patologia, apresentando como fatores de risco a obesidade, o uso de tabaco, o uso de bebidas alcoólicas, a inatividade física, as dislipidemias, a diabetes mellitus, a idade, a microalbuminúria e o histórico familiar de doença cardiovascular prematura. Enquanto que, para a HA secundária há um fator causal específico, como é o caso da HA na gravidez, dos tumores cerebrais que levam ao aumento da pressão intracraniana, das disfunções glandulares, das patologias renais, do uso de substâncias exógenas, entre outros (BRASIL, 2006; CRANWELL-BRUCE, 2008; HOUSTON, 2009; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2010).

### 3.2 Tratamento da HAS

Apesar da HAS não possuir uma cura definida, a PA pode ser controlada de forma eficaz utilizando-se medidas não-farmacológicas, como a modificação do estilo de vida e redução dos fatores de risco, como também através de medidas farmacológicas. Assim, o principal objetivo da terapia anti-hipertensiva é a redução da morbidade e mortalidade de pacientes que apresentam elevado risco cardiovascular. Para isto, visa-se reduzir a PA para valores inferiores a 140 mmHg de pressão sistólica e a 90 mmHg de pressão diastólica, respeitando-se as características individuais, a presença de comorbidades e a qualidade de vida dos pacientes (BRASIL, 2006; CORRÊA *et al.*, 2005; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2010).

O tratamento não-medicamentoso é recomendado para todos os estágios da HAS e relaciona-se à adoção de hábitos alimentares saudáveis, prática de atividades físicas, controle do peso, redução do consumo de álcool e tabaco. Por outro lado, esse tratamento pode não ser suficiente como única estratégia para o controle da PA, em especial, se riscos cardiovasculares adicionais estão envolvidos, tornando-se necessária a implementação de um tratamento medicamentoso (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2010).

Inúmeras abordagens farmacológicas podem ser utilizadas no tratamento e controle da HA. Os medicamentos utilizados para o seu tratamento podem ser divididos em seis classes principais: diuréticos, inibidores adrenérgicos, vasodilatadores diretos, inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA), bloqueadores dos canais de cálcio e antagonistas do receptor AT<sub>1</sub> da angiotensina II (AII). A combinação de fármacos é frequentemente utilizada, uma vez que a monoterapia inicial controla a PA em menos de 1/3 dos hipertensos. Dentre os medicamentos orais disponíveis estão os fármacos inibidores da ECA, tal como o delapril (DEL) e os diuréticos, como a indapamida (IND), que podem ser usados individualmente ou associados (BRASIL, 2006; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2010).

Na escolha da combinação dos fármacos anti-hipertensivos deve-se considerar os diferentes mecanismos de ação das classes dos medicamentos disponíveis, já que a combinação de fármacos com mecanismos complementares apresenta efeitos farmacêuticos aditivos e acarreta na administração de doses menores destes, diminuindo assim os seus efeitos adversos, como as alterações do perfil glicêmico, a hipercalemia, a taquicardia, o aumento de triglicérides e arritmias cardíacas, dentre outros (BROWN *et al.*, 2003; ESCOBAR; BARRIOS, 2009; FIGUEIREDO; BRANDÃO, 2013; GRADMAN *et al.*, 2010; KOHLMANN JR *et al.*, 2006; LAW *et al.*, 2003; PAREEK *et al.*, 2010; POVOA *et al.*, 2014; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2010; STANTON; REID, 2002).

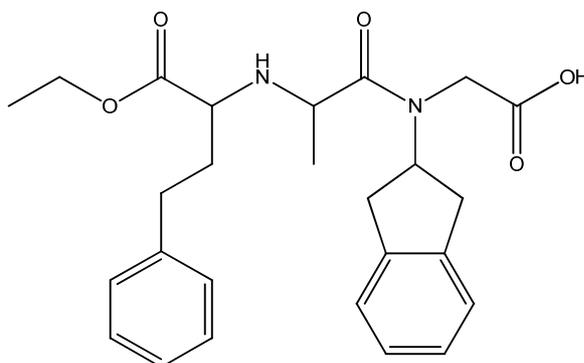
A adesão ao tratamento refere-se ao grau de cumprimento das medidas terapêuticas indicadas, sejam elas medicamentosas ou não, com o objetivo de manter a PA em níveis normais (GUSMÃO; MION JR, 2006). Este comprometimento é imprescindível ao controle da HAS, sendo um dos maiores desafios do tratamento anti-hipertensivo. Uma das razões para uma melhor adesão está centrada na quantidade de medicamentos utilizados e no número de administrações diárias (BROWN *et al.*, 2003; ESCOBAR; BARRIOS, 2009; GRADMAN *et al.*, 2010).

Nesse sentido, o uso de dois fármacos associados em uma única formulação representa um importante determinante para adesão ao tratamento (NOBRE *et al.*, 2003; POVOA *et al.*, 2014). Assim, a associação entre os fármacos DEL e IND (DELAPRIDE®), produzida pelo laboratório Chiesi Farmaceutici S.p.A, constitui uma importante alternativa de terapia farmacológica desta patologia.

### 3.3 Delapril (DEL)

O DEL (2-[(2S)-N-(2,3-dihidro-1H-inden-2-il)-2-[(2S)-1-etoxi-1-oxo-4-fenilbutan-2-il]amino)propanamido] ácido acético) trata-se de um fármaco anti-hipertensivo que apresenta-se fisicamente como um material cristalino incolor, altamente solúvel em metanol, solúvel em etanol e pouco solúvel em água (OKA *et al.*, 1988). Possui massa molar de 452,542 g/mol e apresenta fórmula molecular  $C_{26}H_{32}N_2O_5$ , com a estrutura química representada na Figura 1. O fármaco apresenta valores de pKa de 5,56 e 3,26 (AKIYAMA *et al.*, 1994).

O efeito anti-hipertensivo de DEL se dá através da inibição da ECA, levando a uma diminuição da resistência vascular periférica, com efeito mínimo sobre o débito cardíaco e o volume plasmático (OTERO, 2007).



**FIGURA 1-** Estrutura molecular do delapril.

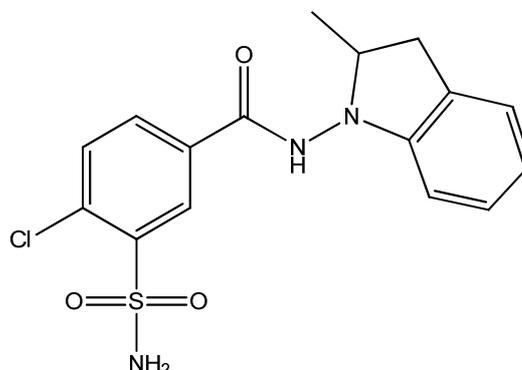
A comercialização de DEL como monoterapia não está disponível em nosso país, mas este é nacionalmente comercializado em combinação ao anti-hipertensivo manidipino (MAN), na forma de comprimidos, na posologia de 30 mg de DEL e 10 mg de MAN.

### 3.4 Indapamida (IND)

A IND (4-cloro-N(2-metil-2,3-dihidroindoli-1-il)-3-sulfamoil-benzamida), uma substância derivada da sulfonamida, é farmacologicamente relacionada aos diuréticos tiazídicos. Apresenta-se como um pó cristalino branco ou levemente amarelado, solúvel em metanol, etanol, ácido acético e acetato de etila, muito ligeiramente solúvel em éter, clorofórmio e benzeno e praticamente insolúvel em água. Possui massa molar de 365,835 g/mol e apresenta fórmula molecular  $C_{16}H_{16}ClN_3O_3S$ . O fármaco é um ácido fraco com pKa de 8,3 e sua estrutura química é apresentada na Figura 2 (EP-6, 2006; RUTSAERT; FERNANDES, 1983).

A atuação farmacológica da IND ocorre através da inibição da reabsorção de sódio e aumento da excreção urinária de sódio e de cloro e, menos intensamente, de

potássio e magnésio, além de uma ação vascular direta, que promove diminuição da resistência vascular periférica (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2007).



**FIGURA 2-** Estrutura molecular da indapamida.

No Brasil, o fármaco é apresentado comercialmente na forma de comprimidos orais de 2,5 mg de liberação imediata e 1,5 mg de liberação prolongada, conhecidos como NATRILIX® 2,5 mg e NATRILIX® SR 1,5 mg (Laboratórios Servier do Brasil). Há também disponível a combinação de IND com o anti-hipertensivo perindopril (PER), na posologia de 0,625 mg de IND e 2 mg de PER e de 1,25 mg de IND e 4 mg de PER, conhecidos como COVERSYL PLUS™ (Laboratórios Servier do Brasil).

### 3.5 Associação entre DEL e IND

A terapia combinada para o tratamento da HA está sendo cada vez mais recomendada, visto que a monoterapia inicial não fornece o controle adequado da PA na maioria dos pacientes (POVOA *et al.*, 2014). A combinação entre o DEL, um inibidor da ECA e a IND, um diurético inibidor da reabsorção de sódio, tem se mostrado uma opção eficaz e bem tolerada pelos pacientes. Além disso, a única administração diária de um comprimido de dose combinada fixa auxilia na adesão dos pacientes. A literatura destaca que o DEL apresenta vantagens no controle da PA em relação a outros fármacos da mesma classe, enquanto a IND oferece maior eficácia e tolerabilidade em doentes com insuficiência renal, quando comparada com outros diuréticos. Juntos, os dois fármacos exercem um efeito renoprotetor, tornando-os adequados para doentes com disfunção renal. Os diferentes mecanismos de ação de

DEL e IND proporcionam efeitos anti-hipertensivos aditivos, o que significa que o controle da PA pode ser conseguido com doses relativamente mais baixas que as utilizadas em monoterapia (CAVALIERI; CREMONESI, 2007; CIRCELLI *et al.*, 2012; CREMONESI, 2002, 2003; LEONETTI, 1997).

Atualmente, a combinação de DEL e IND é comercializada na Itália sob o nome comercial de Delapride®, apresentando-se na forma de comprimidos orais com 30 mg de DEL e 2,5 mg de IND. No país, o medicamento ainda não está disponível.

### **3.6 Métodos Analíticos para Avaliação de Fármacos**

A química analítica é a área responsável pelo desenvolvimento de novas metodologias de análise, que podem ser aplicadas aos mais variados setores da pesquisa científica e laboratórios de rotina. Várias metodologias analíticas estão disponíveis para a análise farmacêutica, dispondo-se de técnicas cromatográficas, eletroquímicas e espectroscópicas, empregadas conforme a análise requerida. A escolha da metodologia analítica apropriada é essencial para a realização do procedimento de controle de qualidade de uma substância ativa ou forma farmacêutica (LA ROCA *et al.*, 2007; RIBANI *et al.*, 2004; SKOOG, 2006; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2007).

As técnicas analíticas apresentam-se em constante evolução, de forma a atender as necessidades de cada época. Atualmente, há um consenso universal sobre a necessidade do monitoramento contínuo da produção de fármacos, de modo a garantir que se cumpram as especificações pré-estabelecidas (SIDDIQUI, 2013). Devido à seriedade que este tipo de controle envolve, grande parte dos métodos analíticos fundamenta-se em técnicas instrumentais modernas, muitas vezes demoradas e dispendiosas, dentre as quais destacam-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (ZEEVI *et al.*, 2001), a cromatografia gasosa (SPEED *et al.*, 2001; WEIGEL *et al.*, 2001; SUNKERSETT *et al.*, 2001) e a eletroforese capilar (AHRER; SCHERWENK; BUCHBERGER, 2001; DILLON *et al.*, 2000; ZAUGG *et al.*, 2001).

### 3.7 Métodos Espectrofotométricos

A espectroscopia é a ciência que estuda as interações da radiação eletromagnética com a matéria, sendo a espectrofotometria relacionada aos processos que utilizam a luz para medir concentrações químicas. Os métodos espectrofotométricos de análise são baseados na medida da quantidade de radiação absorvida pelas moléculas ou pelas espécies atômicas de interesse, sendo amplamente empregados para determinação qualitativa e quantitativa de fármacos (HARRIS, 2005, 2013; SILVERSTEIN; WEBSTER, 1997; SKOOG *et al.*, 2000, 2007). Estes métodos podem ser basicamente classificados em quatro categorias: emissão atômica, luminescência, espalhamento e absorção (SILVERSTEIN; WEBSTER, 1997; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2007).

Os métodos analíticos espectrofotométricos baseados na medida da quantidade de radiação emitida ou absorvida pelas moléculas ou espécies atômicas de interesse são classificados de acordo com a região do espectro eletromagnético envolvida (SILVERSTEIN; WEBSTER, 1997; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2007). Dentre estes métodos, a espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta (UV) destaca-se em virtude de suas características favoráveis. Apresentando ampla aplicabilidade, sendo empregada em química, biologia, ciências forenses, análises clínicas, dentre outros, para determinação direta ou indireta, qualitativa e/ou quantitativa, em sistemas orgânicos e inorgânicos. Mostrando também uma boa sensibilidade, na faixa de  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, podendo chegar a  $10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>; ainda com um aceitável grau de exatidão (com erros relativos na faixa de 1 a 3 %). Além disso, trata-se de uma técnica de fácil operação, onde as medidas são realizadas de forma rápida e fácil (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2007).

A técnica é fundamentada na lei de Lambert-Beer, que é a base matemática para medidas de absorção de radiação por amostras no estado sólido, líquido ou gasoso, nas regiões UV, visível e infravermelho (IV) do espectro eletromagnético. Esta lei afirma que absorbância é proporcional à concentração da absorção do analito em uma solução (HARRIS, 2013; PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2001; SKOOG *et al.*, 2000).

Para medidas de absorção de radiação em determinado comprimento de onda, tem-se:

$$A = \epsilon cl,$$

onde:

A= absorvância,

$\epsilon$ = absorvidade molecular ou coeficiente de extinção,

c= concentração do analito,

l= comprimento do caminho óptico.

A região UV está compreendida na faixa de 200 a 400nm do espectro eletromagnético. A absorção molecular nesta região depende da estrutura eletrônica da molécula envolvida e o comprimento de onda no qual esta molécula absorve depende de quão fortemente seus elétrons estão ligados. As moléculas com ligações insaturadas geralmente apresentam picos de absorção no UV mais intensos, já que os elétrons envolvidos nestas ligações são mais facilmente excitáveis pela radiação UV (HARRIS, 2013; ROCHA; TEIXEIRA, 2004; SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2007).

A utilização da espectrofotometria de absorção molecular no UV permite a determinação quantitativa de um analito, como também a identificação da substância em análise através da comparação espectral (ZARBIELLI; MACEDO; MENDEZ, 2006).

