



Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologias

Análise por refletância difusa de formulações farmacêuticas sólidas: aplicação na quantificação de Ranolazina

Inês Filipa Calmeirão Diogo

Dissertação para obtenção do grau de mestre em

Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Prof. Doutora Ana Rosa Garcia

2020



Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologias

Análise por refletância difusa de formulações farmacêuticas sólidas: aplicação na quantificação de Ranolazina

Inês Filipa Calmeirão Diogo

Dissertação para obtenção do grau de mestre em

Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Prof. Doutora Ana Rosa Garcia

2020

Declaração de autoria de trabalho:

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Copyright© 2020

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

À minha “vó” Teresa

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Professora Ana Rosa Garcia, por todo o apoio e força que me deu, por estar sempre lá quando precisava, por acreditar desde o início que iria ser possível e por me conduzir ao sucesso desta dissertação, mesmo quando eu própria não acreditava ser possível.

Aos meus pais e irmão, por serem o meu suporte desde sempre, apesar de todas as adversidades, por estarem sempre ao meu lado a celebrar todas as minhas conquistas e suportá-las. Um grande obrigada a eles, que sempre ajudaram a construir o meu futuro, mostrando-me qual é o melhor caminho. Aos meus avós, por serem o meu suporte emocional, sempre com aquela palavra de carinho, força e orgulho.

Aos meus primos, que sempre me mostraram que a Universidade é uma balança, em que há espaço e tempo para tudo, em especial à minha madrinha Neuza por me ter acompanhado de uma forma especial sempre ao meu lado e por me incentivar a alcançar sempre o melhor.

À Dra. Isabel, por me ter incentivado a conhecer o mundo farmacêutico e por ter acreditado desde o início que eu iria conseguir.

À Feminis Ferventis, a família que me acolheu em Faro e que me mostrou que a organização é a chave do sucesso, que tudo era possível desde que trabalhássemos para isso, mas em especial à Inês Lopes, que é a pessoa que mais me incentiva a lutar pelo sucesso, a que acredita em mim independentemente de tudo e que para além disso ainda me ajuda a alcançar os meus objetivos.

Ao “Não Sei”, os amigos que a Universidade me deu a oportunidade de conhecer e evoluir um bocadinho com cada um deles. À Bruna Ramos, por ter sido a primeira pessoa que eu conheci, apoiando todos os meus sonhos, mostrando-me sempre a realidade. À Soraia Alves, por ter sido a melhor companheira de laboratório, partilhando o amor pela química, que sempre me ajudou com tudo o que eu precisava. À Catarina Correia, Stefania Cardos, Inês Claro e Vasco Martins, por toda a amizade e suporte que me deram durante os cinco anos.

Por fim, um agradecimento especial ao Cristiano Sales, que esteve ao meu lado e que acreditou sempre que eu ia conseguir ser a melhor versão de mim mesma.

RESUMO

A Ranolazina é um fármaco utilizado na angina de peito estável, quando não há resposta à restante terapêutica. É uma molécula que não consta na Farmacopeia Portuguesa, pelo que não tem métodos de quantificação definidos e aprovados, e também não existem muitos trabalhos publicados visando a quantificação de Ranolazina em comprimidos. Assim, o objetivo desta dissertação será realizar estudos exploratórios visando o desenvolvimento de um método espectroscópico para a quantificação da Ranolazina em comprimidos Ranexa (750 mg). Para além da análise UV-vis em transmissão, da Ranolazina em solução metanólica, também foram estudados métodos de refletância difusa para a análise de amostras na forma de pó, na região espectral do UV-vis e no infravermelho. O desenvolvimento de métodos de análise sem solventes para a Ranolazina é muito importante, pois a sua solubilidade é reduzida na maioria dos solventes e nos que é solúvel estes apresentam alguma toxicidade. Os resultados obtidos, permitiram concluir que será possível obter facilmente um método de análise para a quantificação de Ranolazina em solução metanólica, por espectroscopia de absorção UV-vis em transmissão, partido do protocolo proposto. No que respeita aos procedimentos experimentais por refletância difusa utilizados para as amostras sólidas, tanto no UV-vis como no infravermelho, não foi possível obter curvas de calibração com significado analítico suficiente para uma avaliação completa dos métodos, contudo percebeu-se que existe um futuro promissor. As principais conclusões que se retiraram é que as gamas de trabalho tem que ser ajustadas assim como a técnica da preparação das amostras, sendo possível compreender as alterações necessárias num futuro trabalho. A diferença observada nos espectros refletância difusa da Ranolazina, em amostras obtidas por mistura mecânica e por adsorção, permitiu concluir que após adsorção na matriz sólida existe estabelecimento de interações entre o analito e a celulose, um dos componentes da matriz.

Termos Chave: Ranolazina, Quantificação, Espectroscopia, Refletância difusa, UV-vis, infravermelho

ABSTRACT

Ranolazine is a drug used instable angina pectoris, when there is no response to other therapy. Is a molecule that does not appear in the Portuguese Pharmacopoeia, so it does not have official and approved quantification methods, and also there are only few published studies related to Ranolazine quantification in tablets. Thus, the objective of this work will be to carry out exploratory studies aiming the development of a spectroscopic method for Ranolazine quantification in Ranexa tablets (750 mg). In addition to the transmission UV-vis analysis of Ranolazine in methanol solution, diffuse reflectance methods were also studied for the analysis of powder form samples, in the UV-vis and infrared spectral regions. The development of solvent-free methods for Ranolazine is very important, as its solubility is reduced in most solvents and it is soluble in solvents with some toxicity. The work results allowed to conclude that it will be possible to obtain an analysis method for Ranolazine quantification in methanol solution, by transmission UV-vis absorption spectroscopy, based on the proposed protocol. Regarding to the diffuse reflectance experimental procedures used for solid samples, both in UV-vis and infrared, it was not possible to obtain calibration curves with sufficient analytical meaning for a complete evaluation of the methods. The main conclusions that can be drawn are that the working ranges need to be adjusted as well as the technique of sample preparation. However, it was understood that it would be possible to achieve the proposed goal with some experimental protocol corrections. The difference observed in the diffuse reflectance spectra of Ranolazine in samples obtained by mechanical mixing and by adsorption, allowed us to conclude that after adsorption in the solid matrix, interactions between the analyte and cellulose, one of the components of the matrix, are established.

Key Terms: Ranolazine, Quantification, Spectroscopy, Diffuse reflectance, UV-vis, infrared

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	V
RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE TABELAS	XIV
LISTA DE ABREVIATURAS	XVIII
Introdução	1
1.1. Doenças Cardiovasculares.....	2
1.2. Angina de Peito	7
1.3. Ranolazina.....	11
1.3.1. <u>Indicação terapêutica e regime posológico</u>	11
1.3.2. <u>Propriedades farmacológicas e farmacodinâmicas</u>	13
1.3.3. <u>Propriedades farmacocinéticas</u>	15
1.4. Espectroscopia Aplicada a Amostras Sólidas	16
1.4.1. <u>Radiação eletromagnética e a análise espectroscópica</u>	17
1.4.2. <u>Análises espectroscópicas em refletância difusa</u>	21
2. Desenvolvimento dos Métodos	25
2.1. Materiais.....	25
2.2. Equipamento	25
2.3. Reagentes	27
2.4. Amostras	27
2.5. Procedimento Experimental	28
2.5.1. <u>Purificação da Ranolazina</u>	28
2.5.2. <u>Preparação dos padrões e amostras para análise em solução</u>	28
2.5.3. <u>Preparação dos padrões e amostras de misturas mecânicas</u>	28
2.5.4. <u>Preparação dos padrões por adsorção em matriz</u>	29
2.5.5. <u>Condições da análise espectrofotométrica</u>	30
3. Apresentação e Discussão de Resultados	31
3.1. Resultados da Recristalização da Ranolazina	35
3.2. Quantificação de Ranolazina em Solução	37
3.2.1. <u>Espectros de absorção UV-vis em transmissão</u>	37
3.2.2. <u>Curvas de calibração</u>	40
3.2.3. <u>Parâmetros principais do método de análise</u>	47
3.2.4. <u>Quantificação da Ranolazina em comprimidos Ranexa 750</u>	49
3.2.5. <u>Comparação do método desenvolvido com outros trabalhos publicados</u>	54

3.3.	Quantificação de Ranolazina em Amostras Sólidas por UV-Vis em Refletância Difusa (DRUV).....	56
3.3.1.	<u>Espectros de refletância difusa no UV-Vis</u>	56
3.3.2.	<u>Curvas de calibração</u>	60
3.4.	Quantificação de Ranolazina em Amostras Sólidas por Infravermelho em Refletância Difusa (DRIFT).....	70
3.4.1.	<u>Espectros de refletância difusa no infravermelho</u>	71
3.4.2.	<u>Curvas de calibração do método analítico do padrão externo</u>	74
3.4.3.	<u>Curvas de calibração do método analítico do padrão interno</u>	79
3.4.4.	<u>Quantificação da Ranolazina em comprimidos Ranexa 750</u>	83
4.	Trabalho Futuro.....	87
5.	Conclusões	90
	BIBLIOGRAFIA.....	95
	ANEXOS.....	106
	Anexo 1: Fichas de segurança dos solventes.....	107
	Anexo 2: SCORE	113
	Anexo 3 – Plano de preparação dos padrões e das amostras para a análise de Ranolazina	115
	Anexo 4: Repetibilidade do método.....	121
	Anexo 4: Equações utilizadas no método dos mínimos quadrados.....	123
	Anexo 5: Espectros de Ranolazina.....	124

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1: Distribuição do número de óbitos provocados pelos diferentes tipos de doenças cardiovascular. (género masculino). Fonte de dados: Global Atlas on Cardiovascular Diseases Prevention and Control.⁶ _____ 2
- Figura 2: Distribuição do número de óbitos provocados pelos diferentes tipos de doenças cardiovascular. (género Feminino). Fonte de dados: Global Atlas on Cardiovascular Diseases Prevention and Control.⁶ _____ 3
- Figura 3: Proporção de óbitos por doenças cardiovasculares, no ano de 2004, nas diferentes regiões da OMS. Fonte de dados: OMS - The global burden of disease 2004. Updat. World Heal.¹⁰ _____ 3
- Figura 4: Gráfico da evolução do número de óbitos devido a patologias do aparelho circulatório nos anos compreendidos entre 2012 e 2018, na população geral e apenas nos géneros feminino e masculino em relação ao total de óbitos. Fonte dos dados: Instituto Nacional de Estatística – Causas de Morte (do ano referente).¹⁴ _____ 4
- Figura 5: Esquema terapêutico para uma crise aguda de uma angina. Fonte de dados: "Montalescot, G. e Sechtem, U."²⁵ _____ 9
- Figura 6: Esquema terapêutico de prevenção de crises anginosas, medidas não-farmacológicas e farmacológicas. ARAs - Antagonistas do recetor da angiotensina II; IECAs - Inibidores da enzima de conversão da angiotensina. Fonte de dados: "Montalescot, G. e Sechtem, U."²⁵ _____ 10
- Figura 7: Aparência do miocárdio antes e depois da cirurgia de revascularização do miocárdio. Adaptado de: Medical Illustration Copyright © 2019 Nucleus Medical Media _____ 10
- Figura 8: Estrutura 2D e 3D da Ranolazina, a orientação espacial dos diferentes grupos da molécula foi obtida por minimização de energia com o programa Avogadro⁴⁸ ____ 11
- Figura 9: Estratégia terapêutica de ajuste de dose para a utilização de Ranolazina em adultos. Fonte de informação: European Medicines Agency - European Union.⁵² ____ 13
- Figura 10: Potenciais de ação nas diferentes fases de contração do miocárdio ao nível ventricular. Adaptado de: Robert M. Lester, Sabina Paglialunga, Ian A. Johnson:⁵⁶ _ 14
- Figura 11: Alteração a nível molecular nas diferentes regiões do espectro eletromagnético. Adaptado de: Douglas A. Skoog, Donald M. West, F. James Holler, Stanley R. Crouch.⁶⁸ _____ 18

- Figura 12: Representação esquemática da interação da radiação com a matéria no caso de ocorrer transmissão em ambos os estados físico das matéria, isto é, em soluções (do lado esquerdo) e no estado sólido (do lado direito). _____ 20
- Figura 13: Representação esquemática dos ângulos da radiação incidente e emergente na dispersão especular (à esquerda) e na dispersão difusa (à direita). _____ 21
- Figura 14: Representação esquemática (A) do funcionamento de uma esfera de integração e (B) do caminho percorrido pela radiação numa análise por refletância difusa em infravermelho. _____ 22
- Figura 15: (A) Espectrofotômetro de absorção UV-vis e (B) acessório para a análise em refletância difusa. _____ 26
- Figura 16: (A) Espectrofotômetro de infravermelho (FTIR) e (B) acessório para a análise em refletância difusa. _____ 26
- Figura 17: Espectros DRIFT da Ranolazina em comprimido Ranexa 750mg (linha azul), primeira recristalização (linha verde) e segunda recristalização (linha amarela), na gama espectral de 4000 e 50 cm^{-1} . _____ 35
- Figura 18: Espectros de absorção UV-vis da Ranolazina em metanol (190 e 400 nm), para uma gama de concentrações entre 4,0 e 48,0 ppm. _____ 38
- Figura 19: Pormenor do espectro de absorção UV-vis da Ranolazina em metanol, para as concentrações de 16,0 ppm (linha verde); 40,0 ppm (linha azul) e 120,0 ppm (linha amarela). _____ 39
- Figura 20: Espectro de absorção UV-vis da Ranolazina em metanol, para as concentrações de 16,0 - 480,0 ppm, na gama espectral de 250 a 300 nm. _____ 40
- Figura 21: Curva de calibração para a Ranolazina em metanol a 204,5 nm, para a gama de concentrações: (A-1) [0,00 – 520,21] ppm; (A-2) [0,00 – 48,02] ppm. (B) reta de calibração e(C) gráfico dos resíduos . _____ 41
- Figura 22: (A) Curva de calibração da Ranolazina em metanol a 228,0 nm na gama de concentrações [0,00 – 520,21] ppm, (B) reta de calibração e(C) gráfico dos resíduos. 42
- Figura 23: (A) Curva de calibração para a Ranolazina em metanol a 272,5 nm na gama de concentrações [0,00 – 520,21] ppm, (B) reta de calibração e (C) gráfico dos resíduos. _____ 43
- Figura 24: Espectros DRUV da Ranolazina em mistura mecânica com PROSOLV[®], para as concentrações de 0,0 ppm (linha cinzenta), 50,63 ppm (linha laranja), 63,21 ppm (linha amarela) e 108,73 ppm (linha azul), na gama espectral de 200 a 300 nm. ____ 57

- Figura 25: Espectros DRUV da Ranolazina adsorvida em matriz de PROSOLV, para as concentrações de 0,0 ppm (linha cinzenta), 1399,2 ppm (linha laranja), 1801,8 ppm (linha azul), 1999,6 ppm (linha verde) e 2401,4 ppm (linha amarela) na gama espectral de 200 a 300 nm. _____ 58
- Figura 26: Espectro DRUV (gama de 250 a 290 nm) da Ranolazina adsorvida em matriz de PROSOLV, para as concentrações de 0,0 ppm (linha cinzenta), 1399,2 ppm (linha laranja), 1801,8 ppm (linha azul), 1999,6 ppm (linha verde) e 2401,4 ppm (linha amarela) na gama espectral de 255 a 290 nm. _____ 59
- Figura 27: (A) Curva de calibração da Ranolazina em misturas mecânicas, para a análise a 240 nm para a gama de concentrações [50,63 e 108,73] ppm e (B) gráfico dos resíduos resultantes do ajuste a uma reta. _____ 63
- Figura 28: (A) Curva de calibração da Ranolazina em misturas mecânicas, para a análise a 274 nm para a gama de concentrações [50,63 e 108,73] ppm e (B) gráfico dos resíduos resultantes do ajuste a uma reta. _____ 64
- Figura 29: (A) Curva de calibração da Ranolazina em misturas mecânicas, para a análise a 283 nm para a gama de concentrações [50,63 e 108,73] ppm e (B) gráfico dos resíduos resultantes do ajuste a uma reta. _____ 65
- Figura 30: (A) Curva de calibração da Ranolazina adsorvida em matriz de PROSOLV, para a análise a 225 nm para a gama de concentrações [400,4 e 1801,8] ppm e (B) gráfico dos resíduos resultantes do ajuste a uma reta. _____ 67
- Figura 31: (A) Curva de calibração da Ranolazina adsorvida em matriz de PROSOLV, para a análise a 275 nm para a gama de concentrações [1000,6 e 2401,4] ppm e (B) gráfico dos resíduos resultantes do ajuste a uma reta. _____ 67
- Figura 32: (A) Curva de calibração da Ranolazina adsorvida em matriz de PROSOLV, para a análise a 281 nm para a gama de concentrações [400,4 e 2401,4] ppm e (B) gráfico dos resíduos resultantes do ajuste a uma reta. _____ 67
- Figura 33: (A) Curva de calibração da Ranolazina adsorvida em matriz de PROSOLV, para a análise a 225 nm para a gama de concentrações [1998,6 e 8000,8] ppm e (B) gráfico dos resíduos resultantes do ajuste a uma reta. _____ 68
- Figura 34: (A) Curva de calibração da Ranolazina adsorvida em matriz de PROSOLV, para a análise a 275 nm para a gama de concentrações [1998,6 e 8000,8] ppm e (B) gráfico dos resíduos resultantes do ajuste a uma reta. _____ 68

- Figura 35: (A) Curva de calibração da Ranolazina adsorvida em matriz de PROSOLV, para a análise a 281 nm para a gama de concentrações [1998,6 e 8000,8] ppm e (B) gráfico dos resíduos resultantes do ajuste a uma reta. _____ 68
- Figura 36 - Espectros DRIFT da Ranolazina para o método analítico do padrão externo, para as concentrações de 64,1 ppm (linha azul), 120,7 ppm (linha laranja), 146,4 ppm (linha cinzenta) e 169,4 ppm (linha amarela), na gama espectral de 4000 e 500 cm^{-1} . 72
- Figura 37 - Espectros DRIFT da Ranolazina para o método analítico do padrão interno, para as concentrações de 0,0 ppm (linha cinzenta) e 132,2 ppm (linha amarela), na gama espectral de 4000 e 500 cm^{-1} . _____ 73
- Figura 38: Curvas de calibração da Ranolazina por DRIFT, pelo método analítico do padrão externo usando a área integrada 806,1 – 721,8 cm^{-1} (linha amarelo), 1559,0 – 1408,4 cm^{-1} (linha cinzenta), 1766,7 – 1625,9 cm^{-1} (linha laranja) e – cm^{-1} (linha azul) na gama espectral de 4000 e 500 cm^{-1} . _____ 74
- Figura 39: (A) Curva de calibração da Ranolazina por DRIFT, pelo método analítico do padrão externo usando a área integrada entre 3708,8 – 2606,7 cm^{-1} para a gama de concentrações [64,03 e 146,36] ppm e (B) gráfico dos resíduos resultantes do ajuste. 74
- Figura 40: (A) Curva de calibração da Ranolazina por DRIFT, pelo método analítico do padrão externo usando a área integrada entre 1766,7 – 1625,9 cm^{-1} para a gama de concentrações [64,03 e 146,36] ppm e (B) gráfico dos resíduos resultantes do ajuste. 75
- Figura 41: (A) Curva de calibração da Ranolazina por DRIFT, pelo método analítico do padrão externo usando a área integrada entre 1559,0 – 1408,4 cm^{-1} para a gama de concentrações [64,03 e 146,36] ppm e (B) gráfico dos resíduos resultantes do ajuste. 75
- Figura 42: (A) Curva de calibração da Ranolazina por DRIFT, pelo método analítico do padrão externo usando a área integrada entre 806,1 – 721,8 cm^{-1} para a gama de concentrações [64,03 e 146,36] ppm e (B) gráfico dos resíduos resultantes do ajuste. 75
- Figura 43: Curvas de calibração da Ranolazina por DRIFT, pelo método analítico do padrão interno usando a área integrada 806,1 – 721,8 cm^{-1} (linha amarelo), 1559,0 – 1408,4 cm^{-1} (linha cinzenta), 1766,7 – 1625,9 cm^{-1} (linha laranja) e – cm^{-1} (linha azul) na gama espectral de 4000 e 500 cm^{-1} . _____ 80
- Figura 44: (A) Curva de calibração da Ranolazina por DRIFT pelo método analítico do padrão interno, para a análise da área entre 3708,8 – 2606,7 cm^{-1} para a gama de concentrações [109,1 - 196,5] ppm e (B) gráfico dos resíduos resultantes do ajuste a uma reta. _____ 82

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Resumo da incidência de utilização de Ranexa, em número de embalagens vendidas, nos anos de 2015, 2016, 2017,2018 e 2019 para as três dosagens disponíveis nas farmácias portuguesas. ⁵³	12
Tabela 2: Reações adversas, interações farmacológicas e grupos populacionais em que o uso de Ranolazina está contraindicado. Fonte: European Medicines Agency - European Union ⁵²	13
Tabela 3: Resumo das propriedades Farmacocinéticas da Ranolazina. ^{42,63-65}	16
Tabela 4: Posição das bandas mais intensas observados no espectro DRIFT da Ranolazina e atribuição aos correspondentes modos vibracionais. ^{102,103} . ν - alongação; δ - deformação no plano.	36
Tabela 5: Equações das retas (para um grau de confiança de 95%) obtidas aos diferentes comprimentos de onda de análise da Ranolazina em solução utilizando como solvente o metanol.	44
Tabela 6: Intervalo de validação de outliers (Teste-t) de cada padrão a para a análise 204,5 nm da Ranolazina em solução de metanol.....	44
Tabela 7: Intervalo de validação de outliers (Teste-t) de cada padrão a para a análise 228,0 nm da Ranolazina em solução de metanol.....	45
Tabela 8: Intervalo de validação de outliers (Teste-t) de cada padrão a para a análise 272,5 nm da Ranolazina em solução de metanol.....	45
Tabela 9: Valores do teste de homogeneidade de variância para a análise da Ranolazina em metanol aos comprimentos de onda de 204,5; 228,0 e 272,5 nm.....	46
Tabela 10: Parâmetros do método aos diferentes comprimentos de onda para a análise da Ranolazina em solução de metanol.....	47
Tabela 11: Coeficiente de variação do sinal dos padrões, em unidades de absorvência, para a análise da Ranolazina em solução de metanol.....	48
Tabela 12: Concentração de Ranolazina nas soluções de trabalho, para um grau de confiança de 95%, utilizando como solvente metanol e obtidas por dissolução de comprimidos Ranexa 750. (*) Valores de concentração sem significado analítico por estarem fora da gama de trabalho.	49
Tabela 13: Massa média de Ranolazina por comprimido, coeficiente de variação (em %) da massa obtida e respetivo erro absoluto associado.....	51

Tabela 14: Dados espectroscópicos das amostras fortificadas e respectivas concentrações, da análise da Ranolazina em comprimidos Ranexa 750 utilizando como solvente metanol (*) Valores de concentração sem significado analítico por estarem fora da gama de trabalho.	52
Tabela 15: Percentagens de recuperação obtidas de cada amostra fortificada e média dos valores, %CV associada a cada padrão.	53
Tabela 16: Desvio padrão e coeficiente de variação de $F(R_{\infty})$, dos padrões para a análise da Ranolazina em misturas mecânicas.	61
Tabela 17: Desvio padrão e coeficiente de variação de $F(R_{\infty})$, dos padrões de concentração mais baixas para a análise da Ranolazina adsorvida em matriz de PROSOLV.	61
Tabela 18: Desvio padrão e coeficiente de variação de $F(R_{\infty})$, dos padrões de concentração mais altas para a análise da Ranolazina adsorvida em matriz de PROSOLV.	62
Tabela 19: Equações das retas (para um grau de confiança de 95%) obtidas aos diferentes comprimentos de onda de análise da Ranolazina em misturas mecânicas utilizando o PROSOLV® como matriz.	65
Tabela 20: Intervalo de validação de outliers (Teste-t) de cada padrão para a análise a 240 nm da Ranolazina em misturas mecânicas.	65
Tabela 21: Intervalo de validação de outliers (Teste-t) de cada padrão para a análise a 277 nm da Ranolazina em misturas mecânicas.	66
Tabela 22: Intervalo de validação de outliers (Teste-t) de cada padrão para a análise a 283 nm da Ranolazina em misturas mecânicas.	66
Tabela 23: Equações de ajuste (para um grau de confiança de 95%) obtidas aos diferentes comprimentos de onda de análise e diferentes gamas de concentração da Ranolazina adsorvida em matriz de PROSOLV.	69
Tabela 24: Intervalo de validação de outliers (Teste-t) de cada padrão para a análise a 225, 275 e 281 nm da Ranolazina adsorvida em matriz de PROSOLV, para a gama de concentrações mais baixas.	69
Tabela 25: Intervalo de validação de outliers (Teste-t) de cada padrão para a análise a 225, 275 e 281 nm da Ranolazina adsorvida em matriz de PROSOLV, para a gama de concentrações mais altas.	70

Tabela 26: Equações de ajuste (para um grau de confiança de 95%) obtidas às diferentes áreas integradas na análise da Ranolazina por DRIFT pelo método analítico do padrão externo.	76
Tabela 27: Intervalo de validação de outliers (Teste-t) para a análise da área integrada 3708,8 – 2606,7 cm ⁻¹ da Ranolazina por DRIFT pelo método analítico do padrão externo.	77
Tabela 28: Intervalo de validação de outliers (Teste-t) para a análise da área integrada 1766,7 – 1625,9 cm ⁻¹ da Ranolazina por DRIFT pelo método analítico do padrão externo.	77
Tabela 29: Intervalo de validação de outliers (Teste-t) para a análise da área integrada 1559,0 – 1408,4 cm ⁻¹ da Ranolazina por DRIFT pelo método analítico do padrão externo.	77
Tabela 30: Intervalo de validação de outliers (Teste-t) para a análise da área integrada 806,1 – 721,8 cm ⁻¹ da Ranolazina por DRIFT pelo método analítico do padrão externo.	77
Tabela 31: Desvio padrão e coeficiente de variação de Sinal para as áreas integradas indicadas, na análise da Ranolazina por DRIFT pelo método analítico do padrão externo.	78
Tabela 32: Parâmetros do método para a análise da Ranolazina por DRIFT pelo método analítico do padrão externo.....	79
Tabela 33: Desvio padrão e coeficiente de variação de Sinal, dos padrões para a análise da Ranolazina por DRIFT pelo método analítico do padrão interno.....	81
Tabela 34: Equação de ajuste (para um grau de confiança de 95%) obtida da análise da Ranolazina por DRIFT pelo método analítico do padrão interno.	82
Tabela 35: Intervalo de validação de outliers (Teste-t) de cada padrão para a análise a 3708,8 – 2606,7 cm ⁻¹ da Ranolazina em misturas mecânicas, usando como matriz KBr+ K ₃ [Fe(CN) ₆]......	83
Tabela 36: Parâmetros do método para a análise da Ranolazina por DRIFT pelo método analítico do padrão interno.	83
Tabela 37: Concentração de Ranolazina nas misturas de trabalho dos comprimidos Ranexa 750, obtidas por DRIFT e pelo método analítico do padrão externo.	84
Tabela 38: Massa média de Ranolazina por comprimido Ranexa 750, coeficiente de variação (em %) da massa obtida e respetivo erro absoluto associado, obtidos por DRIFT e pelo método analítico do padrão externo.	84

Tabela 39: Concentração de Ranolazina nas amostras fortificadas de comprimidos Ranexa 750, obtidas por DRIFT e pelo método analítico do padrão externo. (*) Valores de concentração sem significado analítico por estarem fora da gama de trabalho.....	85
Tabela 40: Concentração de Ranolazina nas amostras fortificadas e percentagem de recuperação para os comprimidos Ranexa 750, obtidas por DRIFT e pelo método analítico do padrão externo.....	86
Tabela A3 - 541: Preparação dos padrões, amostras e ensaios de recuperação em solução para um gama de concentrações mais altas.....	116
Tabela A3 - 542: Preparação dos padrões, amostras e ensaios de recuperação de misturas mecânicas para o método de padrão externo para a análise por DRIFT.....	117
Tabela A3 - 943: Preparação dos padrões, amostras e ensaios de recuperação de misturas mecânicas para o método de padrão externo para a análise por DRUV.....	119
Tabela A3 - 1144: Preparação dos padrões por adsorção para o método de padrão externo para a análise por DRUV.....	120
Tabela A3 - 1345: Preparação das Soluções Stock para a preparação dos padrões por adsorção para a análise por DRUV.	120
Tabela A4 - 146: Repetibilidade do sinal medido dos padrões para a análise da Ranolazina em metanol.	121

LISTA DE ABREVIATURAS

ARAs - Antagonista do recetor de angiotensina II

ATP - Adenosina trifosfato

CL - Clearance

C_{max} - Concentração máxima

COVID-19 - Doença respiratória causa pelo Coronavirus 2019 (do inglês Coronavirus Disease 2019)

C_{ss} - Concentração no estado estacionário

CV - Coeficiente de variação

DGS - Direção-Geral da Saúde

DRIFT - Refletância difusa por infravermelho com transformada de Fourier

DRUV - Refletância difusa no ultravioleta-visível

ECG - Electrocardiograma

EMA - Agência Europeia do Medicamento

F(R_∞) - Função de remissão

FDA - Food and Drug Administration

FTIR - Fourier-transform infrared

GC - Gas Chromatography

GD - Gama dinâmica

HDL - Lipoproteína de alta densidade (em inglês: High Density Lipoprotein)

HPLC - High-Pressure Liquid Chromatography

IECAs - Inibidores da enzima de conversão da angiotensina

INFARMED, I.P. - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde

IV - Infravermelho

k - Coeficiente de absorção

K_a - Constante de absorção

K-M - Kubelka-Munk

LC - Liquid Chromatography

LD - Limite de detecção

LL - limite de linearidade

LQ - Limite de quantificação

OMS - Organização Mundial de Saúde

R_∞ - Intensidade da radiação dispersa por refletância difusa

RT-HPLC - Reverse Phase High-Pressure Liquid Chromatography

SARS-CoV-2 - Síndrome respiratória aguda grave por coronavírus 2(em inglês: Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)

t_{1/2} - Tempo de semi vida

Teste-F - Teste de homogeneidade de variância

t_{max} - Tempo em que é atingida a concentração máxima

Uv-vis - Ultravioleta-visível

V_d - Volume de distribuição

Introdução

Atualmente mais de 80% dos fármacos estão no estado sólido por diversos motivos, pelo que o uso de técnicas e métodos de análises desenvolvidos para amostras no estado sólido é cada vez mais relevante na área de análise e controlo de qualidade de fármacos.¹ Por outro lado, protocolos de análise que envolvam a utilização de solventes, quer estes sejam orgânicos ou inorgânicos, podem levar a outro problema. Alguns solventes podem ser tóxicos para os seres vivos, sendo por isso ambientalmente perigosos se o seu descarte ou recuperação não for feita de modo adequado.² Contudo, quer a sua recuperação quer a sua eliminação controlada requerem, na maioria dos casos, consumo de energia, o que pode aumentar significativamente os custos ambientais. Portanto, o desenvolvimento de métodos de análise sem solventes que possam ser utilizados no controle de qualidade é cada vez mais premente.

A solubilidade dos compostos pode também ser um obstáculo à análise, pelo que explorar a possibilidade de efetuar a análise destes no estado sólido é especialmente importante. No caso da Ranolazina, que será objeto de estudo neste trabalho, apresenta solubilidade em poucos solventes, como o metanol e o diclorometano, e mesmo nestes solventes é um composto de difícil dissolução. No entanto a literatura existente no que diz respeito à quantificação de Ranolazina no estado sólido é reduzida e nesse sentido o objetivo deste estudo será explorar a possibilidade de desenvolver um método de análise para a sua quantificação no estado sólido.

O trabalho será desenvolvido comparando a análise espectroscópica de amostras no estado sólido, obtidas por mistura mecânica ou adsorção em matriz sólida, com a análise em solução, utilizando o metanol como solvente. Excluiu-se a possibilidade de utilizar o diclorometano, solvente no qual a Ranolazina também apresenta uma boa solubilidade, devido aos problemas de toxicidade que este solvente apresenta, no Anexo 1 estão as fichas de dados de segurança de ambos os solventes.

A molécula de Ranolazina foi descrita pela primeira vez em 1996³ e associada à piperazina, como sendo um derivado desta. Devido à sua conformação estável, esta foi incorporada em alguns compostos que revelaram ter propriedades medicinais, em particular para problemas cardiovasculares por apresentar atividade antianginosa.⁴

O enquadramento do trabalho, que será o objetivo desta secção introdutória, focará não só as propriedades físico-químicas e farmacológicas mais relevantes da molécula, mas tendo em conta as propriedades acima descritas da Ranolazina, abordará também alguns aspetos relacionados com as doenças cardiovasculares e a angina de peito de modo a mostrar a importância que este tipo de fármacos têm no contexto da saúde humana.