Grande parte dos fármacos são moléculas orgânicas com insaturações e apresentam sinais intensos na região UV, viabilizando a utilização da espectrofotometria no UV, mesmo em baixas concentrações do analito (MADAN *et al.*, 2005). Por outro lado, muitos compostos podem absorver na mesma região do espectro, levando a uma possível baixa seletividade da técnica para a realização de análises de matrizes complexas (MALUF *et al.*, 2008; SAHIN, S.; DEMIR, C.; GÁER, S, 2007). Para contornar este inconveniente diversas alternativas têm sido propostas. Porém, muitas destas estão fundamentadas na aplicação de processos de separação prévia dos compostos, acrescentando etapas que podem prejudicar a reprodutibilidade da análise e aumentando seu custo (CÓRDOVA *et al.*, 2003).

### 3.8 Métodos Analíticos envolvendo DEL e IND

Destaca-se que não há métodos analíticos descritos em compêndios oficiais para determinação simultânea de DEL e IND, como também, não foram encontradas referências descrevendo métodos com o mesmo objetivo na literatura pesquisada.

Da mesma forma, o DEL isoladamente não possui monografia farmacopeica descrevendo a sua determinação em produto acabado. Há, entretanto, estudos envolvendo o desenvolvimento e validação de métodos para determinação simultânea do mesmo associado ao manidipino em produtos farmacêuticos. Estes trabalhos foram conduzidos utilizando a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (TODESCHINI; SANGOI; VOLPATO, 2011), a CLAE (TODESCHINI *et al.*, 2012), a espectrofotometria no UV (TODESCHINI *et al.*, 2013) e a eletroforese capilar (EC) (TODESCHINI *et al.*, 2014).

Por outro lado, quando analisada isoladamente, a IND possui método descrito na European Pharmacopoeia 6.0 (EP-6) (2011), na British Pharmacopoeia no volume III (BP-III) (2008) e na United States Pharmacopoeia na 32ª edição (USP-32) (2009), não havendo registros na Farmacopéia Brasileira 5ª edição (FB-5) (2010).

Na EP-6 (2011), há método descrito para sua identificação em matérias-primas, onde preconiza-se a sua identificação por espectrofotometria de absorção no IV; ou pelo uso de cromatografia em camada delgada, com visualização em luz UV em 254 nm; ou também por espectrofotometria na região do UV entre 220-350 nm, com absorção máxima em 242 nm.

Além disso, a IND possui método de quantificação por CLAE para comprimidos na BP-III (2008), onde preconiza-se o uso de coluna C18 com diâmetro interno de empacotamento de 5  $\mu$ m, 15cm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro, com fase móvel com o fluxo de 1,6ml/min de uma mistura de 6 partes de uma solução a 5% (p/v) de dodecil sulfato de sódio e 3% (v/v) de ácido acético glacial, 10 partes de trietilamina, 20 partes de 2-butanol, 310 partes de acetonitrila e 690 partes de água, sendo a mistura ajustada ao pH 3,0 com ácido ortofosfórico. A detecção deve ser feita em 240 nm e as soluções de IND protegidas da luz. Neste caso, são aceitáveis teores entre 95 e 105% do valor declarado de IND.

Há também método de quantificação descrito, na USP-32 (2009), empregando CLAE para determinação de IND em comprimidos. Onde, preconiza-se o uso de coluna C18 com diâmetro interno de empacotamento de 3  $\mu$ m, 10 cm de comprimento

e 4,5 mm de diâmetro. Sendo a fase móvel preparada com 1,08 g 1-octanossulfonato de sódio em 700 mL de água, 10ml de ácido acético glacial e 300 mL de acetonitrila, com um fluxo de 1 ml/min. O detector do cromatógrafo deve ser regulado para 242 nm. Neste caso, os comprimidos devem conter pelo menos 90% do valor rotulado e não mais que 110%.

### 3.9 Análise multicomponente

A análise multicomponente por espectrofotometria no UV é tradicionalmente realizada através da utilização de reagente cromogênicos específico para cada componente ou pela separação do elemento de interesse de seus interferentes. Entretanto, nem sempre há a disponibilidade destes reagentes, tornando a separação dos elementos interferentes uma tarefa trabalhosa e demorada. Por esse motivo, a análise espectrofotométrica simultânea de misturas normalmente se limita à análise parcial de apenas um ou dois componentes usando bandas de absorção características, quando essas aparecem isoladas (SALDANHA; ARAÚJO; BARROS NETO, 1999). Os sistemas com mais de dois componentes são usualmente analisados por etapas, determinando-se um componente de cada vez. Assim, os experimentos são desenvolvidos no sentido de evitar esses inconvenientes processos de separação de interferentes, permitindo que seja realizada a determinação simultânea de um número cada vez maior de componentes em menos tempo e com um custo menor para as análises (FERREIRA *et al.*, 1999; SALDANHA; ARAÚJO; BARROS NETO, 1999).

As interferências espectrais provocam imprecisões na discriminação e análise dos espectros dos compostos de interesse, sendo estes inconvenientes contornáveis por meio da aplicação de um tratamento matemático e estatístico para otimização dos resultados obtidos com a análise. A quimiometria é um campo da química analítica que emprega métodos matemáticos e estatísticos para planejamento, ou seleção, de experimentos com o objetivo de otimizar a coleta de informações químicas (FERREIRA *et al.*, 1999).

Neste sentido, diversas técnicas quimiométricas têm sido desenvolvidas e empregadas para determinação de compostos presentes em matrizes complexas, tais como, os métodos de estatística multivariada e os métodos derivativos. Dessa forma,

o emprego de metodologia quimiométrica pode auxiliar na discriminação e quantificação de fármacos associados em formulações farmacêuticas (FERREIRA *et al.*, 1999; SALDANHA; ARAÚJO; BARROS NETO, 1999; SENA *et al.*, 2000), como no caso de DEL e IND.

### 3.9.1 Calibração Multivariada

Os métodos multivariados de análise quantitativa empregados com maior frequência são os de calibração. Tais metodologias têm sido cada vez mais utilizadas em química analítica, principalmente quando os componentes presentes em uma mistura necessitam ser determinados, mas a informação analítica disponível não apresenta seletividade; isto é, quando não é possível identificar os componentes individuais, a partir da resposta instrumental (BRO, 2003).

Diversos são os exemplos de aplicação da calibração multivariada em espectrofotometria no UV, atestando o grande potencial desta abordagem para a resolução de interferências espectrais, sem a necessidade de recorrer a metodologias químicas, frequentemente associadas à contaminação ou perda da amostra de interesse (BARTHUS *et al.*, 2007; CORDEIRO, 2006; COSCIONE, 2001; TODESCHINI *et al.*, 2013).

A técnica multivariada consiste em substituir a separação física das espécies presentes na amostra pela separação quimiométrica de seus sinais através da construção de modelos matemáticos que se ajustam aos dados obtidos experimentalmente. Os métodos de calibração multivariada para análise quantitativa mais conhecidos são a regressão linear múltipla, do inglês *multiple linear regression (MLR)*, a regressão em componentes principais, *principal component regression (PCR)* e a regressão por mínimos quadrados parciais, *partial least squares (PLS)*. Sendo esses métodos considerados lineares, pelo fato dos modelos resultantes descreverem uma relação proporcional entre as respostas e as concentrações dos componentes das amostras (SALDANHA; ARAÚJO; BARROS NETO, 1999).

Os métodos por PCR e PLS são métodos de calibração indiretos, pois não exigem o conhecimento prévio dos espectros individuais dos constituintes de interesse, nem dos interferentes. Por outro lado, eles requerem a análise de uma série de misturas de calibração (série de treinamento), cuja composição seja conhecida e

leve em conta todos os fenômenos físicos e químicos que possam afetar os espectros das amostras cujas concentrações deverão ser previstas (SALDANHA; ARAÚJO; BARROS NETO, 1999). Destaca-se que o PLS é um método robusto, onde os parâmetros do modelo resultante praticamente não se alteram com a inclusão de novas amostras no conjunto de calibração, o que proporciona um incremento na capacidade preditiva do modelo à medida que se aumenta a quantidade de informação (GELADI; KOWALSKI, 1986).

### **3.10 Validação de métodos analíticos**

A qualidade analítica de uma metodologia é detalhadamente avaliada durante a fase de delineamento e otimização, bem como através do processo de validação do método, que apresentará todas as averiguações efetuadas de modo a demonstrar que o método, nas condições em que é realizado, exibe as características necessárias para fornecer resultados com qualidade adequada para os fins a que se destinam (ROZET *et al.*, 2012; TAVERNIERS; LOOSE; BOCKSTAELE, 2004a, 2004b).

A validação de um método deve ser realizada de forma subjacente à sua implementação e seu objetivo é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos (HARRIS, 2005; LA ROCA, 2007).

Conceitualmente, a validação é o ato documentado que atesta que qualquer procedimento, processo, equipamento, material, operação ou sistema realmente conduza aos resultados verdadeiros (BRASIL, 2003).

Nesse contexto, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), de acordo com a resolução nº 899, de 29 de maio de 2003, divulgou aspectos relacionados à validação de métodos analíticos (BRASIL, 2003). Os parâmetros fundamentais de avaliação incluem especificidade, linearidade, exatidão, precisão, robustez, limites de quantificação e detecção e, no caso de métodos cromatográficos e eletroforéticos, teste de adequabilidade do sistema (BRASIL, 2003; BRASIL 2010; HARRIS, 2013; ICH, 2005; RIBANI *et al.*, 2004; SHABIR, 2003). De acordo com essa mesma resolução, os métodos analíticos são classificados em quatro categorias (Tabela 2), sendo exigido um conjunto de testes (Tabela 3) conforme a classificação do mesmo.

**TABELA 2-** Classificação dos testes analíticos, de acordo com a sua finalidade.

<b>Categoria</b>	<b>Finalidade do teste</b>
<b>I</b>	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas;
<b>II</b>	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas;
<b>III</b>	Testes de desempenho;
<b>IV</b>	Testes de identificação.

Fonte: BRASIL, 2003.

Cabe ressaltar que, no Brasil, o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) possui um documento orientativo para a validação de procedimentos analíticos, o DOQ-CGCRE-008 – Orientação sobre validação de métodos analíticos, que apresenta informações acerca do tema de forma objetiva; sendo baseado em normas internacionais, como as descritas pelo ICH (BRASIL, 2010).

**TABELA 3-** Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.

<b>Parâmetro</b>	<b>Categoria I</b>	<b>Categoria II</b>		<b>Categoria III</b>	<b>Categoria IV</b>
		<b>Quantitativo</b>	<b>Ensaio limite</b>		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão	Repetibilidade	Sim	Sim	Não	Sim
	Intermediária	**	**	Não	**
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

\* pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

\*\* se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária.

Fonte: BRASIL, 2003.

### **3.10.1 Especificidade**

A especificidade do método analítico indica sua capacidade de diferenciar e quantificar o analito, mesmo na presença de outros constituintes da amostra que inclusive poderiam interferir na sua determinação, como adjuvantes, impurezas, produtos de degradação ou mesmo outra substância ativa (BRASIL, 2003; BRASIL, 2010; ICH, 2005; VALENTINI; SOMMER; MATIOLI, 2007).

Os procedimentos para demonstrar a especificidade de um método dependerão do objetivo do método analítico. Em relação às análises quantitativas (teor) e análises de impurezas, a sua avaliação pode ser realizada através da comparação dos resultados obtidos na análise de amostras (fármaco ou medicamento) contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes, e amostras não contaminadas, de forma a demonstrar que o resultado do teste não é afetado por esses materiais. Além disso, a especificidade pode ser demonstrada através da comparação dos resultados do teste com os de outro método já validado e bem caracterizado (BRASIL, 2003; BRASIL, 2010; VALENTINI; SOMMER; MATIOLI, 2007).

Uma vez que a linearidade, a exatidão e a precisão podem ser comprometidas se esse parâmetro não estiver bem definido, a especificidade deve ser o primeiro parâmetro a ser considerado no processo de validação (BRASIL, 2010).

### **3.10.2 Linearidade**

A linearidade corresponde à capacidade do método analítico de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração da substância analisada, dentro de um intervalo especificado. Esse parâmetro assegura que a resposta medida pelo equipamento seja representativa da concentração do analito em pesquisa (BRASIL, 2003; BRASIL, 2010; ICH, 2005; SHABIR, 2003).

A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. A linearidade pode ser obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real. Uma vez que este parâmetro correlaciona a resposta medida e a concentração do analito na amostra,

pode ser expresso através da equação da reta (BRASIL, 2003; BRASIL, 2010; ICH, 2005):

$$y = a + bx.$$

Sendo:

$y$  = resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.);

$x$  = concentração;

$a$  = interseção com o eixo  $y$ , quando  $x = 0$ ;

$b$  = inclinação da curva analítica = sensibilidade (BRASIL, 2010).

Para que se obtenha a equação da reta, também chamada de curva analítica, são recomendadas a verificação de, no mínimo, cinco concentrações dentro do intervalo de aplicação do teste (Tabela 4) (BRASIL, 2003; BRASIL, 2010; ICH, 2005; RIBANI *et al.*, 2004). Vale destacar que, a faixa linear para a qual o ensaio vai ser utilizado deve estar coberta pelo intervalo. Recomenda-se que a concentração mais esperada da amostra esteja, sempre que possível, no centro deste intervalo (BRASIL, 2010).

Os resultados devem ser avaliados por métodos estatísticos apropriados, como a regressão linear pelo método de mínimos quadrados, de forma a obter dados como o coeficiente de correlação ( $r$ ) ou determinação ( $r^2$ ), a interseção com o eixo  $Y$  e o coeficiente angular. Os coeficientes ( $r$  ou  $r^2$ ) avaliam a qualidade da curva obtida, sendo que quanto mais o seu valor se aproximar de 1,0, podemos dizer que menor é a dispersão dos pontos obtidos experimentalmente e menor será a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI *et al.*, 2004). Para a ANVISA (2003), o critério mínimo aceitável de  $r$  é 0,99.

### 3.10.3 Limite de Detecção

O limite de detecção (LD) corresponde à menor concentração da substância em análise que pode ser detectada com confiabilidade, porém não necessariamente quantificada (BRASIL, 2003).

Este parâmetro pode ser determinado experimentalmente mediante a obtenção do sinal/ruído para aqueles processos analíticos que exibem linha de base, bem como

através da comparação dos sinais medidos da amostra com baixas concentrações conhecidas do analito com as do branco, estabelecendo-se a concentração mínima na qual o analito pode ser detectado. Há, ainda, a possibilidade de o LD ser calculado com base nas equações obtidas nos estudos de linearidade (BRASIL, 2003; BRASIL, 2010; SHABIR, 2003; VALENTINI; SOMMER; MATIOLI, 2007), aplicando-se a seguinte equação:

$$LD = \frac{3 \times DP}{b}$$

na qual:

DP = desvio-padrão da resposta;

b = coeficiente angular do gráfico de calibração (BRASIL, 2003).