1.1. Doenças Cardiovasculares

Doenças cardiovasculares são disfunções fisiológicas que afetam todo o sistema circulatório, ou seja, coração e vasos sanguíneos. Um dos fatores que mais desencadeia este tipo de patologia é aterosclerose, no entanto existem inúmeros fatores de risco que contribuem para o desenvolvimento das doenças cardiovasculares.⁵

As doenças cardiovasculares são um conjunto de complicações ao nível do coração e vasos sanguíneos que podem ser divididas em vários tipos. Aquelas que são causadas por aterosclerose como é as cardiopatias isquémicas, doenças cerebrovasculares (acidente vascular cerebral) e as doenças da aorta e artérias.⁶ Paralelamente existe outras doenças cardiovasculares, nomeadamente as doenças cardíacas congénitas e reumáticas, cardiopatias e arritmias cardíacas, angina de peito, síndrome coronária aguda, aneurisma, insuficiência cardíaca, doença arterial periférica, hipertensão, valvulopatias, trombose venosa e embolismo pulmonar.^{7,8}

De uma forma geral a taxa de mortalidade de cada uma das patologias é semelhante tanto nos homens como nas mulheres, sendo que as que provocam maior número de óbitos são cardiopatias isquémicas e doenças cerebrovasculares tal como retratado na Figura 1 e 2.⁶

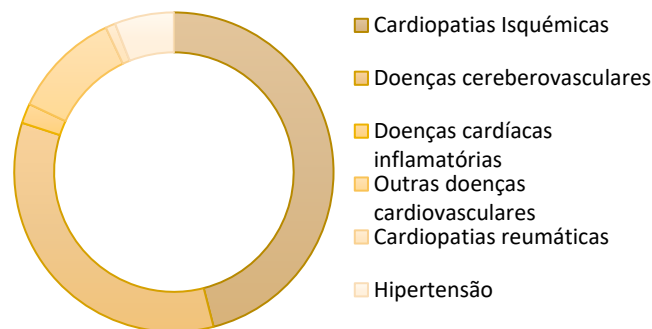


Figura 1: Distribuição do número de óbitos provocados pelos diferentes tipos de doenças cardiovasculares. (género masculino). Fonte de dados: Global Atlas on Cardiovascular Diseases Prevention and Control.⁶

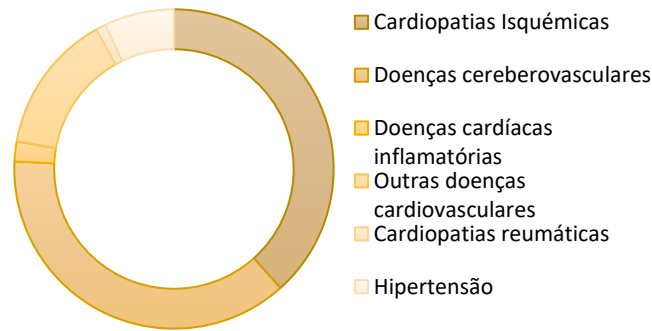


Figura 2: Distribuição do número de óbitos provocados pelos diferentes tipos de doenças cardiovascular. (género Feminino). Fonte de dados: Global Atlas on Cardiovascular Diseases Prevention and Control.⁶

A percentagem da população que tem um diagnóstico de doenças cardiovascular é cada vez maior nos últimos anos, no entanto, a percentagem de óbitos por essa causa tem vindo a diminuir nas últimas décadas, ainda que continue a ser a principal causa de mortalidade em Portugal. Esta evolução deve-se ao facto de os tratamentos serem cada vez mais eficazes e haver novas alternativas. Neste sentido é importante que a investigação e investimento em novas formas terapêuticas sejam cada vez mais e maiores.⁹

Em 2004 a Organização Mundial de Saúde (OMS) desenvolveu um estudo global em que relaciona o número de óbitos por patologia, géneros e regiões. O estudo mostra que, 17073 óbitos, por doenças cardiovasculares, representando 29,0% dos óbitos totais, sendo que desses 8338 são Homens e 8735 Mulheres, retratando 26,8% e 31,5% de óbitos dessa população, respetivamente. Na Figura 3 estão representadas as percentagens de óbitos nesse ano pelas regiões da OMS.¹⁰

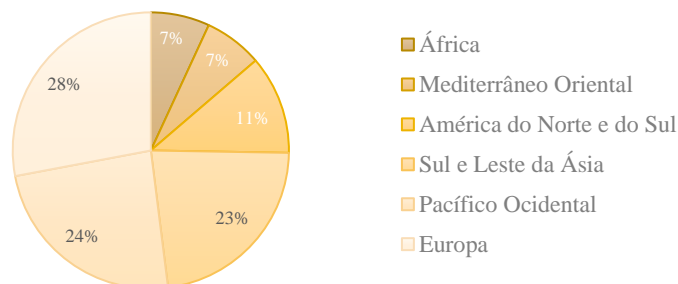


Figura 3: Proporção de óbitos por doenças cardiovasculares, no ano de 2004, nas diferentes regiões da OMS. Fonte de dados: OMS - The global burden of disease 2004. Updat. World Heal.¹⁰

De acordo com a Direção-Geral da Saúde (DGS), em 2010, 36,0% das mortes na Europa são referentes a doenças cardiovasculares.⁹ A OMS refere que em 2016, 17,9 milhões é o número de óbitos por doenças cardiovasculares em todo o mundo, representando assim uma percentagem de 31,0% de todos os óbitos no Mundo.¹¹

Na Figura 4, relativamente a Portugal, é apresentada a evolução do número de óbitos devido a patologias do aparelho circulatório, em relação ao total de óbitos, entre 2012 e 2018, na população geral e particularizando para o género feminino e masculino. No ano de 2012, 30,4% da mortalidade da população portuguesa era devida a doenças cardiovasculares, sendo mais predominante no género feminino do que no sexo masculino (respetivamente 34,7 e 26,3%), representado assim a maior causa de óbitos em Portugal, nesse ano.¹² Em 2018 a percentagem de óbitos causados por patologias do aparelho circulatório era de 29,0%, embora se observe uma diminuição, esta continua a ser a principal causa de morte em Portugal.¹³

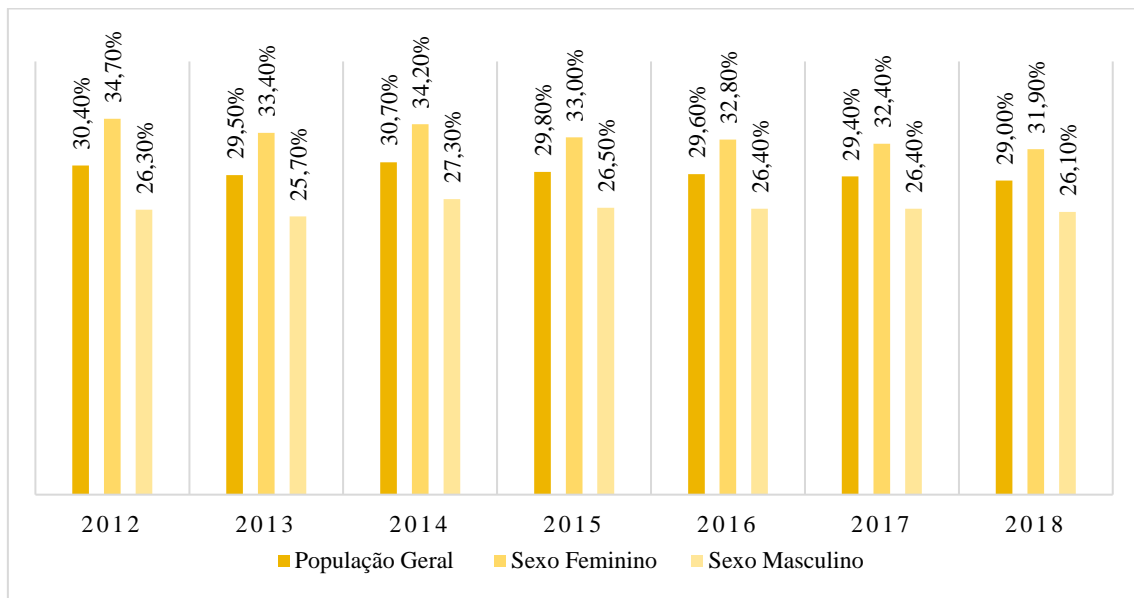


Figura 4: Gráfico da evolução do número de óbitos devido a patologias do aparelho circulatório nos anos compreendidos entre 2012 e 2018, na população geral e apenas nos géneros feminino e masculino em relação ao total de óbitos. Fonte dos dados: Instituto Nacional de Estatística – Causas de Morte (do ano referente).¹⁴

Existem vários fatores de risco cardiovascular que podem ser divididos em dois tipos: modificáveis e não modificáveis. Os fatores de risco cardiovasculares são predisposições que cada indivíduo possui e que fazem com que o risco cardiovascular seja menor ou maior. Alteração de hábitos de vida pode levar à eliminação ou atenuação de alguns fatores de risco, evitando que alguns eventos cardiovasculares ocorram, por esta razão a avaliação e controlo do risco cardiovascular torna-se relevante.⁵

De acordo com a DGS, considera-se que os fatores de risco não modificáveis são a idade, género e genética e que os fatores modificáveis são: diabetes, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hipertensão arterial, obesidade, hábitos tabágicos, alcoolismo, sedentarismo.⁵

Os fatores de risco modificáveis acabam por estar relacionados entre si, no caso da obesidade existem comorbidades como diabetes e hipertrigliceridemia que estão frequentemente associadas a hipercolesterolemia. Esta caracteriza-se pela acumulação de colesterol nas paredes das artérias, resultando em aterosclerose que conduz ao aparecimento de grande parte das doenças cardiovasculares. Os hábitos tabágicos e de alcoolismo provocam inúmeras agressões ao organismo, que resultam em lesões nos órgãos, entre as quais a alteração na elasticidade das paredes das artérias que perdem elasticidade. À semelhança do que acontece quando a pressão com que o sangue circula nos vasos sanguíneos é muito elevada, esta perda de elasticidade faz com que surjam algumas doenças cardiovasculares.⁵

O risco cardiovascular é uma medida da probabilidade de um indivíduo desenvolver um evento cardiovascular num dado período de tempo. No seu cálculo utiliza os vários fatores de risco (modificáveis e não modificáveis) e relaciona-os de forma a perceber qual a probabilidade de ocorrer esse acontecimento. Esta probabilidade pode ser utilizada em medicina de diferentes modos e tem como principal objetivo estimular a mudança no estilo de vida da pessoa de forma a minimizar alguns dos fatores de risco modificáveis, diminuindo assim a probabilidade de se desenvolver uma doença cardiovascular.¹⁵

Foram desenvolvidos vários sistemas de avaliação, de forma a calcular o risco cardiovascular, entre eles Framingham, SCORE, ASSIGN, Q-RISK, PROCAM, WHO/ISH, Reynolds Risk Score, CUORE, Arriba e Globorisk.^{16,17} Sendo o sistema mais utilizado o SCORE que vai de encontro às *guidelines* europeias para a prevenção clínica de doenças cardiovasculares.¹⁶

O método SCORE foi desenvolvido pela European Society of Cardiology em 2003 e utiliza uma base de dados de doze estudos prospetivos de onze países diferentes da europa, estes estudos foram realizados no espaço de tempo entre 1972 e 1991, com uma amostra de 117098 homens e 88080 mulheres. Esta ferramenta permite calcular a probabilidade de desenvolver um evento cardiovascular nos dez anos seguintes,

relacionando vários fatores de riscos como género, idade (sendo que apenas abrange indivíduos que compreendam uma idade entre 40 e 65 anos), colesterol total ou o rácio colesterol total/HDL*, hábitos tabágicos e pressão arterial sistólica.¹⁸ Contudo há países que pelos seus hábitos de vida tem uma maior propensão para o desenvolvimento de eventos cardiovasculares do que outros, sendo assim foi também feita essa divisão em tabelas de dupla entrada para países que tenham um risco aumentado (Tabela A2 -1 do Anexo 2) e um risco diminuído (Tabela A2 - 2 do Anexo 2) para o desenvolvimento desses eventos. Existem quatro categorias em que o risco cardiovascular se divide, são elas, baixo (SCORE <1%), moderado (SCORE ≥1% e <5%), alto (SCORE ≥5% e <10%) e muito alto (SCORE ≥10%) e consoante a categoria em que se encontra as medidas a adotar variam. Se as pessoas tiverem certas patologias crónicas, o risco cardiovascular aumenta pelo que também foram divididas de acordo com o grau de gravidade pelas categorias anteriores (Tabela A2 - 3 do Anexo 2), e com base nestas categorias são tomadas medidas adequadas a cada grau de severidade, ou seja, permitindo-nos perceber qual a melhor abordagem a ser feita de forma a diminuir o SCORE.¹⁶

Em março de 2020, foi declarada pela OMS uma pandemia causada pelo vírus SARS-CoV-2, este afetou milhões de pessoas provocando milhares de mortes. No dia 8 de setembro de 2020, a nível mundial no site da OMS eram registados mais de 27,5 milhões de casos e mais de 890 mil óbitos devido ao vírus.

Nos óbitos registados, verificou-se que muitas das pessoas apresentavam algum tipo de doença cardiovascular.¹⁹ Nos Estados Unidos, entre 12 e 18 de Fevereiro, um estudo com uma amostra de 74439 pacientes, mostrou que cerca 647 pessoas (9%) com infeções pulmonares tinham simultaneamente algum tipo de doença cardiovascular, sendo que dessas 647 pessoas, 36,9% não estavam hospitalizadas, 37,4% hospitalizadas sem cuidados intensivos, 20,4% internadas nos cuidados intensivos e 5,3% não se tinha conhecimento acerca do estado hospitalar.²⁰ Em Wuhan na China, local onde teve início o surto, foi também feito um estudo (até ao dia 24 de Março de 2020) em 138 pacientes internados diagnosticados com pneumonia grave causada pelo SARS-CoV-2, e concluiu-se que a taxa de mortalidade à data era superior para alguns grupos de risco, entre eles pacientes com doenças cardiovasculares, em que a taxa de mortalidade desses

* lipoproteína de alta densidade (em inglês: *High Density Lipoprotein* - HDL)

pacientes foi estimada em 10,5%, superior à taxa de mortalidade em pacientes com uma doença respiratória grave subjacente (6,3%).²¹ Na COVID-19, a existência de doença cardiovascular é um fator que pode conduzir ao agravamento da infecção precocemente e complicações a longo prazo, pelo que o acompanhamento e monitorização destes pacientes é muito importante.²²

1.2. Angina de Peito

A angina de peito caracteriza-se por dor forte ou sensação de pressão no peito ou na zona do esterno que dura alguns minutos e pode, em alguns casos, não ser considerada como uma doença mas como um sintoma de doença.²³ Existem várias formas de angina e cada uma delas tem características distintas: (1) angina de peito estável, a mais comum; (2) angina instável, ocorre geralmente em repouso e por redução do fluxo sanguíneo devido ao facto das artérias serem mais estreitas; (3) angina variante/Prinzmetal's, pouco comum, é uma variante da angina instável e causada por um espasmo nas artérias coronárias; e (4) angina microvascular, que geralmente é um sintoma da doença cardiovascular coronária.²⁴

A angina de peito, mais frequentemente designada de *Angina Pectoris*, pode ocorrer espontaneamente e os fatores que podem desencadear um episódio anginoso são o exercício físico, a emoção e o stress, podendo ainda ser um sintoma de outras doenças cardiovasculares, como é o caso da doença cardíaca coronária.²⁵ Este tipo de manifestação ocorre quando o sangue que chega ao coração não é suficiente para transportar o oxigénio necessário ao esforço deste, levando à hipóxia o que provoca isquemia e conseqüentemente dor. Geralmente a dor é localizada no peito, na zona do esterno, no entanto é facilmente difundida por outras zonas como os ombros, braços, pescoço, mandíbulas ou costas.²⁶ Neste tipo de angina de peito, é mais recorrente as crises acontecerem no período da manhã.²⁷

Uma vez que a angina de peito não é considerada uma patologia, mas sim um sintoma ou um síndrome associado a outras patologias cardiovasculares, o seu diagnóstico é bastante subjetivo, sendo feito essencialmente com base nos relatos dos episódios e por esta razão o diagnóstico torna-se dúbio e muito dependente do julgamento clínico. Deste modo, a epidemiologia associada torna-se complicada de analisar sendo bastante variável de estudo para estudo. Alguns estudos populacionais revelam que a idade é um fator bastante preponderante. Em 2012 verificou-se que as

mulheres entre os 45 e 64 anos apresentavam uma prevalência de 5 a 7% e de 4 a 7% para a população masculina, enquanto que entre os 65 e 84 anos a prevalência era de 10 a 12% para as mulheres, e de 12 a 14% para os homens.²⁸ No entanto, existem formas de diagnóstico que não têm por base apenas a descrição dos episódios que ocorreram. Por exemplo, nas crises desencadeadas pelo esforço, podem ser realizadas provas de esforço para tentar provocar um crise e monitorizá-la através de um eletrocardiograma (ECG). Contudo nem todos os ataques são provocados pelo esforço físico e por isso nessas provas de esforço é possível não se observar nenhuma crise.²⁹ Assim, para colmatar essa lacuna, em ocasiões que se justifiquem, pode ser realizado um eletrocardiograma em ambulatório de forma a conseguir uma avaliação em contexto mais próximo do quotidiano,^{27,30} mas mesmo nestas condições é possível que durante o período do exame não decorra nenhuma crise, sobretudo se as crises não acontecerem de forma recorrente. É importante referir que nem sempre as alterações observadas num eletrocardiograma estão associadas à angina de peito, podendo estas ser devidas a outras complicações cardiovasculares.³¹

A principal causa de angina de peito é a doença arterial coronária, onde ocorre a formação de placas ateroscleróticas nos vasos sanguíneos, fazendo com que estes se tornem mais finos e dificultando o fluxo sanguíneo, isto quando se encontra num estado avançado da doença, enquanto no início da formação das placas ateroscleróticas, estas podem causar também isquemia caso se soltem e entrem na corrente sanguínea. A isquemia miocárdica tem várias causas, uma delas devida a espasmos das artérias coronárias, os quais resultam numa diminuição do aporte de oxigénio ao miocárdio, outra contribuição pode vir dos microvasos que existem à superfície do miocárdio que na doença arterial coronária podem também ter alguma disfunção. Existem outras causas em que o aporte de oxigénio ao músculo cardíaco se revela insuficiente, como é o caso da cardiomiopatia hipertrófica, valvulopatias e estenose aórtica.³²

1.1.1. Tratamento de angina de peito

No tratamento da angina de peito, podem-se utilizar duas abordagens, uma no efeito preventivo e outra nos ataques agudos.²⁵ Na prevenção das crises de isquemia, são usados antiagregantes plaquetários, tais como ácido acetilsalicílico numa dose de 75-100 mg/dia³³ e inibidores dos recetores P2Y₁₂³⁴ de forma a diminuir a formação de trombos coronários. No caso do síndrome coronário agudo é frequente fazer-se terapia dupla de antiagregantes plaquetários, combinação mais comum é tienopiridina e ácido

acetilsalicílico.³⁵ A estratégia terapêutica adotada para os ataques agudos é ajustada tendo em conta outras condições fisiológicas como as comorbidades pré-existentes e interações medicamentosas. As classes de fármacos utilizadas são, nitratos de curta e longa duração³⁶, betabloqueadores³⁷, bloqueadores dos canais de cálcio³⁸ e outros fármacos antianginosos como Ivabradina³⁹, Nicorandilo⁴⁰, Trimetazidina⁴¹, Ranolazina⁴², Alopurinol⁴³.

O tratamento é obviamente adaptado a cada caso, sendo não só necessário assegurar que os fármacos escolhidos atuem no alívio da angina, mas também que atuem na minimização dos eventos isquémicos, isto é, que atuem com o objetivo de solucionar a origem do problema e não só a sintomatologia (como é o caso da Ranolazina). Contudo, existem outros fármacos, por exemplo os vasodilatadores, que têm como objetivo, corrigir a condição pré-existente, ou seja, melhorar o prognóstico, minimizando os episódios isquémicos que ocorrem. A estratégia terapêutica, representada na Figura 5 revela que a associação entre nitratos de curta ação com betabloqueadores ou bloqueadores dos canais de cálcio é a melhor opção no controlo dos sinais e sintomas. No entanto, caso não se consiga controlar os sintomas é necessário substituir por Diidropiridina, ou associar um betabloqueador com Diidropiridina, sendo que a associação de betabloqueadores com bloqueadores de canais de cálcio não é aconselhada. Se os objetivos terapêuticos não forem atingidos com as opções acima descritas ou existam contraindicações ou intolerâncias das mesmas, existem outros medicamentos antianginosos que podem ser utilizados em associação ou substituição.

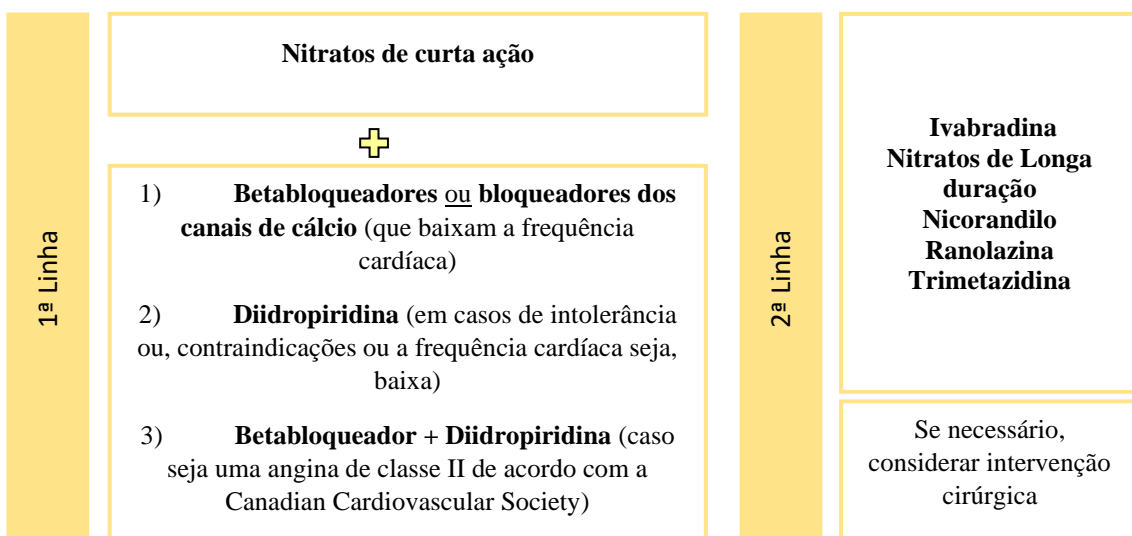


Figura 5: Esquema terapêutico para uma crise aguda de uma angina. Fonte de dados: "Montalescot, G. e Sechtem, U."²⁵

A prevenção das crises anginosas são bastante importante, e pode ser feita com medidas farmacológicas e não farmacológicas, como representado na Figura 6.²⁵



Figura 6: Esquema terapêutico de prevenção de crises anginosas, medidas não-farmacológicas e farmacológicas. ARAs - Antagonistas do recetor da angiotensina II; IECAs - Inibidores da enzima de conversão da angiotensina. Fonte de dados: " Montalescot, G. e Sechtem, U."²⁵

Pacientes com cardiopatias isquêmicas, que não respondem à terapêutica farmacológica, podem ter necessidade de intervenção cirúrgica. A cirurgia de revascularização do miocárdio é um dos procedimentos utilizados, em que se realizam um, dois ou três enxertos.⁴⁴ O mais comum é realizarem-se três enxertos, com uma artéria interna mamária e dois com veias. A utilização da artéria interna mamária reduz a frequência com que ocorre episódios de angina, assim como reduz a necessidade de futuras intervenções, o que torna este procedimento numa boa alternativa a longo prazo.⁴⁵ Na Figura 7, do lado esquerdo está representado um coração com obstrução nos vasos sanguíneos, provocando isquemia antes da cirurgia de revascularização do miocárdio, enquanto que do lado direito é apresentado o resultado desta, onde se vê dois enxertos. Estima-se que cerca de 90 a 95% dos enxertos da artéria interna mamária são bem sucedidos e nos dez anos seguintes à intervenção estes não apresentam complicações, enquanto que cerca de 75% dos enxertos feitos com veias, podem vir a sofrer complicações entre as quais a obstrução destas.⁴⁶

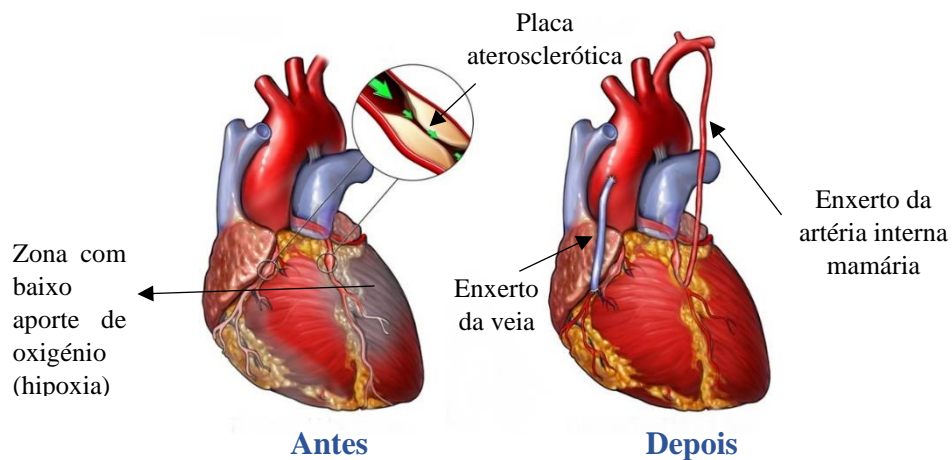


Figura 7: Aparência do miocárdio antes e depois da cirurgia de revascularização do miocárdio. Adaptado de: Medical Illustration Copyright © 2019 Nucleus Medical Media

1.3. Ranolazina

A Ranolazina, $C_{24}H_{33}N_3O_4$, com um peso molecular de 427,5 g/mol, é de acordo com as regras de nomenclatura da IUPAC denominada de *[(+)-N-(2,6-dimethylphenyl)-4-(2-hydroxy-3-(2-methoxyphenoxy)-propyl)-1-piperazine acetamide dihydrochloride]*. A sua estrutura está representada na Figura 8.⁴⁷

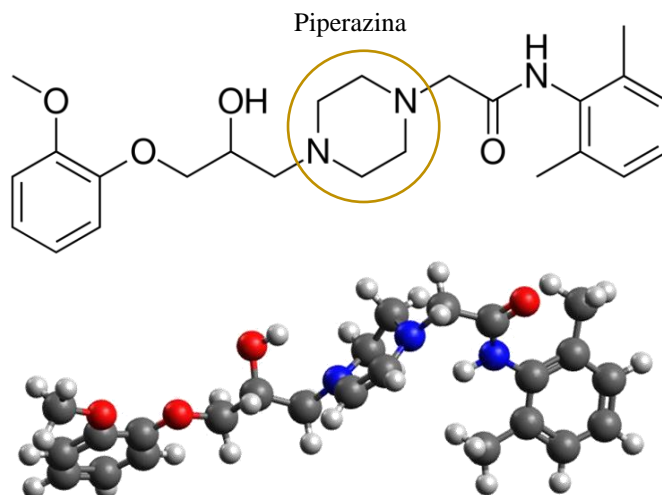


Figura 8: Estrutura 2D e 3D da Ranolazina, a orientação espacial dos diferentes grupos da molécula foi obtida por minimização de energia com o programa Avogadro⁴⁸

A molécula foi descrita pela primeira vez em 1996³ e associada à piperazina, como sendo um derivado desta. Devido à sua estável conformação, esta foi incorporada em alguns compostos que revelaram ter propriedades medicinais, nomeadamente como atividade antianginosa.⁴

É um composto sólido, cristalino de cor branca que apenas é solúvel em metanol e diclorometano e muito pouco solúvel em água (0,11 mg/mL),⁴⁹ com ponto de fusão de 120 – 124°C e ponto de ebulição de 624,1°C.⁵⁰

1.3.1. Indicação terapêutica e regime posológico

A *Food and Drug Administration* (FDA), entidade reguladora do medicamento nos Estados Unidos da América, aprovou pela primeira vez a utilização da Ranolazina em 2006, em pacientes que apresentassem um diagnóstico de angina estável crónica. Inicialmente a sua utilização apenas era considerada caso o esquema terapêutico de primeira linha não obtivesse resultados suficientes para a melhoria contínua dos pacientes. No entanto passado dois anos, em 2008 a sua utilização foi alargada, sendo considerada tratamento de primeira linha na angina estável crónica.⁵¹

Em julho de 2008, a Agência Europeia do Medicamento (EMA) aprova a introdução no mercado de Ranolazina, de nome comercial Ranexa pela Menarini International Operations Luxembourg, S.A.⁵² A sua utilização na europa apenas está autorizada no tratamento de sintomatologia de doentes que não respondam de forma positiva aos fármacos de primeira linha ou que apresentem alguma contraindicação ou ainda que desenvolvam reações adversas a estes.⁵¹

Nos Estados Unidos existem disponíveis formulações de comprimidos de ação prolongada em dose de 500 mg e de 1000 mg, enquanto que na europa são comercializados nas doses de 375, 500 e 750 mg.⁵¹ De acordo com o Centro de Conferência de Faturas, o consumo de Ranolazina nas três diferentes doses tem vindo a aumentar desde o ano de 2015, uma vez que só existe registo desta informação a partir desse ano, como se pode observar na Tabela 1 onde se apresenta a informação disponibilizada pelo Centro de Informação do Medicamento e Produtos de Saúde do INFARMED, I.P. Estes dados dizem respeito apenas às embalagens dispensadas nas Farmácias comunitárias, não sendo contabilizadas aquelas que são utilizadas em âmbito Hospitalar.⁵³

Dose	Embalagens 2015	Embalagens 2016	Embalagens 2017	Embalagens 2018	Embalagens 2019
375 mg	4140	14883	24012	31944	39737
500 mg	2321	9751	15720	23912	31168
750 mg	137	1165	2776	4793	7157

Tabela 1: Resumo da incidência de utilização de Ranexa, em número de embalagens vendidas, nos anos de 2015, 2016, 2017, 2018 e 2019 para as três dosagens disponíveis nas farmácias portuguesas.⁵³

O estudo CARISA,⁵⁴ demonstrou que tanto a dosagem de 1000 como a de 750 mg duas vezes por dia apresenta o efeito terapêutico equivalente aos fármacos de primeira linha, e que por isso é aconselhável o regime posológico de 750 mg duas vezes por dia. A dosagem máxima deve ser titulada gradualmente a uma dosagem mais baixa de 375 mg duas vezes por dia, tal como no esquema representado na Figura 9. Caso apresente alguma reação adversa a dosagem deve ser reduzida para a dose imediatamente inferior e caso os sintomas permaneçam, suspender a terapêutica.⁵²

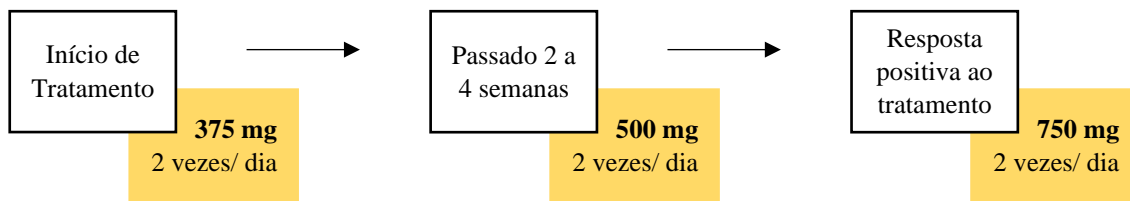


Figura 9: Estratégia terapêutica de ajuste de dose para a utilização de Ranolazina em adultos. Fonte de informação: European Medicines Agency - European Union.⁵²

A Ranolazina é um composto químico estranho ao organismo e como tal, o seu comportamento dentro deste pode ser de alguma forma inesperado. Ao longo do período em que foi sendo utilizado, foram observadas algumas reações indesejáveis causadas pelo fármaco, os ensaios clínicos mostraram que o uso desta terapêutica não é aconselhável em alguns grupos populacionais bem como com alguns outros fármacos, como mostra na Tabela 2.

Reações Adversas		Interações Farmacológicas	Contraindicado
Frequentes	tonturas	Fármacos indutores ou inibidores da enzima CYP2A4	- compromisso renal severo com uma clearance da creatinina < 30 ml/min;
Pouco frequentes	visão enevoada confusão alucinações dupla visão		- compromisso hepática moderado ou severo;
Raro	Distúrbios de coordenação		- utilização simultânea de Ranolazina e fortes inibidores da enzima CYP3A4 - utilização coexistente de antiarrítmicos de Classe Ia ou de Classe III (exceção da amiodarona)

Tabela 2: Reações adversas, interações farmacológicas e grupos populacionais em que o uso de Ranolazina está contraindicado. Fonte: European Medicines Agency - European Union⁵²

1.3.2. Propriedades farmacológicas e farmacodinâmicas

A contração do miocárdio é um mecanismo de cinco fases de despolarização da membrana seguida de contração dos miócitos cardíacos. O potencial de ação, que é uma diferença de potencial que se estabelece na membrana dos miócitos cardíacos, é devido à diferença de concentrações dos iões e consequentemente dos gradientes das cargas destes. A regulação dos gradientes é efetuada pelas respetivas bombas e canais iónicos. A Figura 10 mostra as cinco fases em que se divide o processo: fase 0, onde ocorre um influxo muito acentuado de iões Na⁺, fase 1 em que se dá a passagem dos iões K⁺ e Cl⁻ para o interior da célula, havendo assim um fenómeno de repolarização da membrana,

fase 2 em que uma concentração inferior a 10 mM de Na^+ é mantida no interior da célula fase 3 em que a concentração intracelular de Ca^{2+} é mantida entre 10 a 200 nM e a fase 4 correspondente ao potencial de ação na membrana quando esta se encontra em repouso, através da corrente iônica de K^+ e pela bomba iônica $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. As características associadas aos diferentes potenciais de ação são definidas pelas correntes iônicas ativas, cujo o equilíbrio é mantido pela passagem de íons do interior para o exterior da célula e vice-versa, quer seja pelas bombas ou canais iônicos.^{55,56}

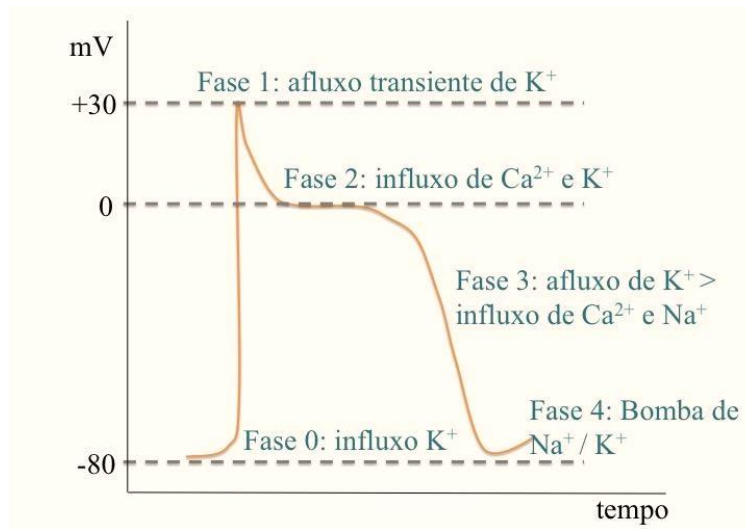


Figura 10: Potenciais de ação nas diferentes fases de contração do miocárdio ao nível ventricular. Adaptado de: Robert M. Lester, Sabina Paglialonga, Ian A. Johnson:⁵⁶

No caso de haver alguma disfunção neste processo, como é no caso da angina de peito, existe uma produção deficiente de ATP, utilizado no transporte iônico transmembranar, provocando um desequilíbrio na concentração intracelular de Na^+ . A consequência será uma atuação deficiente na bomba de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, de que resulta uma concentração superior de Ca^{2+} que impede o relaxamento do miocárdio e conduz a dor.^{57,58}

A forma de atuação da Ranolazina está intimamente relacionada com as bombas iônicas presentes nos miócitos cardíacos. Embora o seu mecanismo não seja completamente conhecido⁴², sabe-se que esta modifica a corrente iônica, provocando efeito na despolarização da membrana.⁵⁹ Mesmo que tenha demonstrado provocar alterações na corrente elétrica de vários íons como o Na^+ e o K^+ , a afinidade para o canal de Na^+ é maior.⁶⁰ A Ranolazina impede o influxo de Na^+ na célula, isto faz com

que a concentração de Na^+ intracelular seja menor, e conseqüentemente impede a saturação de Ca^+ , resultando num relaxamento mais eficaz do miocárdio.⁶¹

1.3.3. Propriedades farmacocinéticas

Os fármacos no interior dos organismos seguem um determinado percurso desde que são ingeridos até que são excretados, ao conjunto destes processos chama-se farmacocinética. No caso da Ranolazina a sua farmacocinética é constituída por cinco fases: libertação, absorção, distribuição, metabolismo e eliminação. É através destes processos que o fármaco sofre alterações físicas para que possa ser absorvido após a sua libertação, entrar na corrente sanguínea para ser distribuído pelo organismo e conduzido até aos alvos terapêuticos, ao ser metabolizado por estes pode exercer o objetivo terapêutico, e por fim, ser eliminado.⁶²

Muito autores, não consideram a libertação como uma fase farmacocinética, no entanto dada a forma farmacêutica em que a Ranolazina é apresentada, comprimidos de libertação prolongada, torna-se pertinente usar o conceito como uma fase de farmacocinética, uma vez que a libertação, neste caso está intimamente ligada à concentração de fármaco no sangue ao longo tempo. Na estrutura física do comprimido existe uma película (espessa e com ~0,5 mm) que o reveste, com propriedades específicas para que o fármaco seja libertado, de modo controlado, ao longo do tempo por dissolução.

Após o princípio ativo ser libertado, este entra na corrente sanguínea, atingindo uma concentração máxima (C_{max}) de 2600 ng/mL, no período de tempo (t_{max}) de duas a seis horas (para uma dosagem de 1000 mg em 2 vezes ao dia), não sendo substancialmente influenciada pela alimentação.⁶³ A concentração no estado estacionário (C_{ss}) é atingido em três dias.⁶⁴

A ação terapêutica necessita que o fármaco atinja o alvo terapêutico e para isso terá de se conjugar com alguma das proteínas transportadoras. No caso da Ranolazina existe uma ligação preferencial à glicoproteína ácida α -1 com uma extensão entre 60,9 e 63,9 %, e uma ligação muito fraca à albumina. O seu volume de distribuição (V_d) varia entre 85 e 180 L.⁴²

A metabolização da Ranolazina é preferencialmente feita no fígado e intestino, pela ação das enzimas de fase II do citocromo P450, da família 3A, sendo

preferencialmente metabolizado pelo CYP3A4, pode ainda em menor extensão ser metabolizado pelo CYP2D6. Os metabolitos resultantes são em elevado número, no entanto não se conhece a ação que têm sobre o organismo.^{63,65} Na eliminação da Ranolazina, 5 a 10% do fármaco é eliminado de forma inalterada e uma pequena parte sofre glucuronidação antes da excreção. Ou seja, a maior parte do fármaco é excretado após a sua metabolização, da percentagem que é metabolizada 75% é excretada na urina e 25% nas fezes.^{42,63}

Três dos parâmetros farmacocinéticos mais importantes para descrever o comportamento deste fármaco no organismo são a constante de absorção (K_a) com um valor de $0,0631 \text{ h}^{-1}$, a Clearance (CL) de $22,4 \text{ L/h}$ e o tempo de semivida ($t_{1/2}$) que varia entre 1,4 e 1,9 horas.⁴² Na Tabela 3 é apresentado um resumo das características farmacocinéticas.

C_{\max}	2600 ng/mL	
t_{\max}	2 – 6 h	
C_{ss}	3 dias	
V_d	85 – 180 L	
CL	22,4 L/h	
K_a	$0,0631 \text{ h}^{-1}$	
$t_{1/2}$	1,4 – 1,9 h	
Ligação às proteínas transportadoras	Proteína	glicoproteína ácida α -1,
	Extensão de ligação	60,9 - 63,9 %
Enzima metabolizadora	CYP3A4 CY2D6 (em menor extensão)	
Eliminação	Cerca de 5% é eliminado inalterado	

Tabela 3: Resumo das propriedades Farmacocinéticas da Ranolazina.^{42,63-65}

1.4. Espectroscopia Aplicada a Amostras Sólidas

O controlo de qualidade aplicado aos fármacos deve responder de modo eficaz ao objetivo desse controlo, pois estes compostos são capazes de restaurar, corrigir ou modificar funções fisiológicas dos organismos vivos⁶⁶ e por isso de importância cada vez maior na sociedade atual. Assim, caso não sejam devidamente verificados podem provocar problemas de saúde sérios ou tornarem-se ineficazes para quem os utiliza. Um dos parâmetros mais importantes do controlo de qualidade na indústria farmacêutica ou

afim, é a quantificação do princípio ativo no fármaco e a identificação de possíveis contaminantes que podem resultar tanto da síntese como da formulação final.

Existem inúmeras técnicas e métodos aplicáveis à quantificação de fármacos e vários desses métodos descritos na farmacopeia fazem uso de uma técnica espectroscópica.⁶⁷

1.4.1. Radiação eletromagnética e a análise espectroscópica

A espectroscopia, pode ser definida como um ramo da ciência que tem como objeto de estudo a interação entre a matéria e a radiação eletromagnética, as análises espectroscópicas têm por base tanto a radiação emitida como a absorvida pela amostra.

A radiação eletromagnética é uma forma de energia que é alvo de várias descrições. Esta pode ser descrita como uma onda e tendo, portanto, propriedades como comprimento de onda, frequência, velocidade e amplitude. No entanto, quando associada a processos de absorção ou emissão a radiação também pode ser caracterizada como energia de partículas e descrita como fóton. Apesar destas duas descrições serem aparentemente diferentes as duas abordagens complementam-se naquilo que é a descrição da radiação eletromagnética.⁶⁸ O espectro eletromagnético é composto por várias regiões espectrais, estas regiões são diferenciadas pela sua energia, ou seja, pelas características associadas às ondas correspondentes. As interações a nível molecular da radiação com a amostra, apresentadas na Figura 11, mostram que estas diferem de acordo com as diferentes regiões ao longo de todo o espectro eletromagnético.⁶⁹ Embora todas as regiões possam eventualmente ser utilizadas para análises espectroscópicas quantitativas e qualitativas, as regiões do ultravioleta-visível e do infravermelho (próximo e médio) são as mais utilizadas para o controle de qualidade de produtos farmacêuticos.⁶⁸

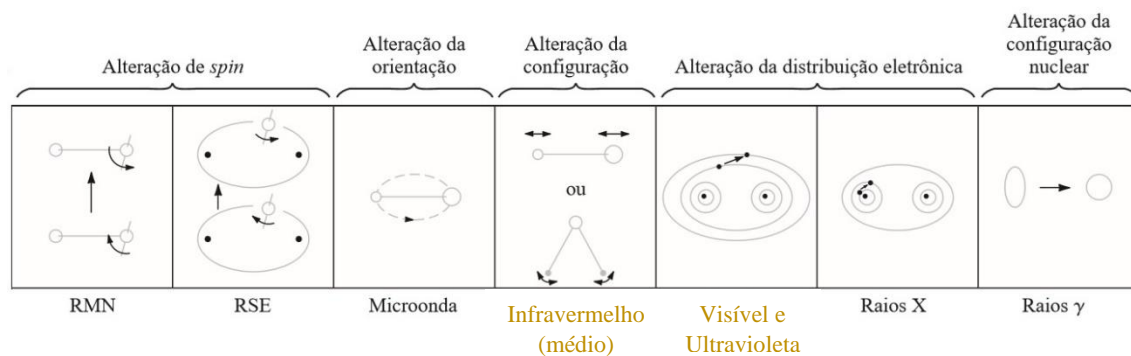


Figura 11: Alteração a nível molecular nas diferentes regiões do espectro eletromagnético. Adaptado de: Douglas A. Skoog, Donald M. West, F. James Holler, Stanley R. Crouch.⁶⁸

Quando as moléculas estão no estado fundamental, o seu estado de mais baixa energia, e são submetidas a radiação podem ser promovidas transições energéticas para as orbitais de níveis de energia superiores, isto ocorre quando há absorção de fótons. Como os diferentes estados de energia numa molécula estão quantificados, para que seja possível a passagem para um nível de energia superior é necessário que a radiação tenha a energia adequada, ou seja que a energia da radiação seja compatível com a diferença de energia entre os dois níveis da transição.

Sendo o estado mais estável das moléculas o estado de menor energia, após ocorrer a transição para níveis de energia superiores as moléculas tendem a regressar ao estado fundamental por perda do excesso de energia. Esta transição, entre níveis de energia mais elevados para mais baixos, em geral para o estado fundamental, pode ocorrer com ou sem emissão de fótons.^{70,71} Quando a perda do excesso de energia ocorre sem emissão de fótons são denominadas por transições não radiativas, e por emissão quando existe libertação de energia na forma de fótons.

A condição para absorção de radiação, como já foi referido, é a de que a diferença de energia entre dois níveis de energia da molécula corresponda à energia da radiação. Nas regiões do ultravioleta-visível (UV-Vis) e do infravermelho (IV), que vão ser utilizadas neste trabalho, podem ser estimuladas, respetivamente, transições eletrónicas e as transições vibracionais.

À temperatura ambiente, todas as moléculas estão no estado eletrónico fundamental pois a diferença de energia entre os estados fundamental e excitado é relativamente grande.⁷² Os eletrões na camada externa de um átomo (orbital de valência) podem estar nos seguintes tipos de orbitais moleculares: orbitais de ligação

simples (ou sigma, σ) com a menor energia, orbitais de ligação duplas ou triplas (π , π) e orbitais não ligantes (n) com a maior energia. As transições eletrônicas, são observadas na região do ultravioleta-visível (180-900 nm), ou no caso da molécula ter metais pesados no infravermelho próximo (900-1100 nm), pois é nestas regiões que o comprimento de onda da radiação possui energia suficiente para o elétron passar de um nível de energia mais baixo para um mais alto (designado por estado excitado).⁷³ A transição que pode ocorrer, quando há absorção de radiação, é para um nível de energia vazio, ou seja, para uma orbital molecular anti-ligante, σ^* ou π^* . Em geral, apenas transições π - π^* , n - π^* e n - σ^* são observadas, com exceção para os complexos de metais de transição, que por apresentarem orbitais d parcialmente preenchidas, para os quais podem ocorrer transições d-d.^{72,73} A transição $n \rightarrow \pi^*$ é a que requer menor energia, enquanto $\sigma \rightarrow \sigma^*$ a que requer maior quantidade de energia para que a transição possa ocorrer. Pelo que se espera observar no espectro a menores comprimentos de onda a transição $\sigma \rightarrow \sigma^*$ e a maiores a transição $n \rightarrow \pi^*$. Em geral, pode dizer-se que a ordem de energias das diferentes transições eletrônicas é $(n \rightarrow \pi^*) < (\pi \rightarrow \pi^*) < (n \rightarrow \sigma^*) < (\sigma \rightarrow \sigma^*)$.⁷³

A radiação de infravermelho, não tem energia suficiente para excitar os elétrons, mas tem a energia necessária para estimular numa molécula a alteração da posição relativa dos átomos, provocando alterações de comprimento e/ou dos ângulos das ligações. Na espectroscopia de infravermelho, o objetivo é observar estas alterações que se designam por vibrações.^{69,74}

Numa molécula as ligações químicas entre os átomos têm um comportamento que pode ser descrito como o de molas elásticas, pelo que, dependendo do tipo de átomos (da sua massa) e da força das ligações (simples, dupla ou tripla), cada molécula possui um conjunto característico de frequências vibracionais, ou seja um espectro.^{75,76} Átomos com massas maiores fazem com que a vibração seja observada a uma frequência menor (menor energia) e, átomos com uma massa inferior apresentam vibrações a maiores frequências (maiores energias). O tipo de ligação é também um aspeto importante, pois dependendo da sua multiplicidade a força da ligação é diferente, e, portanto, ligações simples aparecem a frequências mais baixas que vibrações envolvendo ligações duplas e as ligações triplas são aquelas que são observadas a frequências mais elevadas.⁷⁵ Além disso, existem outros fatores que influenciam as frequências vibracionais de uma molécula, como sejam a posição e a geometria dos

grupos funcionais. Unidades estruturais semelhantes tendem a absorver a radiação de infravermelho a frequências e com intensidades semelhantes, pelo que as moléculas com esses grupos apresentam bandas semelhantes nos espectros, estas são as chamadas frequências de grupo.⁷⁶

Os espectros, quer de UV-vis quer de IV do mesmo composto podem apresentar algumas diferenças quando são analisadas amostras em diferentes estados físico-químicos. O espectro de absorção tem, de um modo geral, uma grande influência das interações intramoleculares e intermoleculares que são estabelecidas, uma vez que a mudança de estado físico das amostras pode resultar num rearranjo da estrutura, este rearranjo pode implicar a observação de bandas diferentes no espectro ou de alteração da sua posição relativa.^{77,78}

Em espectroscopia um aspeto importante é a interação entre a radiação e a amostra, sendo que esta interação é dependente do estado físico da amostra. Quando a radiação incide na amostra podem ocorrer diferentes modos de interação, como transmissão, dispersão (ou difusão) ou ainda reflexão. Destes, em amostras sólidas são possíveis os modos de transmissão difusa e o de dispersão.⁷⁹

A possibilidade de se observar a transmissão difusa depende muito das características físicas da amostra, embora não sendo vulgar, esta interação pode ocorrer quando a amostra é composta por partículas de diâmetro pequeno e em filmes finos (espessura inferior a 1 mm). Neste caso a radiação que incide na superfície da amostra, atravessa a matéria, mas o seu caminho não é retilíneo, como aconteceria em solução (à esquerda na Figura 12), pois a radiação não penetra o interior da partícula mas difunde-se no espaço entre estas (à direita na Figura 12).⁷⁶

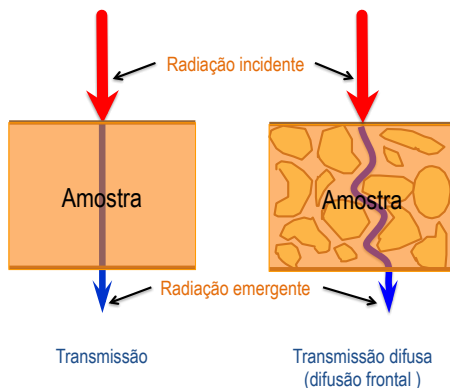


Figura 12: Representação esquemática da interação da radiação com a matéria no caso de ocorrer transmissão em ambos os estados físico das matéria, isto é, em soluções (do lado esquerdo) e no estado sólido (do lado direito).

Na análise de pós (amostras sólidas finamente moídas e compactas) a interação da radiação com a amostra é por dispersão, ou seja, a radiação não atravessa a amostra, mas é “refletida”, esta dispersão pode ser especular ou difusa.

1.4.2. Análises espectroscópicas em refletância difusa

A interação da radiação por dispersão no caso de amostras no estado sólido é muito dependente da rugosidade da amostra. Se a superfície for completamente lisa, sem qualquer rugosidade, a dispersão é feita com um ângulo semelhante ao da radiação incidente, tal como representado à esquerda na Figura 13. No caso da superfície não ser regular, ou seja, apresentar rugosidade, a radiação incidente após a interação com a amostra é dispersa em todas as direções com ângulos diferentes dos da radiação incidente de acordo com as irregularidades da superfície, como representado à direita na Figura 13. O modo de dispersão difusa, designado por refletância difusa, é o mais comum, uma vez que a maior parte das amostras, especialmente as que estão na forma de pó, apresentam superfícies irregulares. Através da diferença entre a intensidade da radiação que incide e a intensidade da radiação que é dispersa, é possível determinar a quantidade de radiação que foi absorvida.^{76,79}

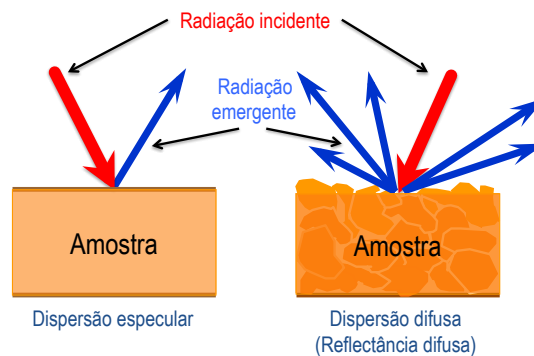


Figura 13: Representação esquemática dos ângulos da radiação incidente e emergente na dispersão especular (à esquerda) e na dispersão difusa (à direita).

A análise espectroscópica destas amostras tem diferenças no equipamento, em particular no porta-amostras, em relação à análise feita a amostras líquidas, ou seja, é necessário acoplar acessórios aos equipamentos que permitam as condições necessárias à sua análise. Esses acessórios possuem esferas de integração, ou esfera de Ulbricht, como também muitas vezes é referida que têm como função corrigir toda a radiação dispersa. A esfera de integração é uma estrutura como se representa esquematicamente na Figura 14(A). A radiação incidente entra por uma abertura específica e dado as

características estruturais da esfera integradora a radiação que inicialmente se dispersa pelo interior da esfera é encaminhada para incidir na amostra. Na amostra a radiação que não é absorvida e se dispersa em todas as direções é colimada, acabando por sair pela abertura destinada a esse efeito e encaminhada para o detetor. Muitos dos acessórios, como no caso da análise por refletância difusa por infravermelho com transformada de Fourier (DRIFT), representado na Figura 14(B), não existe uma esfera completa mas uma calote esférica de espelhos que têm a mesma função e atua do mesmo modo.⁷⁰

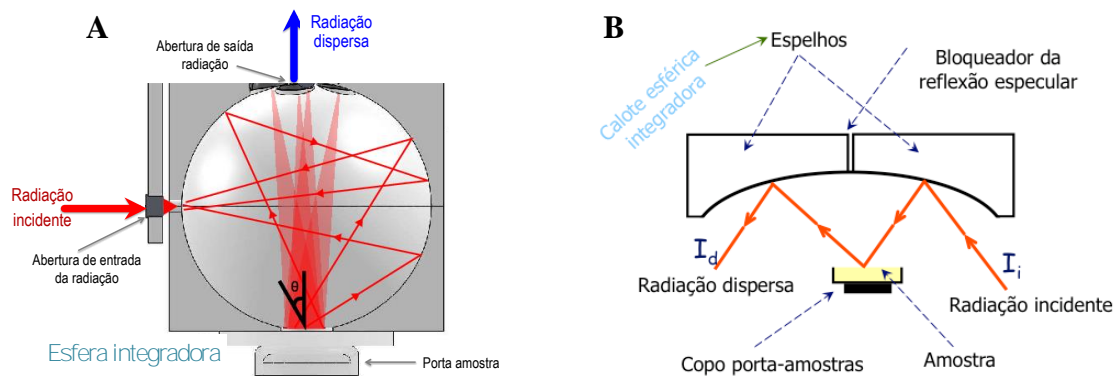


Figura 14: Representação esquemática (A) do funcionamento de uma esfera de integração e (B) do caminho percorrido pela radiação numa análise por refletância difusa em infravermelho.

A explicação teórica da refletância difusa tem por base a descrição da propagação da radiação através de materiais heterogêneos.⁸⁰ O modelo mais utilizado para dispersão difusa da radiação, apesar de se tratar de uma descrição aproximada é o proposto por Kubelka e Munk.^{81,82} No modelo Kubelka-Munk (K-M), no caso de amostras com espessura infinita não homogêneas, as particularidades geométricas são condensadas em dois parâmetros: o coeficiente de dispersão também designado por constante de difusão (S) e o coeficiente de absorção (K) que depende do comprimento de onda da radiação.^{83,84} A intensidade da radiação dispersa por refletância difusa (R_{∞}) é dada pela Equação 1, apresentada abaixo.

$$R_{\infty} = 1 + \frac{K}{S} - \sqrt{\frac{k}{s} \left(2 + \frac{k}{s} \right)} \quad \text{Equação 1}$$

A teoria de Kubelka-Munk estabelece ainda o que se designa por função de remissão, $F(R_\infty)$ onde é relacionada a intensidade da radiação dispersa com a absorção da radiação pela matéria, representado na Equação 2.⁸⁵

$$F(R_\infty) = \frac{K}{S} \quad \text{Equação 2}$$

A teoria, com base na Equação 1 e 2, culmina no desenvolvimento matemático de uma relação entre a função de remissão e a intensidade da radiação dispersa por refletância difusa, expressa na Equação 3, também designada por equação de Kubelka-Munk.⁸⁶

$$F(R_\infty) = \frac{(1-R_\infty)^2}{2R_\infty} \quad \text{Equação 3}$$

Em que R_∞ simboliza a refletância máxima da superfície da amostra, considerando que a espessura desta seja infinita, ou seja quando não há possibilidade de ocorrer transmissão da radiação. Quando não há absorção da radiação pela amostra a intensidade da radiação dispersa é igual ao total da intensidade da radiação incidente, ou seja, é 1, sendo $F(R_\infty)$ igual a zero. Sendo que à medida que a radiação dispersa diminui (quando há absorção) o valor de $F(R_\infty)$ aumenta. Assim, $(1-R_\infty)$ está de algum modo relacionado com a fração de radiação absorvida pela amostra. Esta teoria quando aplicada, é numa correção do espectro de refletância difusa, de que resulta um espectro semelhante a um espectro de absorção de soluções diluídas.

O modelo de Kubelka-Munk, tem sido alvo de muito interesse desde a sua proposta inicial e a equação tem sido adequada e corrigida para permitir a sua aplicação a vários tipos de análises e materiais específicos.^{83,86} Contudo, devido à sua relativa simplicidade, a equação de Kubelka-Munk (Equação 3) continua a ser o modelo mais aplicado.

Quando se pretende fazer análise quantitativa por refletância difusa, um aspeto fundamental é a possibilidade de obtenção de uma relação linear entre a função de remissão de Kubelka-Munk e a concentração das espécies absorventes à semelhança do que acontece na Lei de Lambert-Beer.⁸⁷ A intensidade da radiação difusa que é dispersa pode ser relacionada com a concentração, através da Equação 4, em que C representa a concentração da amostra, K a constante de absorção e $F(R_\infty)$, a função de remissão.⁸⁸

$$F(R_{\infty}) = \frac{C}{K} \quad \text{Equação 4}$$

Neste modelo, vários detalhes experimentais devem ser cuidadosamente abordados e controlados durante a preparação das amostra, como o tamanho das partículas, a densidade e a homogeneidade da amostra. Outra questão importante é o design ótico do acessório de refletância difusa, que pode comprometer a repetibilidade dos dados espectrais.^{89,90}

2. Desenvolvimento dos Métodos

2.1. Materiais

Foram utilizados, para além de material corrente de laboratório, balões volumétricos de 25,00±0,04 mL, 50,00±0,06 mL, 100,0±0,1 mL, 250,00±0,15 mL e 1000,0±0,4 mL. Utilizaram-se também placas de *petri* e copos de 250 mL e 500 mL para purificar a Ranolazina.

Nos ensaios preliminares e amostras de mistura mecânica, foram utilizados tubos de ensaio para preparação dos padrões. De forma a preparar os padrões por adsorção usaram-se frascos de poliestireno com a capacidade de 50 mL. Os padrões e amostras de mistura mecânica foram preparadas com auxílio a um almofariz e pilão de quartzo.

Na preparação de soluções foram utilizadas duas micropipetas: uma P1000 com uma incerteza associada ao erro sistemático de ±0,003 mL até 0,100 mL, ±0,004 mL até 0,500 mL, ±0,008 mL até 1,000 mL e uma P5000 com uma incerteza associada ao erro sistemático de ±0,012 mL até 0,500 mL, ±0,015 mL até 2,500 mL, ±0,030 mL até 5,000 mL, ambas da marca Gilson[®], modelo PIPETMAN[®] *classic*.

Em todos, os padrões e amostras para a análise em solução foram utilizadas células de quartzo para a análise espectroscópica. Para a análise da refletância difusa dos padrões e amostras por misturas mecânicas e adsorção recorreu-se a um porta amostras incluído no *kit* do equipamento, em ambas as análises.

2.2. Equipamento

Ao longo do trabalho experimental, realizaram-se pesagens em duas balanças distintas, uma balança da marca Precisa[®], modelo 125 ASCS, com uma incerteza de 0,1 mg e uma balança (modelo ADB 600-C3, da marca KERN), ambas balanças analíticas. Na preparação dos padrões por adsorção foi também utilizado uma estufa de vácuo.

A análise de todos os padrões e amostras no UV-Vis foram realizadas no espectrofotômetro de absorção *UV-Vis*, modelo Evolution 300, da marca Thermo Scientific[®]. No caso das análises de refletância difusa foi utilizado um acessório do espectrofotômetro, designado *Praying Mantis Accessory*, representado na Figura 15.

Para a realização da análise dos padrões e amostras no IV foi utilizado um espectrofotômetro FTIR (*Fourier-transform infrared*), modelo VERTEX 70, representado na Figura 16, da marca Bruker Optik GmbH.

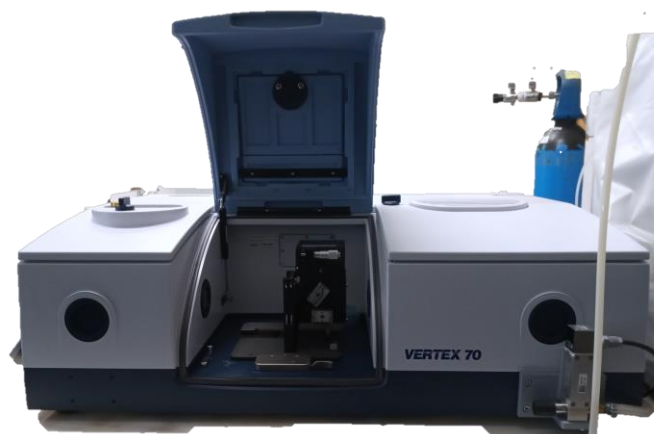


(A)

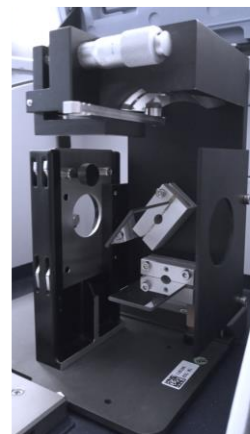


(B)

Figura 15: (A) Espectrofotômetro de absorção UV-vis e (B) acessório para a análise em refletância difusa.



(A)



(B)

Figura 16: (A) Espectrofotômetro de infravermelho (FTIR) e (B) acessório para a análise em refletância difusa.

2.3. Reagentes

Com o objetivo de purificar a amostra foram utilizados dois solventes, são eles Etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, massa molecular: 46,07 g/mol) da Sigma-Aldrich, com um grau de pureza >99,9% e Metanol (CH_3OH , massa molecular: 32,04 g/mol) da Sigma-Aldrich, com um grau de pureza >99,9%. Na preparação de todos padrões e amostras foi utilizado Ranolazina purificada no laboratório ($\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_4$, massa molecular: 427,54 g/mol), no caso das amostras para a análise em solução foi também utilizado Metanol (CH_3OH , massa molecular: 32,04 g/mol) da Sigma-Aldrich, com um grau de pureza igual a 70,0%.

Na preparação dos padrões por adsorção para além do metanol foi também utilizado como matriz PROSOLV[®] (celulose microcristalina, dióxido de silício coloidal, ácido glicólico de amido de sódio, fumarato de estearil sódico) da JRS Pharma, com um tamanho médio de partícula por difração a laser de 130 μm e uma densidade aparente entre 0,30 e 0,42 g/mL. No caso da preparação dos padrões e amostras por mistura mecânica foi utilizado também brometo de potássio FTIR (KBr, massa molecular: 119,002 g/mol), da Sigma-Aldrich e com um grau de pureza de $\geq 99,0\%$.

2.4. Amostras

As amostras utilizadas foram comprimidos revestidos de 750 mg de Ranolazina (Denominação Comercial: Ranexa), do laboratório Menarini International O.L.S.A.

Estes comprimidos são compostos por cera de carnaúba, hipromelose, estearato de magnésio, copolímero de etilacrilato e ácido metacrílico (numa proporção de um para (1:1)), celulose microcristalina, hidróxido de sódio e dióxido de titânio. O revestimento deste é constituído por triacetato de glicerol, lactose monohidratada, azul n° 1/ laca de alumínio azul Brilhante FCF (E133) e amarelo n° 5/laca de Alumínio tartrazina (E102).

2.5. Procedimento Experimental

2.5.1. Purificação da Ranolazina

Inicialmente retirou-se todo o revestimento dos comprimidos de forma a eliminar o máximo possível de componentes que não a Ranolazina. De seguida pulverizou-se os comprimidos necessários e dissolveu-se nos solventes testados, etanol e metanol. Deixou-se a repousar durante uma hora aproximadamente e de seguida decantou-se a solução do resíduo sólido que se depositou. Deixou-se a solução obtida cerca de duas a três semanas em repouso, para que o solvente evapore e o sólido se deposite. Colocou-se na estufa durante uma hora e a uma temperatura de 60 °C, com o objetivo de eliminar todo solvente existente. Por fim transferiu-se o composto obtido para tubos de ensaio, de forma a armazená-lo.

2.5.2. Preparação dos padrões e amostras para análise em solução

Preparou-se uma solução stock de Ranolazina, pesando uma massa de Ranolazina pura, de acordo com a Tabela A2 – 1 do Anexo 3 e transferiu-se para um balão volumétrico de 250 mL, perfazendo-se este com metanol.

Preparou-se também uma solução stock de amostra, pesando uma massa de comprimido revestido de Ranolazina, de acordo com a Tabela A3 – 3 do Anexo 3 e transferiu-se para um balão volumétrico de 1000 mL, perfazendo-se este com metanol.

Na preparação dos padrões para a análise em solução, de acordo com as Tabelas A3 – 4 e A3 - 5 do Anexo 3, pipetou-se um volume adequado às concentrações pretendidas, para uma balão volumétrico de 25 mL e perpez-se o volume com metanol e homogeneizou-se. No caso das amostras, pipetou-se um volume equivalente, para um balão volumétrico de 25 mL e perpez-se o volume com metanol. Para os ensaios de recuperação, pipetou-se um volume equivalente tanto de solução-stock de Ranolazina como de amostra, para um balão volumétrico de 25 mL e perpez-se o volume com metanol.

2.5.3. Preparação dos padrões e amostras de misturas mecânicas

No caso da análise feita por espectroscopia de infravermelho em modo de refletância difusa de acordo com a Tabela A3 – 5 do Anexo 3, pesou-se

sequencialmente em todos os tubos de ensaio para a preparação dos padrões, uma massa equivalente de brometo de potássio e massas adequadas às concentrações de Ranolazina pura, no caso das amostras pesou-se sequencialmente massas equivalentes de brometo de potássio e comprimido revestido de Ranolazina e os testes de recuperação pesou-se sequencialmente massas equivalentes de Ranolazina pura, comprimido revestido de Ranolazina e brometo de potássio. Após a preparação dos padrões e amostras, homogeneizou-se estas com recurso ao almofariz de quartzo e realizou-se a análise. Para a preparação dos padrões e amostras para o método de padrão interno, pulverizou-se o ferricianeto de potássio pesou-se sequencialmente uma massa deste e uma massa de brometo de potássio, de acordo com a Tabela A3 – 7 do Anexo 3, por fim homogeneizou-se.

No caso da análise feita por espectroscopia de UV-Vis em modo de refletância difusa, pesou-se sequencialmente em todos os tubos de ensaio e frascos de poliestireno, de acordo com a Tabela A3 – 9 do Anexo 3, para a preparação dos padrões, uma massa equivalente de PROSOLV[®] e massas adequadas às concentrações de Ranolazina pura, no caso das amostras pesou-se sequencialmente massas equivalentes de PROSOLV[®] e comprimido revestido de Ranolazina e os testes de recuperação pesou-se sequencialmente massas equivalentes de Ranolazina pura, comprimido revestido de Ranolazina e PROSOLV[®]. Após a preparação dos padrões e amostras, homogeneizou-se estas com recurso ao almofariz de quartzo e realizou-se a análise espectroscópica.

2.5.4. Preparação dos padrões por adsorção em matriz

Preparou-se uma solução stock de Ranolazina, pesando a massa de Ranolazina pura necessária para a concentração pretendida, de acordo com a Tabela A3 – 2 do Anexo 3, e transferindo-se para o balão volumétrico de 100 mL, perfazendo-se este com metanol.

As pesagens de PROSOLV[®] (utilizado como matriz) foram efetuadas diretamente para tubos de ensaio ou frascos de poliestireno, tendo-se pipetado para esses os volumes adequados de solução stock de Ranolazina para obter a concentração pretendida, de acordo com a Tabelas A3 – 11 e A3 – 12 do Anexo 3. Deixou-se evaporar o solvente durante duas semanas aproximadamente, de forma a haver adsorção da solução. Durante este tempo as amostras foram homogeneizadas

todos os dias. quando já só apresentavam líquido residual, colocaram-se na estufa a vácuo, à temperatura ambiente durante uma a duas semanas, com o objetivo de retirar todo o solvente residual das amostras. Estando as amostras completamente secas, procedeu-se à análise espectroscópica das mesmas.

2.5.5. Condições da análise espectrofotométrica

A análise espectrofotométrica das soluções por absorção UV-vis realizada em modo de transmissão teve as seguintes especificações: gama espectral 190-400 nm, largura de fenda de 2,0 nm, a uma velocidade de leitura de 240 nm/mim e leituras com um intervalo de 0,5 nm com um ciclo em cada amostra.

No caso das amostras sólidas de mistura mecânica e por adsorção da matriz, estas foram analisadas por Refletância difusa no UV-vis numa gama espectral entre 200 e 400 nm com uma largura de fenda de 2,0 nm, a uma velocidade de leitura de 240 nm/mim, sendo que as leituras foram realizadas com um intervalo de 1 nm e com um ciclo em cada leitura.

Na análise das misturas mecânicas por DRIFT, os espectros foram o resultado de 200 espectros de feixe único acumulados para a amostra, divididos para o mesmo número de leituras de KBr puro, utilizado como linha de base, na gama espectral de 4000-500 cm^{-1} e com resolução de 4 cm^{-1} . Os espectros foram transformados em unidades Kubelka-Munk, a linha de base corrigida e feita a integração das áreas das bandas usando o software OPUS.

3. Apresentação e Discussão de Resultados

Neste trabalho estudaram-se várias possibilidades de análise para a quantificação de Ranolazina nos comprimidos Ranexa 750 mg, com o objetivo de avaliar alguns métodos menos abordados pela literatura.

Para se validar um método é necessário proceder a uma caracterização prévia de um protocolo e só depois disso é possível avaliar a possibilidade de se validar o método. Não havendo muita informação para a quantificação de Ranolazina por DRUV ou DRIFT, o objetivo não será validar um método com este estudo, mas sim utilizar alguns parâmetros que regularmente se usam para validação de métodos de forma a avaliar os protocolos desenvolvidos.⁹¹

A caracterização de um método, com recurso aos parâmetros que normalmente são usados para a validação, implica um tratamento matemático e estatístico dos dados experimentais obtidos. O método dos mínimos quadrados é um modelo matemático que se pode dividir em duas partes, são elas, o modelo funcional e o modelo estocástico. O modelo funcional descreve a geometria do estudo, enquanto que o modelo estocástico descreve as propriedades estatísticas de todos os componentes implicados no modelo funcional⁹². Os resultados obtidos quando sujeitos a esse tratamento dão origem a uma equação de ajuste que minimiza a soma dos quadrados das diferenças entre o valor estimado e os valores observados. As equações matemáticas utilizadas para calcular os parâmetros de ajuste dos dados experimentais a uma regressão linear estão na Tabela A4 – 1 do Anexo 4. Através de interpolações na função de ajuste é possível quantificar o analito em amostras das quais se desconhecem as concentrações.⁹¹

A diferença entre o valor esperado de y (sinal) e o valor observado de y pode ser denominada de resíduo, com base nesses valores é possível traçar o gráfico dos resíduos (resíduos de y em função de x) em que os valores teóricos de y são os valores esperados a partir da equação de reta de ajuste. É de considerar que os valores residuais devem ter um valor baixo e ser aleatórios, ou seja não exibindo nenhuma tendência significativa, sendo deste modo possível aferir sobre as hipóteses da função de ajuste não ser a mais adequada aos dados experimentais e ainda da existência de erros sistemáticos. Tendo esta teoria por base, qualquer ponto que se desvie significativamente do esperado, ou seja que tenha um valor de resíduo mais elevado, deve ser testado para a eventualidade deste ponto não ser completamente representado pela função de ajuste (ser um *outlier*).

A confirmação de dado experimental como um *outlier*[†], quando se ajustam esses dados por uma equação da reta, pode ser obtida através do Teste-t. Este é um método possível, de entre outros, que de um modo simples e aplicando a Equação 5 permite calcular um intervalo com o grau de confiança definida no qual o valor do sinal deve estar, $IP(P_x)$, para que esse valor experimental do padrão P_x não seja considerado um *outlier*.

$$IP(P_x) = b + m_x \times C_{P_x} \pm t_{(95, N-2)} \times S_y \times \sqrt{1 + \frac{1}{N} + \frac{(C_{P_x} - \bar{C}_P)^2}{\sum C_P^2 - \frac{1}{N} (\sum C_P)^2}} \quad \text{Equação 5}$$

Em que b é a ordenada na origem da reta de ajuste obtida e m o declive correspondente, C_{P_x} é a concentração do padrão, $t_{(95, N-2)}$ é o valor de t-student para os N padrões utilizados para construir a reta para um grau de confiança de 95 %, S_y é o valor dos residuais do sinal e C_P será o valor da concentração do padrão obtido por interpolação do sinal na reta.