**TABELA 4-** Limites percentuais do teor do analito para o intervalo de linearidade de métodos analíticos.

<b>ENSAIO</b>	<b>ALCANCE</b>
<b>Determinação quantitativa do analito em matérias-primas ou em formas farmacêuticas</b>	De 80% a 120% da concentração teórica do teste.
<b>Determinação de impurezas</b>	Do nível de impureza esperado até 120% do limite máximo especificado. Quando apresentarem importância toxicológica ou efeitos farmacológicos inesperados, os limites de quantificação e detecção devem ser adequados às quantidades de impurezas a serem controladas.
<b>Uniformidade de conteúdo</b>	De 70% a 130% da concentração teórica do teste.
<b>Ensaio de dissolução</b>	De $\pm 20\%$ sobre o valor especificado para o intervalo. Caso a especificação para a dissolução envolva mais que um tempo, o alcance do método deve incluir $- 20\%$ sobre o menor valor e $+ 20\%$ sobre o maior valor.

Fonte: BRASIL,2003.

#### 3.10.4 Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração de um analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão (BRASIL, 2003). Da mesma forma que o LD, o LQ pode ser estimado por meio do sinal/ruído, do desvio-padrão e calculado, sendo expresso pela equação a seguir:

$$LD = \frac{10 \times DP}{b},$$

na qual:

DP = desvio-padrão da resposta;

b = coeficiente angular do gráfico de calibração (BRASIL, 2003).

#### 3.10.5 Exatidão

A exatidão descreve a proximidade dos resultados médios fornecidos pelo método em relação ao valor teórico (BRASIL, 2003). Pode ser determinada através várias metodologias, como:

- Pela aplicação da metodologia analítica proposta para a análise de uma substância de pureza conhecida (SQR), ou comparação dos resultados obtidos com aqueles resultantes de uma segunda metodologia bem caracterizada, cuja exatidão tenha sido estabelecida;

- Através da análise de uma amostra, com uma quantidade conhecida de fármaco adicionada a uma mistura dos excipientes do medicamento (placebo contaminado) ou, nos casos em que amostras de todos os componentes do medicamento não estão disponíveis, através da análise pelo método de adição de padrão, no qual adiciona-se quantidades conhecidas do analito (SQR) ao medicamento (BRASIL, 2003, BRASIL, 2010; SHABIR, 2003).

A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, podendo ser verificada a partir de, no mínimo, 9 determinações que contemplem o intervalo linear do procedimento, sendo, 3 concentrações, baixa, média e alta, com 3 réplicas cada. Este parâmetro é calculado, conforme a equação abaixo, como o percentual de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a

diferença porcentual entre as médias obtidas e o valor verdadeiro aceito (BRASIL, 2003; TAVERNIERS; LOOSE; BOCKSTAELE, 2004a, 2004b).

$$\text{EXATIDÃO \%} = \frac{\text{Concentração Média obtida Experimentalmente} \times 100}{\text{Concentração Teórica}}$$

Recomenda-se que a exatidão para ensaios de teor esteja entre  $100 \pm 2\%$  (SHABIR, 2003).

### 3.10.6 Precisão

A precisão mede quanto os resultados obtidos de uma mesma amostra, em uma série de medidas, sobre as mesmas condições de análise, se aproximam entre si. A precisão é geralmente expressa através do coeficiente de variação (CV), ou desvio padrão relativo (DPR), de uma série de medidas, ambos expressos em percentual (BRASIL, 2003; BRASIL, 2010; ICH, 2005; SHABIR, 2003). Esta medida de dispersão pode ser calculada pela seguinte equação:

$$\text{CV} = \text{DPR} = \frac{\text{DP} \times 100}{\text{CMD}}$$

onde:

DP = desvio padrão;

CMD = concentração média determinada (BRASIL, 2003; BRASIL, 2010).

A precisão pode ser considerada em três níveis (BRASIL, 2003; BRASIL, 2010; ICH, 2005):

- Repetibilidade (precisão intra-dia): refere-se à concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. Este parâmetro é verificado através de, no mínimo, 9 (nove) determinações, que contemplem o intervalo linear do método, ou seja, 3 concentrações, baixa, média e

alta, com 3 réplicas cada. Outra alternativa é a realização de, no mínimo, 6 determinações a 100% da concentração do teste;

- Precisão intermediária (precisão inter-dias): refere-se à concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, podendo ser realizada com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes.

- Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial): refere-se à concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes, como em estudos colaborativos ou de proficiência; geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopéias (BRASIL, 2003; BRASIL, 2010; ICH, 2005; SHABIR, 2003).

O valor máximo aceitável de CV ou DPR deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, concentração do analito na amostra, tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5% para o caso de métodos analíticos (BRASIL, 2003).

### **3.10.7 Robustez**

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. A avaliação deste parâmetro visa controlar e prevenir variações que possam interferir no resultado final (BRASIL, 2003; BRASIL, 2010; ICH, 2005; shabir, 2003). A Tabela 5 relaciona os principais parâmetros que podem resultar em variação na resposta do método.

**TABELA 5-** Fatores a considerar na avaliação da robustez do método analítico.

<b>Preparo das Amostras</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>· Estabilidade das soluções analíticas;</li><li>· Tempo de extração.</li></ul>
<b>Espectrofotometria</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>· Variação do pH da solução;</li><li>· Temperatura;</li><li>· Diferentes fabricantes de solventes.</li></ul>
<b>Cromatografia Líquida</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>· Variação do pH da fase móvel;</li><li>· Variação na composição da fase móvel;</li><li>· Diferentes lotes ou fabricantes de colunas;</li><li>· Temperatura;</li><li>· Fluxo da fase móvel.</li></ul>
<b>Cromatografia Gasosa</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>· Diferentes lotes ou fabricantes de colunas;</li><li>· Temperatura;</li><li>· Velocidade do gás de arraste.</li></ul>

Fonte: BRASIL, 2003.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 MATERIAIS**

#### **4.1.1 Substâncias químicas de referência (SQR)**

A SQR do DEL foi gentilmente cedida pelo laboratório fabricante dos comprimidos (Chiesi Farmaceutici S.p.A), com pureza de 99,6%. Já a SQR da IND foi adquirida no comércio brasileiro, com pureza de 100%.

#### **4.1.2 Produtos farmacêuticos**

Os comprimidos contendo 30 mg de DEL e 2,5 mg de IND ainda não são comercializados no Brasil e foram adquiridos através de importadora oficial sob o nome de Delapride<sup>®</sup> (Chiesi Farmaceutici S.p.A).

#### **4.1.3 Solventes, materiais de consumo e vidrarias**

- Como solventes foram utilizados etanol com grau analítico P.A. (99,8%), da marca ÊXODO CIENTÍFICA<sup>®</sup> e da marca VETEC QUÍMICA<sup>®</sup>, e água destilada.
- Para o preparo das soluções usou-se vidraria analítica, incluindo balões e pipetas volumétricas, previamente calibradas. Além de béqueres de diversos volumes.
- Para a trituração dos comprimidos utilizou-se gral de porcelana, pistilo e espátula.
- Para as filtrações das amostras utilizou-se papel de filtro quantitativo, funis, suportes universais e garras. Também foi feito uso de filtros de seringa da marca ALLCROM<sup>®</sup>, contendo membrana de *nylon* com poro de 0,45 µm e 25mm de diâmetro.

#### **4.1.4 Equipamentos**

As análises qualitativas e quantitativas por UV foram realizadas no Laboratório de Análises Farmacêuticas e Controle de Qualidade do Curso de Farmácia (UFRJ-campus Macaé).

#### **4.1.4.1 Espectrofotômetro**

Os espectros de absorção UV e leituras de absorbância das soluções foram adquiridos no espectrofotômetro PerkinElmer Lambda 35, utilizando-se o software PerkinElmer UV WinLab e cubetas de quartzo de 1 cm.

#### **4.1.4.2 Balança analítica**

As pesagens foram realizadas em balança analítica digital do modelo MSU2245-1CE-DU da empresa Sartorius do Brasil Ltda.

#### **4.1.4.3 Banho Ultrassônico**

Amostras foram homogeneizadas em equipamento de banho ultrassônico da marca UNIQUE, modelo Ultracleaner 1600A.

#### **4.1.4.4 Pipetador motorizado**

As soluções foram preparadas com o auxílio do pipetador motorizado da marca HTL, modelo Swift Pet.

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Preparo das soluções estoques das SQR

Para a preparação das soluções estoques, foram pesados cerca de 30 mg da SQR de DEL e aproximadamente 2,5 mg da SQR de IND. Os materiais foram transferidos para diferentes balões volumétrico de 100 mL, completando-se o volume com etanol. As soluções foram homogeneizadas por 2 minutos manualmente. Obtendo-se assim a concentração de 300 µg/mL e 25 µg/mL de DEL e IND, respectivamente.

A partir destas soluções estoques de DEL e IND, as diluições foram realizadas através da retirada de alíquotas específicas de cada uma dessas soluções para balões volumétricos de capacidades adequadas, com posterior preenchimento do volume com etanol. A Tabela 6 relaciona os volumes utilizados para o preparo das soluções no decorrer deste trabalho.

**TABELA 6-** Relação dos volumes de solução estoque das substâncias químicas de referência (SQR) necessários para a diluição e preparo das diferentes soluções de DEL e IND.

DELAPRIL (DEL)				INDAPAMIDA (IND)			
Soluções finais		Diluição realizada		Soluções finais		Diluição realizada	
µg/mL	% <sup>1</sup>	Vol. <sup>2</sup> (mL)	Vol. <sup>3</sup> (mL)	µg/mL	% <sup>1</sup>	Vol. <sup>2</sup> (mL)	Vol. <sup>3</sup> (mL)
24	40	2	25	2	40	2	25
30	50	2,5	25	2,5	50	2,5	25
36	60	3	25	3	60	3	25
42	70	3,5	25	3,5	70	3,5	25
48	80	4	25	4	80	4	25
54	90	4,5	25	4,5	90	4,5	25
<b>60</b>	<b>100</b>	<b>5</b>	<b>25</b>	<b>5</b>	<b>100</b>	<b>5</b>	<b>25</b>
66	110	5,5	25	5,5	110	5,5	25
72	120	6	25	6	120	6	25
84	140	7	25	7	140	7	25
90	150	7,5	25	7,5	150	7,5	25
108	180	9	25	9	180	9	25

<sup>1</sup> Percentual da concentração obtida em relação à concentração de trabalho no estudo (DEL = 60 µg/mL; IND = 5,0 µg/mL)

<sup>2</sup> Volume de solução estoque transferida.

<sup>3</sup> Volume final da diluição (balões volumétricos de 25 mL).

#### 4.2.2 Preparo das soluções das amostras dos comprimidos

Calcular o peso médio dos comprimidos de Delapride®, realizar a trituração destes comprimidos em gral de porcelana com o auxílio de pistilo e espátula. Em seguida, pesar o equivalente à metade do peso médio calculado (obtendo assim, 15mg de DEL + 1.25mg de IND) e transferir este material pulverizado para balão volumétrico de 25 ml. Preencher cerca de 80% do volume do balão com etanol, promover agitação manual e posteriormente em ultrassom por 15 minutos. Então, completar o volume do balão até o menisco e agitar manualmente por 2 minutos. Realizar a filtração desta solução com papel de filtro e posteriormente com o filtro de seringa, obtendo-se assim a concentração de 600µg de DEL + 50µg de IND. Proceder as diluições necessárias para obtenção de soluções mais diluídas através da retirada de alíquotas desta solução.

#### 4.2.3 Preparo da solução do placebo

A solução do placebo foi preparada com os excipientes da formulação, informados na bula do medicamento DELAPRIDE®, de acordo com concentrações preconizadas na literatura e demonstradas na Tabela 7 (ROWE; SHESKEY; OWEN, 2006). Conforme a bula do medicamento, os excipientes presentes na formulação são: lactose, estearato de magnésio, hidroxipropilcelulose e hidroxipropilcelulose de baixa substituição. Assim, uma solução destes foi preparada utilizando-se a mesma metodologia adotada para o preparo das amostras (item 4.2.2.).

**TABELA 7-** Excipientes presentes na formulação e seus respectivos percentuais utilizados no preparo da solução placebo.

Excipiente	Faixa recomendada (%)	% Utilizado <sup>1</sup>
Lactose	65,0 - 85,0%	57%
Estearato de magnésio	0,25 - 5,0	5%
Hidroxipropilcelulose	2,0 - 6,0	6%
Hidroxipropilcelulose de baixa substituição	5,0 - 50,0	5%

<sup>1</sup> Percentual relativo ao peso médio dos comprimidos de DELAPRIDE®, onde DEL (30 mg) e IND (2,5 mg) correspondem respectivamente a 25% e a 2%.

#### **4.2.4 Espectrofotometria no ultravioleta**

Os espectros de UV foram obtidos utilizando o intervalo dos comprimentos de onda de 200 a 300nm. As leituras das absorvâncias foram realizadas nos comprimentos de onda de 225nm para análise de DEL e de 243nm para análise de IND.

#### **4.2.5 Delineamento experimental**

O modelo experimental multinível foi delineado através da utilização da ferramenta de calibração multivariada com o auxílio do software Minitab®. Foram analisadas 25 soluções contendo combinações aleatórias das concentrações das SQR de DEL em 0, 36, 60, 84 e 108 µg/mL e de IND em 0, 3, 5, 7 e 9 µg/mL. As leituras das absorvâncias destas soluções foram realizadas nos comprimentos de onda de 220, 222, 225, 228, 240, 243 e 246 nm e posteriormente analisadas estatisticamente através do mesmo software.

#### **4.2.6 Validação**

A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003). Assim, a validação do método proposto por UV foi efetuada através da avaliação dos parâmetros de especificidade, exatidão, linearidade, precisão e robustez, seguindo parâmetros preconizados pela legislação (BRASIL, 2003) e guias internacionalmente aceitos (ICH, 2005).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO

#### 5.1.1 Escolha dos solventes

Durante o desenvolvimento do método, vários testes foram realizados a fim de estabelecer os solventes e diluentes adequados à análise simultânea dos fármacos em questão. Para tal, foram considerados a solubilidade dos mesmos, a facilidade de preparação da amostra, a sensibilidade do método, a toxicidade do solvente e o seu custo. Neste sentido, o etanol foi selecionado para a primeira etapa de preparação da amostra.

Como uma das propostas iniciais desse trabalho consiste na obtenção de uma metodologia com menor geração de resíduos, ou geração de resíduos menos tóxicos, experimentos foram realizados para definir o diluente mais apropriado para o preparo das amostras a serem submetidas à análise espectrofotométrica. Assim, a partir da solução estoque etanólica de DEL e IND, foram preparadas soluções etanólicas, hidroetanólicas (1:1) e aquosas dos fármacos.