O método de análise é ainda caracterizado por outros parâmetros como os seus limites: de deteção, de quantificação e de linearidade. O limite de deteção (LD) é um valor de concentração definido como a concentração mínima de analito que o método consegue distinguir relativamente ao sinal do branco da análise com grau de confiança estatística aceitável.⁹³ O LD é também associado à relação sinal / ruído, ou seja diz-se que o limite de deteção é atingido quando é possível distinguir o sinal do ruído. O limite de deteção pode ser calculado através da Equação 6 para um grau de confiança de 95 %, em que S_y simboliza o desvio padrão residual e m simboliza a sensibilidade do método, ou seja o declive da reta de ajuste dos pontos experimentais.^{91,94}

$$LD = \frac{3 \times S_y}{m} \quad \text{Equação 6}$$

O limite de quantificação (LQ) represente a mínima concentração em que é possível com um certa precisão e exatidão quantificar o analito nas amostras. Neste sentido o limite de quantificação deve ser o primeiro padrão da reta de calibração, uma vez que esta concentração simboliza que o coeficiente de variação de sinal é razoável e

[†] um *outlier* é um valor que não se enquadra na normalidade e que provavelmente irá causar anomalias nos resultados obtidos por meio de algoritmos e sistemas de análise. Dependendo do caso, estes podem ainda ser designados em português como dados discrepantes ou pontos fora da curva, entre outros, neste trabalho optou-se pela designação em inglês por ser mais abrangente.

por isso a relação de ruído e sinal é de 1:10, ou seja 10%. Através da Equação 7, é possível calcular o LQ para um grau de confiança de 95 %, utilizando os mesmo dados do ajuste que foram utilizados para calcular o LD.^{95,96}

$$LQ = \frac{10 \times S_y}{m} \quad \text{Equação 7}$$

O limite de linearidade (LL) representa o limite máximo de concentração para o qual é possível quantificar o analito com a exatidão e precisão exigidas. Intervalo de concentrações compreendidas entre o LQ e o LL, representam o gama de trabalho, ou seja, o intervalo de concentrações para o qual é demonstrado um comportamento linear. Aquando a análise das amostras, é importante que a concentração destas, seja superior ao LQ e inferior ao LL, para que seja possível determinar a concentração das amostras por interpolação na função de ajuste. O LL é calculado com base na última concentração que evidencie um comportamento linear, visualmente e confirmado com o coeficiente de determinação e o Teste-t que confirma a existência de *outliers*, como explicado anteriormente.^{91,93}

Os ensaios de recuperação implicam a preparação de amostras fortificadas (com massa m_{Am}) com alíquotas de analito de concentração bem conhecida (de padrões, com massa $m_{sol.stock}$), de forma a perceber com a análise qual a percentagem de analito recuperada (% *recuperação*). Este parâmetro permite-nos perceber a interferência da matriz ou a perda de analito na análise. A Equação 8 representa o cálculo da percentagem de recuperação, em que o valor da concentração total do analito na amostra fortificada (m_{AmF}) é obtida por interpolação do sinal medido para a amostra fortificada na reta obtida.

$$\% \text{ recuperação} = \frac{m_{AmF} - m_{Am}}{m_{sol. stock}} \times 100 \quad \text{Equação 8}$$

O valor da percentagem de recuperação deve estar compreendido entre 80 – 120%, para que se considere não haver perda significativa ou interferência da matriz.⁹⁴

A exatidão representa a proximidade ao valor real, a precisão avalia se existe variações significativas nos resultados obtidas de medições repetidas da mesma amostra. O valor da exatidão é obtido pela diferença entre o valor obtido e o valor real.⁹⁷

A repetibilidade de um método é representada pela precisão de um trabalho realizado nas mesmas condições experimentais, ou seja, o mesmo laboratório, mesmo operador, com o mesmo equipamento, utilizando os mesmo reagente e em curtos

intervalos de tempo. Ou seja quanto maior é a repetibilidade do método maior é a homogeneidade entre as amostras. Enquanto que a reprodutibilidade avalia a precisão de um trabalho realizado, em condições diferentes, trabalhos num período de tempo alargado, por operadores diferentes e em diferentes laboratórios. A repetibilidade, da análise ou dos dados experimentais obtidos, pode ser avaliada através do Coeficiente de variação (CV), calculado através da Equação 9, em que s simboliza o desvio padrão e \bar{y} a média das leituras para cada padrão.⁹⁴

$$CV(\%) = \frac{s}{\bar{y}} \times 100 \quad \text{Equação 9}$$

A teoria de Horwitz, avalia a reprodutibilidade de um método, mas pode ser adaptada de forma a analisar a repetibilidade de um estudo.⁹⁸ Esta teoria resulta numa relação entre a precisão de um método analítico e a concentração do analito, em que para um analito puro (100 % em concentração mássica) é aceitável um CV de ~2 %, sendo que o %CV admissível aumenta com a diminuição da concentração. Assim, no caso de uma concentração com ordem de grandeza de 1 a 0,01 % m/m (10000-100 ppm) que se insere na gama de concentrações utilizadas neste trabalho, a %CV aceitável, é de 4 a 8 %.⁹⁹

Neste trabalho irá também ser utilizado o teste de homogeneidade de variâncias, denominado de Teste-F, o qual pretende avaliar se existem alterações significativas em leituras sucessiva do sinal da mesma amostra. Este teste permitirá garantir a aplicabilidade do método dos mínimos quadrados no cálculo da melhor reta que ajusta um conjunto de pontos experimentais. O Teste-F tem por base a comparação de dois parâmetros $F_{\text{crítico}}$ e F_{obs} .

O $F_{\text{crítico}}$ representa o limite máximo que F_{obs} pode assumir, valor esse que é calculado (tabelado) com base num determinado grau de confiança, tendo em consideração $N-1$ (N é número de replicados) graus de liberdade. Quando se verifica que o F_{obs} é inferior ao $F_{\text{crítico}}$, este revela que não existe evidência de erros aleatórios.⁹¹ O F_{obs} é calculado através da Equação 10, onde S^2_{pi} representa a variância do sinal obtido do ponto experimental em estudo e $S^2_{\text{pi-1}}$ representa a variância do sinal obtido do ponto experimental, imediatamente antes do em estudo. A literatura¹⁰⁰ descreve que o teste deve ser feito analisando 10 leituras do padrão de concentração mais baixa e 10 leituras do padrão de concentração mais alta, no entanto tendo em conta as

circunstâncias no decorrer do trabalho, foi necessário adaptar à realidade. Nesse sentido o teste foi feito comparando todos os padrões, com a média das três leituras efetuadas em cada padrão, garantido assim que não há alteração significativa de variâncias entre todos os padrões.

$$F_{\text{obs}} = \frac{S^2_{\text{pi}}}{S^2_{\text{pi}-1}} \quad \text{Equação 10}$$

3.1. Resultados da Recristalização da Ranolazina

Na impossibilidade de adquirir em tempo útil a Ranolazina pura o trabalho foi realizado como reagente o produto obtido por recristalização tendo como material inicial comprimidos Ranexa 750. Embora a Ranolazina tenha poucos solventes em que é solúvel,⁴⁹ foi necessário ainda verificar a não solubilidade dos excipientes no solvente escolhido, e de facto quase nenhum é solúvel em metanol, com exceção do hidróxido de sódio, cuja solubilidade em metanol é de 1g/4,2ml¹⁰¹.

A caracterização estrutural do pó resultante desta purificação foi feita por espectroscopia de infravermelho em modo de refletância difusa. O espectro DRIFT do comprimido, sem qualquer purificação mas após retirar todo o seu revestimento, uma vez que é nesta zona do comprimido onde existe a maior parte do excipiente, está na Figura 17 em comparação com os pós obtidos na primeira e na segunda recristalização, os espectros obtidos, foram normalizados ao máximo da banda mais intensa.

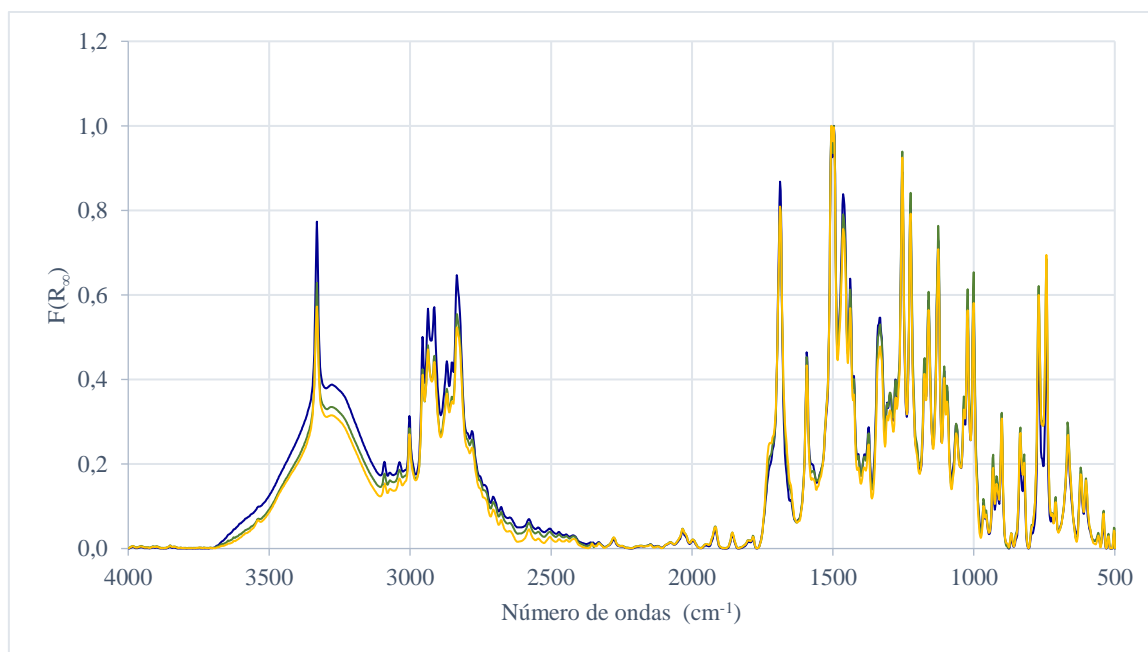


Figura 17: Espectros DRIFT da Ranolazina em comprimido Ranexa 750mg (linha azul), primeira recristalização (linha verde) e segunda recristalização (linha amarela), na gama espectral de 4000 e 50 cm^{-1} .

Os espectros anteriores mostram um número elevado de bandas bem definidas como é característico de moléculas complexas, sendo por isso importante fazer uma atribuição aos respetivos modos vibracionais das bandas mais intensas. Com base na literatura e na estrutura da molécula é possível atribuir às bandas às ligações e grupos existentes na Ranolazina. Na Tabela 4 são apresentados os números de ondas do máximo das bandas e a respetiva atribuição dessas bandas aos respetivos modos normais de vibração, mas apenas para o espectro do comprimido uma vez que as alterações de posição dos máximos nos espectros obtidos após recristalização está dentro da resolução espectral, não sendo por isso significativa.

Número de ondas (cm ⁻¹)	Atribuição de bandas	Número de ondas (cm ⁻¹)	Atribuição de bandas
3330	vNH	1434	δCH ₃ (Assimétrica, éter)
3278	vOH	1334	δCH ₃ (Simétrica)
3003	v=CH	1255	vC–O–C (Simétrica)
2956	vCH ₃ (Assimétrica)	1161	vC–C–C
2936	vCH ₂ (Assimétrica)	1126	vC–O (Álcool)/vC–N
2915	vCH ₂ (Assimétrica)	1109	vC–O (Éter) / vC–C
2870	vCH ₃ (Simétrica)	1022	vC–O–C (Assimétrica)
2850	vCH ₂ (Simétrica)	1001	vC–C–C (Anel)
2834	CH ₃ (sobreton da deformação em ressonância de Fermi)	901	vC–C–O (Álcool)
1722 (om)	vC=O	835	vC–C–O (Éter)
1678	vC=O	769	δCH (Anel Aromático, fora do plano da molécula)
1593	vC=C (Anel Aromático)	742	δCH (Anel Aromático, fora do plano da molécula)
1506	δNH	665	δOH (fora do plano da molécula)
1496	vC=C (Anel Aromático)	620	δC–C–C (Anel)
1464	δCH ₃ (Assimétrica)		

Tabela 4: Posição das bandas mais intensas observados no espectro DRIFT da Ranolazina e atribuição aos correspondentes modos vibracionais.^{102,103}. v - elongação; δ - deformação no plano.

Ao analisar os três espectros, referentes ao comprimido e aos do analito purificado, e comparando com os espectros da Ranolazina encontrados na literatura, percebemos que as bandas são muito semelhantes, não havendo uma evidência clara do excipiente. Esta primeira observação seria esperável pois ao retirar-se a película exterior, que é responsável pela libertação prolongada e onde se encontra a maioria dos componentes do excipiente, o restante produto deverá ser quase exclusivamente Ranolazina.

Embora os três espectros anteriormente mostrados sejam quase sobreponíveis, existem algumas diferenças, em particular na região $3500 - 3000 \text{ cm}^{-1}$ há uma diminuição da intensidade relativa de uma banda com máximo a 3278 cm^{-1} após a recristalização, indicação de que a recristalização permitiu remover outros componentes da mistura. O modo associado a esta banda é a elongação OH, que origina sempre uma banda bastante larga e se sobrepõe com qualquer outra nesta região. Considerando a Ranolazina e o excipiente, verificamos que existe OH não só na molécula como no NaOH um dos componentes do excipiente. Sendo este último também solúvel no metanol é possível que com o processo de purificação se tenha eliminado. Também a banda na região espectral abaixo de 1800 cm^{-1} se verifica uma diminuição da intensidade relativa de algumas bandas contudo essa variação é pouco significativa, mas pode indicar que o excipiente que possa existir ainda na mistura de comprimidos utilizada e cujas bandas se sobrepõem às bandas da Ranolazina, foi eliminado.

A análise por DRIFT do produto resultante da recristalização do pó do comprimido Ranexa permite concluir que não há quantidade significativa de excipiente e que não foram promovidas alterações da estrutura da Ranolazina durante o processo. A purificação foi realizada com cinco comprimidos, com uma massa total de 5,1065 g e após a recristalização obteve-se uma massa de Ranolazina de 2,1646 g, o que equivale a um rendimento de 42,4%.

3.2. Quantificação de Ranolazina em Solução

3.2.1. Espectros de absorção UV-vis em transmissão

O primeiro passo de qualquer análise por espectroscopia é determinar o perfil de bandas do espectro do composto a analisar e a influência da concentração no seu espectro. Assim, para a análise da Ranolazina em solução, foi feito um varrimento espectral entre 190 e 400 nm com um conjunto de 7 amostras com concentrações

compreendidas entre 4,0 e 48,0 nm, utilizando como solvente o metanol (que será o branco desta análise).

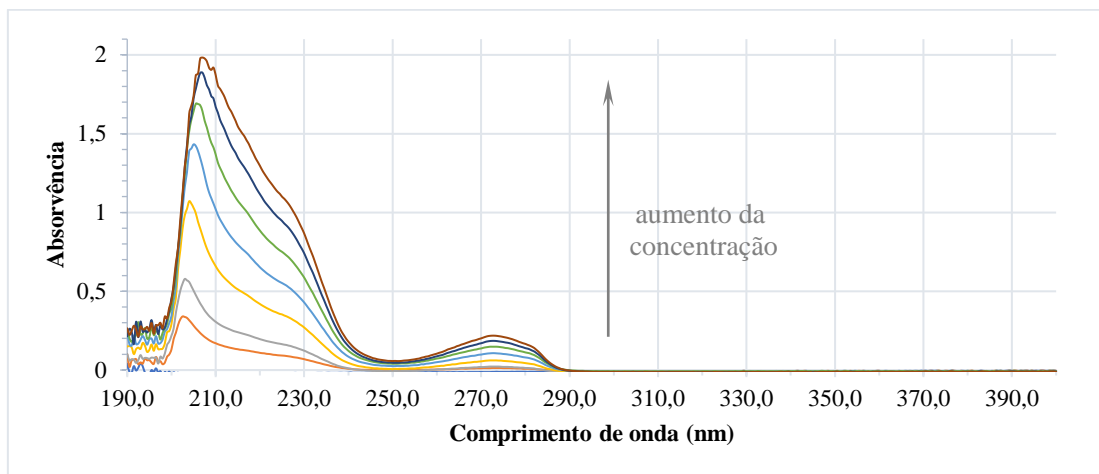


Figura 18: Espectros de absorção UV-vis da Ranolazina em metanol (190 e 400 nm), para uma gama de concentrações entre 4,0 e 48,0 ppm.

Os espectros apresentados na Figura 18 para soluções metanólicas de Ranolazina, mostram que acima dos 290 nm não há absorção de radiação. Assim, conseguimos restringir o região espectral de interesse para a análise, aquela em que existe absorção do analito, ao intervalo de comprimentos de onda compreendido entre 200 e 290 nm. Nesta região espectral as transições eletrônicas esperadas são as que envolvem as orbitais moleculares n e π , uma vez que as envolvem as orbitais σ , em geral, apenas são observadas a comprimentos de onda abaixo de 200 nm.⁷⁶ O efeito de concentração no espectro UV-vis da Ranolazina é notado até 48,0 ppm apenas pelo aumento sistemático da intensidade das bandas enquanto que o perfil das bandas não é alterado.

A evolução dos espectros com a concentração, contudo não se mantém sem alteração da estrutura de bandas para concentrações mais elevadas, na Figura 19 são apresentados os espectros relativos às concentrações de 16,0, 40,0 e 120,0 ppm de Ranolazina em metanol.

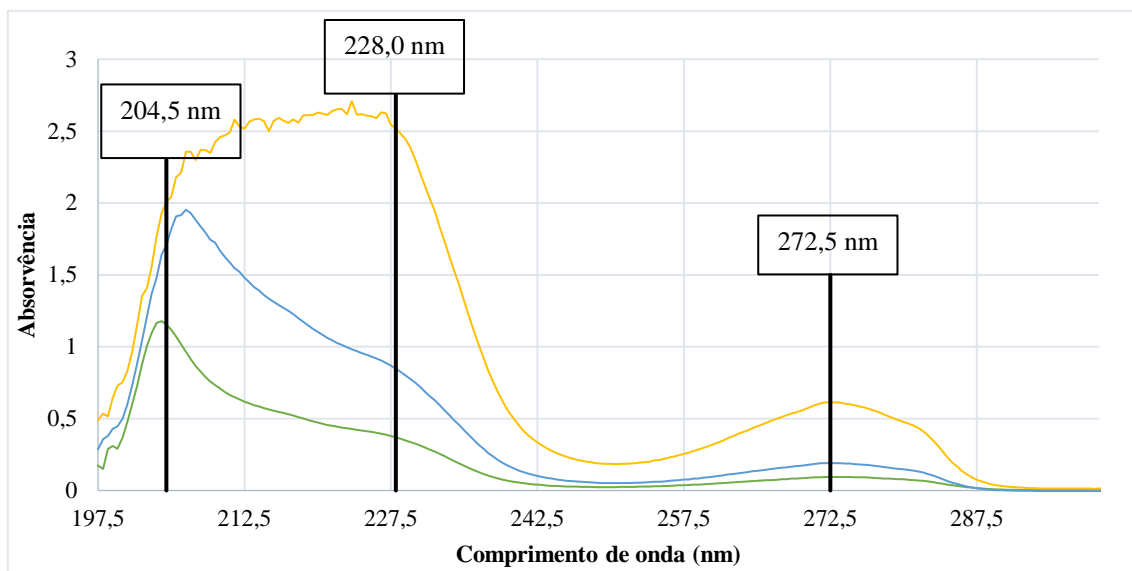


Figura 19: Pormenor do espectro de absorção UV-vis da Ranolazina em metanol, para as concentrações de 16,0 ppm (linha verde); 40,0 ppm (linha azul) e 120,0 ppm (linha amarela).

A estrutura do espectro reflete a complexidade da molécula de Ranolazina, apresentando duas bandas muito largas com máximos a 204,5 nm e a 272,5 nm, a concentrações mais baixas, sendo que ambas apresentam pontos de inflexão (ombros) que podem ser devidos à existência de grupos cromóforos idênticos, mas com diferentes grupos vizinhos. Estas bandas correspondem respetivamente a um máximo absoluto e um máximo relativo do espectro. Quando a concentração aumenta é possível observar também que ao comprimento de onda de 228,0 nm, muito visível no espectro relativo a 120 ppm, o ombro transforma-se no máximo de absorção da primeira banda. Esta variação pode ter duas explicações uma de carácter instrumental, em que a resposta do equipamento deixar de ser representativa da evolução com a concentração, por a radiação que chega ao detetor a ~200 nm ser demasiado baixa para se observar qualquer variação (de notar que os valores de absorvência já estão muito perto do limite instrumental). Outra hipótese é a transição envolvida $\pi \rightarrow \pi^*$ ser resultante de cromóforos distintos e o aumento de concentração não afetar ambos de igual modo. Este efeito diferenciado pode ser uma consequência do estabelecimento de diferentes interações intermoleculares com o solvente que se intensificam com o aumento de concentração e que se refletem mais para o cromóforo que se observa a 228,0 nm.

A estrutura da banda a 272,5 nm não têm alteração significativa com o aumento da concentração como se observa na Figura 20 onde se apresentam os espectros de 10 soluções de Ranolazina em metanol, com concentrações diferentes (16,0 a 480,0 ppm) na região espectral de 250,0 e 300 nm.

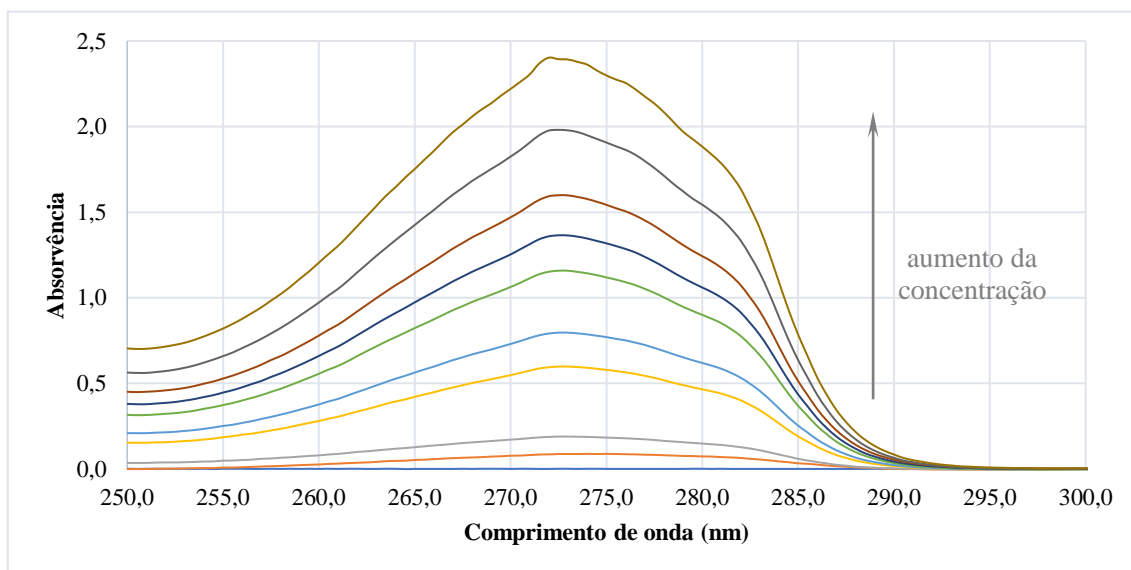


Figura 20: Espectro de absorção UV-vis da Ranolazina em metanol, para as concentrações de 16,0 - 480,0 ppm, na gama espectral de 250 a 300 nm.

Deste modo foi possível detetar qual a região espectral mais conveniente para a realização da análise da solução abrangendo todas as zonas de absorção do analito. Pela análise da evolução da banda com máximo de absorção a 272,5 nm é possível avaliar o comportamento da absorvência em função da concentração, verificando-se assim que existe uma evolução sistemática da absorvência com a concentração e que desta forma há possibilidade de se aplicar com algum sucesso a Lei de Lambert-Beer e consequentemente realizar uma análise quantitativa da Ranolazina a este comprimento de onda. Relativamente aos comprimentos de onda de 204,5 e 228,0 nm, embora não mostrando ser tão promissores, pelo menos para as concentrações mais elevadas, vão ser também utilizados na análise seguinte.

3.2.2. Curvas de calibração

A linearidade do método foi estudada através do cálculo da reta que ajusta os pontos experimentais pelo método dos mínimos quadrados, a evolução dos resíduos da regressão linear e o coeficiente de correlação da reta obtida. Foi feito o estudo a três comprimentos de ondas diferentes, como referido anteriormente a 204,5, 228,0 e 272,5 nm. As Figuras 21, 22, 23, são figuras compostas em que (A) representa a curva de calibração para a gama de concentrações em estudo [0,00 – 520,21] ppm, (B) representa a regressão linear e (C) a evolução dos resíduos, para cada comprimento de onda, respetivamente. O critério para a escolha dos pontos a utilizar no ajuste teve por base o

critério de obtenção do melhor coeficiente de determinação ($R^2 \sim 1$) com aleatoriedade dos resíduos.

Na Figura 21 são representados graficamente os dados espectrais obtidos para o comprimento de onda de 204,5 nm correspondente ao máximo de absorção para quase todos os padrões.

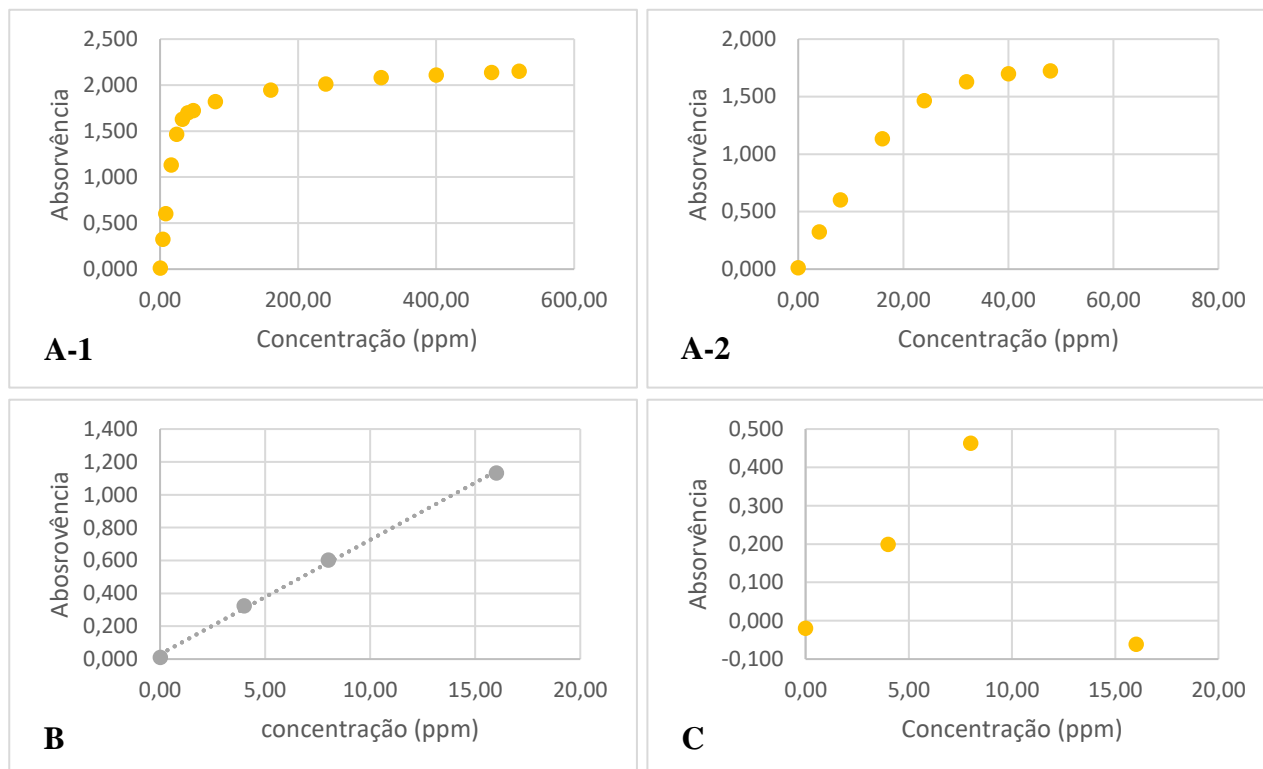


Figura 21: Curva de calibração para a Ranolazina em metanol a 204,5 nm, para a gama de concentrações: (A-1) [0,00 – 520,21] ppm; (A-2) [0,00 – 48,02] ppm. (B) reta de calibração e(C) gráfico dos resíduos .

Na análise a 204,5 nm, foi necessário ajustar a representação dos dados espectroscópicos a dois intervalos de concentração, para que fosse possível identificar o ponto de inflexão da curva, ou seja a zona de linearidade. Assim, são representados na Figura 21(A-1) todos os pontos experimentais e em (A-2) uma gama de concentrações menor. A análise desta última figura mostra que a reta de calibração poderá ter no máximo três padrões e o branco (quatro pontos). Embora este comprimento de onda seja o máximo absoluto, a relação entre a absorvência e a concentração apresenta linearidade para um conjunto de padrões muito reduzido, com um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9985. Por outro lado, o gráfico dos resíduos aparenta ter uma pequena tendência nos primeiros pontos, o que pode ter algum significado negativo devido ao número reduzido de padrões considerados para a construção da reta de calibração. A primeira

conclusão que se pode retirar deste comprimento de onda é a de que a ser utilizado teria que se considerar uma gama de concentrações muito baixa, até cerca de 16 ppm.

Na Figura 22 são representados os dados espectrais obtidos para o comprimento de onda de 228,0 nm.

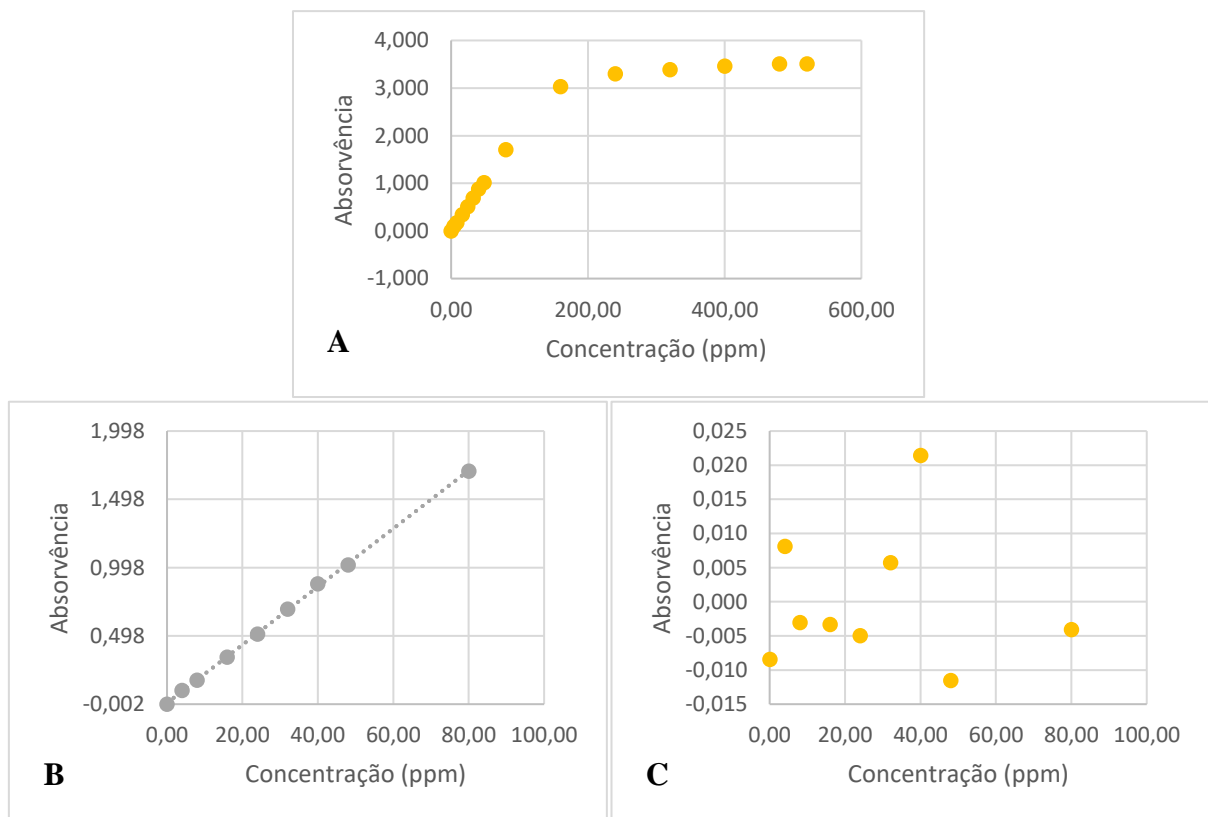


Figura 22: (A) Curva de calibração da Ranolazina em metanol a 228,0 nm na gama de concentrações [0,00 – 520,21] ppm, (B) reta de calibração e(C) gráfico dos resíduos.

A análise realizada a 228,0 nm para a totalidade dos pontos experimentais na Figura 22(A) mostra que se observa uma relação linear até ao padrão de concentração 80,03 ppm. Assim, foi construída a da reta de calibração (Figura 22(B)), que ao contrário da análise ao comprimento de onda anterior, mostra uma boa relação entre a absorvência e a concentração apresentando linearidade para um conjunto maior de padrões (no total 9 pontos incluindo o branco), com um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9996 o que indica uma boa relação linear entre a concentração dos padrões e a absorvência a este comprimento de onda. Ainda de notar que no gráfico dos resíduos, Figura 22(C) há completa aleatoriedade entre os pontos resíduo.

A representação gráfica dos dados espectrais obtidos para o comprimento de onda de 272,5 nm está na Figura 23.

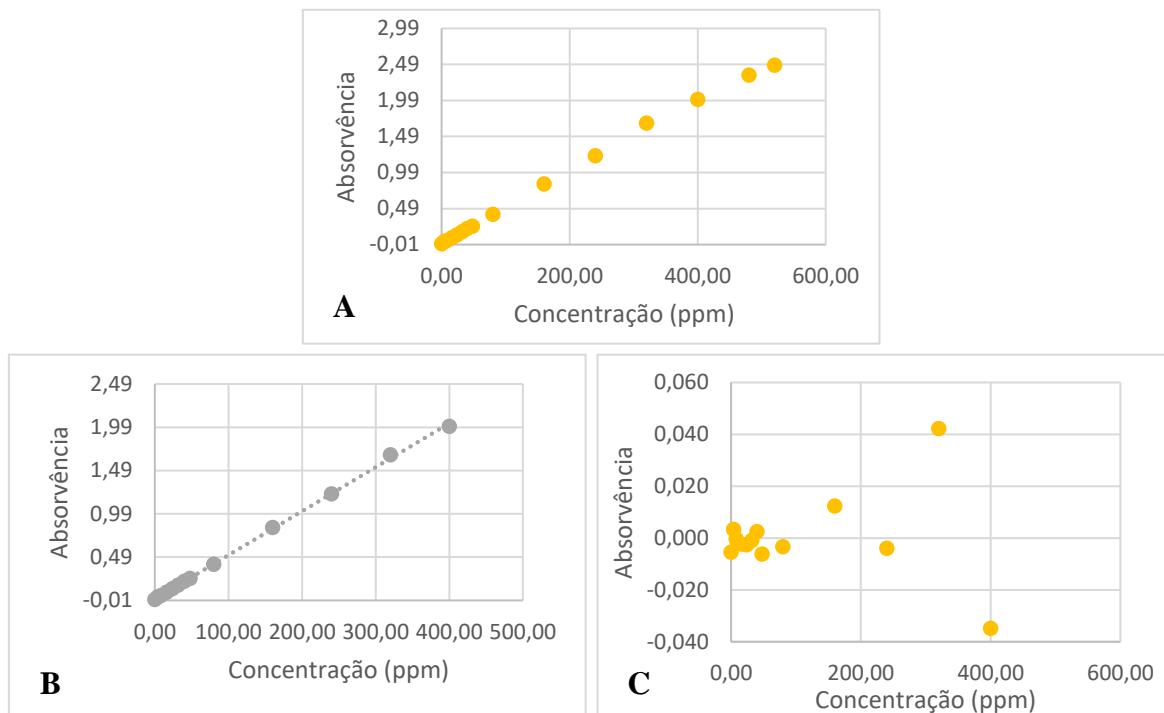


Figura 23: (A) Curva de calibração para a Ranolazina em metanol a 272,5 nm na gama de concentrações [0,00 – 520,21] ppm, (B) reta de calibração e (C) gráfico dos resíduos.

A Figura 23(A), mostra que a 272,5 nm, de uma forma geral, o intervalo de concentrações escolhido para este comprimentos de onda tem aparentemente um comportamento de evolução linear. O ajuste aos pontos experimentais, Figura 23(B), permite comprovar que há linearidade até 400,16 ppm, ou seja para um conjunto de 12 padrões e o branco (13 pontos no total), com um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9994. Na Figura 23(C) os resíduos não mostram qualquer tendência de evolução, ou seja são aleatórios, sendo uma prova adicional de que no ajuste dos pontos experimentais é possível utilizar esta reta.

Na Tabela 5 é apresentado o resumo dos resultados dos ajustes dos dados experimentais, da absorvência (S_{abs}) medida em função da concentração de Ranolazina (C_{ran}): equações das retas e os coeficientes de determinação (R^2) aos três comprimentos de onda escolhidos. As equações matemáticas utilizadas no cálculo do declive e ordenada na origem, assim como as respectivas incertezas, encontram-se na Tabela A4 – 1 no Anexo 4.

comprimentos de onda de análise (nm)	Equação da reta	R ²
204,5	$S_{\text{abs}} = (0,070 \pm 0,008)C_{\text{ran}} + (0,03 \pm 0,08)$	0,9985
228,0	$S_{\text{abs}} = (0,0213 \pm 0,0004) C_{\text{ran}} + (0,01 \pm 0,02)$	0,9996
272,5	$S_{\text{abs}} = (0,0050 \pm 0,0002) C_{\text{ran}} + (0,01 \pm 0,02)$	0,9994

Tabela 5: Equações das retas (para um grau de confiança de 95%) obtidas aos diferentes comprimentos de onda de análise da Ranolazina em solução utilizando como solvente o metanol.

O critério para a obtenção das retas apresentadas na tabela anterior foi utilizar os pontos experimentais com os quais se obtenha o melhor coeficiente de determinação.

Nas Tabelas 6,7 e 8 estão os resultado do teste de *outliers* (T- test), efetuado aos dados experimentais aos comprimentos de onda que foram utilizados na construção das retas de calibração. Este é um dos métodos que podem ser utilizados para provar que a reta escolhida é a mais adequada no que diz respeito aos pontos retirados (*outliers*).

	Concentração (ppm)	Absorvência	Valor mínimo	Valor máximo
Padrão 0	0,00	0,010	-0,093	0,151
Padrão 1	4,00	0,323	0,197	0,418
Padrão 2	8,00	0,602	0,478	0,694
Padrão 3	16,01	1,132	1,014	1,274
Padrão 4	24,01	1,463	1,526	1,876
Padrão 5	32,01	1,627	2,028	2,488
Padrão 6	40,02	1,696	2,526	3,105
Padrão 7	48,02	1,723	3,022	3,723
Padrão 8	80,03	1,820	4,998	6,205
Padrão 9	160,06	1,943	9,925	12,424
Padrão 10	240,10	2,011	14,849	18,646
Padrão 11	320,13	2,08	19,772	24,868
Padrão 12	400,16	2,11	24,694	31,092
Padrão 13	480,19	2,14	29,617	37,315
Padrão 14	520,21	2,15	32,078	40,426

Tabela 6: Intervalo de validação de *outliers* (Teste-t) de cada padrão a para a análise 204,5 nm da Ranolazina em solução de metanol.

	Concentração (ppm)	Absorvência	Valor mínimo	Valor máximo
Padrão 0	0,00	-0,001	-0,022	0,036
Padrão 1	4,00	0,100	0,064	0,121
Padrão 2	8,00	0,174	0,149	0,205
Padrão 3	16,01	0,344	0,320	0,375
Padrão 4	24,01	0,513	0,491	0,545
Padrão 5	32,01	0,694	0,661	0,715
Padrão 6	40,02	0,880	0,831	0,886
Padrão 7	48,02	1,017	1,001	1,057
Padrão 8	80,03	1,71	1,677	1,743
Padrão 9	160,06	3,03	3,359	3,467
Padrão 10	240,10	3,30	5,036	5,196
Padrão 11	320,13	3,39	6,712	6,926
Padrão 12	400,16	3,46	8,387	8,657
Padrão 13	480,19	3,51	10,062	10,388
Padrão 14	520,21	3,51	10,899	11,254

Tabela 7: Intervalo de validação de *outliers* (Teste-t) de cada padrão a para a análise 228,0 nm da Ranolazina em solução de metanol.

	Concentração (ppm)	Absorvência	Valor mínimo	Valor máximo
Padrão 0	0,00	-0,0003	-0,035	0,046
Padrão 1	4,00	0,029	-0,015	0,09257
Padrão 2	8,00	0,045	0,005	0,15180
Padrão 3	16,01	0,084	0,046	0,28241
Padrão 4	24,01	0,124	0,087	0,41649
Padrão 5	32,01	0,167	0,128	0,55484
Padrão 6	40,02	0,211	0,168	0,69669
Padrão 7	48,02	0,243	0,209	0,81042
Padrão 8	80,03	0,41	0,372	1,34947
Padrão 9	160,06	0,83	0,778	2,71344
Padrão 10	240,10	1,22	1,184	4,03078
Padrão 11	320,13	1,67	1,590	5,55753
Padrão 12	400,16	2,00	1,995	6,89127
Padrão 13	480,19	2,34	2,399	8,36213
Padrão 14	520,21	2,48	2,601	9,05974

Tabela 8: Intervalo de validação de *outliers* (Teste-t) de cada padrão a para a análise 272,5 nm da Ranolazina em solução de metanol.

A análise das tabelas anteriores permite verificar que ao comprimento de onda de 204,5 nm apenas os três primeiros padrões se encontram, dentro do intervalo de absorvências estimado, o que indica que os restantes pontos, que foram retirados para a construção da reta de calibração, estão efetivamente fora da linearidade. Os valores de absorvência a 228,0 nm dos padrões [160,06 – 520,21] ppm encontram-se fora do intervalo estabelecido pelo Teste-t, justificando assim a retirada desses pontos pois são de facto *outliers*. Embora a reta de calibração a 272,5 nm com os padrões compreendidos entre [4,00 – 320,13] ppm, apresente um coeficiente de determinação de 0,9997, melhor do que o obtido com a reta incluindo o padrão com concentração de 400,16 ppm, (com $R^2=0,9994$), o teste de *outliers* mostra que este não pode ser considerado um *outlier*, uma vez que o valor da absorvência se encontra dentro do intervalo estimado. Contudo, a diferença de valores do coeficiente de determinação é muito pequena e mostra em ambos os casos que os pontos experimentais podem igualmente ser bem descritos através da equação de uma reta.

Na tabela seguinte (Tabela 9), apresentam-se os resultados do teste de homogeneidade de variâncias (Teste-F), para que se possa garantir a aplicabilidade do método dos mínimos quadrados no cálculo da melhor reta que representa os pontos experimentais, quando se tratam dos dados espectrais obtidos aos comprimentos de onda escolhidos para a análise.

Padrão	Concentração (ppm)	204,5 nm		228,0 nm		272,5 nm	
		Absorvência	F _{obs}	Absorvência	F _{obs}	Absorvência	F _{obs}
Padrão 0	0,000	0,010	---	-0,001	---	0,000	---
Padrão 1	4,002	0,323	0,265	0,100	37,000	0,029	28,000
Padrão 2	8,003	0,602	4,846	0,174	0,189	0,045	0,143
Padrão 3	16,006	1,132	1,000	0,344	2,286	0,084	0,000
Padrão 4	24,010			0,513	0,188	0,124	0,000
Padrão 5	32,013			0,694	7,000	0,167	0,143
Padrão 6	40,016			0,880	3,000	0,211	13,000
Padrão 7	48,019			1,017	0,302	0,243	2,154
Padrão 8	80,032			1,706	4,421	0,408	0,321
Padrão 9	160,064					0,830	4,333
Padrão 10	240,096					1,220	2,077
Padrão 11	320,128					1,672	17,568
Padrão 12	400,160					2,002	0,093

Tabela 9: Valores do teste de homogeneidade de variância para a análise da Ranolazina em metanol aos comprimentos de onda de 204,5; 228,0 e 272,5 nm

O parâmetro F_{obs} calculado será comparado com o $F_{crítico}$, para o número de graus de liberdade de 2 (tanto para o numerador como para o denominador). Para 5% de significância o $F_{crítico}$ retirado da tabela de distribuição de Fisher é de 19,000.¹⁰⁰ Na tabela anterior pode ser observado que para todos os pontos experimentais utilizados para calcular a melhor reta de ajuste o F_{obs} é inferior ao $F_{crítico}$ à exceção do padrão 1 tanto para o comprimento de onda de 228,0 e 272,5 nm e por isso garantimos que há homogeneidade de variância entre os pontos experimentais, logo o método dos mínimos quadrados pode ser utilizados no cálculo da retas.

3.2.3. Parâmetros principais do método de análise

A caracterização de um método de análise implica o estudo de alguns dos seus parâmetros tais como os limites (deteção quantificação e linearidade), a sensibilidade, a gama de trabalho e a gama dinâmica. Os resultados desta análise estão na Tabela 10 para os três comprimentos de onda escolhidos, tendo sido aplicadas as equações matemáticas já referidas no início desta secção.

	204,5 nm	228,0 nm	272,5 nm
sensibilidade (ppm^{-1})	0,070 \pm 0,008	0,021 \pm 0,0004	0,0051 \pm 0,0002
LL (ppm)	15,8	79,8	393,3
LD (ppm)	0,9	1,53	10,2
LQ (ppm)	3,2	5,1	33,9
Gama de trabalho (ppm)	[3,2 – 15,8]	[5,1 – 79,8]	[33,9 – 393,3]
GD	4,9	15,7	11,6

Tabela 10: Parâmetros do método aos diferentes comprimentos de onda para a análise da Ranolazina em solução de metanol.

O número de padrões utilizado para a obtenção de regressão linear variam nos três comprimentos de onda de análise, uma vez que as bandas de absorção não têm um comportamento semelhante com o aumento da concentração, sendo que a análise a 204,5 nm apenas apresenta linearidade até a uma concentração de 15,8 ppm, enquanto que para 228,0 e 272,5 nm têm um limite de linearidade de 79,8 ppm e 272,5 nm, respetivamente. No que diz respeito ao limite de quantificação, naturalmente este também varia e, à semelhança do que acontece com o limite de linearidade é possível observar que à medida que o comprimento de onda aumenta a gama de trabalho apresenta um maior intervalo, ou seja, a 204,5 nm apenas se poderá fazer a análise com um número muito reduzido de padrões, cujo as concentrações são muito próximas umas

das outras, sendo que foi para este comprimento de onda que se obteve o maior valor de sensibilidade. Analisando a gama dinâmica percebemos que a análise a 228,0 nm é aquela que apresenta uma maior gama dinâmica, ou seja, tem uma maior gama de concentrações onde o comportamento do sinal instrumental é linear, ao contrário do verificado para a análise a 204,5 nm.

A repetibilidade espectrofotométrica, pode ser obtida pelo coeficiente de variação relativo (CV) das leituras de cada padrão sendo uma indicação da qualidade dos resultados obtidos pois afere a variação entre leituras realizadas pelo mesmo analista, num curto intervalo de tempo, utilizando o mesmo equipamento. Na Tabela A4 – 1 do Anexo 4 estão representadas todas as leituras efetuadas, três para cada padrão, para todos os padrões aos diferentes comprimentos de onda, assim como a média dessas leituras e o desvio padrão entre elas. Na Tabela 11, apresenta-se o coeficiente de variação em percentagem para este conjunto de padrões.

Padrão	Concentração (ppm)	CV (%)		
		204,5 nm	228,0 nm	272,5 nm
Padrão 0	0,000	-	-	-
Padrão 1	4,002	0,644	3,500	10,657
Padrão 2	8,003	0,761	0,876	2,547
Padrão 3	16,006	0,405	0,671	0,000
Padrão 4	24,010	0,142	0,195	1,229
Padrão 5	32,013	0,128	0,381	0,346
Padrão 6	40,016	0,223	0,521	0,988
Padrão 7	48,019	0,089	0,247	1,259
Padrão 8	80,032	0,127	0,310	0,425
Padrão 9	160,064	0,154	0,125	0,434
Padrão 10	240,096	0,057	0,229	0,426
Padrão 11	320,128	0,268	0,221	1,302
Padrão 12	400,160	0,072	0,435	0,333
Padrão 13	480,190	0,221	0,171	0,348
Padrão 14	520,210	0,635	0,525	0,230

Tabela 11: Coeficiente de variação do sinal dos padrões, em unidades de absorvência, para a análise da Ranolazina em solução de metanol.

Os valores do coeficiente de variação das leituras efetuadas a cada padrão aos comprimentos de onda de análise, de acordo com a tabela anterior, encontram-se entre 0 e 3,5 % para a quase totalidade das leituras efetuadas. Verificou-se uma única exceção para a solução com concentração de 4,002 ppm (Padrão 1) em que se obteve o valor bastante mais elevado de 10,66 % na análise 272,5 nm. Este padrão é também o que apresenta o maior valor de %CV a 228,0 nm. Assim, os resultados mostram que existe

uma boa repetibilidade espectrofotométrica aos três comprimentos de onda para o conjunto de padrões analisados. A média de %CV a cada comprimento de onda, embora seja apenas indicativo, aponta para uma melhor repetibilidade espectrofotométrica das leituras efetuadas a 204,5 nm e pior a 272,5 nm.

3.2.4. Quantificação da Ranolazina em comprimidos Ranexa 750

Com base no sinal das amostras e a equação da reta obtida através da relação entre o sinal e a concentração dos padrões, é possível calcular a concentração das amostras por interpolação da reta.

Padrões	Absorvência			Concentração (ppm)		
	204,50 nm	228,00 nm	272,50 nm	204,50 nm	228,00 nm	272,50 nm
Am1_1	1,638	0,721	0,179	(*)	33,6 ± 0,5	(*)
Am1_2	1,628	0,700	0,170	(*)	32,6 ± 0,5	(*)
Am1_3	1,626	0,693	0,166	(*)	32,2 ± 0,5	(*)
Am2_1	1,618	0,691	0,166	(*)	32,1 ± 0,5	(*)
Am2_2	1,613	0,679	0,159	(*)	31,6 ± 0,5	(*)
Am2_3	1,611	0,685	0,161	(*)	31,9 ± 0,5	(*)
Am3_1	1,588	0,639	0,151	(*)	29,7 ± 0,5	(*)
Am3_2	1,597	0,644	0,153	(*)	29,9 ± 0,5	(*)
Am3_3	1,590	0,643	0,151	(*)	29,9 ± 0,5	(*)
Am4_1	1,614	0,683	0,160	(*)	31,8 ± 0,5	(*)
Am4_2	1,610	0,673	0,156	(*)	31,3 ± 0,5	(*)
Am4_3	1,616	0,680	0,160	(*)	31,6 ± 0,5	(*)
Am5_1	1,608	0,675	0,159	(*)	31,4 ± 0,5	(*)
Am5_2	1,616	0,680	0,163	(*)	31,6 ± 0,5	(*)
Am5_3	1,613	0,674	0,159	(*)	31,3 ± 0,5	(*)
Am6_1	2,051	3,389	1,580	(*)	(*)	310 ± 2
Am6_2	2,078	3,372	1,591	(*)	(*)	312 ± 2
Am6_3	2,061	3,384	1,592	(*)	(*)	313 ± 2
Am7_1	2,070	3,387	1,621	(*)	(*)	318 ± 2
Am7_2	2,079	3,395	1,638	(*)	(*)	322 ± 2
Am7_3	2,076	3,394	1,642	(*)	(*)	322 ± 2
Am8_1	2,043	3,340	1,396	(*)	(*)	274 ± 2
Am8_2	2,071	3,385	1,639	(*)	(*)	322 ± 2
Am8_3	2,056	3,385	1,637	(*)	(*)	321 ± 2
Am9_1	2,081	3,370	1,647	(*)	(*)	323 ± 2
Am9_2	2,079	3,380	1,648	(*)	(*)	324 ± 2
Am9_3	2,075	3,391	1,650	(*)	(*)	324 ± 2
Am10_1	2,062	3,381	1,630	(*)	(*)	320 ± 2
Am10_2	2,084	3,390	1,640	(*)	(*)	322 ± 2
Am10_3	2,068	3,391	1,639	(*)	(*)	322 ± 2

Tabela 12: Concentração de Ranolazina nas soluções de trabalho, para um grau de confiança de 95%, utilizando como solvente metanol e obtidas por dissolução de comprimidos Ranexa 750. (*) Valores de concentração sem significado analítico por estarem fora da gama de trabalho.

A Tabela 12, onde se encontram os resultados da análise aos três comprimentos de onda (concentrações para um grau de confiança de 95%), mostra que para a análise a 204,5 nm, nenhuma das amostras se encontra dentro da gama de trabalho (3,2–15,8 ppm) e por essa razão o resultado obtido não tem significado analítico. No caso da análise a 228,0 nm, das 10 amostras preparadas apenas as amostras 1 a 5 se encontram dentro da gama de trabalho (5,1 – 79,8 ppm), enquanto que a 272,5 nm, somente as amostras 6 a 10 apresenta ter uma concentração dentro da gama de trabalho (33,9 – 393,3 ppm).

A totalidade das leituras feitas individualmente a cada uma das soluções de concentração conhecida preparadas e respectivas médias desses três replicados encontram-se na Tabela A4 – 2 no Anexo 4. Foram realizadas duas séries de amostras com concentrações distintas, uma vez que as gamas de concentrações são diferentes para cada comprimento onda, desta forma é possível analisar amostras aos diferentes comprimentos de onda (228,0 e 272,5 nm), pelo que existem duas referências para média, uma para a gama de concentrações mais baixas e a outra para a gama de concentrações mais elevadas. Nesta mesma tabela é também apresentado os valor tanto do desvio padrão como da %CV, obtido através das equações anteriormente apresentadas. Para o conjunto de amostras com concentrações mais baixas verifica-se uma %CV entre 0,030 e 0,183%, enquanto que para o conjunto de amostras mais concentradas observa-se a %CV entre 0,79 e 68,7%. Posto isto, os resultados para as concentrações mais baixas mostram que existe boa repetibilidade espectrofotométrica para o comprimento de onda de 228,0, ao contrário do que se verifica para as amostras de concentrações mais elevadas analisadas a 272,5 nm, que apresentam valores muito elevados, mostrando que a repetibilidade espectrofotométrica não é boa. Nessa mesma tabela é apresentada a massa de Ranolazina equivalente a cada amostra dos triplicados (de leituras), a média dessas massas de Ranolazina estão apresentadas na Tabela 13, assim como a massa de Ranolazina em cada comprimido, calculado através da Equação 11, e os respetivos coeficientes de variação e erro absoluto associado.

$$m_{ranolazina\ experimental} (1\ cp.) = \frac{(m_{amostra} \times m_{1\ cp})}{m_{utilizada\ do\ cp}} \quad \text{Equação 11}$$

Amostras		Massa média de Ranolazina por comprimido (mg)	%CV	Erro absoluto (mg)
Am_1	228,0 nm	920,1 ± 0,5	1,71	170,15
Am_2		894,2 ± 0,5	0,72	144,21
Am_3		837,5 ± 0,5	0,34	87,49
Am_4		885,9 ± 0,5	0,62	135,85
Am_5		882,8 ± 0,5	0,39	132,77
Am_6	272,5 nm	875 ± 2	0,34	124,99
Am_7		900 ± 2	0,56	150,42
Am_8		858 ± 2	7,35	108,22
Am_9		909 ± 2	0,08	158,53
Am_10		902 ± 2	0,28	151,90
Média global		886,45	1,24	136,45

Tabela 13: Massa média de Ranolazina por comprimido, coeficiente de variação (em %) da massa obtida e respetivo erro absoluto associado.

A maioria dos valores de %CV obtidos para a massa média de Ranolazina por comprimido na tabela anterior, apresentam valores inferiores a 2, o que nos indica existe uma boa repetibilidade entre as amostras, pois consideram-se aceitáveis, de acordo com a teoria de Horwitz, valores até 8 %. Apenas a Am_8 apresenta uma %CV de 7,35, sendo a única que se encontra perto do limite máximo, mas ainda aceitável tendo em conta os critérios definidos. Contudo a exatidão do método não é boa, tendo em conta que o erro absoluto é da ordem da centena de mg, o que corresponde a um erro relativo superior a 11% para todas as amostras.

A Tabela 14 apresenta todas as amostras fortificadas preparadas para os três comprimentos de onda e a respetiva concentração, aquelas que é possível calcular, tendo em conta os parâmetros obtido para o método, através da extrapolação da reta. A percentagem de recuperação para cada amostra fortificada aos comprimentos de onda a que a análise foi efetuada, obtida através da Equação 8, encontra-se na Tabela 15.

Padrões	Absorvência			Concentração (ppm)		
	204,5 nm	228,0 nm	272,5 nm	204,5 nm	228,0 nm	272,5 nm
Amf1_1	0,594	0,174	0,044	(*)	7,8	(*)
Amf1_2	0,575	0,162	0,040	(*)	7,3	(*)
Amf1_3	0,572	0,172	0,049	(*)	7,8	(*)
Amf2_1	0,774	0,242	0,070	(*)	11,0	(*)
Amf2_2	0,737	0,219	0,059	(*)	10,0	(*)
Amf2_3	0,717	0,208	0,052	(*)	9,4	(*)
Amf3_1	0,673	0,194	0,049	(*)	8,8	(*)
Amf3_2	0,692	0,201	0,053	(*)	9,1	(*)
Amf3_3	0,690	0,204	0,055	(*)	9,3	(*)
Amf4_1	0,705	0,209	0,057	(*)	9,5	(*)
Amf4_2	0,698	0,198	0,052	(*)	9,0	(*)
Amf4_3	0,689	0,203	0,059	(*)	9,2	(*)
Amf5_1	0,709	0,219	0,063	(*)	10,0	(*)
Amf5_2	0,673	0,196	0,052	(*)	8,9	(*)
Amf5_3	0,684	0,195	0,051	(*)	8,8	(*)
Amf6_1	1,998	3,243	1,104	(*)	(*)	216
Amf6_2	1,986	3,250	1,100	(*)	(*)	216
Amf6_3	1,994	3,241	1,102	(*)	(*)	216
Amf7_1	1,982	3,235	1,079	(*)	(*)	212
Amf7_2	1,990	3,226	1,092	(*)	(*)	214
Amf7_3	1,995	3,229	1,089	(*)	(*)	214
Amf8_1	1,976	3,242	1,093	(*)	(*)	214
Amf8_2	1,976	3,226	1,090	(*)	(*)	214
Amf8_3	1,977	3,242	1,092	(*)	(*)	214
Amf9_1	1,989	3,229	1,081	(*)	(*)	212
Amf9_2	1,970	3,234	1,090	(*)	(*)	214
Amf9_3	1,973	3,217	1,091	(*)	(*)	214
Amf10_1	1,996	3,248	1,087	(*)	(*)	213
Amf10_2	1,987	3,234	1,091	(*)	(*)	214
Amf10_3	1,992	3,241	1,089	(*)	(*)	214

Tabela 14: Dados espectroscópicos das amostras fortificadas e respectivas concentrações, da análise da Ranolazina em comprimidos Ranexa 750 utilizando como solvente metanol (*). Valores de concentração sem significado analítico por estarem fora da gama de trabalho.

Amostra fortificada		Concentração (ppm)	% Recuperação	% Recuperação média	% CV
Amf1_1	228,0 nm	7,8	129,3%	123,8%	5,0
Amf1_2		7,3	115,2%		
Amf1_3		7,8	126,9%		
Amf2_1		11,0	209,1%	186,8%	8,9
Amf2_2		10,0	182,1%		
Amf2_3		9,4	169,2%		
Amf3_1		8,8	152,8%	159,4%	3,1
Amf3_2		9,1	161,0%		
Amf3_3		9,3	164,5%		
Amf4_1		9,5	170,4%	163,7%	3,2
Amf4_2		9,0	157,5%		
Amf4_3		9,2	163,3%		
Amf5_1		10,0	182,1%	163,7%	8,0
Amf5_2		8,9	155,1%		
Amf5_3		8,8	153,9%		
Amf6_1	272,5 nm	216	85,16%	84,9%	0,2
Amf6_2		216	84,67%		
Amf6_3		216	84,91%		
Amf7_1		212	82,08%	83,0%	0,8
Amf7_2		214	83,68%		
Amf7_3		214	83,31%		
Amf8_1		214	83,80%	83,6%	0,2
Amf8_2		214	83,43%		
Amf8_3		214	83,68%		
Amf9_1		212	82,33%	83,1%	0,7
Amf9_2		214	83,43%		
Amf9_3		214	83,56%		
Amf10_1		213	83,07%	83,3%	0,2
Amf10_2		214	83,56%		
Amf10_3		214	83,31%		

Tabela 15: Percentagens de recuperação obtidas de cada amostra fortificada e média dos valores, %CV associada a cada padrão.

Os resultados mostram que para todas as amostras, a 228,0 nm e 272,5 nm, o teor obtido é superior ao de referência (750 mg). Os ensaios de recuperação para as amostras 1 – 5 e análise a 228,0 nm têm uma percentagem de recuperação superior a 120%, enquanto que nas amostras 6 – 10 e análise a 272,5 nm, as percentagens de recuperação rondam os 80%. Sendo que os valores de referência se encontram entre 80 e 120 %.¹⁰⁴ Assim, tendo em conta estes resultados o método de análise para a

quantificação de Ranolazina em solução de metanol por espectroscopia de absorção UV-vis é possível concluir que há uma clara influência do excipiente quando aplicado a amostras de comprimidos Ranexa na análise aos comprimentos de onda com recuperações superiores a 120 % (228 nm). Esta interferência poderá estar relacionada com a sobreposição do espectro UV-vis da Ranolazina com o do excipiente. A análise a 272,5 nm, com recuperações entre 81,1 e 84,9 %, embora os valores estejam na gama aceitável, parece indicar uma possível perda de analito.

3.2.5. Comparação do método desenvolvido com outros trabalhos publicados

Na farmacopeia, como já foi referido até ao momento, a Ranolazina não se encontra descrita, pelo que não é possível a comparação destes resultados com métodos aprovados para a quantificação da molécula em comprimidos de acordo com a Farmacopeia Portuguesa.

Contudo, na pesquisa bibliográfica realizada foi possível encontrar vários trabalhos relacionados com a quantificação de Ranolazina em solução utilizando técnicas espectroscópicas, pelo que a sua comparação com os resultados obtidos neste trabalho é pertinente.¹⁰⁵⁻¹⁰⁹ Existem ainda publicados outros trabalhos para a quantificação de Ranolazina em que são utilizadas outras técnicas de análise como a cromatografia líquida a alta pressão (*High-Pressure Liquid Chromatography*, HPLC), com diferentes fases móveis, nomeadamente metanol com trietilamina a 0,5% com pH de 6 e ácido fosfórico, com uma proporção de 75:25, com detecção espectrofotométrica e a análise realizada a 271 nm¹¹⁰, por outro lado também foi feita uma análise por HPLC mas usando acetonitrilo e ácido fórmico a 0,1% numa proporção de (90:10).¹¹¹ Outro estudo desenvolvido em cromatografia líquida a alta pressão de fase reversa (*Reverse Phase High-Pressure Liquid Chromatography*, RT-HPLC) a 224 nm e utilizando como fase móvel solução tampão e acetonitrilo com uma proporção de 60:40.¹¹² Foram ainda desenvolvidos outros métodos de análise utilizando a técnica de cromatografia líquida (*Liquid Chromatography*, LC), utilizando vários solventes, no entanto o que se verifica é que o metanol é um dos mais recorrentes puro ou associado a outros.¹⁰⁵ Para além destas técnicas também existe informação acerca da determinação de Ranolazina em quantidades residuais por cromatografia gasosa (*Gas Chromatography*, GC).^{105,113}

Nos estudos utilizando espectroscopia como técnica de análise, as condições experimentais variam de forma significativa, em particular o comprimento de onda de

análise, desde os 200 até aos 273 nm¹⁰⁶, que poderá ter um grande impacto nos resultados obtidos. Tendo em conta que o excipiente é uma mistura mais ou menos complexa de vários componentes, a sobreposição de bandas na análise nesta região espectral é determinante para a adequação da análise ao objetivo proposto, ou seja para a qualidade dos resultados. Para todos os trabalhos que se referem de seguida o solvente utilizado foi o metanol, à semelhança do que acontece neste trabalho.

Do estudo feito por *Jayprakash B. Ugale e Sugandha V. Mulgund*¹⁰⁷, em que da realização da quantificação de amostras a 271 nm, resultou uma regressão linear com 6 padrões com concentrações compreendidas entre 75 – 200 ppm, obtendo-se como limite de quantificação 32,63 ppm e percentagens de recuperação que rondam os 99,0% com uma sensibilidade de 0,7054 ppm⁻¹. Enquanto *Ashish Sharma*¹⁰⁸, realizou um estudo a 272 nm, com 10 padrões e concentrações entre 10 e 100 ppm, apresentando resultados para o limite de quantificação de 0,82 ppm, as percentagens de recuperação também perto dos 99,0% e com uma sensibilidade de 0,0061 ppm⁻¹. Outro trabalho publicado por *Ramesh J et al*¹⁰⁹, a análise foi efetuada a 282 nm e 6 padrões num intervalo de concentrações entre 10 e 35 ppm, tendo obtido um limite de quantificação de 0,021 ppm e percentagens de recuperação que rondam uma vez mais os 99,0%, e a sensibilidade de 0,0153 ppm⁻¹.

Da análise bibliográfica podemos concluir que os protocolos seguidos diferem entre eles no que diz respeito às gamas de trabalho e ao número de padrões utilizados. A escolha do comprimento de onda de análise também foi diferente, tendo sido efetuada a análise a 271 ou 272 nm (próximos do utilizado neste trabalho) mas também a 282 nm.

Comparando as condições experimentais e os resultados obtidos no presente trabalho para a gama de trabalho e limite de quantificação (LQ= 33,9 ppm, e LL= 393,3 ppm), para a análise a 272,5 ppm, o mais próximo é descrito por *Jayprakash B. Ugale e Sugandha V. Mulgund*¹⁰⁷. No que diz respeito à sensibilidade do método, o trabalho que apresenta o parâmetro mais próximo do obtido com o trabalho realizado (0,0050 ppm⁻¹) é o descrito por *Ashish Sharma*¹⁰⁸, que utilizando o mesmo comprimento de onda obteve uma sensibilidade de 0,0061.

Nas publicações discutidas o único parâmetro do método que aparenta ser constante é a percentagem de recuperação, de 99 %, mostrando que não há interferência significativa do excipiente ou perda de analito durante a análise, pelo menos para

amostras de comprimidos de Ranexa 500 mg. Se compararmos este valor com os resultados dos ensaios de recuperação obtidos neste trabalho, em que se utilizou como amostra comprimidos de Ranexa 750 mg, é notório que o método proposto terá que ter alterações, pois a percentagem de recuperação ou está fora da gama de aceitabilidade ou nos seus limites.

Deste modo podemos concluir que o método desenvolvido não cumpre completamente os objectivos e necessita de adaptações para a análise de comprimidos Ranexa 750 mg. Algumas causas que podem justificar os resultados, são a grande influência do excipiente na análise, mas também o facto da solubilidade da Ranolazina ser reduzida em muitos dos solventes mais comuns, e mesmo nos poucos solventes em que a solubilidade é razoável, esta não solubiliza da melhor forma, podendo conduzir assim a erros na concentração dos padrões e amostras preparadas que se refletirá nos resultados de recuperação como perdas de analito (percentagem de recuperação muito inferior a 100 %). Tendo em conta isso, a análise do composto em solução representa um obstáculo relacionado com a escolha do solvente e a solubilização do analito.

3.3. Quantificação de Ranolazina em Amostras Sólidas por UV-Vis em Refletância Difusa (DRUV)

3.3.1. Espectros de refletância difusa no UV-Vis

A Ranolazina, como já foi referido, é solúvel em poucos solventes e naqueles em que é solúvel é de difícil dissolução, por esse motivo estudou-se a hipótese de fazer a sua quantificação em comprimidos de Ranexa no estado sólido e a eliminação de solventes na análise. Foram preparadas amostras sólidas por mistura mecânica (mistura do pó de Ranolazina com uma matriz também em pó), não sendo utilizado qualquer solvente, e também por adsorção em matriz sólida (adição de uma quantidade de solução metanólica de Ranolazina a uma matriz sólida). A matriz testada foi o PROSOLV[®], mistura utilizada como excipiente na indústria farmacêutica, de forma a mimetizar o excipiente dos comprimidos da amostra (Ranexa).

Realizou-se o estudo espectral para a Ranolazina por refletância difusa no UV-Vis na região espectral compreendida entre 200 e 400 nm. À semelhança do que já se tinha concluído para o estudo em solução, os espectros não apresentam bandas de absorção acima dos 300 nm. No estudo do efeito de concentração foram preparados

padrões de Ranolazina com concentrações compreendidas entre 50,63 e 166,64 ppm, para traçar os espectros por refletância difusa no UV-Vis.

Na Figura 24 apresentam-se os espectros de três padrões com concentrações entre 50,63 e 108,73 ppm. Em cima na figura é mostrada a evolução da intensidade da radiação dispersa por refletância difusa [%(R_{∞})] com a concentração, enquanto que em baixo está essa mesma evolução para a função de remissão [$F(R_{\infty})$], ou seja após aplicar aos espectros iniciais a função de Kubelka-Munk (Equação 3), esta transformação torna os espectros equivalentes aos obtidos em solução (em absorvência).