Conforme pode ser observado nas Figuras 3 e 4, as soluções hidroetanólicas e as soluções aquosas apresentaram um considerável aumento na intensidade espectral e nos valores de absorbância quando comparadas às soluções etanólicas. Para evitar que as absorbâncias das soluções extrapolassem a faixa de trabalho do equipamento (devendo estar geralmente entre 0,2 e 1,2 de absorbância) optou-se por utilizar o etanol também como solvente de diluição.

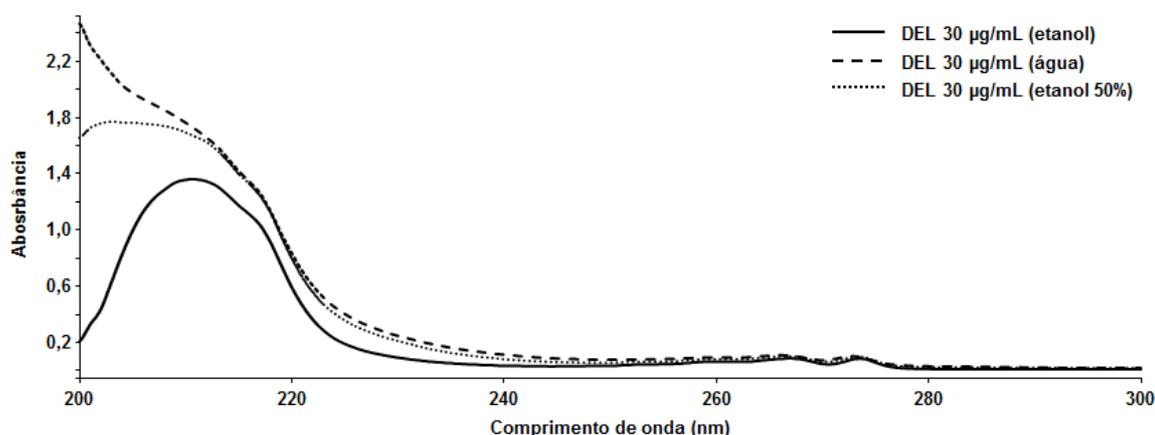


FIGURA 3- Espectros do delapril em diferentes sistemas de solvente.

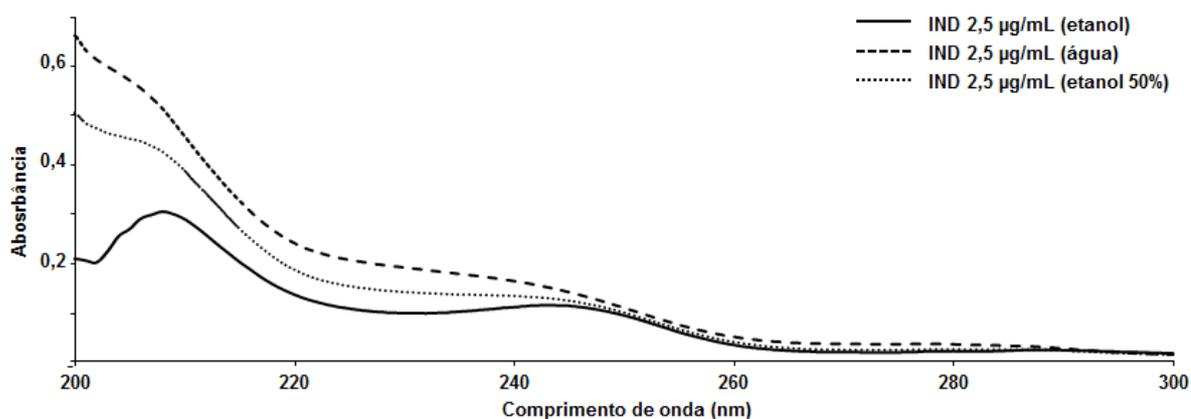


FIGURA 4- Espectros da indapamida em diferentes sistemas de solvente.

### 5.1.2 Espectros de absorção no UV de DEL e IND

Uma vez selecionado os solventes de extração e diluição, procedeu-se a avaliação espectral dos fármacos de forma isolada e sobreposta. A Figura 5 apresenta os espectros de absorção no UV das soluções etanólicas de DEL (60 µg/mL) e IND (5 µg/mL). Pode-se observar que o espectro de DEL possui uma banda com alta intensidade de absorção na região compreendida entre 200 nm e 230 nm. Já no espectro de IND, pode ser observada uma banda larga compreendida entre 200 nm e 220 nm e outra entre 230 nm e 260 nm. Destaca-se que estas regiões espectrais apresentam intensidade e amplitude adequadas para a determinação quantitativa dos fármacos isoladamente.

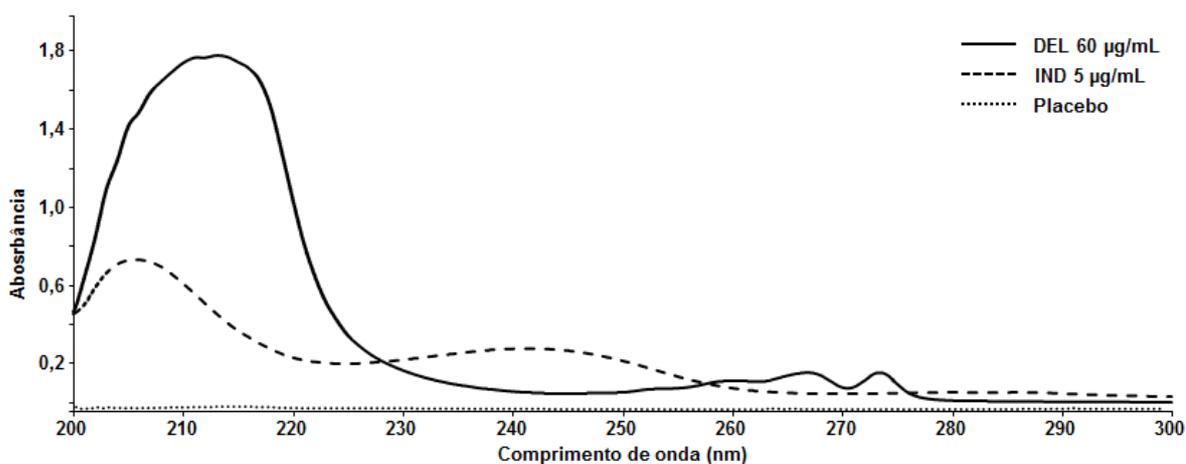


FIGURA 5- Sobreposição dos espectros de absorção no UV de delapril e indapamida em etanol.

Entretanto, a sobreposição espectral observada para DEL e IND nesta análise impede o uso da espectrofotometria no UV direta ou calibração univariada em uma determinação simultânea. Neste sentido, o desenvolvimento do método voltou-se à aplicação de ferramentas de análise quimiométricas multicomponentes. Além disso, buscou-se avaliar um comprimento de onda em que houvesse pouca ou nenhuma absorção de IND para a avaliação de DEL, assim como uma região do espectro onde o DEL apresentasse uma baixa absorção e a IND pudesse ser quantificada de forma adequada.

### 5.1.3 Calibração multivariada

Para elaborar o modelo de calibração multivariada, um conjunto de 25 soluções das SQR dos fármacos foram preparadas conforme o procedimento descrito no item 4.2.1.

As soluções foram preparadas em balões de 25 mL de capacidade, utilizando os volumes específicos de cada solução estoque, obtendo-se as concentrações de 0, 36, 60, 84 e 108 µg/mL de DEL e de 0, 3, 5, 7 e 9 µg/mL de IND. A Tabela 8 traz o delineamento obtido através do software estatístico Minitab® assim como as formas de condução dos experimentos.

As soluções foram analisadas conforme a ordem estabelecida pelo software aleatoriamente, obtendo-se as leituras das absorbâncias e os espectros por varredura realizada nas regiões de 200 a 300 nm. O etanol foi utilizado como solvente para as leituras do branco, assim como para a cubeta referência.

As análises foram realizadas em 6 diferentes comprimentos de onda (222, 225, 228, 240, 243 e 246 nm), contemplando as regiões de melhor intensidade espectral para os fármacos. Os resultados obtidos para as leituras de cada solução foram relacionados na Tabela 9.

Com o intuito de escolher os comprimentos de ondas mais adequados para avaliação simultânea de DEL e IND e avaliar a capacidade preditiva do modelo matemático, os dados de absorbância obtidos foram também analisados com a utilização do Minitab®. Assim, através da aplicação da ferramenta multivariada de regressão por PLS, foi possível a obtenção de dados estatísticos de seleção de modelos para todos os comprimentos de onda analisados. Destaca-se que o modelo ideal é aquele com o maior coeficiente de determinação ( $r^2$ ) predito.

Os resultados permitiram observar que o método multicomponente proposto apresenta-se adequado em todos os comprimentos de onda verificados, apresentando os melhores valores de  $r^2$  usando 225 nm ( $r^2 = 0,9992$ ) e 243 nm ( $r^2 = 0,9997$ ) para a determinação quantitativa de DEL e IND, respectivamente. Além disso, os resultados foram analisados com base na Análise de variância (ANOVA). Os valores de probabilidade foram menores que 0,05 ( $p < 0,05$ ), evidenciando que o modelo de 2 componentes é significativo, ou seja, há proporcionalidade entre as concentrações analisadas.

**TABELA 8-** Soluções das SQR preparadas para o delineamento do método pela calibração multivariada.

Solução	Ordem de análise	Delapril ( $\mu\text{g/mL}$ )	Indapamida ( $\mu\text{g/mL}$ )	Soluções		
				Diluição para Balão de 25 mL		
				Volume de DEL 300( $\mu\text{g/mL}$ )	Volume de IND 25 ( $\mu\text{g/mL}$ ) (mL)	Volume de EtOH (mL)
8	1	36	5	3	5	17
20	2	84	9	7	9	9
7	3	36	3	3	3	19
14	4	60	7	5	7	13
11	5	60	0	5	0	20
3	6	0	5	0	5	20
12	7	60	3	5	3	17
5	8	0	9	0	9	16
23	9	108	5	9	5	11
16	10	84	0	7	0	18
18	11	84	5	7	5	13
6	12	36	0	3	0	22
13	13	60	5	5	5	15
15	14	60	9	5	9	11
22	15	108	3	9	3	13
1	16	0	0	0	0	25
24	17	108	7	9	7	9
17	18	84	3	7	3	15
21	19	108	0	9	0	16
10	20	36	9	3	9	13
2	21	0	3	0	3	22
4	22	0	7	0	7	18
9	23	36	7	3	7	15
25	24	108	9	9	9	7
19	25	84	7	7	7	11

**TABELA 9-** Resultados das leituras de absorvância de cada solução envolvida no delineamento do método analítico, em diferentes comprimentos de onda.

<b>Solução de DEL (<math>\mu\text{g/ml}</math>) + IND (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>222 nm</b>	<b>225 nm</b>	<b>228 nm</b>	<b>240 nm</b>	<b>243 nm</b>	<b>246 nm</b>
Sol 8 Del 36 + Ind 5	0,646	0,411	0,326	0,289	0,289	0,279
Sol 20 Del 84 + Ind 9	1,279	0,832	0,642	0,529	0,528	0,512
Sol 7 Del 36 + Ind 3	0,553	0,339	0,252	0,188	0,186	0,180
Sol 14 Del 60 + Ind 7	1,018	0,626	0,484	0,407	0,407	0,393
Sol 11 Del 60 + Ind 0	0,730	0,378	0,230	0,052	0,045	0,045
Sol 3 Del 0 + Ind 5	0,213	0,192	0,193	0,256	0,260	0,251
Sol 12 Del 60 + Ind 3	0,821	0,475	0,334	0,201	0,198	0,192
Sol 5 Del 0 + Ind 9	0,361	0,330	0,336	0,457	0,465	0,446
Sol 23 Del 108 + Ind 5	1,356	0,827	0,580	0,338	0,332	0,324
Sol 16 Del 84 + Ind 0	0,950	0,504	0,307	0,063	0,055	0,056
Sol 18 Del 84 + Ind 5	1,139	0,689	0,495	0,321	0,318	0,309
Sol 6 Del 36 + Ind 0	0,443	0,220	0,136	0,030	0,026	0,026
Sol 13 Del 60 + Ind 5	0,927	0,547	0,408	0,300	0,298	0,289
Sol 15 Del 60 + Ind 9	1,076	0,694	0,557	0,505	0,507	0,491
Sol 22 Del 108 + Ind 3	1,302	0,747	0,502	0,233	0,225	0,221
Sol 1 Del 0 + Ind 0	0,010	0,007	0,005	0,000	-0,001	0,000
Sol 24 Del 108 + Ind 7	1,547	0,912	0,654	0,439	0,434	0,422
Sol 17 Del 84 + Ind 3	1,085	0,622	0,422	0,219	0,213	0,209
Sol 21 Del 108 + Ind 0	1,249	0,654	0,395	0,081	0,070	0,072
Sol 10 Del 36 + Ind 9	0,778	0,547	0,469	0,490	0,494	0,476
Sol 2 Del 0 + Ind 3	0,131	0,119	0,119	0,155	0,157	0,151
Sol 4 Del 0 + Ind 7	0,310	0,284	0,283	0,360	0,365	0,350
Sol 9 Del 36 + Ind 7	0,716	0,481	0,395	0,385	0,387	0,374
Sol 25 Del 108 + Ind 9	1,743	1,303	0,989	0,550	0,548	0,532
Sol 19 Del 84 + Ind 7	1,242	0,766	0,568	0,419	0,416	0,403

De forma complementar, as respostas de absorvância para o DEL (análise em 225 nm) e IND (análise em 243 nm) foram analisadas através de gráficos de resíduos, estando representados nas Figuras 6 e 7.

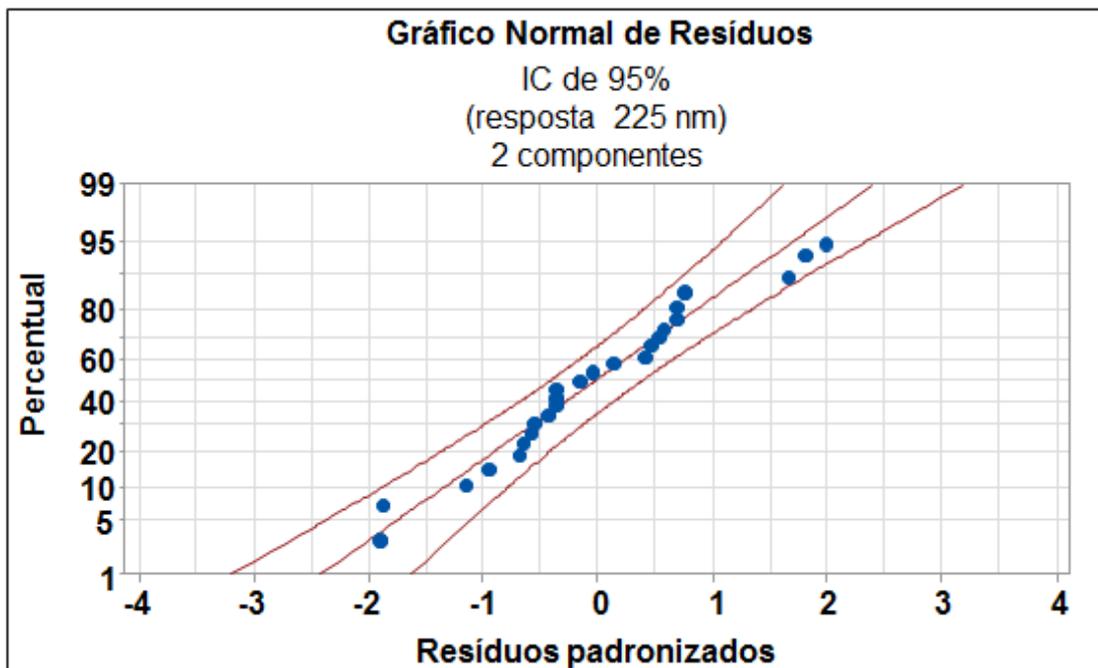


FIGURA 6- Gráfico Normal de Resíduos por regressão PLS (*Parcial Least Squares*) em 225nm.

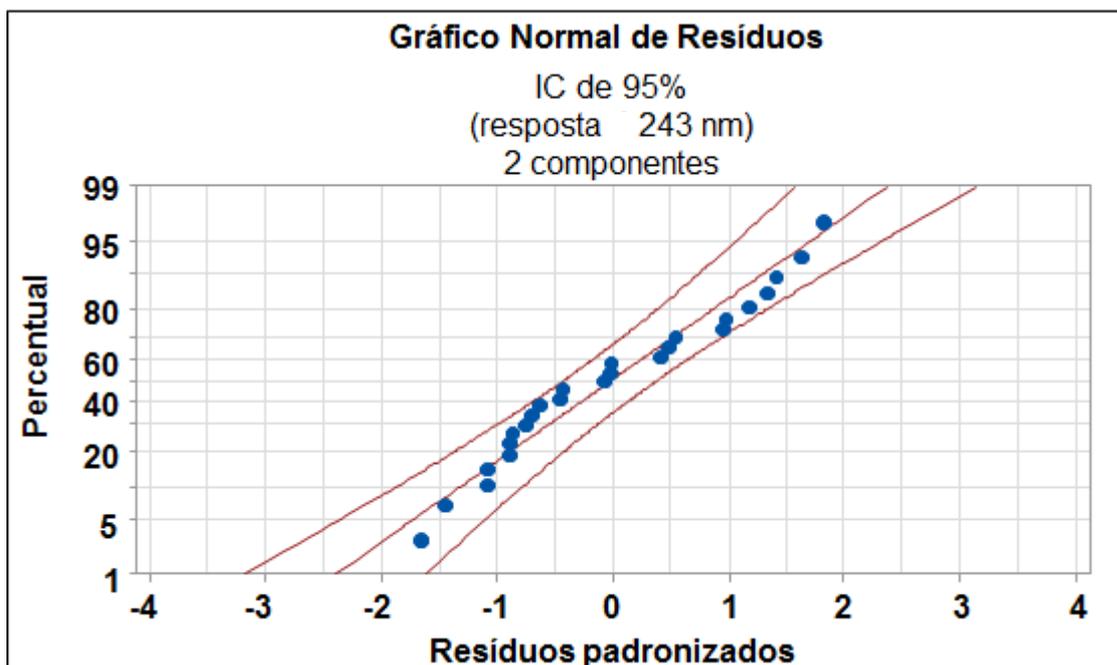


FIGURA 7- Gráfico Normal de Resíduos por regressão PLS (*Parcial Least Squares*) em 243nm.

Os gráficos representam os resíduos padronizados obtidos a partir da aplicação do modelo matemático. Estes resíduos são referentes à diferença entre os valores

experimentais e os valores preditos pela equação da reta, sendo relacionados do erro da análise de regressão.

De acordo com os gráficos obtidos, a dispersão dos dados em torno da reta de regressão é uniforme, tanto para as análises em 225 nm quanto para aquelas em 243 nm. Além disso, os resíduos do modelo apresentam valores entre +2 e -2, apresentando indícios de distribuição normal e confirmando a aplicabilidade do método a análise multicomponente.

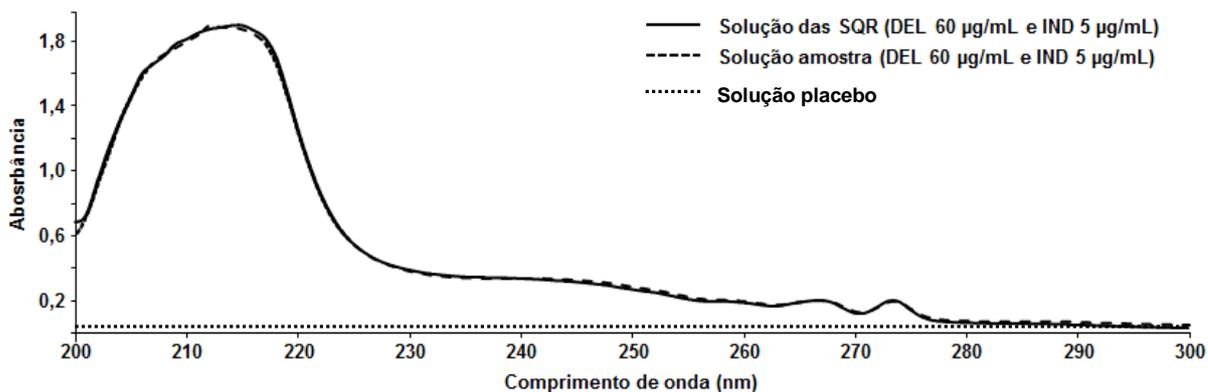
## **5.2 VALIDAÇÃO**

Após a obtenção de resultados satisfatórios durante o desenvolvimento do método e delineamento experimental, foi iniciado o processo de validação do mesmo. Nesta etapa foram avaliados parâmetros preconizados internacionalmente, tais como a especificidade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

### **5.2.1 Especificidade**

Conforme mencionado anteriormente (item 5.1.2.), observou-se a sobreposição entre os espectros de absorção no UV dos fármacos, fato este que inviabiliza a determinação simultânea dos compostos através da espectrofotometria direta (Figura 5). Assim, a especificidade do método foi comprovada através dos estudos de calibração multivariada (item 5.1.3), o qual demonstrou a capacidade do método quantificar os analitos mesmo na coexistência de ambos na forma farmacêutica.

Complementarmente, comparou-se os espectros obtidos para uma solução do simulado dos excipientes (placebo) contaminada com as SQR de DEL (60 µg/mL) e IND (5 µg/mL) com outra solução contendo somente as SQR de DEL (60 µg/mL) e IND (5 µg/mL). Além destas 2 soluções, analisou-se também uma solução contendo somente o placebo. Esses resultados podem ser visualizados na Figura 8.



**FIGURA 8-** Sobreposição dos espectros de uma solução do placebo contaminado com SQR de DEL (60 µg/mL) e IND (5µg/mL) com outra solução contendo somente SQR de DEL (60 µg/mL) e IND (5µg/mL), além de uma solução do placebo.

Através da análise dos espectros dessas 3 soluções, observa-se que a solução do placebo não absorve ao longo da leitura, permanecendo na linha de base. Enquanto que as soluções contendo as SQR de DEL (60 µg/mL) e IND (5 µg/mL) na presença ou não do placebo mostram-se sobrepostas, o que demonstra que a presença ou não dos excipientes da formulação nas soluções não interfere na análise realizada.

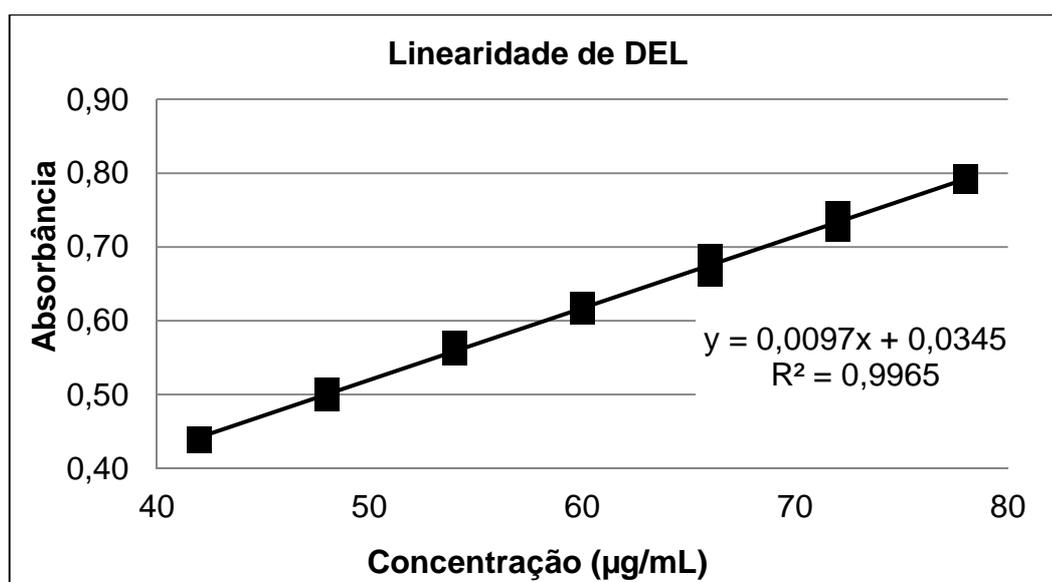
### 5.2.2 Linearidade

A construção da faixa de linearidade foi baseada nas concentrações utilizadas no desenvolvimento da calibração multivariada. Assim, a linearidade do método proposto foi obtida através da construção de curvas de calibração, a partir de 7 soluções com diferentes concentrações das SQR de ambos os fármacos, com análise em 3 dias consecutivos. As soluções foram preparadas nas concentrações de 42, 48, 54, 60, 66, 72 e 78 µg/mL de DEL e respectivamente 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0 e 6,5 µg/mL de IND. Os resultados obtidos nas leituras de cada uma das soluções foram organizados na Tabela 10.

**TABELA 10-** Resultados obtidos para a construção de curva de calibração.

	DEL ( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorbância (225 nm)			IND ( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorbância (243 nm)		
		Dia 1	Dia 2	Dia 3		Dia 1	Dia 2	Dia 3
		Solução 1	<b>42</b>	0,437		0,440	0,437	<b>3,5</b>
Solução 2	<b>48</b>	0,495	0,507	0,494	<b>4,0</b>	0,285	0,297	0,293
Solução 3	<b>54</b>	0,556	0,565	0,547	<b>4,5</b>	0,334	0,329	0,330
Solução 4	<b>60</b>	0,613	0,623	0,615	<b>5,0</b>	0,355	0,369	0,365
Solução 5	<b>66</b>	0,673	0,688	0,673	<b>5,5</b>	0,398	0,406	0,401
Solução 6	<b>72</b>	0,725	0,728	0,721	<b>6,0</b>	0,437	0,437	0,436
Solução 7	<b>78</b>	0,790	0,795	0,789	<b>6,5</b>	0,478	0,478	0,473

Dispondo dos valores desses resultados, procedeu-se a construção das curvas de calibração que podem ser observadas nas Figuras 9 e 10, obtendo-se um coeficiente de determinação ( $r^2$ ) igual a 0,9965 ( $r=0,9982$ ) para DEL e de 0,9990 ( $r=0,9995$ ) para IND. Deste modo, o método proposto apresenta-se com os coeficientes de correlação,  $r$ , acima do que é preconizado para a aceitação, ou seja, maiores que 0,99 (BRASIL, 2003).

**FIGURA 9-** Gráfico da Linearidade do delapril.

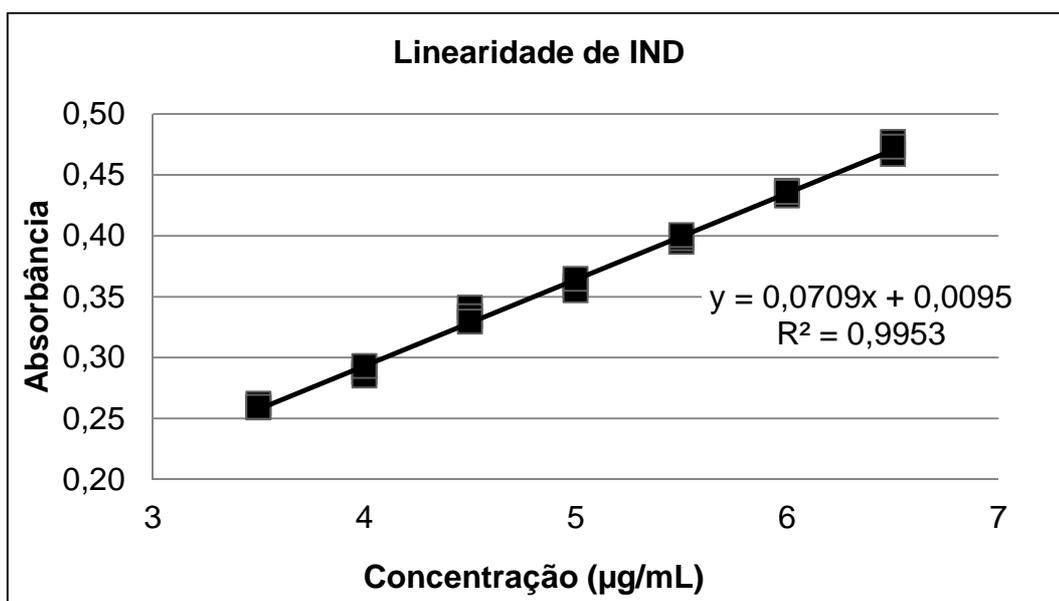


FIGURA 10- Gráfico da linearidade da indapamida.

### 5.2.3 Limite de detecção e de quantificação

Com base nos dados obtidos nos estudos de linearidade, a sensibilidade do método proposto foi determinada através dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ). O valor calculado para a menor concentração detectada pelo processo analítico, o LD, foi de 1,606 µg/mL para DEL e de 0,321 µg/mL para IND. Por sua vez, o LQ calculado foi de 5,354 µg/mL para DEL e de 1,074 µg/mL para IND.

### 5.2.4 Exatidão

O ensaio para a obtenção da exatidão do método proposto foi realizado através da contaminação do placebo com concentrações pré-definidas de DEL e IND. Foram preparadas soluções nas concentrações de 48, 60, e 72 µg/mL de DEL e 4, 5 e 6 µg/mL de IND.

A análise foi realizada em triplicata durante 3 dias subsequentes, sendo calculados o DPR dos resultados para as amostras em cada concentração e também o percentual referente à concentração real média obtida experimentalmente. Os resultados da exatidão são apresentados na Tabela 11.