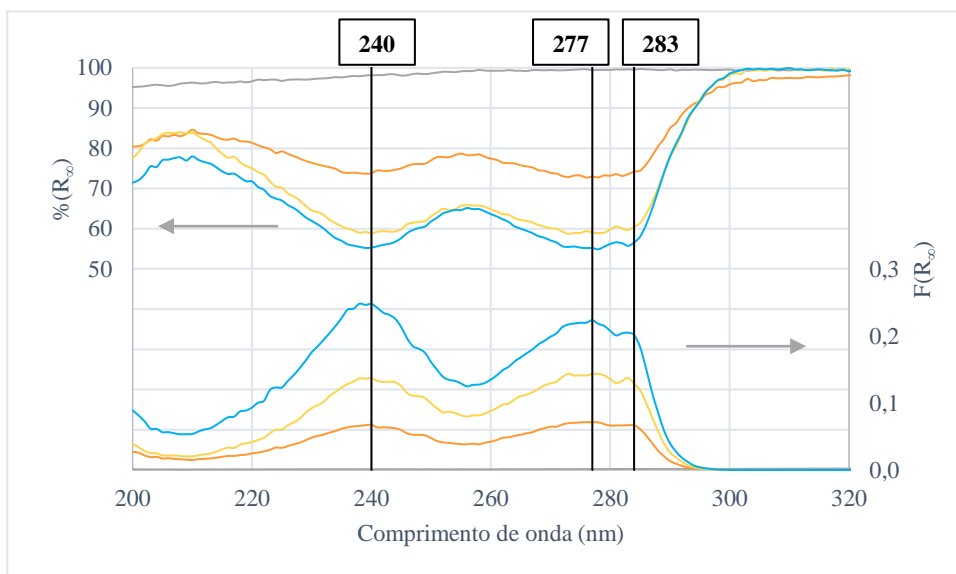


Figura 24: Espectros DRUV da Ranolazina em mistura mecânica com PROSOLV[®], para as concentrações de 0,0 ppm (linha cinzenta), 50,63 ppm (linha laranja), 63,21 ppm (linha amarela) e 108,73 ppm (linha azul), na gama espectral de 200 a 300 nm.

Nos espectros é possível observar uma banda bem definida com máximo a 240 nm e uma segunda banda que resulta da sobreposição de duas ou mais bandas e que apresenta um máximo de absorção a 277 nm e um máximo relativo a 283 nm, menos clara nos espectros com sinal de % R_{∞} mas que se torna bastante mais evidente após aplicar a função de Kubelka-Munk a esses espectros para obter o sinal em unidades de $F(R_{\infty})$. De facto, consegue-se perceber que a influência da concentração com o aumento desta é mais visível quando se utiliza a função de remissão uma vez que os espectros têm maior variação de intensidade, nomeadamente para os padrões de 63,21 e 108,73 ppm, apresentam-se bastante sobrepostos em alguns pontos na figura de % R_{∞} . De acordo com os espectros apresentados na figura anterior os comprimentos de onda escolhidos para a análise foram 240, 277 e 283 nm.

Em paralelo ao estudo anterior, foram preparados padrões por adsorção em matriz de PROSOLV[®] e obtidos utilizando uma solução metanólica de Ranolazina. Sabendo que o analito é difícil de solubilizar, mesmo nos solventes em que é solúvel, estes estudos tiveram como objetivo ver o efeito da fraca solubilidade na análise, mas também estudar as interações que eventualmente se podem estabelecer entre a matriz e o analito aquando do processo de preparação do comprimido envolvendo via húmida.

Na Figura 25 são apresentados os espectros correspondentes aos ensaios dos padrões obtidos por adsorção de Ranolazina em PROSOLV[®], que apresentam coerência de evolução com a concentração entre 1998,6 e 8000,8 ppm. A figura mostra a evolução entre $\% (R_{\infty})$ (acima) e $F(R_{\infty})$ (abaixo) com a concentração dos padrões .

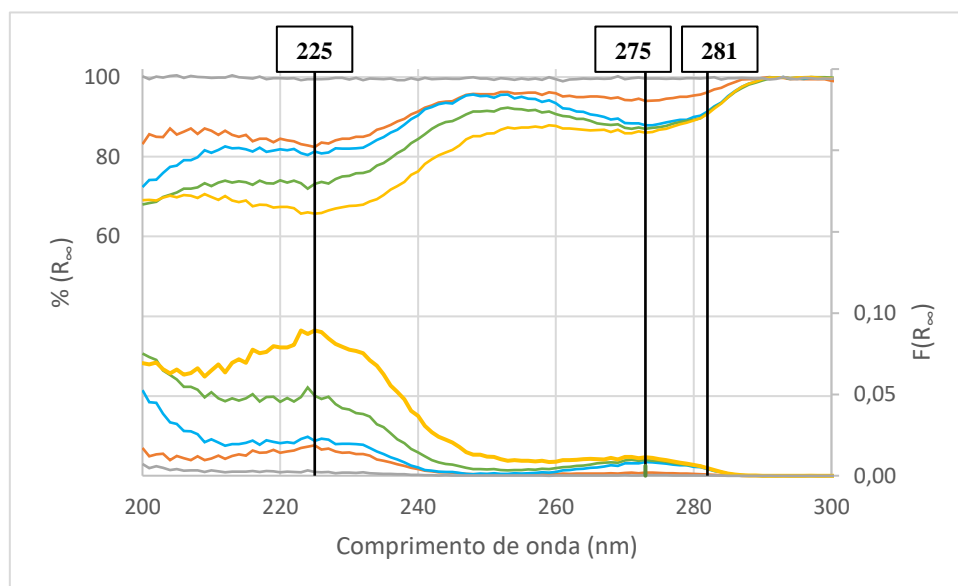


Figura 25: Espectros DRUV da Ranolazina adsorvida em matriz de PROSOLV, para as concentrações de 0,0 ppm (linha cinzenta), 1399,2 ppm (linha laranja), 1801,8 ppm (linha azul), 1999,6 ppm (linha verde) e 2401,4 ppm (linha amarela) na gama espectral de 200 a 300 nm

Na figura anterior não é clara a evolução de $F(R_{\infty})$ para comprimentos de onda superiores a 260 nm, assim a zona do espectro entre 250 e 300 nm, foi ampliada e está representada na Figura 26. Nesta figura conseguimos perceber que efetivamente existe uma banda de absorção com máximo a 275 nm e ombro a 281 nm. Assim, os comprimentos de onda escolhidos para a análise das amostras foram 225, 275 e 281 nm.

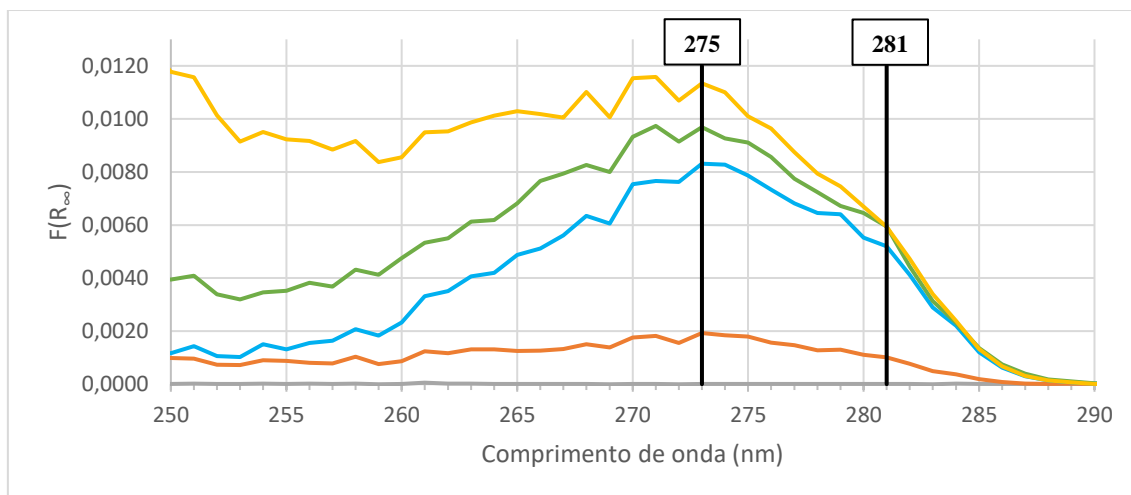


Figura 26: Espectro DRUV (gama de 250 a 290 nm) da Ranolazina adsorvida em matriz de PROSOLV, para as concentrações de 0,0 ppm (linha cinzenta), 1399,2 ppm (linha laranja), 1801,8 ppm (linha azul), 1999,6 ppm (linha verde) e 2401,4 ppm (linha amarela) na gama espectral de 255 a 290 nm.

Embora a preparação das amostras tenham sido feita de forma distinta era de esperar que os espectros apresentados fossem semelhantes, nomeadamente no que diz respeito à posição dos máximos das bandas de absorção do composto. No entanto isso só aconteceria se não houvesse estabelecimento de interações entre o analito e a matriz, promovidas pelo processo de adsorção. Comparando as Figuras 24 e 25 as diferenças mais evidentes estão na banda a menores comprimentos de onda: o máximo que está a 240 nm na mistura mecânica é observada a 225 nm no caso da Ranolazina adsorvida, é ainda possível observar que a intensidade relativa das duas bandas também se altera, pois é semelhante nas misturas mecânicas enquanto que no caso da adsorção a banda a 225 nm é cerca de 15 vezes mais intensa que a banda a 275 nm. Estas diferenças são independentes da concentração e por isso apontam para a possibilidade de estabelecimento de interações entre a Ranolazina e a matriz, possivelmente com a celulose que é um dos seus componentes.

A grande diferença entre os dois estudos reside nas gamas de trabalho utilizadas, sendo que para as misturas mecânicas apresentam-se concentrações significativamente mais baixas do que as amostras por adsorção da matriz. Uma possível explicação pode ser uma causa experimental, por perda de analito nas paredes do frasco onde foram preparadas durante o processo de adsorção, mas também pelas interações que se estabelecem entre a Ranolazina e a matriz originarem um “complexo” com uma constante de absorvidade menor e por isso espectros mais fracos para a mesma concentração.

3.3.2. Curvas de calibração

Os espectros apresentados para as misturas mecânicas pertencem a um conjunto maior de padrões, infelizmente das várias tentativas possíveis no tempo limitado para a realização do trabalho nem todos as séries se podem considerar coerentes. Assim, apesar dos resultados não terem significado analítico que é desejável pelo reduzido número de padrões que foi possível utilizar, a análise seguinte vai permitir discutir e avaliar o protocolo experimental e será uma indicação para o possível desenvolvimento de um método para a quantificação de Ranolazina em comprimidos por refletância difusa. A totalidade do estudo é apresentado nas Figuras A5 -1 do Anexo 5.

Seguindo o mesmo critério do adotado para amostras obtidas por misturas mecânicas, no caso da adsorção também foram preparadas várias séries de padrões, no entanto também nesta abordagem não será possível utilizar todos os ensaios e a análise de resultados não poderá ser completa. A totalidade dos padrões e dos espectros referentes à análise de Ranolazina adsorvida em PROSOLV são apresentados nas Figuras A5 – 2, A5 – 3 e A5 – 4 do Anexo 5. De referir ainda que no caso da adsorção foram efetuados dois estudos, com duas gamas de concentração diferentes, um conjunto de amostras com concentrações mais baixas (800,8–24001,4 ppm) e outra com concentrações mais elevadas (1998,6 e 8000,8 ppm), a totalidade do trabalho desenvolvido encontra-se nas Figuras A5 – 5, A5 – 6 e A5 – 7 do Anexo 5.

Para cada padrão preparado foram realizados triplicados das suas leituras, no entanto para esta análise ser considerada válida é necessário perceber se existe alguma coerência nas diferentes leituras feitas para cada amostra. Assim, foi calculado o desvio padrão e o respetivo coeficiente de variação de $F(R_{\infty})$ para cada padrão, através da Equação 9. Nas Tabelas 16 (para as misturas mecânicas), 17 e 18 (para as amostras por adsorção), estão os valores do desvio padrão como da percentagem de coeficiente de variação obtidos para os triplicados de leitura.

Concentração (ppm)	F(R _∞)			Desvio padrão			%CV		
	240 (nm)	277 (nm)	283 (nm)	240 (nm)	277 (nm)	283 (nm)	240 (nm)	277 (nm)	283 (nm)
0,000	0,001	0,000	0,000	0,010	0,002	0,001	-	-	-
	0,018	0,003	0,002						
	0,001	0,002	0,002						
50,6	0,088	0,092	0,089	0,064	0,041	0,041	62,514	44,478	47,525
	0,046	0,050	0,045						
	0,172	0,131	0,128						
63,2	0,130	0,145	0,128	0,048	0,081	0,019	43,726	83,289	16,079
	0,144	0,142	0,129						
	0,055	0,004	0,096						
108,7	0,001	0,000	0,000	0,042	0,040	0,037	18,598	18,914	19,311
	0,018	0,003	0,002						
	0,001	0,002	0,002						

Tabela 16: Desvio padrão e coeficiente de variação de F(R_∞), dos padrões para a análise da Ranolazina em misturas mecânicas.

Concentração (ppm)	F(R _∞)			Desvio padrão			%CV		
	225 (nm)	275 (nm)	281 (nm)	225 (nm)	275 (nm)	281 (nm)	225 (nm)	275 (nm)	281 (nm)
0,0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-	-	-
	0,000	0,000	0,000						
	0,000	0,000	0,000						
400,4	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	89,137	86,212	87,008
	0,000	0,000	0,000						
	0,000	0,000	0,000						
599,6	0,003	0,000	0,000	0,001	0,002	0,000	77,226	123,765	13,091
	0,001	0,000	0,000						
	0,001	0,004	0,000						
800,8	0,004	0,002	0,001	0,000	0,000	0,000	5,710	6,281	10,010
	0,003	0,002	0,000						
	0,003	0,001	0,000						
1000,6	0,010	0,004	0,001	0,000	0,000	0,000	3,975	5,022	5,603
	0,009	0,003	0,001						
	0,009	0,003	0,001						
1202,6	0,033	0,003	0,001	0,000	0,000	0,000	0,472	2,909	11,180
	0,033	0,003	0,001						
	0,034	0,003	0,001						
1399,2	0,004	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	7,159	6,238	12,585
	0,004	0,001	0,000						
	0,005	0,001	0,000						
1602,9	0,358	0,248	0,215	0,203	0,142	0,124	163,914	167,179	171,411
	0,007	0,003	0,001						
	0,007	0,003	0,001						
1801,8	0,005	0,007	0,002	0,000	0,000	0,000	1,218	0,439	4,298
	0,005	0,007	0,002						
	0,005	0,007	0,002						
1999,6	0,005	0,007	0,002	0,000	0,000	0,000	1,218	0,439	4,298
	0,005	0,007	0,002						
	0,005	0,007	0,002						
2401,4	0,005	0,007	0,002	0,000	0,000	0,000	1,218	0,439	4,298
	0,005	0,007	0,002						
	0,005	0,007	0,002						

Tabela 17: Desvio padrão e coeficiente de variação de F(R_∞), dos padrões de concentração mais baixas para a análise da Ranolazina adsorvida em matriz de PROSOLV

Concentração (ppm)	F(R _∞)			Desvio padrão			%CV		
	225 (nm)	275 (nm)	281 (nm)	225 (nm)	275 (nm)	281 (nm)	225 (nm)	275 (nm)	281 (nm)
0,0	0,000	0,000	0,000	0,010	0,003	0,002	-	-	-
	0,019	0,006	0,004						
	0,009	0,005	0,004						
1998,6	0,054	0,010	0,005	0,024	0,003	0,002	91,278	50,360	55,121
	0,014	0,008	0,004						
	0,011	0,003	0,001						
2404,1	0,126	0,126	0,126	0,151	0,151	0,151	67,764	67,764	67,764
	0,145	0,145	0,145						
	0,396	0,396	0,396						
2799,2	0,154	0,154	0,154	0,053	0,053	0,053	28,026	28,026	28,026
	0,162	0,162	0,162						
	0,249	0,249	0,249						
3600,4	1,056	1,056	1,056	0,275	0,275	0,275	37,106	37,106	37,106
	0,611	0,611	0,611						
	0,555	0,555	0,555						
4000,4	0,339	0,339	0,339	0,394	0,394	0,394	52,595	52,595	52,595
	0,783	0,783	0,783						
	1,126	1,126	1,126						
6007,8	1,818	1,818	1,818	1,744	1,744	1,744	71,399	71,399	71,399
	1,097	1,097	1,097						
	4,413	4,413	4,413						
8000,8	2,701	2,701	2,701	1,192	1,192	1,192	52,338	52,338	52,338
	0,932	0,932	0,932						
	3,200	3,200	3,200						

Tabela 18: Desvio padrão e coeficiente de variação de F(R_∞), dos padrões de concentração mais altas para a análise da Ranolazina adsorvida em matriz de PROSOLV

As variações resultantes das leituras dos padrões dão origem a valores de %CV de F(R_∞) elevados que podem ter várias causas, nomeadamente nos passos que são necessários efetuar para a obtenção dos dados espectrofotométricos. Para que um procedimento de análise por refletância difusa seja correto é necessário assegurar que todas as leituras são feitas nas mesmas condições experimentais, particularmente no que diz respeito granulometria do pó, compactação e espessura do pó colocado no porta-amostras. Todo o processo de obtenção do espectro (ou de leitura de sinal) envolve vários passos críticos, que são feitos pelo operador (sem qualquer automatização) e por isso muito dependente da experiência de quem efetua as análises, pelo que não é possível garantir por completo a repetibilidade. Assim, embora se tenha atenção e tente manter constante o tempo e força aplicada na moagem, a compressão para que o pó fique corretamente compacto no porta amostras, a uniformidade da superfície e ainda a altura do pó no porta-amostras (espessura da amostra), é impossível repetir completamente o processo em cada medida sem que hajam variações mais ou menos significativas. O passo mais crítico é a compactação, que vai determinar a profundidade

com que a radiação penetra na amostra, ou seja o percurso ótico. Em geral, por ser um processo manual é quase impossível garantir que a pressão aplicada é a mesma em todas as medidas no passo de prensagem. Deste modo, as amostras podem ter diferentes compactações, e por isso maior aleatoriedade nas leituras de sinal. Todos estes fatores influenciam a variabilidade dos resultados espectrofotométricos, alterando assim os valores obtidos das leituras e conseqüentemente o desvio padrão e o coeficiente de variação entre estas.

Tendo em conta os valores obtidos de %CV associada ao $F(R_{\infty})$, tanto para a mistura mecânica como para a adsorção, que como já foi referido são todos bastante elevados, pode ser concluído que a repetibilidade do método estará comprometida. Deste modo, foram apenas consideradas duas leituras para cada padrão, de forma a minimizar esta variação entre as leituras, para a construção das retas de calibração aos diferentes comprimentos de onda.

Na Figura 27 está a curva de calibração obtida por DRUV e os respetivos resíduos para a análise a 240 nm para o conjunto de padrões considerado adequado para as misturas mecânicas.

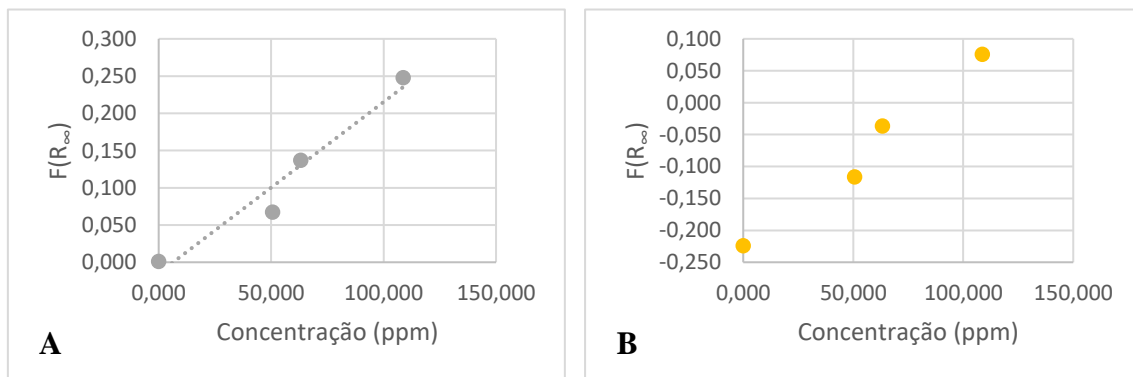


Figura 27: (A) Curva de calibração da Ranolazina em misturas mecânicas, para a análise a 240 nm para a gama de concentrações [50,63 e 108,73] ppm e (B) gráfico dos resíduos resultantes do ajuste a uma reta.

Na Figura 27(A) embora o número de pontos seja reduzido e se observe uma grande dispersão de pontos é possível associar uma tendência linear de evolução de $F(R_{\infty})$ com a concentração. No entanto quando se ajustam os dados a uma reta, o coeficiente de determinação de 0,9513 é bastante baixo, refletindo o número reduzido de pontos e a dispersão de valores, mas mais importante, no gráfico de resíduos na Figura 27(B), existe uma tendência muito semelhante à tendência observada na

dispersão de pontos e por isso não havendo assim aleatoriedade entre os mesmos, o que significa que a linearidade é apenas aparente.

Na Figura 28(A) os dados relativos da análise das misturas mecânicas a 277 nm, onde à semelhança do que acontece a 240 nm na relação entre a concentração e $F(R_{\infty})$ é possível perceber que se pode associar uma relação linear mas o coeficiente de determinação de 0,9579 confirma mais uma vez que a possível regressão linear tem elevada dispersão de pontos. O gráfico dos resíduos, na Figura 28(B), onde se verifica aleatoriedade entre os pontos, permite neste caso confirmar uma linearidade dos dados experimentais ainda que com poucos pontos e muito dispersos.

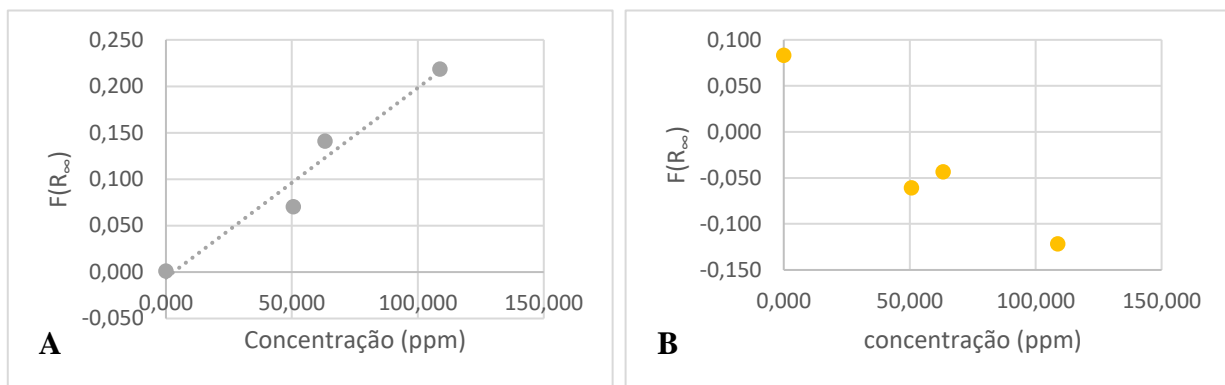


Figura 28: (A) Curva de calibração da Ranolazina em misturas mecânicas, para a análise a 274 nm para a gama de concentrações [50,63 e 108,73] ppm e (B) gráfico dos resíduos resultantes do ajuste a uma reta.

A análise das misturas mecânicas a 283 nm, na Figura 29, mostra um conjunto de dados com comportamento semelhante ao que se obteve a 277 nm. Embora se possa verificar uma relação linear Figura 29(A) com coeficiente de determinação de 0,9639 a dispersão de pontos é grande. Na Figura 29(B) o gráfico de resíduos apresenta aleatoriedade entre os pontos, como desejável para qualquer ajuste.

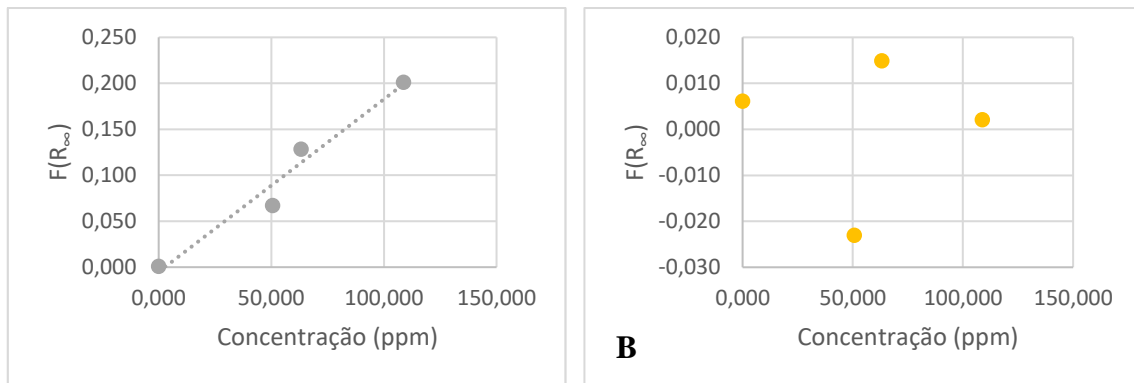


Figura 29: (A) Curva de calibração da Ranolazina em misturas mecânicas, para a análise a 283 nm para a gama de concentrações [50,63 e 108,73] ppm e (B) gráfico dos resíduos resultantes do ajuste a uma reta.

Na Tabela 19 apresentam-se para as misturas mecânicas os resultados obtidos do ajuste dos pontos experimentais a uma reta para um grau de confiança de 95 %, cujos parâmetros foram obtidos pelo método dos mínimos quadrados.

Comprimentos de onda de análise (nm)	Equação de ajuste	R ²
240	$S_{\text{abs}} = (0,002 \pm 0,002) C_{\text{ran}} - (0,0 \pm 0,2)$	0,9513
277	$S_{\text{abs}} = (0,002 \pm 0,002) C_{\text{ran}} - (0,01 \pm 0,09)$	0,9579
283	$S_{\text{abs}} = (0,002 \pm 0,002) C_{\text{ran}} - (0,01 \pm 0,08)$	0,9639

Tabela 19: Equações das retas (para um grau de confiança de 95%) obtidas aos diferentes comprimentos de onda de análise da Ranolazina em misturas mecânicas utilizando o PROSOLV® como matriz.

Na Tabela 19, aos três comprimentos de onda, os valores dos coeficientes de determinação evidenciam que os pontos experimentais são pontos dispersos, o que se reflete também nos erros associados aos parâmetros das retas obtidas, cujo erro associado ao declive é igual ao seu valor.

Para completar a avaliação dos resultados de ajuste a uma regressão linear dos pontos experimentais nas tabelas seguintes (Tabela 20, 21 e 22) estão os resultados do Teste-t para as misturas mecânicas.

	Concentração (ppm)	F(R∞)	Valor mínimo	Valor máximo
Padrão 0	0,00	0,001	-0,108	0,096
Padrão 1	50,63	0,070	-0,015	0,210
Padrão 2	63,21	0,141	0,012	0,234
Padrão 3	108,73	0,219	0,127	0,305

Tabela 20: Intervalo de validação de outliers (Teste-t) de cada padrão para a análise a 240 nm da Ranolazina em misturas mecânicas.

	Concentração (ppm)	F(R _∞)	Valor mínimo	Valor máximo
Padrão 0	0,00	0,001	-0,453	0,289
Padrão 1	50,63	0,067	-0,320	0,576
Padrão 2	63,21	0,137	-0,267	0,628
Padrão 3	108,73	0,248	-0,009	0,747

Tabela 21: Intervalo de validação de *outliers* (Teste-t) de cada padrão para a análise a 277 nm da Ranolazina em misturas mecânicas.

	Concentração (ppm)	F(R _∞)	Valor mínimo	Valor máximo
Padrão 0	0,00	0,001	-0,084	0,074
Padrão 1	50,63	0,067	-0,006	0,186
Padrão 2	63,21	0,128	0,018	0,209
Padrão 3	108,73	0,201	0,118	0,280

Tabela 22: Intervalo de validação de *outliers* (Teste-t) de cada padrão para a análise a 283 nm da Ranolazina em misturas mecânicas.

Através da análise das anteriores, é possível perceber que nenhum dos pontos considerados aos diferentes comprimentos de onda são *outliers* das retas propostas de acordo com a premissa do Teste-t, no entanto dado o número reduzido de padrões considerados, esta análise apenas nos diz que as retas escolhidos são efetivamente os pontos mais coerentes de todos os padrões inicialmente feitos.

Em resumo, para as misturas mecânicas de Ranolazina, relativamente à tentativa de obtenção de uma curva de calibração pode concluir-se que para o conjunto de padrões utilizados a análise não tem significado analítico e por esse motivo não é possível utilizar estas calibrações para quantificar a Ranolazina nos comprimidos ou para avaliar os ensaios de recuperação. Também não se procederá à avaliação do método proposto através dos seus parâmetros mais importantes, como os limites ou a gama de trabalho, porque com estas calibrações se obtiveram valores incoerentes.

Nas Figuras 30, 31 e 32 estão os dados espectroscópicos dos padrões obtidos por adsorção, ao comprimento de onda de 225, 275 e 281 nm para o intervalo de concentrações de 400,4 –2401,4 ppm.

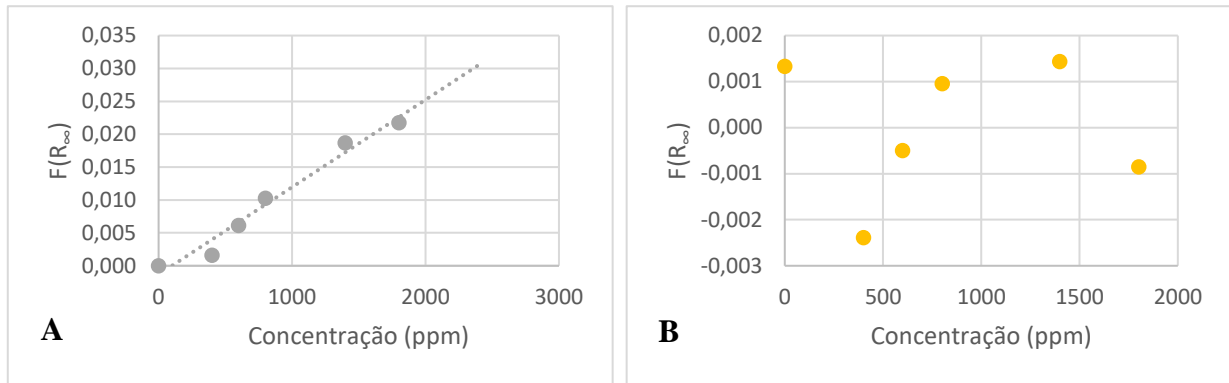


Figura 30: (A) Curva de calibração da Ranolazina adsorvida em matriz de PROSOLV, para a análise a 225 nm para a gama de concentrações [400,4 e 1801,8] ppm e (B) gráfico dos resíduos resultantes do ajuste a uma reta.

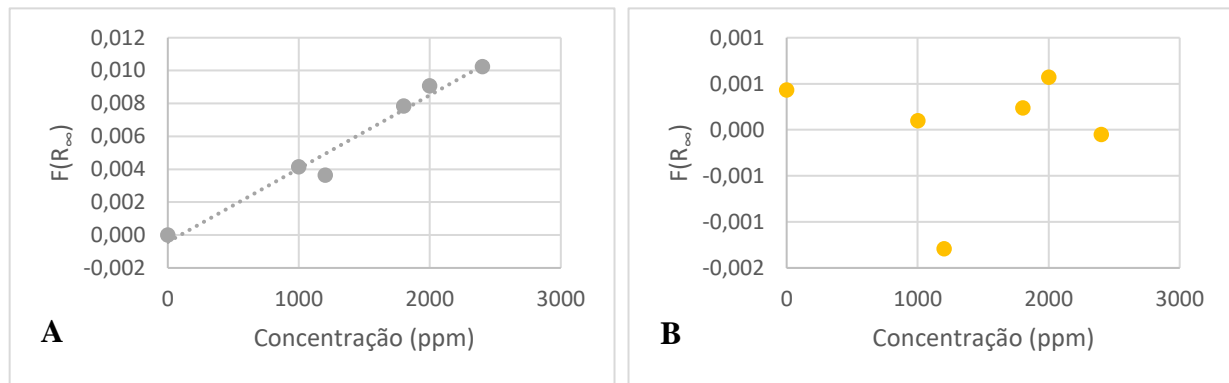


Figura 31: (A) Curva de calibração da Ranolazina adsorvida em matriz de PROSOLV, para a análise a 275 nm para a gama de concentrações [1000,6 e 2401,4] ppm e (B) gráfico dos resíduos resultantes do ajuste a uma reta.

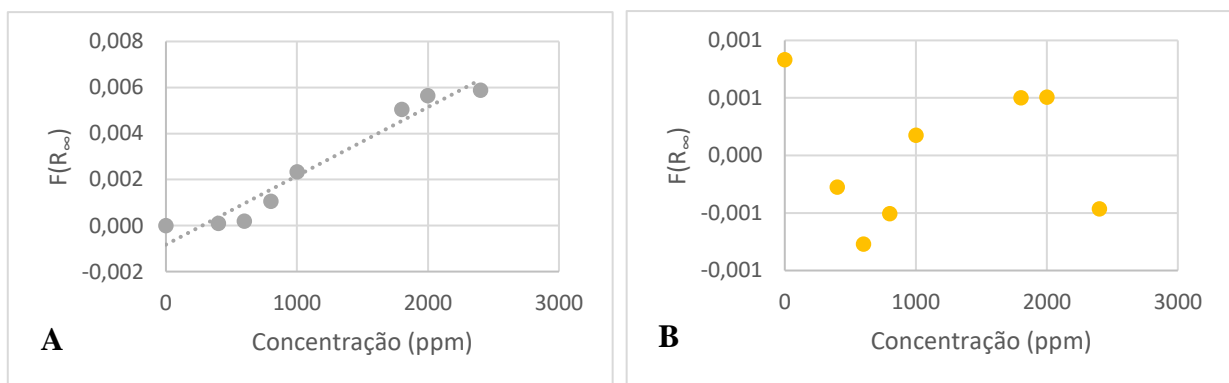


Figura 32: (A) Curva de calibração da Ranolazina adsorvida em matriz de PROSOLV, para a análise a 281 nm para a gama de concentrações [400,4 e 2401,4] ppm e (B) gráfico dos resíduos resultantes do ajuste a uma reta.

Nas Figuras 33, 34 e 35 estão os dados espectroscópicos dos padrões obtidos por adsorção de Ranolazina em matriz de PROSOLV, aos comprimento de onda de 225, 275 e 281 nm para o intervalo de concentrações de 1998,6 – 8000,8 ppm.

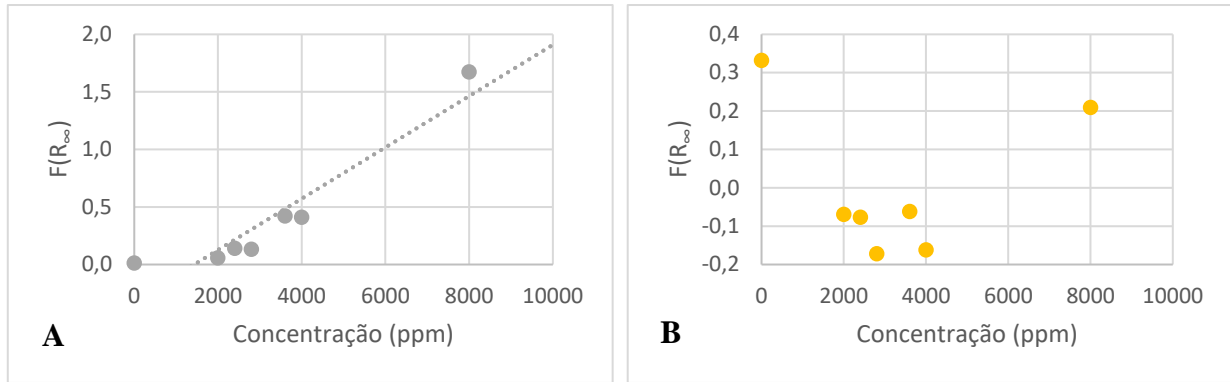


Figura 33: (A) Curva de calibração da Ranolazina adsorvida em matriz de PROSOLV, para a análise a 225 nm para a gama de concentrações [1998,6 e 8000,8] ppm e (B) gráfico dos resíduos resultantes do ajuste a uma reta.

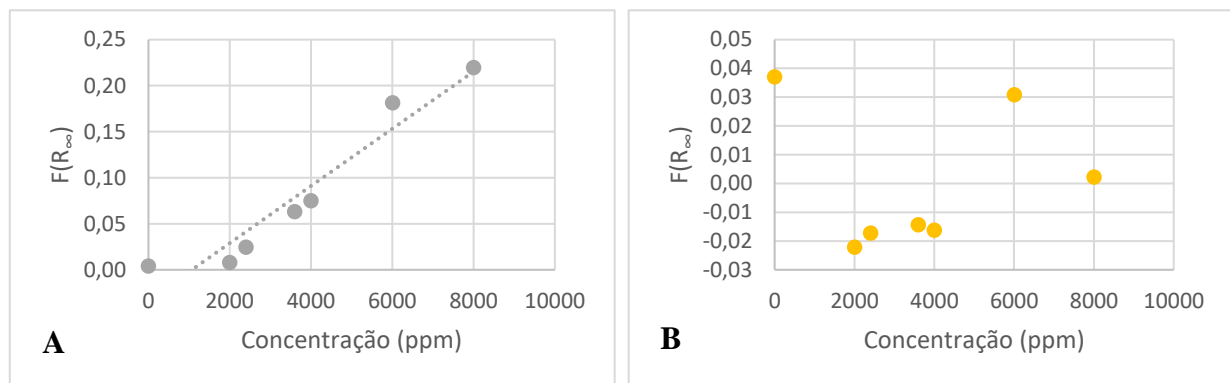


Figura 34: (A) Curva de calibração da Ranolazina adsorvida em matriz de PROSOLV, para a análise a 275 nm para a gama de concentrações [1998,6 e 8000,8] ppm e (B) gráfico dos resíduos resultantes do ajuste a uma reta.

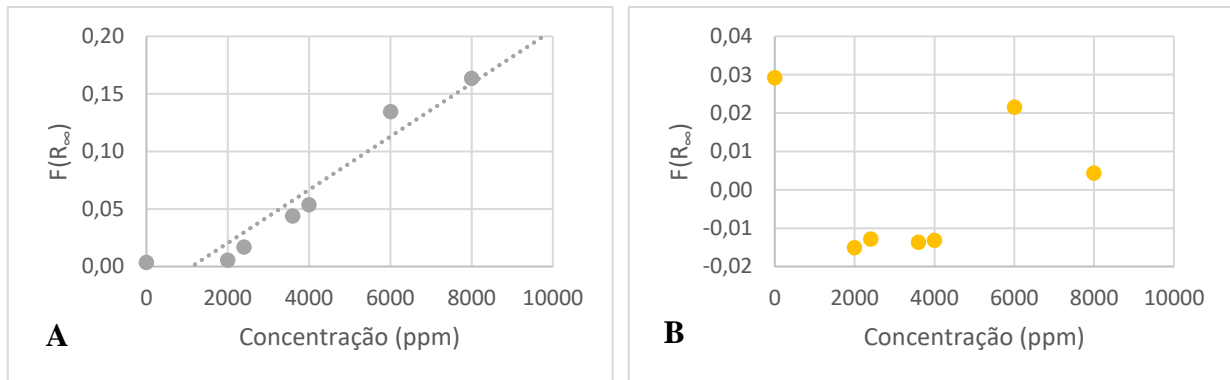


Figura 35: (A) Curva de calibração da Ranolazina adsorvida em matriz de PROSOLV, para a análise a 281 nm para a gama de concentrações [1998,6 e 8000,8] ppm e (B) gráfico dos resíduos resultantes do ajuste a uma reta.

A análise dos dados experimentais resultantes dos padrões de Ranolazina adsorvida em matriz de PROSOLV mostra que, tal como acontecia nas mistura mecânicas, embora os resultados aparentemente revelem alguma tendência de evolução linear, os coeficiente de determinação (na Tabela 23) apontam para uma elevada dispersão de pontos, contudo para a gama de menores concentrações esses valores são

mais elevados do que os obtidos para a análise das misturas mecânicas. Os resíduos resultantes do ajuste dos pontos experimentais apresentam aleatoriedade, pelo que se pode assumir a possibilidade de ajuste dos pontos experimentais por uma reta. Existe uma exceção, a análise a 225 nm para a gama de concentrações mais baixa, que mostra uma tendência da evolução dos resíduos com a concentração.

Na Tabela 23 são apresentados os resultados de ajustes dos pontos experimentais por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados para a Ranolazina adsorvida em matriz de PROSOLV, os intervalos de confiança a 95 %.

comprimentos de onda (nm)	Gama de concentração (ppm)	Equação de ajuste	R ²
225	400,400 – 2401,439	$F(R_{\infty}) = (0,000013 \pm 0,000004) C_{ran} - (0,001 \pm 0,004)$	0,9714
	1998,602 – 8000,800	$F(R_{\infty}) = (0,000004 \pm 0,000001) C_{ran} - (0,000 \pm 0,002)$	0,9702
275	400,400 – 2401,439	$F(R_{\infty}) = (0,000003 \pm 0,000002) C_{ran} - (0,001 \pm 0,001)$	0,9499
	1998,602 – 8000,800	$F(R_{\infty}) = (0,0002 \pm 0,0001) C_{ran} - (0,3 \pm 0,4)$	0,8893
281	400,400 – 2401,439	$F(R_{\infty}) = (0,00003 \pm 0,00002) C_{ran} - (0,03 \pm 0,06)$	0,9227
	1998,602 – 8000,800	$F(R_{\infty}) = (0,00002 \pm 0,00002) C_{ran} - (0,03 \pm 0,05)$	0,9152

Tabela 23: Equações de ajuste (para um grau de confiança de 95%) obtidas aos diferentes comprimentos de onda de análise e diferentes gamas de concentração da Ranolazina adsorvida em matriz de PROSOLV.

Nas Tabelas 24 e 25 está a análise de *outliers* efetuada para os ajustes dos pontos experimentais de que resultaram as equações de ajuste apresentadas na tabela anterior da análise de Ranolazina adsorvida em PROSOLV. O Teste-t prova que todos os ajustes resultam de um conjunto de pontos em que não se identifica qualquer *outlier*, uma vez que estes estão incluídos no intervalo e valores previstos.

Conc (ppm)	225 nm			275 nm			281 nm		
	F(R _∞)	Valor mínimo	Valor máximo	F(R _∞)	Valor mínimo	Valor máximo	F(R _∞)	Valor mínimo	Valor máximo
0,000	0,0000	-0,006	0,003	0,0000	-0,002	0,002	0,0000	-0,002	0,001
400,400	0,0016	-0,001	0,009				0,0001	-0,001	0,002
599,641	0,0061	0,002	0,012				0,0002	-0,001	0,003
800,800	0,0103	0,004	0,014				0,0011	0,000	0,003
1000,600				0,0041	0,002	0,006	0,0023	0,001	0,004
1202,643				0,0037	0,003	0,007			
1399,161	0,0187	0,012	0,022						
1801,800	0,0217	0,018	0,027				0,0079	0,005	0,010
1999,600				0,0091	0,006	0,011	0,0057	0,004	0,007
2401,439				0,0102	0,008	0,012	0,0059	0,005	0,008

Tabela 24: Intervalo de validação de *outliers* (Teste-t) de cada padrão para a análise a 225, 275 e 281 nm da Ranolazina adsorvida em matriz de PROSOLV, para a gama de concentrações mais baixas.

Conc (ppm)	225 nm			275 nm			281 nm		
	F(R _∞)	Valor mínimo	Valor máximo	F(R _∞)	Valor mínimo	Valor máximo	F(R _∞)	Valor mínimo	Valor máximo
0,000	0,0130	-0,853	0,215	0,0042	-0,101	0,035	0,0034	-0,077	0,026
1998,602	0,0566	-0,449	0,701	0,0088	-0,041	0,103	0,0053	-0,035	0,076
2404,085	0,1397	-0,363	0,796	0,0266	-0,029	0,117	0,0169	-0,026	0,085
2799,161	0,1328	-0,277	0,886						
3600,360	0,4212	-0,099	1,065	0,0678	0,008	0,156	0,0437	0,001	0,114
4000,400	0,4101	-0,008	1,152	0,0786	0,021	0,169	0,0535	0,011	0,123
6007,806				0,1898	0,088	0,230	0,1345	0,059	0,167
8000,800	1,6729	0,989	1,938	0,2248	0,157	0,288	0,1634	0,109	0,209

Tabela 25: Intervalo de validação de *outliers* (Teste-t) de cada padrão para a análise a 225, 275 e 281 nm da Ranolazina adsorvida em matriz de PROSOLV, para a gama de concentrações mais altas.

Resumindo, o estudo desenvolvido para a quantificação da Ranolazina adsorvida em matriz sólida, mostrou que esta é dependente dos intervalos de concentração escolhidos e que poderá eventualmente ser possível obter uma curva de calibração adequada. O ideal será conseguir uma relação linear entre a concentração e a função de remissão e os resultados obtidos mostraram que para as concentrações mais baixas a hipótese de conseguir obter uma boa calibração é aparentemente melhor. Deste modo, era importante repetir o estudo, mas com uma gama de trabalho inferior à realizada.

Na pesquisa bibliográfica realizada não se encontraram publicações relativas à quantificação de Ranolazina utilizando a espectroscopia de absorção em modo de refletância difusa no UV-Vis. Portanto, embora não sendo possível excluir a existência de trabalhos neste campo de investigação, não será possível comparar os resultados obtidos neste trabalho com o de outros autores.

3.4. Quantificação de Ranolazina em Amostras Sólidas por Infravermelho em Refletância Difusa (DRIFT)

Já foram desenvolvidos alguns estudos com a Ranolazina no infravermelho, embora pouco trabalho tenha sido encontrado na literatura no que diz respeito à quantificação da Ranolazina no infravermelho por refletância difusa. Dos trabalhos publicados um dos estudos está ligado à incorporação do fármaco em micropartículas, contudo não abordam a quantificação e por essa razão estes trabalhos apenas tem interesse no que diz respeito à caracterização espectral da molécula.¹¹⁴ O objetivo desta parte do trabalho é perceber se é possível desenvolver um método de quantificação da Ranolazina por DRIFT e na literatura apenas foi encontrado um estudo semelhante em que a análise foi

feita tendo em conta uma área de integração correspondente ao carbonilo, com máximo da banda a 1689 cm^{-1} , para uma gama de trabalho de 1.0–3.0 % m/m. As principais conclusões do estudo acima referido, são que a análise de Ranolazina no estado sólido tem um grande potencial para a indústria farmacêutica, quer seja na análise quantitativa como qualitativa, apresentando como vantagem as amostras estarem no estado sólido e por isso não ser necessária a utilização de solventes, tornando os métodos mais ecológicos e mais económicos.¹⁰²

Neste trabalho, foram feitos padrões de Ranolazina e com base nos espectros DRIFT iniciais relativos à purificação da Ranolazina, foi avaliada a possibilidade de se fazer a análise utilizando quatro áreas de integração. Os estudos preliminares permitiram concluir que a gama de trabalho a ser testada teria que ser diferentes da do estudo referido, pois os valores de sinal obtidos com essas concentrações se encontravam fora da gama dinâmica do equipamento. Deste modo, as diferenças de metodologia adotadas no trabalho publicado e no presente trabalho não permite uma comparação direta dos resultados.

3.4.1. Espectros de refletância difusa no infravermelho

Os espectros por refletância difusa no infravermelho para os padrões utilizados na análise por padrão externo estão na Figura 36, onde se evidencia as áreas de integração que são utilizadas para a análise. Os espectros na figura são apenas os que se consideraram mais representativos, de forma a avaliar melhor as áreas de integração e a evolução com a concentração, a totalidade dos espectros encontra-se nas Figuras A5 – 8 no Anexo 5.

As áreas que são utilizadas como dados espectrais foram obtidas por integração da totalidade das bandas em cada uma das regiões, como detalhado nas figuras seguintes, porque se espera que exista uma relação entre a concentração e área dessa região. A área integrada é o equivalente à leitura de intensidade do sinal, neste caso ao $F(R_{\infty})$.

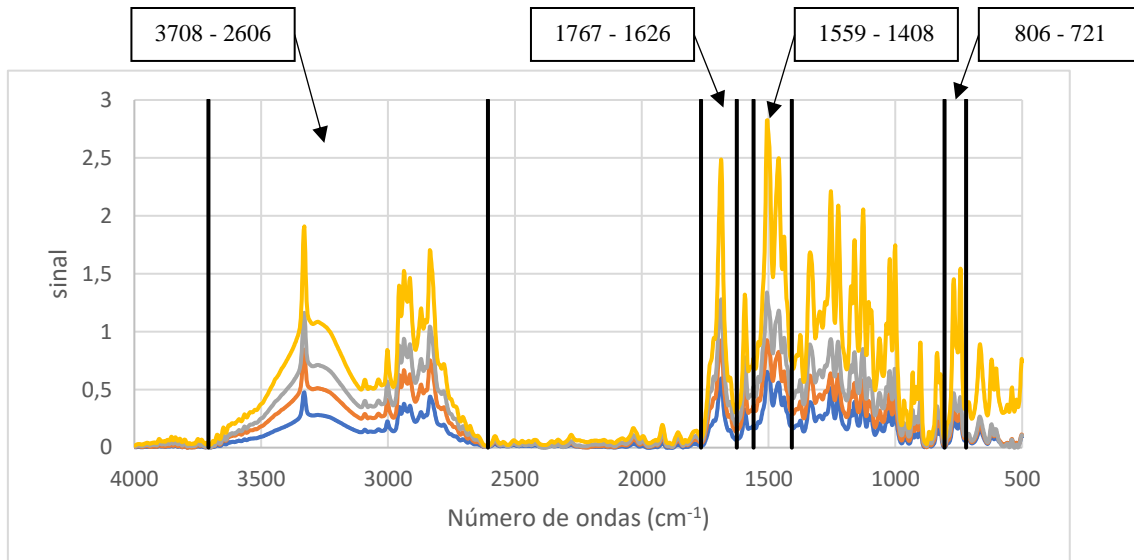


Figura 36 - Espectros DRIFT da Ranolazina para o método analítico do padrão externo, para as concentrações de 64,1 ppm (linha azul), 120,7 ppm (linha laranja), 146,4 ppm (linha cinzenta) e 169,4 ppm (linha amarela), na gama espectral de 4000 e 500 cm^{-1} .

No delineamento de um protocolo para um método de padrão interno um dos aspectos fundamentais é a escolha da molécula que irá ser utilizada como padrão interno. O padrão interno deve ser um composto quimicamente diferente da molécula em estudo mas que tenha um estrutura que sofra as mesma variações aleatórias, e é adicionado em quantidade constante em todos os padrões, incluindo o branco e as amostras. Com a adição deste componente pretende-se retificar, as variações aleatórias nas medições uma vez que a concentração de padrão interno deve ter uma concentração bem definida, de preferência constante, em todas as misturas em análise. Neste trabalho irá ser utilizado como padrão interno o $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ que por ser uma molécula quimicamente distinta da Ranolazina terá um espectro de infravermelho com as bandas de absorção diferentes, e que se espera que não interfira no sinal obtido para a Ranolazina. Na Figura 37 estão os epsctros DRIFT do $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ e de um padrão para comparação.

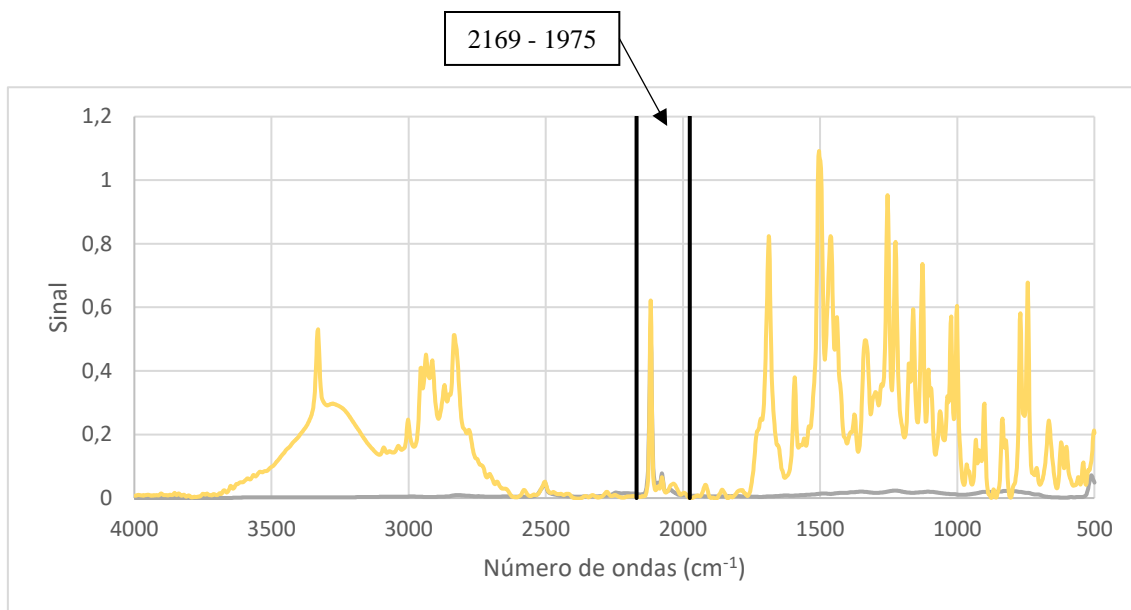


Figura 37 - Espectros DRIFT da Ranolazina para o método analítico do padrão interno, para as concentrações de 0,0 ppm (linha cinzenta) e 132,2 ppm (linha amarela), na gama espectral de 4000 e 500 cm^{-1} .

O espectro do padrão interno apresenta apenas uma banda com um máximo a 2117 cm^{-1} , correspondente ao modo de elongação do grupo CN. Analisando as figuras anteriores conseguimos perceber que a zona do espectro onde se observa a banda do padrão interno não são observadas bandas da Ranolazina, isto é, não há sobreposição entre o espectro do analito e do padrão interno na região espectral do infravermelho médio. Assim, pode concluir-se que em termos espectrais o $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ é um molécula ideal para ser utilizada como padrão interno na quantificação da Ranolazina. Os espectros obtidos relativos aos padrões preparados para a análise por DRIFT da Ranolazina por DRIFT pelo método analítico do padrão interno estão na Tabela A5 – 9 no Anexo 5.

Na hipótese de desenvolver um método de quantificação da Ranolazina por refletância difusa no infravermelho (DRIFT), explorou-se uma gama de concentrações entre 64,06 e 288,36 ppm para a análise de padrão externo, e uma gama de concentrações entre 58,56 e 268,47 ppm para a análise de padrão interno.

3.4.2. Curvas de calibração do método analítico do padrão externo

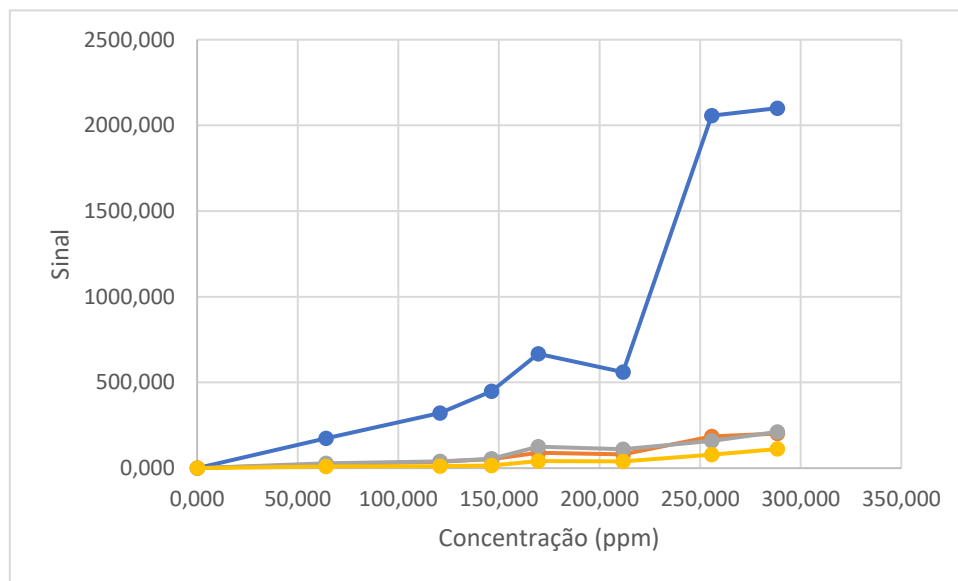


Figura 38: Curvas de calibração da Ranolazina por DRIFT, pelo método analítico do padrão externo usando a área integrada 806,1 – 721,8 cm^{-1} (linha amarelo), 1559,0 – 1408,4 cm^{-1} (linha cinzenta), 1766,7 – 1625,9 cm^{-1} (linha laranja) e – cm^{-1} (linha azul) na gama espectral de 4000 e 500 cm^{-1} .

A Figura 38 mostra que os dados experimentais não têm uma evolução do sinal com a concentração coerente. Deste modo, é necessário reduzir a análise às concentrações mais baixas de modo a obter uma resposta o mais linear possível.

Nas Figuras 39, 40, 41 e 42, encontram-se representadas as curvas de calibração com a respetiva linha de ajuste para resultados obtidos por DRIFT dos padrões preparados para o método do padrão externo, num intervalo de concentrações de 64,03 - 146,36 ppm e os respetivos gráficos de resíduos, sendo o sinal a área integrada do espectro em diferentes gamas espectrais.

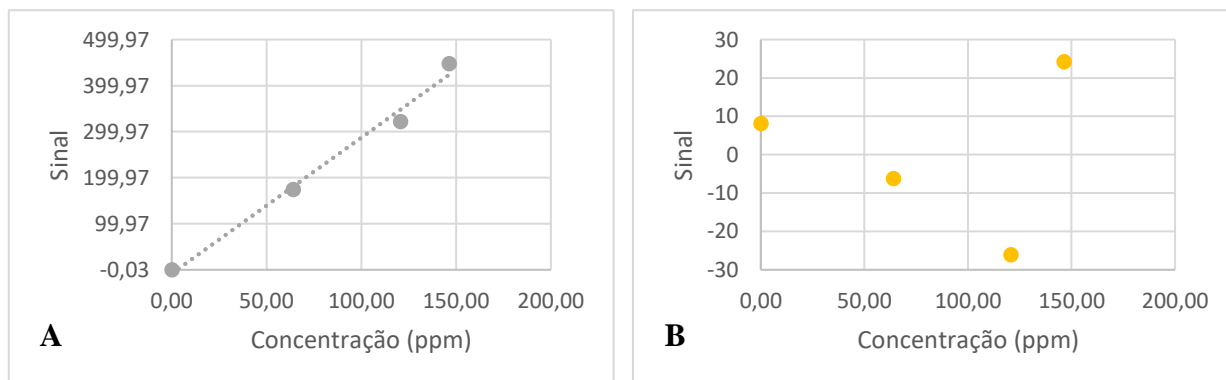


Figura 39: (A) Curva de calibração da Ranolazina por DRIFT, pelo método analítico do padrão externo usando a área integrada entre 3708,8 – 2606,7 cm^{-1} para a gama de concentrações [64,03 e 146,36] ppm e (B) gráfico dos resíduos resultantes do ajuste.

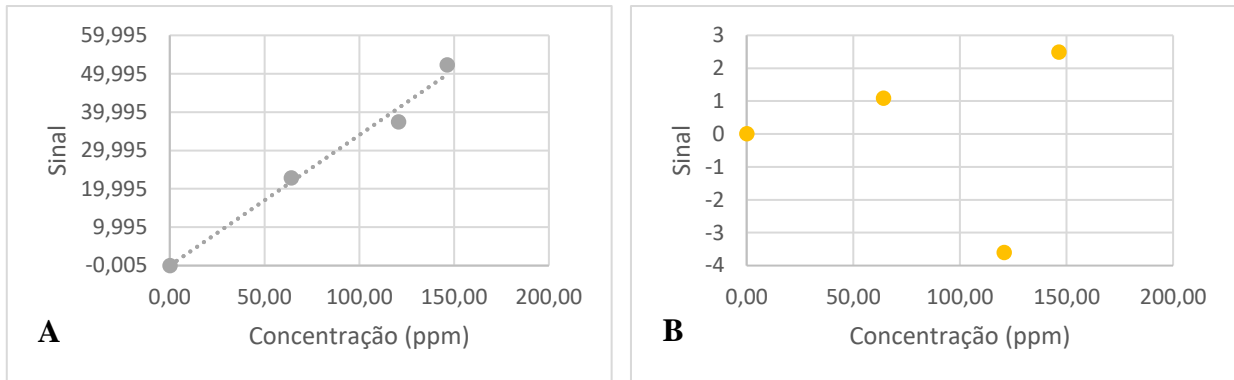


Figura 40: (A) Curva de calibração da Ranolazina por DRIFT, pelo método analítico do padrão externo usando a área integrada entre $1766,7 - 1625,9 \text{ cm}^{-1}$ para a gama de concentrações [64,03 e 146,36] ppm e (B) gráfico dos resíduos resultantes do ajuste.

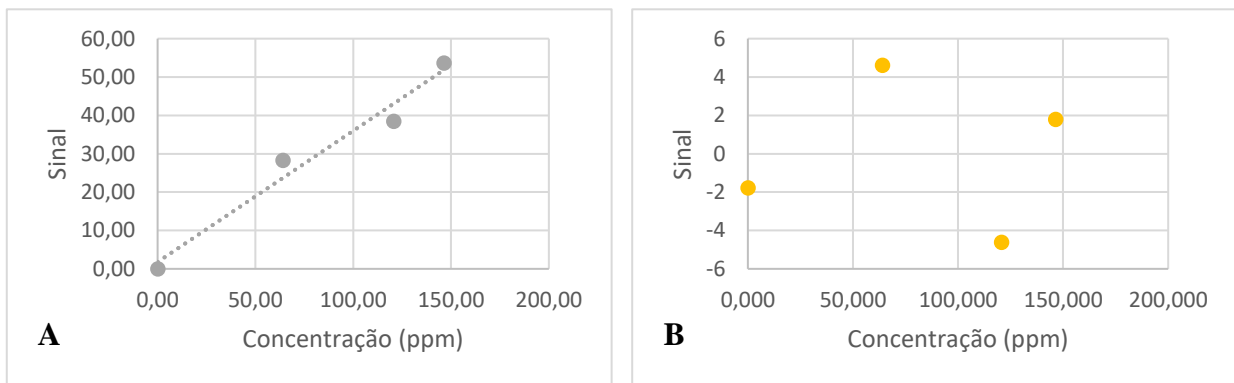


Figura 41: (A) Curva de calibração da Ranolazina por DRIFT, pelo método analítico do padrão externo usando a área integrada entre $1559,0 - 1408,4 \text{ cm}^{-1}$ para a gama de concentrações [64,03 e 146,36] ppm e (B) gráfico dos resíduos resultantes do ajuste.

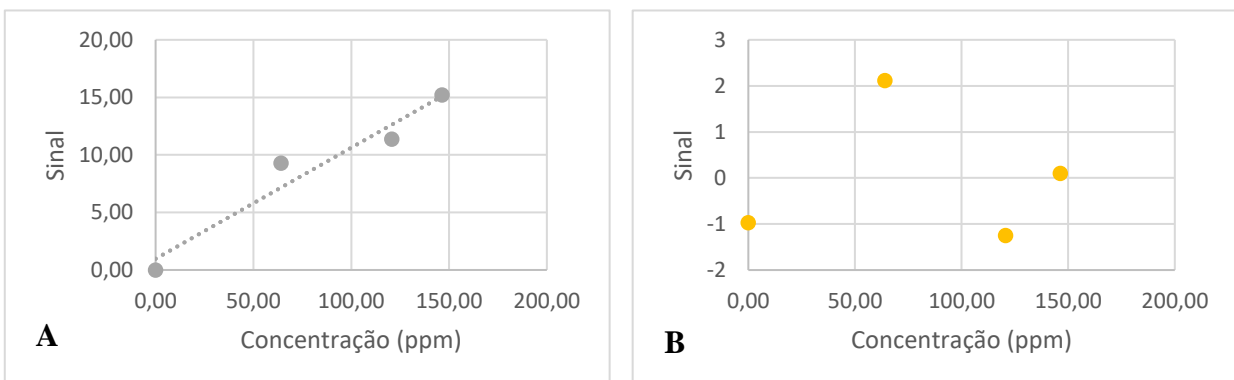


Figura 42: (A) Curva de calibração da Ranolazina por DRIFT, pelo método analítico do padrão externo usando a área integrada entre $806,1 - 721,8 \text{ cm}^{-1}$ para a gama de concentrações [64,03 e 146,36] ppm e (B) gráfico dos resíduos resultantes do ajuste.

O resultado de DRIFT obtidos pelo método do padrão externo para todas as áreas integradas de análise apresentam uma tendência que se pode aproximar de uma reta para as concentrações mais baixas, ou seja de 64,03 a 146,36 ppm. Contudo, o número de padrões utilizados para efetuar o ajuste dos dados experimentais é reduzido, o que pode condicionar a fiabilidade do estudo. De facto, os coeficientes de determinação apresentados na Tabela 26 apontam para que os resultados obtidos tenham uma elevada dispersão. Os gráficos de resíduos, na sua maioria mostram que existe aleatoriedade entre os pontos, o que indica que embora as equações de ajuste não resultem num ajuste satisfatório pelos valores de coeficiente de determinação, esta é uma hipótese a ser explorada. No entanto, há uma exceção para a área integrada 3708,8 – 2606,7 cm^{-1} , apesar desta apresentar o coeficiente de determinação mais elevado, o gráfico de resíduos exhibe comportamento não aleatório ou seja uma tendência.

Região de integração (cm^{-1})	Equação de ajuste	R ²
3708,8 – 2606,7	Sinal = $(3 \pm 2)C_{\text{ran}} - (8 \pm 101)$	0,9877
1766,7 – 1625,9	Sinal = $(0,3 \pm 0,2)C_{\text{ran}} - (0 \pm 13)$	0,9863
1559,0 – 1408,4	Sinal = $(0,3 \pm 0,2)C_{\text{ran}} + (2 \pm 19)$	0,9680
806,1 – 721,8	Sinal = $(0,10 \pm 0,08)C_{\text{ran}} + (1 \pm 8)$	0,9441

Tabela 26: Equações de ajuste (para um grau de confiança de 95%) obtidas às diferentes áreas integradas na análise da Ranolazina por DRIFT pelo método analítico do padrão externo.

Os parâmetros da regressão linear obtida para explicar os dados experimentais, na tabela anterior, não são os que se esperam de um bom ajuste com o erros associados ao declive da mesma ordem de grandeza do valor do declive. De facto, os erros relativos do declive são de cerca de 66 % para as as três primeiras áreas de integração e de 80 % para a última.

As Tabelas 27, 28, 29 e 30 apresentam os resultados obtidos do Teste-t, para determinar se os pontos experimentais escolhidos anteriormente, embora não apresentem os parâmetros de ajuste satisfatórios, são os mais corretos.

	Concentração (ppm)	Sinal	Valor mínimo	Valor máximo
Padrão 0	0,00	-0,03	-130,71	114,47
Padrão 1	64,06	174,65	56,05	305,78
Padrão 2	120,71	322,00	222,19	473,98
Padrão 3	146,36	448,00	297,68	549,81
Padrão 4	169,44	667,55	365,79	617,90
Padrão 5	211,60	559,86	490,62	741,94
Padrão 6	255,76	2056,88	621,87	871,29
Padrão 7	288,36	2100,68	719,11	966,41

Tabela 27: Intervalo de validação de *outliers* (Teste-t) para a análise da área integrada 3708,8 – 2606,7 cm⁻¹ da Ranolazina por DRIFT pelo método analítico do padrão externo.

	Concentração (ppm)	Sinal	Valor mínimo	Valor máximo
Padrão 0	0,00	0,00	-14,95	14,93
Padrão 1	64,06	22,89	6,58	37,01
Padrão 2	120,71	37,47	25,73	56,41
Padrão 3	146,36	52,29	34,44	65,16
Padrão 4	169,44	89,22	42,29	73,01
Padrão 5	211,60	80,54	56,69	87,32
Padrão 6	255,76	185,90	71,84	102,23
Padrão 7	288,36	201,58	83,06	113,19

Tabela 28: Intervalo de validação de *outliers* (Teste-t) para a análise da área integrada 1766,7 – 1625,9 cm⁻¹ da Ranolazina por DRIFT pelo método analítico do padrão externo.

	Concentração (ppm)	Sinal	Valor mínimo	Valor máximo
Padrão 0	0,00	0,01	-21,36	24,94
Padrão 1	64,06	28,30	0,11	47,27
Padrão 2	120,71	38,45	19,29	66,84
Padrão 3	146,36	53,63	28,03	75,64
Padrão 4	169,44	124,36	35,92	83,53
Padrão 5	211,60	110,61	50,41	97,87
Padrão 6	255,76	159,71	65,69	112,79
Padrão 7	288,36	211,47	77,04	123,74

Tabela 29: Intervalo de validação de *outliers* (Teste-t) para a análise da área integrada 1559,0 – 1408,4 cm⁻¹ da Ranolazina por DRIFT pelo método analítico do padrão externo.

	Concentração (ppm)	Sinal	Valor mínimo	Valor máximo
Padrão 0	0,00	0,00	-7,77	9,72
Padrão 1	64,06	9,27	-1,75	16,06
Padrão 2	120,71	11,38	3,64	21,60
Padrão 3	146,36	15,20	6,10	24,09
Padrão 4	169,44	41,06	8,33	26,32
Padrão 5	211,60	39,40	12,43	30,36
Padrão 6	255,76	78,42	16,76	34,55
Padrão 7	288,36	111,48	19,98	37,62

Tabela 30: Intervalo de validação de *outliers* (Teste-t) para a análise da área integrada 806,1 – 721,8 cm⁻¹ da Ranolazina por DRIFT pelo método analítico do padrão externo.

Nos resultados anteriormente apresentados para o Teste-t, é possível verificar que nenhum dos resultados obtidos pelas integrações, ou seja o valor das áreas integradas selecionadas para a construção da reta de ajuste se encontra fora do limite definido pelo valor mínimo e máximo, ou seja nenhuma das retas de ajuste possui *outliers*, sendo então aquelas equações as reais. Não obstante, é importante avaliar a repetibilidade das medidas, e para isso calculou-se o desvio padrão e o coeficiente de variação, cujos valores se apresentam na Tabela 31. Os valores obtidos para quase a totalidade dos padrões são inferiores a 4 % (ou mesmo 8 %), limite já referido como aceitável de acordo com a teoria de Horwitz, sendo as exceções o padrão com concentração de 211,6 ppm para a área integrada de 3108,8 – 2606,7 cm⁻¹, o padrão com concentração 255,8 ppm para a área integrada de 1559,0 – 1408,4 cm⁻¹ e o padrão com concentração 288,4 ppm para a área integrada de 1766,7 – 1625,9 cm⁻¹, no entanto este valores não representam um problema para as retas de ajuste em estudo, porque as mesmas não consideram os padrões com estas concentrações.