**TABELA 11-** Resultados obtidos no ensaio para verificação da exatidão.

C <sup>1</sup> (%)	DEL			IND		
	C Teórica <sup>2</sup> (µg/mL)	Exatidão <sup>3</sup> (%)	DPR (%)	C Teórica <sup>2</sup> (µg/mL)	Exatidão <sup>3</sup> (%)	DPR (%)
80	48	102,95	1,170	4,0	102,78	0,851
100	60	100,49	0,653	5,0	100,56	0,575
120	72	101,60	0,311	6,0	101,47	0,746

<sup>1</sup> % relacionado à concentração de trabalho de DEL (60 µg/mL) e IND (5,0 µg/mL)

<sup>2</sup> Concentrações teórica

<sup>3</sup> Concentrações obtidas experimentalmente

Os percentuais de recuperação obtidos estão compreendidos entre 100,49% e 102,95%, estando em faixa aceitável para a análise deste parâmetro (BRASIL, 2003). Neste caso, o método apresentou uma recuperação média de 101,68% para DEL e de 101,60% para IND. O DPR deve-se apresentar inferior a 5%, diante disso, foram efetuados os cálculos obtendo-se o valor de 1,21% para análise de DEL e de 1,10% para IND; mostrando assim a exatidão da metodologia proposta.

### 5.2.5 Precisão

A precisão foi avaliada através da repetibilidade (precisão intradia) e também através da precisão intermediária (precisão interdia), sendo feitas análises por 3 dias consecutivos de 6 soluções preparadas com as amostras de DELAPRIDE® na concentração de trabalho, ou seja, com DEL (60 µg/mL) e IND (5 µg/mL) como concentração final. Os resultados foram expressos em DPR, considerando-se adequados valores inferiores a 5% (BRASIL, 2003). O DPR médio obtido foi de 1,74% (teor médio = 99,83%) para DEL e 1,63% (teor médio = 99,47%) para IND, mostrando-se assim abaixo dos limites aceitáveis. A Tabela 12 demonstra os resultados obtidos para a análise das 18 amostras avaliadas.

A precisão foi expressa na forma de desvio padrão relativo, considerando-se aceitos valores inferiores a 5% (BRASIL, 2003). O DPR médio obtido foi de 1,94%

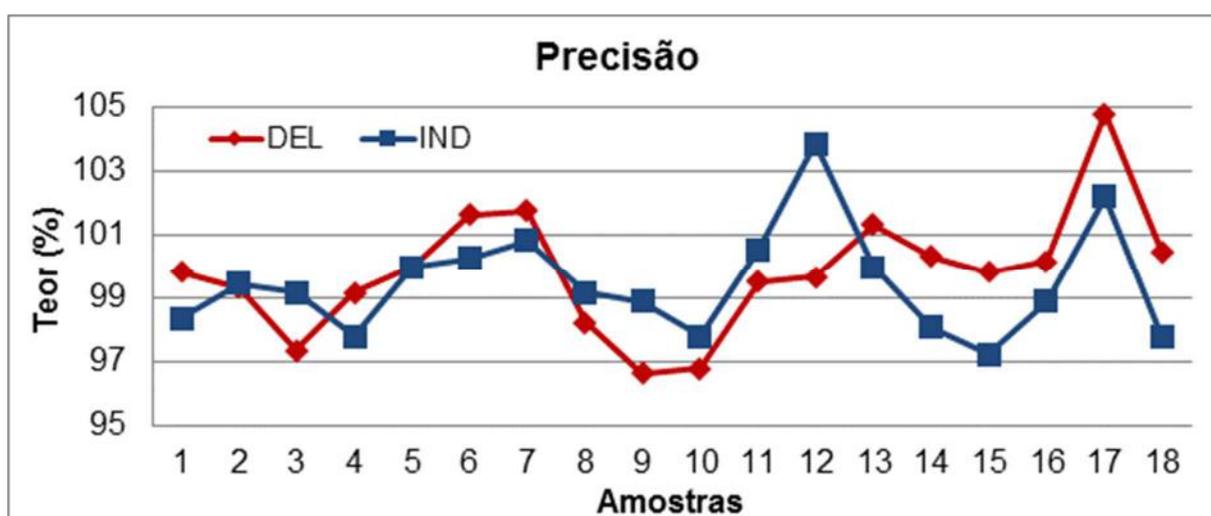
(teor médio = 99,83%) para DEL e 1,69% (teor médio = 99,47%) para IND, mostrando-se assim abaixo dos limites aceitáveis.

**TABELA 12-** Resultados obtidos nos ensaios de precisão do método.

Amostras	% DEL			% IND		
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 1	Dia 2	Dia 3
1	99,84	101,77	101,33	98,35	100,83	100,00
2	99,34	98,23	100,33	99,45	99,17	98,07
3	97,36	96,63	99,83	99,18	98,90	97,25
4	99,18	96,79	100,17	97,80	97,80	98,90
5	100,00	99,52	104,83	100,00	100,55	102,20
6	101,65	99,68	100,50	100,27	103,86	97,80
<b>Intradia</b>	<b>99,56</b>	<b>98,77</b>	<b>101,16</b>	<b>99,18</b>	<b>100,18</b>	<b>99,04</b>
<b>DPR</b>	<b>1,39</b>	<b>1,96</b>	<b>1,86</b>	<b>0,95</b>	<b>2,12</b>	<b>1,83</b>
<b>Interdias<sup>1</sup></b>	<b>99,83</b>			<b>99,47</b>		
<b>DPR<sup>1</sup></b>	<b>1,94</b>			<b>1,69</b>		

<sup>1</sup> Resultados da análise de 18 amostras (n=18).

A Figura 11, mostra a dispersão dos resultados obtidos para as amostras analisadas para a avaliação da precisão do método proposto, onde é possível observar que todas as amostras apresentam-se com teor na faixa de 95 a 105%, de acordo com o preconizado (BRASIL, 2003).



**FIGURA 11-** Gráfico do teor percentual obtido para precisão intradia e interdia (n=18).

### 5.2.6 Robustez

A robustez foi determinada através da realização de pequenas e deliberadas variações no método analítico. Foram avaliados diferentes comprimentos de onda de análise, sendo as determinações das absorvâncias realizadas em 223, 225, 227 nm para o DEL e 241, 243 e 246 nm para a IND. Foram utilizadas diferentes marcas de etanol para o preparo das soluções. Assim, o etanol 1 refere-se ao solvente da marca ÊXODO CIENTÍFICA®, utilizada em todos os experimentos relacionados ao desenvolvimento e validação do método proposto, e o etanol 2 refere-se à VETEC®, utilizada apenas nos estudos de robustez.

Após a realização destas análises, os resultados obtidos foram organizados nas Tabelas 13 e 14; onde é possível verificar que estes não sofrem alterações expressivas no teor aferido (entre 99,88% e 101,84% para DEL e de 99,43% a 101,13% para IND), mesmo com as pequenas alterações promovidas; mostrando assim a robustez do método proposto.

**TABELA 13-** Tabela contendo os resultados para o doseamento de DEL obtidos no ensaio de robustez.

Soluções (DEL)	Absorbância (223 nm)	Teor (%)	Absorbância (225 nm)	Teor (%)	Absorbância (227 nm)	Teor (%)
SQR (etanol 1)	0,806	<b>99,88</b>	0,595	<b>100,84</b>	0,49	<b>100,41</b>
Amostra (etanol 1)	0,805		0,600		0,492	
SQR (etanol 2)	0,926	<b>101,84</b>	0,698	<b>101,00</b>	0,578	<b>100,52</b>
Amostra (etanol 2)	0,943		0,705		0,581	

**TABELA 14-** Tabela contendo os resultados para o doseamento de IND obtidos no ensaio de robustez.

Soluções (IND)	Absorbância (241 nm)	Teor (%)	Absorbância (243 nm)	Teor (%)	Absorbância (245 nm)	Teor (%)
Padrão (etanol 1)	0,356	<b>100,84</b>	0,355	<b>101,13</b>	0,35	<b>99,43</b>
Amostra (etanol 1)	0,359		0,359		0,348	
Padrão (etanol 2)	0,402	<b>101,00</b>	0,399	<b>100,75</b>	0,39	<b>100,77</b>
Amostra (etanol 2)	0,406		0,402		0,393	

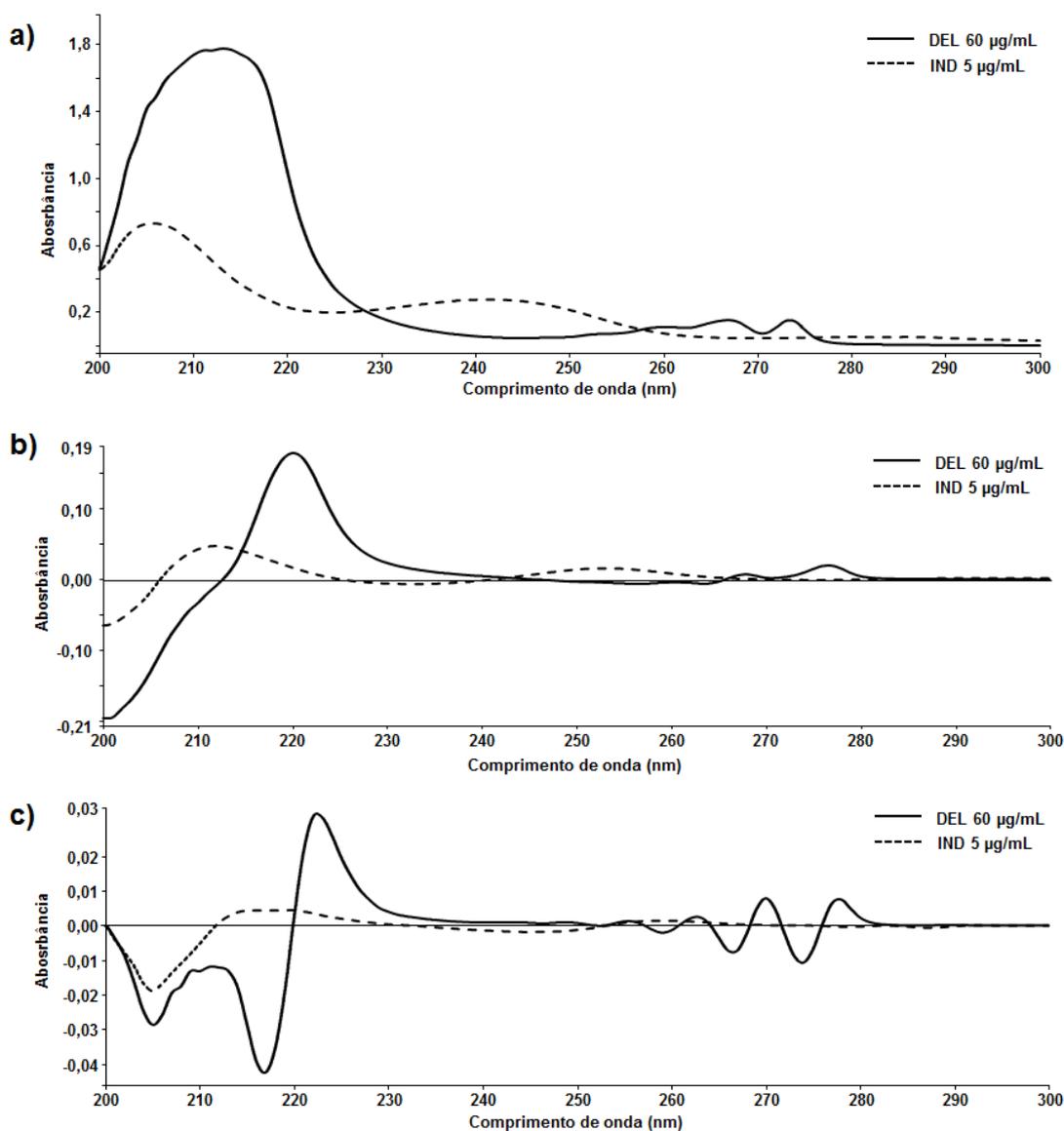
## **6 CONCLUSÕES**

A preocupação em produzir medicamentos com qualidade, segurança e eficácia comprovadas deve ser uma tônica de todas as empresas farmacêuticas. Neste sentido, faz-se necessário o desenvolvimento de metodologias analíticas adequadas para o controle de qualidade dos medicamentos.

O método quantitativo desenvolvido por UV usando a ferramenta multivariada cumpriu com os parâmetros de validação preconizados para métodos analíticos e apresenta-se como uma alternativa simples e econômica para a análise simultânea dos fármacos. Além disso, os resultados aqui apresentados estabelecem bases para progressivos trabalhos científicos na área e procedimentos importantes para aprimorar o controle da qualidade dos produtos farmacêuticos.

## 7 PERSPECTIVAS

Como já mencionado, a sobreposição entre os espectros de absorção no UV dos fármacos, inviabiliza a determinação simultânea dos compostos através da espectrofotometria direta. Além da aplicação da ferramenta multivariada conforme desenvolvido neste trabalho, outra estratégia possível seria a aplicação da espectrofotometria derivada. Assim, espectros das soluções padrões de DEL e IND foram obtidos utilizando um intervalo de comprimento de onda de 200-300 nm, sendo apresentadas na Figura 12.



**FIGURA 12-** Sobreposição dos espectros de absorção das SQR de DEL (60 µg/mL) e IND (5 µg/mL) na zero ordem (a); primeira ordem (b); segunda ordem (c).

Conforme os resultados obtidos, não foram observadas interações espectrais utilizando as diferentes ordens da derivada, permitindo, portanto, a quantificação individual dos fármacos mesmo na presença dos outros componentes da formulação. Assim, uma perspectiva de continuidade do trabalho se dará através da finalização do desenvolvimento e posterior validação do método usando esta ferramenta analítica, buscando, se possível, o estabelecimento de um método alternativo simples, econômico e sustentável para a análise simultânea dos fármacos na forma farmacêutica disponível comercialmente.

## REFERÊNCIAS

AHRER, W.; SCHERWENK, E.; BUCHBERGER, W. **Determination of drug residues in water by the combination of liquid chromatography or capillary electrophoresis with electrospray mass spectrometry.** *Journal of Chromatography A*, v.910, p.69-78, 2001.

AKIYAMA, Y. et al. **Anti-hypertensive Effect of Oral Controlled-release Microspheres Containing an ACE Inhibitor (Delapril Hydrochloride) in Rats.** *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 46, n. 8, p. 661-665, 1994.

BARTHUS, R. et al. **Aplicação de métodos de calibração multivariada para a determinação simultânea de riboflavina (VB2), tiamina (VB1), piridoxina (VB6) e nicotinamida (VPP).** *R. Química Nova*, v.30, n.7, p.1638-1643, 2007.

BOING, A.C.; BOING, A.F. **Hipertensão arterial sistêmica: o que nos dizem os sistemas brasileiros de cadastramentos e informações em saúde.** *Revista Brasileira de Hipertensão*, v.14, n.2, p.84, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA-ANVISA. **Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003.** Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". Diário Oficial da União, Brasília-DF, 02/06/2003. Disponível em: <<http://www.in.gov.br/imprensa/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=56&data=02/06/2003>>. Acesso em:15/06/2014.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO. **DOQ-CGCRE-008 - Orientação sobre validação de métodos analíticos.** Revisão 3, 2010. Disponível em: <[www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/.../DOQ-CGCRE-8\\_03.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/.../DOQ-CGCRE-8_03.pdf)> Acesso em: 10/07/2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Hipertensão arterial sistêmica.** *Caderno de Atenção Básica à Saúde*, Brasília-DF, 1ª edição, n.15, p.58, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigitel Brasil 2011: Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico.** Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília-DF, 1ª edição, p.132, 2012.

**BP-III.** BRITISH PHARMACOPOEIA. Volume III. London: *Pharmacopoeial Commission Office*, 2008.

**BRO, R. Multivariate calibration. What is in chemometrics for the analytical chemistry?** *Analytica Chimica Acta*, v.500, p.185-194, 2003.

**BROWN, M. J. et al. Better blood pressure control: how to combine drugs.** *Journal of Human Hypertension*, v. 17, n. 2, p.81-86, 2003.

**BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica.** 11<sup>a</sup>. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, p.1821, 2007.

**CAVALIERI, L.; CREMONESI, G. Delapril plus indapamide: a review of the combination in the treatment of hypertension.** *Clinical Drug Investigation*, v.27, p.367-380, 2007.

**CHOBANIAN, A.V. et al. Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. National Heart, Lung, and Blood Institute; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. The seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure.** *Hypertension Journal of American Heart Association*, v. 42, n.6, p. 1206-1252, 2003.

**CIRCELLI, M. Efficacy and safety of delapril/indapamide compared to different ACE-inhibitor/hydrochlorothiazide combinations: a meta-analysis.** *International Journal of General Medicine*, v.5: p.725–734, 2012.

**CORDEIRO, G.A. Desenvolvimento de metodologias espectroscópicas multivariadas para quantificação de fármacos em formas farmacêuticas.** Tese (Mestrado em Química) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, p.118, 2006.

**CORDEIRO, G.A. et al. Determinação de misturas de sulfametoxazol e trimetoprima por espectroscopia eletrônica multivariada.** *R. Química Nova*, v.31 n. 2, p.254-260, 2008.

**CÓRDOVA, M. L. F. et al. A flow injection sensor for simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim by using Sephadex SP C-**

**25 for continuous online separation and solid phase UV transduction.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.31, p.669, 2003.

CORRÊA, T.D *et al.* **Hipertensão arterial sistêmica: atualidades sobre sua epidemiologia, diagnóstico e tratamento.** *Arquivo de Medicina do ABC*, v. 31, p. 91-101, 2005.

CORRER, C.J. *et al.* **Determinação de ácido fólico em produtos farmacêuticos por espectroscopia UV-Vis e processo de calibração multivariada.** *Acta Farmacéutica Bonaerense*, v. 24, n.3, p. 416-420, 2005.

COSCIONE, A. R. **O Uso de calibração multivariada para a determinação espectrofotométrica simultânea de alumínio e ferro: aplicação na análise de plantas e solos.** Tese (Doutorado em Química) - UNICAMP, Campinas, p.129, 2001.

CRANWELL-BRUCE, L. A. **Antihypertensives.** *MEDSURG Nursing*, v. 17, n. 5, p. 337-341, 2008.

CREMONESI, G. *et al.* **Fixed combinations of delapril plus indapamide vs fosinopril plus hydrochlorothiazide in mild to moderate essential hypertension.** *Advances In Therapy*, v.19, n. 3, p.129, 2002.

CREMONESI, G. *et al.* **Efficacy and tolerability of delapril plus indapamide versus lisinopril plus hydrochlorothiazide combination treatments in mild to moderate hypertension: a multicenter, randomized clinical study.** *Current Therapeutic Research*, v. 64, n. 5, p. 290–300, 2003.

DIB, M.W.; RIERA, R.; FERRAZ, M.B. **Estimated annual cost of arterial hypertension treatment in Brazil.** *Pan American Journal of Public Health / Revista Panamericana de Salud Pública*, v.27, n.2, p.125-31, 2010.

DILLON, P.F. *et al.* **Natural electrophoresis of norepinephrine and ascorbic acid.** *Biophysical Journal*, v.79, p.370-376, 2000.

**EP-6.** EUROPEAN PHARMACOPOEIA. 6<sup>th</sup> ed. *Council of Europe*. Strasbourg. Indapamide; p. 1793-1794; 2006.

ESCOBAR, C.; BARRIOS, V. **Combined therapy in the treatment of hypertension.** *Fundamental & Clinical Pharmacology*, v. 24, n. 1, p.3-8, 2009.

EUROPEAN SOCIETY OF HYPERTENSION. **European Society of Cardiology guidelines for management of arterial hypertension.** *Journal of Hypertension*, v.21, p.1011-1153, 2003.

FERREIRA, M. C. *et al.* **Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial.** R. Química Nova, v.22, n.5, p.12-15, 1999.

FIGUEIREDO, F. S.; BRANDÃO, A. A. **Combinação de Fármacos no Tratamento da Hipertensão Arterial: Vantagens e Desvantagens.** *Revista Brasileira de Cardiologia*, v.26, n.5, p.325-328, 2013.

GELADI, P.; KOWALSKI, B. R. **Partial Least-Square Regression: A tutorial.** *Analytica Chimica Acta*, Amsterdam, v. 185, p. 1-7, 1986.

GRADMAN, A. H. *et al.* **Combination therapy in hypertension.** *Journal of the American Society of Hypertension*, v. 4, n. 2, p.90-98, 2010.

GUSMÃO, J.L; MION JR, D. **Adesão ao tratamento—conceitos.** *Revista Brasileira de Hipertensão*, v.13, n.1, p.23-25, 2006.

HARRIS, D.C. **Análise Química Quantitativa.** 6ª Edição, Rio de Janeiro-RJ: LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2005.

HARRIS, D.C. **Exploring Chemical Analysis.** 5<sup>th</sup> ed. *New York: W. H. Freeman*, 2013.

HOUSTON, M. C. **Handbook of Hypertension.** 1<sup>st</sup> ed. *New Jersey: Wiley-Blackwell*, 2009. Disponível em <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781444311808.fmatter/pdf>>. Acesso em 10/08/2014.

HUTT, V. *et al.* **Bioavailability and pharmacokinetics of a fixed combination of delapril/indapamide following single and multiple dosing in healthy volunteers.** *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, v.19, n.1, p.59-69, 1994.

**ICH - INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). ICH Harmonised Tripartite Guideline, 2005.**

KEARNEY, P.M. *et al.* **Worldwide prevalence of hypertension: a systematic review.** *Journal of Hypertension*, v.22, n.1, p.11-19, 2004.

KOHLMANN JR, O. *et al.* **Estudo "LOTHAR": avaliação de eficácia e tolerabilidade da combinação fixa de anlodipino e losartana no tratamento da hipertensão arterial primária.** *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 86, n., p.39-51, 2006.

LAW, M. R. *et al.* **Value of low dose combination treatment with blood pressure lowering drugs: analysis of 354 randomised trials.** *British Medical Journal*, v. 326, n. 7404, p.1427, 2003.

LA ROCA, M.F. **Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos.** *Revista Brasileira de Farmácia*, v.88, n.4, p.177-180, 2007.

LEONETTI, G. **Efficacia antiipertensiva dell'associazione delaprilindapamide: Delapril-Indapamide Multicenter Study (DIMS).** *Cardiologia*, v. 42, n. 3, p. 401–406, 1997.

LIMA, L. R. *et al.* **Desenvolvimento e Validação de Metodologia de Quantificação Gravimétrica de Resina Glicosídica em Fitoterápico Contendo *Operculina macrocarpa* (L.).** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, n. 4, p. 562-567, 2006.

MADAN, J.; DWIVEDI, A.K.; SINGH, S. **Estimation of antitubercular drugs combination in pharmaceutical formulations using multivariate calibration.** *Analytica Chimica Acta*, v. 538, p. 345–353, 2005.

MALUF, D.F. *et al.* **Determinação simultânea de paracetamol e cafeína por espectrometria UV-Vis associada a ferramentas matemáticas.** *Revista Brasileira de Farmácia*, v.89, n.1, p. 39-43, 2008.

MOREIRA, J.P.L.; MORAES, J.R.; RAGGIO, R.L. **Prevalence of self-reported systematic arterial hypertension in urban and rural environments in Brazil: a population-based study.** *Caderno de Saúde Pública*, v.29, p.62-72, 2013.

NOBRE, F. *et al.* **Associações fixas de drogas anti-hipertensivas: vantagens e desvantagens na prática clínica.** *Revista Brasileira de Hipertensão*, v.10, p.270-276, 2003.

NOGUEIRA, A.R. **A utilização da associação de fármacos para tratamento de hipertensão arterial nos grandes ensaios clínicos.** *Revista Brasileira de Hipertensão*, v.10, p.265-269, 2003.

OKA, Y. *et al.* **Delapril.** *Cardiovascular Drug Reviews*, v. 6, n. 1, p.192-205, 1988.

OTERO, M.L. **Manidipine-Delapril combination in the management of hypertension.** *Vascular Health and Risk Management*, v. 3, p. 255-263, 2007.

PAREEK, A. *et al.* **Efficacy and tolerability of a fixed-dose combination of metoprolol extended release/amlodipine in patients with mild-to-moderate hypertension: a randomized, parallel-group, multicentre comparison with losartan plus amlodipine.** *Clinical Drug Investigation*, v. 30, n. 2, p.123-131, 2010.

PARISOTTO, G. *et al.* **Análise Exploratoria Aplicada no Estudo de Medicamentos Contendo Piroxicam.** *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 41, n. 4, p. 499-505, 2005.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.L.; KRIZ, G.S. **Introduction to spectroscopy: a guide for students of organic chemistry.** 3<sup>rd</sup> edition, *United States of America: Thomsom/Brooks Cole*, 2001.

POVOA, R. *et al.* **I Posicionamento Brasileiro sobre Combinação de Fármacos Anti-Hipertensivos.** *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, vol.102, n.3, 2014.

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

RITTER, N.M.; HAYES, T.; DOUGHERTY, J. **Analytical laboratory quality: part II. analytical method validation.** *Journal of Biomolecular Techniques*, v.12, p.11–15, 2001.

ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G. **Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS.** *R. Química Nova*, v. 27, n. 5, p.807-812, 2004.

ROSEI, E.A.; RIZZONI, D. **Evaluation of the efficacy and tolerability of the combination delapril plus indapamide in the treatment of mild to moderate essential hypertension: a randomised, multicentre, controlled study.** *Journal of Human Hypertension*, v.17, p.139–146, 2003.

ROWE, R. C., SHESKEY, P. J., & OWEN, S. C. **Handbook of pharmaceutical excipients.** Pharmaceutical Press: London, 2006.

ROZET, E. *et al.* **Quality by design compliant analytical method validation.** *Analytical Chemistry*, v.84, p.106–112, 2012.

RUTSAERT, R.; FERNANDES, M. **Indapamide.** *New Drugs Annual:Cardiovascular Drugs*, v.1, n.1, p.49-67, 1983.

SAHIN, S.; DEMIR, C.; GÁER, S. **Simultaneous UV-Vis spectrophotometer determination of disperse dyes in textile wastewater by partial least squares and principal component regression.** *Dyes and Pigments*, v.73, p. 368-376, 2007.

SALDANHA, T.C.B.; ARAUJO, M.C.U.; BARROS NETO, B. **Análise multicomponente simultânea por espectrofotometria de absorção molecular UV-VIS.** *R. Química Nova*, v. 22, n. 6, 1999.

SENA, M.M. *et al.* **Application of two-and three-way chemometric methods in the study of acetylsalicylic acid and ascorbic acid mixtures using ultraviolet spectrophotometry.** *Analytica Chimica Acta*, v. 409, 159, 2000.

SHABIR, G.A. **Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization.** *Journal of Chromatography A*, v.987, p. 57–66, 2003.

SIDDIQUI, M. R. *et al.* **Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review.** *Arabian Journal of Chemistry*, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.04.016>>. Acesso em 12/09/2014

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. **Spectrometric identification of organic compounds.** 6<sup>th</sup> edition, *New York: John Wiley & Sons, Inc.*, 1997.

SKOOG D.A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. Tradução da 8ª edição norte-americana, São Paulo: Editora Thomson, 2006.

SKOOG, D.A. et al. **Analytical chemistry – an introduction**. 7<sup>th</sup> edition, Orlando: Harcourt Inc., 2000.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A., **Principles of Instrumental Analysis**. 6<sup>st</sup> edition, Canada: Thomsom/Brooks Cole, 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. **VI diretrizes brasileiras de hipertensão**. *Revista Brasileira de Hipertensão*, v.17, n. 1, 2010.

SPEED, D.J. et al. **Analysis of paracetamol using solid-phase extraction, deuterated internal standards, and gas chromatography-mass spectrometry**. *J. Journal of Analytical Toxicology*, v.25, n.3, p.198-202, 2001.

STANTON, T; REID, J.L. **Fixed dose combination therapy in the treatment of hypertension**. *Journal of Human Hypertension*, v.16, p.75–78, 2002.

SUNKERSETT, M.R. et al. **The changes in surface energetics with relative humidity of carbamazepine and paracetamol as measured by inverse gas chromatography**. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.13, n.2, p.219-225, 2001.

TAVERNIERS, I.; LOOSE, M. D.; BOCKSTAELE, E. V. **Trends in quality in the analytical laboratory. I. Traceability and measurement uncertainty of analytical results**. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 23, n.7, p. 480-490, 2004a.

TAVERNIERS, I.; LOOSE, M. D.; BOCKSTAELE, E. V. **Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance**. *Trends in Analytical Chemistry*. v. 23, n.8, p. 535-550, 2004b.

TOCCI, G. et al. **Multivariate risk assessment and risk score cards in hypertension**. *Vasc Health Risk Manag*, v. 3, n.3, p.313-320, 2007.

TODESCHINI, V et al. **Stability-indicating micellar electrokinetic chromatography technique for simultaneous measurement of delapril and**

**manidipine from their combination drug formulation.** *Journal Association of Official Analytical Chemists International*, v. 97, p.114-120, 2014.

TODESCHINI, V. *et al.* **First-order derivative UV spectrophotometric method for simultaneous measurement of delapril and manidipine in tablets.** *Acta Chimica Slovenica*, v.60, n.2, p. 335–342, 2013.

TODESCHINI, V. *et al.* **Simultaneous determination of delapril and manidipine in a pharmaceutical formulation by a stability-indicating RP-LC method.** *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 35, p. 603-620, 2012.

TODESCHINI, V.; SANGOI, M.; VOLPATO, N.M. **Delapril and manidipine measurements by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in pharmaceutical formulation.** *European Journal of Mass Spectrometry*, v. 17, p. 287-296, 2011.

**USP32.** United States Pharmacopoeia and National Formulary Rockville, MD: *United States pharmacopoeial convention*, p. 2624, 2009.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. **Microextração por Fase Sólida.** *R. Química Nova*, v. 23, n. 4, p. 523-530, 2000.

VALENTINI, S.R.; SOMMER, W.A.; MATIOLI, G. **Validação de métodos analíticos.** *Arquivos do Mudi*, v. 11, n.2, p. 26-31, 2007.

WEIGEL, S.; BESTER, K.; HUHNERFUSS, H. **New method for rapid solid-phase extraction of large-volume water samples and its application to non-target screening of North Sea water for organic contaminants by gas chromatographymass spectrometry.** *Journal of Chromatography A*, v. 912, 151-161, 2001.

**WHO.** *World Health Organization. Global status report on noncommunicable diseases 2010.* Geneva: WHO, 2011.

ZARBIELLI M.G.; MACEDO, S.M.D.; MENDEZ, A.S.L. **Controle de qualidade de cápsulas de piroxicam manipuladas em farmácias do município de Erechim – RS.** *Revista Brasileira de Farmácia*, v.87, n.2, p.55-59, 2006.

**ZAUGG, S. et al. Determination of salicylate, gentisic acid and salicyluric acid in human urine by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection.** *Journal of Chromatography B*, v. 752, n.1, p. 17-31, 2001.

**ZEEVI, M. et al. The use of a response surface methodology on HPLC analysis of methyldopa, amiloride and hydrochlorothiazide in tablets.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.24, 1019, 2001.

## ANEXO A- Texto da Bula do DELAPRIDE®

### CHIESI FARMACEUTICI SpA

**PRINCIPIO** Delapril 30 mg, indapamide 2,5 mg. **ATTIVO:**

**ECCIPIENTI:** Lattosio, idrossipropilcellulosa basso sostituita, idrossipropilcellulosa, magnesioestearato.

**CATEGORIA** Antiipertensivo (ACE-inibitore e diuretico in associazione). **FARMACOTERAPEUTICA:**

**INDICAZIONI:** Trattamento dell'ipertensione arteriosa in pazienti per i quali è indicata l'associazione terapeutica.

**CONTROINDICAZIONI:** Ipersensibilità nota al delapril, all'indapamide, ad altri ACE-inibitori o ad altri derivati sulfamidici. Grave insufficienza epatica e renale, anuria. Stenosi uni o bilaterale dell'arteria renale. Accidenti cerebro-vascolari recenti. Feocromocitoma e sindrome di Conn. Gravidanza e allattamento. Precedenti di edema angioneurotico, ipopotassiemia e iposodiemia refrattaria.

**EFFETTI INDESIDERATI:** Gli effetti collaterali comprendono più frequentemente capogiri o vertigini, cefalea, astenia, tosse, epigastralgia, vomito, eruzioni cutanee, prurito. Sono stati osservati sporadicamente aumento di CPK e LDH. Con l'impiego dei soli ACE-inibitori o di indapamide sono state segnalate altre reazioni a carico di: Sistema cardiovascolare: all'inizio del trattamento ed in occasione di incremento posologico si può riscontrare ipotensione. Raramente può verificarsi ipotensione sintomatica accompagnata da senso di vertigini, debolezza e nausea nei soggetti con grave ipovolemia e deplezione salina, in quelli sottoposti a dialisi od in quelli affetti da grave insufficienza cardiaca congestizia. Raramente si possono verificare sincope. Apparato renale: in determinati pazienti il trattamento con ACE-inibitore può compromettere la funzione renale. Apparato gastrointestinale e fegato: in rarissimi casi possono verificarsi alterazioni del gusto; aumento degli enzimi epatici e della bilirubina. Reazioni allergiche: reazioni di ipersensibilità accompagnate da prurito, eruzioni cutanee ed a volte da febbre, comunque reversibili con la sospensione della terapia. In rari casi durante il trattamento con ACE-inibitori può verificarsi edema angioneurotico. Reazioni neurologiche: insonnia, nervosismo, sonnolenza e parestesia. Altri effetti indesiderati possibili sono dispnea, iperidrosi, crampi muscolari. Si possono inoltre riscontrare alterazioni dei parametri clinici di laboratorio, quali aumento dell'azoto ureico e della creatinemia, soprattutto nei pazienti con insufficienza renale od in quelli precedentemente trattati con diuretici. Durante il trattamento con ACE-inibitori, a seguito della diminuzione della secrezione di aldosterone può verificarsi un aumento della potassiemia. Tra i fattori di rischio per lo sviluppo di iperpotassiemia devono essere considerati insufficienza renale, diabete mellito e uso contemporaneo di diuretici a risparmio di potassio e/o l'integrazione di potassio. Dopo somministrazione di indapamide sono state segnalate modificazioni dell'equilibrio idro-salino, in particolare ipopotassiemia. D'altra parte la perdita di potassio che si può verificare nel trattamento con indapamide tende ad essere controbilanciata dalla contemporanea somministrazione di delapril.

### PRECAUZIONI D'IMPIEGO:

**ANGIOEDEMA:** con l'impiego di ACE-inibitori sono stati riportati casi di angioedema, specie dopo le prime somministrazioni. In tali casi la terapia deve essere

immediatamente sospesa ed il paziente deve essere trattato appropriatamente e tenuto sotto stretto controllo finché l'edema non è sparito. Quando l'edema è limitato al viso ed alle labbra la condizione si risolve generalmente senza trattamento, sebbene gli antiistaminici siano utili nel sollievo dei sintomi. L'angioedema con interessamento della laringe può essere fatale e richiede pertanto la pronta adozione di idonee terapie come l'iniezione sottocutanea di una soluzione 1:1000 di adrenalina (0.3-0.5 ml). I pazienti devono pertanto essere avvertiti di riferire immediatamente qualsiasi segno o sintomo che suggerisca l'angioedema (gonfiore del viso, degli occhi, delle labbra, della lingua, stridore laringeo, difficoltà a respirare) e di non assumere più il farmaco prima di aver consultato il medico.

**TOSSE:** durante il trattamento con ACE-inibitori può comparire tosse secca, non produttiva, che scompare con la sospensione della terapia. I

**POTENSIONE:** come per gli altri ACE-inibitori, una risposta ipotensiva marcata si può a volte verificare nel trattamento con delapril specialmente in alcune categorie di pazienti a rischio, quali quelli con scompenso cardiaco congestizio, ipertensione renovascolare, dialisi renale, intensa deplezione salina e/o idrica di qualsiasi eziologia (ad es. intensa terapia diuretica). In caso di ipotensione è opportuno porre il paziente in posizione supina e, se necessario, somministrare perinfusione endovenosa una normale soluzione salina. In questi pazienti, prima di iniziare la terapia con il prodotto, è prudente sospendere la terapia diuretica oppure provvedere ad un adeguato trattamento di reidratazione.

**ALTERATA FUNZIONE RENALE:** nel trattamento con ACE-inibitori, pazienti con preesistente scompenso cardiaco congestizio, ipertensione renovascolare e intensa deplezione idrica o salina, hanno un rischio aumentato di sviluppare segni di disfunzione renale (aumento di creatinina, azoto ureico e potassio sierici; proteinuria; alterazioni del volume urinario) e, raramente, insufficienza renale acuta. In particolare Delapride è controindicato nei casi di stenosi uni o bilaterale dell'arteria renale. Lievi aumenti dell'azoto ureico e della creatinemia sono possibili occasionalmente anche in pazienti con funzionalità renale integra. Pur non essendo descritta tale evenienza con delapril, se tali casi dovessero verificarsi è consigliabile la riduzione di dosaggio o la sospensione della somministrazione.

**FUNZIONALITÀ EPATICA:** poiché in parte il delapril viene trasformato nelle forme attive a livello epatico, nei soggetti con insufficienza epatica severa tale conversione può essere rallentata. In tali occasioni è consigliabile osservare la risposta del paziente in funzione della dose adottata. Comunque Delapride deve essere usato con cautela in quanto eventuali alterazioni del bilancio idroelettrolitico possono precipitare un coma epatico.

**QUILIBRI ELETTROLITICI:** nel trattamento con ACE-inibitori, la presenza delle seguenti condizioni può determinare maggior rischio di iperpotassiemia: insufficienza renale, supplementi di potassio e/o sostituti salinici contenenti potassio. D'altra parte, il trattamento con indapamide può determinare riduzione della potassiemia negli anziani, nei pazienti sottoposti a restrizione dietetica, in caso di vomito ed diarrea persistenti, nei portatori di

afezioni epato-renali. Pertanto periodici controlli del quadro elettrolitico devono essere effettuati durante la terapia con indapamide, anche in considerazione di possibili lievi aumenti della calcemia.

**CHIRURGIA-ANESTESIA:** gli ACE-inibitori possono aumentare gli effetti ipotensivi di farmaci anestetici. L'ipotensione che si manifesta in questi casi può essere corretta mediante espansione della volemia, reidratando il paziente per via parenterale.

**NEUTROPENIA/AGRANULOCITOSI:** il trattamento con altri ACE-inibitori è stato, in rari casi, associato ad agranulocitosi e depressione midollare, in particolare in pazienti con associata insufficienza renale e/o collagenopatia. Pur non essendosi mai verificata tale evenienza con delapril, è consigliabile eseguire controlli periodici dei globuli bianchi in pazienti con insufficienza renale e/o collagenopatia o in trattamento con farmaci quali corticosteroidi.

**PEDIATRIA:** il prodotto non va usato in età pediatrica, poiché finora non vi sono sufficienti esperienze in merito.

**PARAMETRI EMATOCHIMICI:** nonostante l'indapamide non modifichi significativamente uricemia e glicemia, si consiglia di monitorare periodicamente tali dati nel corso della terapia.

**AZIENTI IN EMODIALISI:** in pazienti trattati con ACE-inibitori sono state osservate reazioni anafilattoidi in corso di emodialisi con membrane in poliacrilonitrile ad alto flusso (AN69). Si consiglia pertanto di non impiegare queste membrane in tali pazienti.

**IPERSENSIBILITÀ:** reazioni di ipersensibilità possono verificarsi in pazienti con anamnesi positiva per allergia o asma bronchiale.

**AVVERTENZE SPECIALI:** Poiché possono verificarsi capogiri attribuibili all'effetto antiipertensivo del prodotto, occorre prestare attenzione nell'uso di macchinari.

**INTERAZIONI: ANTIACIDI:** la somministrazione contemporanea di antiacidi può ridurre leggermente l'assorbimento intestinale di delapril.

**POTASSIO E DIURETICI RISPARMIATORI DI POTASSIO:** il trattamento con delapril può ridurre la perdita di potassio causata dall'indapamide. L'effetto ipopotassiémico dell'indapamide può essere aumentato da corticosteroidi, ACTH, amfotericina e carbenoxolone. L'ipopotassiémia o l'ipomagnesiémia, che possono verificarsi come effetti collaterali, favoriscono l'insorgenza di aritmie cardiache indotte da diuretici risparmiatori di potassio (spironolattone, amiloride, triamterene ed altri) o la somministrazione dei sali di potassio può far aumentare il rischio di iperpotassiémia. Pertanto, l'impiego di tali farmaci, se richiesto, deve essere praticato con cautela ed i livelli di potassiémia controllati frequentemente.

**LITIO:** nei pazienti in trattamento contemporaneo con ACE-inibitori e litio sono stati descritti aumenti dei livelli ematici di litio e sintomi di intossicazione da litio. Pertanto, la contemporanea somministrazione dei due farmaci dovrebbe essere fatta con cautela ed i livelli ematici di litio controllati frequentemente. La contemporanea somministrazione di indapamide può accrescere la tossicità del litio, dal momento che ne viene ridotta la clearance renale.

**IPOGLICEMIZZANTI:** la somministrazione contemporanea di ACE-inibitori e farmaci antidiabetici (ipoglicemizzanti orali o insulina) può causare un aumento dell'effetto ipoglicemizzante di questi ultimi, con maggiore rischio di ipoglicemia, soprattutto durante le prime settimane di trattamento combinato ed in pazienti con funzionalità renale compromessa.

**ALTRI FARMACI:** è opportuno somministrare con cautela

indapamide in pazienti in terapia digitalica, cortisonica e in quelli che assumono cronicamente lassativi. Alcool, barbiturici, narcotici: può verificarsi un potenziamento del calopressorio in ortostatismo. L'effetto ipotensivo dell'indapamide può risultare aumentato nei simpatectomizzati, ed inoltre la reattività ad agenti pressori come la noradrenalina, può essere diminuita. Come con altri ACE-inibitori, in alcuni pazienti i farmaci antiinfiammatori non steroidei potrebbero ridurre l'effetto antiipertensivo del prodotto. Quando il prodotto viene impiegato insieme ad un'altra terapia antiipertensiva potrebbero manifestarsi effetti additivi.

**POSOLOGIA:** La posologia usuale è di una compressa di Delapride Mite al giorno da somministrarsi preferibilmente al mattino. La maggioranza dei pazienti con ipertensione arteriosa lieve/moderata ottiene un adeguato controllo pressorio con tale posologia. Qualora dopo 2-4 settimane l'effetto antiipertensivo fosse insufficiente, è consigliabile incrementare la posologia somministrando una compressa di Delapride al giorno. Tale dose può essere indicata anche all'inizio della terapia nei pazienti con ipertensione moderata (PAD 105 mmHg). Una volta stabilizzati i valori pressori, un soddisfacente controllo pressorio può essere mantenuto con la posologia standard. In pazienti con ipertensione "borderline" (PAD=90-95 mmHg), può essere proposta l'assunzione di mezza compressa di Delapride. In pazienti già in trattamento con diuretici, è importante sospendere il diuretico qualche giorno prima di somministrare Delapride. Insufficienza renale: poiché in presenza di insufficienza renale si verifica ridotta escrezione di delapril, sono necessari aggiustamenti posologici nei pazienti con livelli serici di creatinina 3 mg/dl; si consiglia di raggiungere il dosaggio appropriato partendo da dosi adeguatamente ridotte, ad es. mezza compressa di Delapride. Pazienti anziani: nei pazienti anziani, in considerazione della fisiologica compromissione della funzionalità renale, è consigliabile non superare la posologia standard di 1 compressa di Delapride Mite.

**SCADENZA E NORME DI CONSERVAZIONE:** Utilizzare il prodotto entro due mesi dalla prima apertura del flacone.