Concentração (ppm)	Sinal				Desvio padrão				%CV			
	3708,8 – 2606,7 cm ⁻¹	1766,7 – 1625,9 cm ⁻¹	1559,0 – 1408,4 cm ⁻¹	806,1 – 721,8 cm ⁻¹	3708,8 – 2606,7 cm ⁻¹	1766,7 – 1625,9 cm ⁻¹	1559,0 – 1408,4 cm ⁻¹	806,1 – 721,8 cm ⁻¹	3708,8 – 2606,7 cm ⁻¹	1766,7 – 1625,9 cm ⁻¹	1559,0 – 1408,4 cm ⁻¹	806,1 – 721,8 cm ⁻¹
0,0	-0,019	0,003	0,004	0,000	0,008	0,002	0,002	0,000	-	-	-	-
	-0,030	0,005	0,006	0,000								
	-0,034	0,006	0,007	0,000								
64,1	174,786	22,947	28,625	9,228	1,222	0,078	0,330	0,039	0,700	0,339	1,167	0,424
	175,805	22,920	28,324	9,290								
	173,372	22,801	27,965	9,301								
120,7	321,171	37,633	39,013	11,360	0,715	0,144	0,528	0,015	0,222	0,384	1,373	0,133
	322,441	37,413	38,354	11,389								
	322,376	37,362	37,969	11,382								
146,4	448,451	52,547	54,878	15,168	0,545	0,233	1,236	0,032	0,122	0,446	2,306	0,208
	447,397	52,236	53,591	15,196								
	448,162	52,091	52,406	15,231								
169,4	670,209	89,568	125,621	41,057	3,373	0,368	1,349	0,018	0,505	0,412	1,085	0,045
	668,687	89,262	124,523	41,081								
	663,757	88,836	122,937	41,045								
211,6	537,944	80,765	111,640	39,412	19,015	0,211	0,961	0,041	3,396	0,263	0,868	0,105
	571,953	80,512	110,465	39,442								
	569,688	80,345	109,736	39,360								
255,8	2077,999	187,685	163,899	77,322	18,291	1,552	4,547	1,184	0,889	0,835	2,847	1,509
	2046,716	185,194	160,368	78,258								
	2045,935	184,835	154,876	79,673								
288,4	2088,603	211,256	215,486	111,232	26,988	14,897	3,790	1,670	1,285	7,390	1,792	1,498
	2131,602	209,062	210,965	113,256								
	2081,846	184,427	207,956	109,943								

Tabela 31: Desvio padrão e coeficiente de variação de Sinal para as áreas integradas indicadas, na análise da Ranolazina por DRIFT pelo método analítico do padrão externo.

Tendo em conta os resultados obtidos pode concluir-se que este conjunto de padrões não seria o mais adequado, no entanto dado o tempo limitado para a realização do trabalho não foi possível refazer com uma gama de trabalho ajustada às necessidades do método.

Na Tabela 32 são apresentados os parâmetros principais para a quantificação de Ranolazina por DRFT retirados do ajuste dos pontos experimentais a uma regressão linear.

	Área integrada 3708 – 2606 cm^{-1}	Área integrada 1766 – 1625 cm^{-1}
sensibilidade (ppm^{-1})	3 ± 2	0,3 ± 0,2
LL (ppm)	154,58	153,68
LD (ppm)	26,65	28,15
LQ (ppm)	88,82	93,84
Gama de trabalho (ppm)	[88,82 – 154,58]	[93,84 – 153,68]
GD	1,7	1,6

Tabela 32: Parâmetros do método para a análise da Ranolazina por DRIFT pelo método analítico do padrão externo.

Ao analisar as retas de calibração obtidas para cada área de integração é claro que apenas as duas primeiras (3708 – 2606 cm^{-1} e 1766 – 1625 cm^{-1}) apresentam uma relação próxima da linear, embora o coeficiente de determinação, indique dispersão de pontos. No que diz respeito aos resultados dos limites, os resultados são semelhantes para ambas as áreas de integração, obtendo-se uma gama de trabalho de [~90,00 - ~150] ppm. No entanto no que diz respeito à sensibilidade do método verifica-se uma diferença significativa, sendo que para a área integrada de 3708 – 2606 cm^{-1} é cerca de 98 vezes mais elevada que para a área integrada de 1766 – 1625 cm^{-1} . Os parâmetros do método não são os que se esperariam de um bom ajuste, contudo tratando-se de ensaios exploratórios e sendo possível a análise de algumas amostras utilizando estas duas áreas de integração, será feita a quantificação de Ranolazina nas amostras cuja concentração se encontrar na gama de trabalho obtida.

3.4.3. Curvas de calibração do método analítico do padrão interno

No método analítico do padrão interno quando se fazem as leituras de sinal obtém-se dois sinais distintos, o do padrão em estudo e o do padrão interno. O valor do sinal que irá ser utilizado como dado experimental, para estudar o efeito deste em

função da concentração, é a relação entre os sinais dos padrões e o sinal do padrão interno do padrão correspondente. Assim, na análise do padrão interno, é necessário dividir a área integrada da região com a área integrada do padrão interno. Tendo em conta que as amostras e padrões são preparados por pesagem, manter a concentração do padrão interno constante é muito difícil, pelo que há ainda a necessidade de corrigir a variação de concentração do padrão interno, o que implica multiplicar a razão de áreas pela concentração do padrão interno, pelo que a análise será feita ajustando os resultados experimentais à Equação 12.

$$\frac{A_p}{A_{pi}} \times C_{pi} = m \times C_p + b$$

Em que A_p é a área integrada das bandas da Ranolazina numa dada região, A_{pi} a área do padrão interno nesse padrão (ambas retiradas do espectro do padrão), C_{pi} a concentração de padrão interno no padrão, C_p a concentração de Ranolazina no padrão, e m e b os parâmetros de ajuste, respetivamente declive e ordenada na origem.

A análise dos dados experimentais foi efetuada utilizando as áreas integradas das mesmas regiões espectrais de que resultaram os gráficos que se apresentam a seguir na Figura 43, para as áreas $1766,7 - 1625,9 \text{ cm}^{-1}$, $1559,0 - 1408,4 \text{ cm}^{-1}$ e $806,1 - 721,8 \text{ cm}^{-1}$.

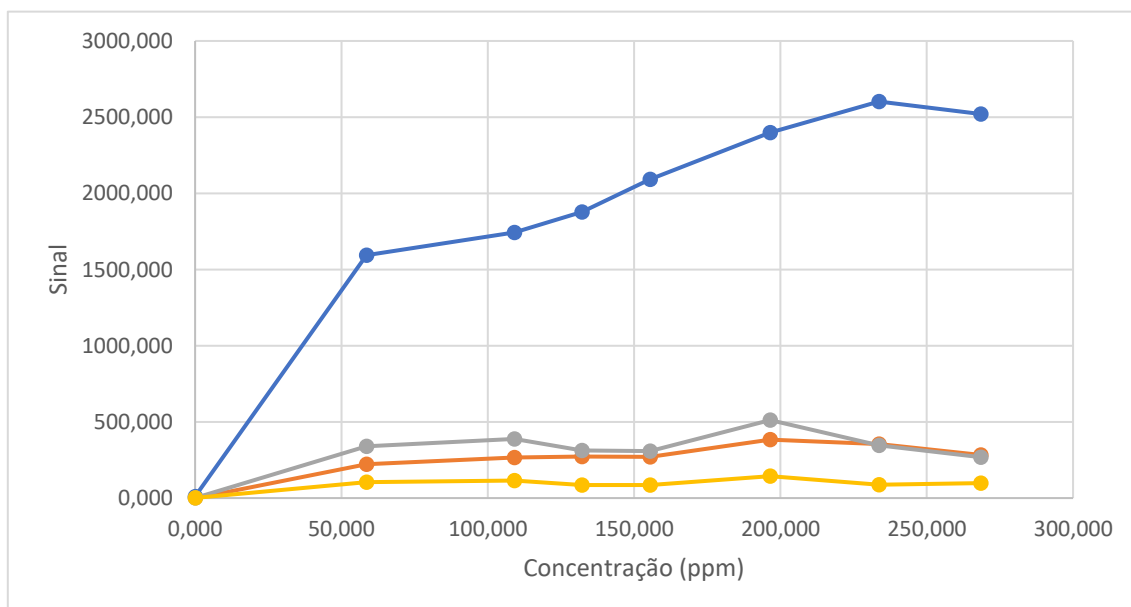


Figura 43: Curvas de calibração da Ranolazina por DRIFT, pelo método analítico do padrão interno usando a área integrada $806,1 - 721,8 \text{ cm}^{-1}$ (linha amarelo), $1559,0 - 1408,4 \text{ cm}^{-1}$ (linha cinzenta), $1766,7 - 1625,9 \text{ cm}^{-1}$ (linha laranja) e $806,1 - 721,8 \text{ cm}^{-1}$ (linha azul) na gama espectral de 4000 e 500 cm^{-1} .

A figura anterior mostra que a evolução do sinal com a concentração embora seja mais clara do que no caso do padrão externo, as áreas de integração a menores concentrações não tem pontos suficientes para construir uma reta. Assim, é claro que não é possível continuar o tratamento de dados para estas áreas de integração.

A análise utilizando a região espectral $3708,8 - 2606,7 \text{ cm}^{-1}$, mostrou ter resultados mais coerentes pelo que para avaliar a repetibilidade do método, foi calculado o desvio padrão e o coeficiente de variação, representado na Tabela 33, onde se verifica que os valores deste são bastante elevados, justificados pelo facto desta técnica exigir bastante experiência por parte do analista, como já foi referido. Assim a opção foi prosseguir o tratamento dos dados experimentais apenas com os resultados de dois replicados, de forma a minimizar a sua dispersão.

Concentração (ppm)	Sinal	Desvio padrão	%CV
0,000	1,127	1,838	-
	4,615		
	1,868		
58,561	189,289	47,408	35,051
	115,845		
	100,633		
109,081	156,491	15,753	9,116
	174,027		
	187,928		
132,215	135,398	42,138	23,783
	219,664		
	176,462		
155,529	279,232	61,860	29,632
	183,615		
	163,432		
196,456	238,942	40,822	15,455
	242,225		
	311,232		
233,730	266,239	41,451	15,031
	239,908		
	321,152		
268,474	1323,993	612,239	99,118
	238,390		
	290,671		

Tabela 33: Desvio padrão e coeficiente de variação de Sinal, dos padrões para a análise da Ranolazina por DRIFT pelo método analítico do padrão interno.

A Figura 44 representa a relação entre a concentração e o sinal corrigido, bem como a evolução dos resíduos destes mesmos padrões.

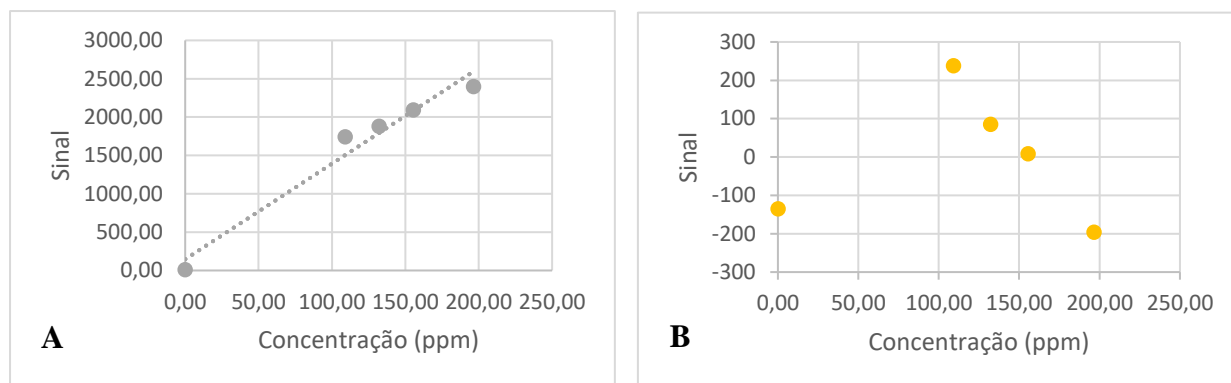


Figura 44: (A) Curva de calibração da Ranolazina por DRIFT pelo método analítico do padrão interno, para a análise da área entre 3708,8 – 2606,7 cm^{-1} para a gama de concentrações [109,1 - 196,5] ppm e (B) gráfico dos resíduos resultantes do ajuste a uma reta.

Analisando os resultados obtidos da evolução do sinal com a concentração, conseguimos observar que não é claro um comportamento linear, o que se comprova ao analisar gráfico dos resíduos e o coeficiente de determinação que se encontra na Tabela 34. O gráfico de resíduos mostra que existe uma tendência de evolução dos resíduos e por isso sabemos que este não será o ajuste mais correto. Assim, embora o coeficiente de determinação esteja perto dos obtidos pelo método padrão externo, estes dados de facto não podem ser completamente explicados por uma regressão linear.

Área integrada (cm^{-1})	Equação de ajuste	R^2
3708,8 – 2606,7	$\text{Sinal} = (12 \pm 5)C_{\text{ran}} + (146 \pm 587)$	0,9656

Tabela 34: Equação de ajuste (para um grau de confiança de 95%) obtida da análise da Ranolazina por DRIFT pelo método analítico do padrão interno.

Embora, analisando o gráfico dos resíduos, não seja possível aferir que o ajuste realizado seja o mais correto, o Teste-t representado na Tabela 35, indica que os pontos seleccionados se encontram todos dentro do limite compreendido entre o valor mínimo e o valor máximo e por isso nenhum deles pode ser considerado como um *outlier*.

Concentração (ppm)	Sinal	Valor mínimo	Valor máximo
0,0	10,81	-526,72	818,93
109,1	1743,36	186,20	1565,56
132,2	1878,73	808,26	2202,63
155,5	2092,37	1095,21	2492,25
196,5	2398,57	1385,72	2782,81
233,7	2602,35	1898,92	3289,65
168,5	2521,67	2369,93	3747,65

Tabela 35: Intervalo de validação de *outliers* (Teste-t) de cada padrão para a análise a $3708,8 - 2606,7 \text{ cm}^{-1}$ da Ranolazina em misturas mecânicas, usando como matriz $\text{KBr} + \text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

Embora o coeficiente de variação, mostre a heterogeneidade entre as leituras efetuadas para cada padrão e o gráfico de resíduos, mostrar que existe tendência residual, foi calculado os parâmetros que caracterizam o método, que estão expressos na Tabela 36.

	$3708,8 - 2606,7 \text{ cm}^{-1}$
sensibilidade (ppm^{-1})	12 ± 5
LL (ppm)	180,75
LD (ppm)	48,25
LQ (ppm)	160,83
Gama de trabalho (ppm)	[160,83 – 180,75]
GD	1,1

Tabela 36: Parâmetros do método para a análise da Ranolazina por DRIFT pelo método analítico do padrão interno.

Tendo em conta os valores dos limites apresentados na tabela anterior, não é possível, com recurso a este método com estas condições experimentais, calcular a concentração de Ranolazina nos comprimidos Ranexa por as amostras preparadas se encontrarem fora da gama de trabalho.

3.4.4 Quantificação da Ranolazina em comprimidos Ranexa 750

A quantificação da Ranolazina nos comprimidos por DRIFT e seguindo o protocolo proposto neste trabalho só será possível pelo método analítico do padrão externo, uma vez que o proposto para a análise pelo método do padrão interno não se mostrou adequado. Na Tabela 37, estão representados os valores das concentrações das amostras, para a análise por DRIFT pelo método analítico do padrão externo e obtidas através do sinal destas por interpolação da reta obtida para as áreas de integração indicadas.

Sinal		Concentração (ppm)	
3708 – 2606 cm^{-1}	1766 – 1625 cm^{-1}	3708 – 2606 cm^{-1}	1766 – 1625 cm^{-1}
400,60	45,30	138,51	133,14
394,17	47,97	136,33	140,99
370,34	43,16	128,26	126,84
270,41	30,67	94,39	90,16
208,35	22,08	73,36	64,91
473,13	57,24	163,09	168,22
356,79	40,88	123,66	120,16
418,39	46,00	144,54	135,19
365,47	39,29	126,61	115,47
340,41	38,32	118,12	112,62
384,07	42,57	132,91	125,10
371,90	41,56	128,79	122,16

Tabela 37: Concentração de Ranolazina nas misturas de trabalho dos comprimidos Ranexa 750, obtidas por DRIFT e pelo método analítico do padrão externo.

Podemos observar na tabela anterior que em média todas as leituras tem uma concentração de Ranolazina entre 100 – 120 ppm, não se verificando grandes diferenças entre os resultados para a mesma amostra nas duas áreas de integração.

Com base nos resultados acima descritos, calculou-se a massa média de Ranolazina em cada comprimido para todas as amostras preparadas, assim como o coeficiente de variação e o erro absoluto associado a estas, todos estes valores encontram-se na Tabela 38.

Massa média de Ranolazina por comprimido (mg)		%CV		Erro absoluto	
3708 – 2606 cm^{-1}	1766 – 1625 cm^{-1}	3708 – 2606 cm^{-1}	1766 – 1625 cm^{-1}	3708 – 2606 cm^{-1}	1766 – 1625 cm^{-1}
1004,49	999,17	3,28	4,33	254,49	249,17
795,27	777,12	34,75	40,81	45,27	27,12
952,74	894,84	7,01	6,81	202,74	144,84
958,06	907,76	4,92	4,44	208,06	157,76
927,64	894,72	12,49	14,10	177,64	144,72

Tabela 38: Massa média de Ranolazina por comprimido Ranexa 750, coeficiente de variação (em %) da massa obtida e respetivo erro absoluto associado, obtidos por DRIFT e pelo método analítico do padrão externo.

Os resultados obtidos para a massa de Ranolazina em cada comprimido, é superior em todos os casos do teor indicado pela farmacêutica, 750 mg, apenas uma das amostras apresenta teores obtidos é próximos desse valor. No que diz respeito ao coeficiente de variação, alguns valores encontram-se na gama de valores que podem ser considerados

aceitáveis de acordo com a teoria de Horwitz (inferiores a 8 %), mas outros estão francamente acima deste valor. Assim, parece claro que nestas condições experimentais não é possível obter a concentração na Ranolazina nos comprimido com o grau de confiança pretendido. Esta conclusão pode ser confirmada pelo elevado valor do erro absoluto.

De forma a perceber que erros sistemáticos possam existir, no que diz respeito às perdas de analito no processo ou ainda influência do excipiente, foram preparadas amostras fortificadas. Os valores do sinal obtido para a análise por DRIFT pelo método do padrão externo destas amostras, assim como a concentração obtida por interpolação da reta, encontram-se na Tabela 39.

Padrões	Sinal		Concentração (ppm)	
	3708 – 2606 cm ⁻¹	1766 – 1625 cm ⁻¹	3708 – 2606 cm ⁻¹	1766 – 1625 cm ⁻¹
Amf1_1	190,204	20,195	(*)	(*)
Amf1_2	397,881	47,289	137,59	138,98
Amf1_3	790,943	100,087	(*)	(*)
Amf2_1	461,300	57,797	(*)	(*)
Amf2_2	365,304	43,367	126,55	127,46
Amf2_3	501,905	62,051	(*)	(*)
Amf3_1	458,927	55,038	(*)	(*)
Amf3_2	523,464	62,367	(*)	(*)
Amf3_3	200,771	22,012	(*)	(*)
Amf4_1	311,228	32,663	108,22	96,00
Amf4_2	483,827	58,746	(*)	(*)
Amf4_3	372,428	43,238	128,96	127,08
Amf5_1	292,048	36,198	101,72	106,39
Amf5_2	186,132	19,967	(*)	(*)
Amf5_3	243,825	27,701	(*)	(*)

Tabela 39: Concentração de Ranolazina nas amostras fortificadas de comprimidos Ranexa 750, obtidas por DRIFT e pelo método analítico do padrão externo. (*) Valores de concentração sem significado analítico por estarem fora da gama de trabalho.

A tabela anterior mostra que das amostras fortificadas preparadas apenas 5 se encontram dentro da gama de trabalho, para ambas as áreas de integração em estudo, e por isso apenas para essas é possível calcular a concentração por interpolação da reta e consequentemente percentagem de recuperação que se encontra na Tabela 40. Com isto, podemos aferir que a preparação das amostras, nomeadamente no que diz respeito à sua análise espectroscópica, tem uma influência bastante significativa nos resultados obtidos.

O facto de os replicados da mesma amostra apresentarem valores tão discrepantes evidencia isso mesmo e assim como uma possível heterogeneidade das amostras.

3708 – 2606 cm ⁻¹			1766 – 1625 cm ⁻¹		
Sinal da Amostra fortificada	Concentração	% Recuperação	Sinal da Amostra fortificada	Concentração	% Recuperação
397,881	137,59	86,65	47,289	138,98	87,95
365,304	126,55	80,13	43,367	127,46	80,96
311,228	108,22	57,79	32,663	96,00	46,49
372,428	128,96	76,99	43,238	127,08	75,24
292,048	101,72	55,88	36,198	106,39	60,18

Tabela 40: Concentração de Ranolazina nas amostras fortificadas e percentagem de recuperação para os comprimidos Ranexa 750, obtidas por DRIFT e pelo método analítico do padrão externo.

A percentagem de recuperação obtida pela Equação 8, varia entre 46 e 88 %, sendo que o ideal seria manter-se entre os 80 -120 %. Embora algumas amostras, se encontrem dentro do limite esperado, é importante perceber que apenas, estamos a considerar na maioria dos casos um replicado por cada padrão. Logo, é importante realçar que os resultados apresentados não têm grande significado analítico, sendo importante repetir-se estes estudos, assegurando então uma melhor coerência nas medidas efetuadas.

Em conclusão, o protocolo seguido para a análise de Ranolazina por DRIFT, quer pelo o método analítico do padrão externo como pelo do padrão interno, não tem a gama de concentrações mais adequada. No entanto dado o tempo limitado para a realização do trabalho não foi possível refazer o protocolo com uma gama de trabalho ajustada às necessidades do método. Outro aspeto é a escolha das áreas de integração poderia ser modificada, pois dada complexidade do espectro de DRIFT da Ranolazina muitas outras hipóteses podem ainda ser testadas.

4. Trabalho Futuro

Neste trabalho, a Ranolazina utilizada para a preparação dos padrões foi obtida por purificação dos comprimidos a utilizar como amostra, futuramente é importante considerar a utilização de Ranolazina pura como matéria prima. Deste modo poderá ser evitada alguma interferência devida a excipiente residual.

No que diz respeito ao protocolo desenvolvido para a análise em solução, existem trabalhos publicados, com algumas diferenças no que diz respeito aos protocolos seguidos e aos resultados obtidos, embora o solvente em todos tenha sido o metanol. Sendo a Ranolazina uma molécula bastante difícil de dissolução, o que pode condicionar a preparação das soluções, é importante que se façam estudos utilizando outro tipo de solventes. Contudo o diclorometano, outro solvente em que a solubilidade da Ranolazina é boa, é ambientalmente perigoso e por isso deve ser evitado. Assim outros tipo de solventes como os líquidos iônicos poderiam eventualmente ser estudados. Tendo em consideração os resultados obtidos nos ensaios de recuperação, também é de considerar a utilização do método da adição de padrão, numa tentativa de eliminar as possíveis interferências de matriz.

Em relação aos outros protocolos, onde são utilizadas amostras no estado sólido é importante aperfeiçoar a técnica de preparação dos padrões e da análise espectroscópica dos pós de forma a haver uma manipulação mais correta. Uma das possibilidades seria utilizar ferramentas que eliminem a variabilidade dos processos de moagem e prensagem dos pós de forma a garantir a repetibilidade da preparação das amostras e posteriormente na leitura destas. Contudo, não existem equipamentos disponíveis para este efeito específico pelo que a dependência da competência do analista nunca poderá ser eliminada.

Os resultados obtidos para as misturas mecânicas de Ranolazina na análise por DRUV, mostram que é necessário avaliar melhor a gama de trabalho utilizada. Desta forma, é importante repetir-se o estudo utilizando gamas de trabalho diferentes, utilizando concentrações mais baixas e fazer um maior número de replicados de leituras de cada um dos padrões e das amostras tentando assim aumentar repetibilidade dos resultados. De referir, que não foram encontrados para este estudo qualquer trabalho publicado, sendo necessário desenvolver ainda muito trabalho na área, nomeadamente a pesquisa de um composto que possa ser utilizado como padrão interno, fazendo a

análise pelo método do padrão interno, tentado eliminar os efeitos de variação de compactação dos pós a analisar.

A análise de Ranolazina em amostras por adsorção em matriz sólida por DRUV, mostrou que também será decisivo encontrar a gama de trabalho ideal que será de certo com concentrações mais baixas do que as utilizadas no desenvolvimento deste trabalho, devendo-se então repetir todo o estudo. É importante explorar este método de caracterização na indústria farmacêutica para a Ranolazina, e que poderá eventualmente ser aplicada a outros fármacos, uma vez que a produção de comprimidos pode ser feito por via húmida. Um estudo importante seria a caracterização estrutural da Ranolazina adsorvida, por exemplo por espectroscopia de infravermelho, de modo a confirmar a hipótese da interação por pontes de hidrogénio entre o analito e a matriz.

Relativamente aos resultados obtidos para a quantificação de Ranolazina por DRIFT, apontam tal como para o caso da análise por DRUV, para um trabalho futuro de adequação da preparação de padrões e amostras a outra gama de concentrações. Tal como acontece na análise por DRUV, estas também são misturas mecânicas e por isso é importante assegurar a correta manipulação das amostras, minimizando a heterogeneidade inerente à preparação destas. Importante será também explorar outras áreas de integração no espectro para se obterem evoluções de sinal mais coerentes com o aumento da concentração.

Sintetizando, tendo em consideração que a maioria dos fármacos estão em formas farmacêuticas sólidas, é importante desenvolver métodos de quantificação com amostras de misturas sólidas, mimetizando o mais fielmente o produto em análise e tendo em conta a insuficiente literatura publicada, é importante que se continue com os estudos exploratórios de forma a atingir-se um método de quantificação fundamentado. Com base no que já foi feito, é oportuno adaptar melhor os intervalos de concentrações que são escolhidos para o estudo, otimizar a preparação das amostras, assegurando a sua homogeneidade e procurar encontrar métodos que ajudem a minimizar erros que possam ocorrer no decorrer do estudo.

É importante referir que a Ranolazina é um fármaco que não vem descrito na Farmacopeia Portuguesa e consequentemente não existem parâmetros exigidos para a matéria prima, nomeadamente métodos de quantificação aprovados como oficiais, por

isso a investigação e trabalho futuro no que concerne aos métodos de quantificação desta tornam-se bastante pertinentes.

5. Conclusões

O trabalho desenvolvido teve como objetivo investigar a possibilidade de desenvolver métodos espectroscópicos de quantificação da Ranolazina, usando amostras em diferentes estados físicos, líquido e em pó. Nesse sentido foram desenvolvidos vários protocolos de análise exploratórios, que permitiram compreender melhor quais os aspectos necessários para o desenvolvimento de métodos de quantificação para a Ranolazina em comprimidos.

Foram estudadas duas técnicas espectroscópicas diferentes para a quantificação da Ranolazina, absorção no UV-Vis e infravermelho, utilizando amostras no estado líquido, no estado sólido e também um híbrido entre eles, ou seja adsorção de solução padrão de concentração conhecida numa matriz que tem como finalidade mimetizar o efeito no analito do fabrico de comprimidos por via húmida.

A Ranolazina foi analisada em solução de metanol, por espectroscopia de absorção UV-Vis em transmissão, aos comprimentos de onda de 204,5, 228,0 e 272,5 nm, onde se obteve, respetivamente, uma sensibilidade para o método de $0,070 \pm 0,008$, $0,0213 \pm 0,0004$ e $0,0050 \pm 0,0002 \text{ ppm}^{-1}$, para uma gama de trabalho correspondente de [3,2 – 15,8 ppm], [5,1 – 79,8 ppm] e [33,9 – 393,3 ppm]. Ao fazer-se os estudos em solução, o objetivo foi mostrar que apesar da difícil solubilidade do fármaco, que pode conduzir a uma fraca homogeneidade das soluções preparadas e conduzir a erros significativos, este poderá ser utilizado em condições otimizadas. Embora seja o método de análise que mais está descrito na literatura, e que revelou ter os melhores resultados com os parâmetros do método de análise muito semelhantes aos publicados, no que diz respeito aos ensaios de recuperação este demonstrou ter bastante efeitos de interferência do excipiente e de perdas de analito.

Percebendo a clara influência da difícil solubilização da Ranolazina, foram preparados padrões por adsorção da matriz, utilizando PROSOLV[®], sendo que a solução a ser adsorvida é uma solução metanólica de Ranolazina. Estes estudos tiveram como finalidade perceber o efeito da fraca solubilidade e também mimetizar o processo da preparação dos comprimidos utilizando a via húmida, com o objetivo de aferir a possibilidade do estabelecimento de interações entre a matriz e o analito e qual seu efeito sobre a análise. Tendo em vista as premissas acima mencionadas, preparam-se

também padrões por mistura mecânica, eliminando assim o problema da dissolução do analito, e o efeito de solvente.

A análise por refletância difusa no UV-Vis para misturas mecânicas de Ranolazina e PROSOLV[®], foi efetuada aos comprimentos de onda de 240, 277 e 283 nm, tendo sido obtida como sensibilidade $0,002 \pm 0,002 \text{ ppm}^{-1}$ para os três comprimentos de onda, para a gama de concentrações de [50,63 e 108,73] ppm. No caso da análise por DRUV da Ranolazina adsorvida na matriz de PROSOLV[®], os dados espectroscópicos foram obtidos a 225, 275, e 281 nm, utilizando duas gamas de concentrações diferente, são elas [400,400 – 2401,439] e [1998,602 – 8000,800] ppm, em que o valor de sensibilidade varia entre $0,000003 \pm 0,000002$ e $0,0002 \pm 0,0001 \text{ ppm}^{-1}$.

Uma vez que a literatura não descreve estudos de quantificação da Ranolazina por DRUV não é possível comparar os parâmetros obtidos neste estudo com outros trabalhos. Ao contrário das amostras em solução, na análise por DRUV o ajuste linear feito mostra-nos que o comportamento deste conjunto de amostras não tem significado analítico. Assim, para além de serem necessários mais ensaios para perceber o verdadeiro comportamento da Ranolazina em amostras sólidas, é ainda importante determinar se estas diferenças tão notórias entre os métodos dependem apenas da preparação das amostras ou se há outros fatores envolvidos.

Os comprimentos de onda escolhidos para a análise na gama espectral do UV-Vis tiveram por base os máximo das bandas de absorção da Ranolazina e como se pode verificar estes não são os mesmo nos três protocolos utilizados. Enquanto que para as misturas em solução metanólica o espectros apresentam máximos de absorção a 204,5 e 228,0 nm dependendo da concentração e outro 272,5 nm, nas misturas mecânicas os máximos de absorção são a 240, 277 nm e um ombro a 283 nm e nas amostras por adsorção são a 225, 275 nm e o ombro a 281 nm. Esta diferença observada na posição e forma das bandas pode ser atribuída por um lado ao estado físico da Ranolazina e às interações que se estabelecem com o solvente quando comparamos a análise em solução e em forma sólida. A comparação entre os espectros das misturas mecânicas e os de adsorção em particular da banda a menores comprimentos de onda leva a concluir que é provável que exista estabelecimento de interações fortes da Ranolazina com a matriz, possivelmente formando novas ligações através de pontes de hidrogénio e alterando

assim a estrutura de bandas do espectros de absorção. Em comum nos espectros existe um máximo de absorção por volta dos 270-275 nm.

Ainda acerca dos espectros é importante referir que as concentrações de Ranolazina não são semelhantes em todos os métodos e esta alteração, embora seja normal uma vez que a resposta às amostras em solução e às amostras por misturas mecânicas é diferente, pode ter também influência na posição e forma das bandas.

A análise por refletância difusa no infravermelho foi efetuada utilizando dois métodos analíticos diferentes, o padrão externo e o padrão interno. A análise para o método de padrão externo foi feita por integração de quatro áreas espectrais distintas: [3708,8 – 2606,7], [1766,7 – 1625,9], [1559,0 – 1408,4] e [806,1 – 7218,8] cm^{-1} ; tendo-se obtido respetivamente a sensibilidade de 3 ± 2 ; $0,3 \pm 0,2$; $0,3 \pm 0,2$ e $0,10 \pm 0,08$ ppm^{-1} . Neste estudo verificou-se que o $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ era um composto passível de ser utilizado como padrão interno. Contudo, no método de padrão interno apenas foi possível ter alguma linearidade por integração da área espectral [3708,8 – 2606,7] cm^{-1} , obtendo-se uma sensibilidade de 12 ± 5 ppm^{-1} , para a gama de trabalho de [84,98 – 189,35] ppm. Na análise do padrão interno a %CV para os triplicados apresentaram valor superiores ao que se considera aceitável de acordo com a teoria de Horwitz, e por esse motivo, foi necessário ajustar a análise a apenas duas leituras.

A análise da Ranolazina por DRIFT, mostrou que à semelhança do que acontecia na análise por DRUV, que existe uma grande variabilidade entre as amostras preparadas e por isso os resultados obtidos não são os mais corretos. No entanto na análise pelo método do padrão externo o coeficiente de variação calculado, medida utilizada ao longo do trabalho para avaliar a repetibilidade das medidas, tem um valor aceitável e por essa razão aponta para a possibilidade de realizar a análise por DRIFT nas quatro áreas de integração estabelecidas. No global, os resultados da análise da Ranolazina por DRIFT não confirmam a aplicabilidade da técnica mas mostram que o método proposto é promissor tanto na análise por padrão externo, como para a análise por padrão interno, sendo necessário repetir o estudo, utilizando condições experimentais mais convenientes, assumindo uma gama de trabalho mais adequada e talvez a utilização de outras áreas integração de outras bandas e/ou regiões espectrais.

Os resultados obtidos nos estudos exploratórios realizados neste trabalho, levam a concluir que todos os protocolos propostos apresentam falhas e que tem que ser

melhorados de forma a torná-los em bons métodos de quantificação para a Ranolazina, mas permitem retirar algumas informações importantes para o trabalho futuro. Por exemplo, ficou claro que as gamas de trabalho escolhidas não foram as mais adequadas, no entanto a partir destes resultados, torna-se mais acessível explorar qual a gama de concentração mais indicada para cada método.

A preparação dos padrões e das amostras para análise por refletância difusa requer bastante rigor, rigor esse que é conseguido com a experiência da preparação, uma vez que para que haja uma boa repetibilidade é necessário que os passos necessários à preparação dos padrões e amostra e ainda da análise espectroscópica não sejam sujeitos a grandes variações. Existem vários passos durante aplicação do protocolo sujeitos a erros significativos e os mais importantes são a pesagem, a moagem e a compactação do pó no porta-amostras. As pesagens realizadas são em sucessão e de massas talvez demasiado pequenas para as balanças disponíveis, que é um fator que pode condicionar a precisão das pesagens e desencadear erros sucessivos por parte do operador. Na preparação para a obtenção dos espectros, nomeadamente no que diz respeito à pulverização, homogeneização, altura e quantidade de pó colocado no porta amostras e também a compactação desta. Posto isto, existem bastantes fatores que condicionam a igualdade das condições de obtenção dos dados espectroscópicos entre as amostras. Para que sejam garantidas essas condições com a maior precisão possível é necessário que o operador tenha muita experiência com a técnica de forma a conseguir reproduzir em todas as amostras as mesmas condições.

A análise espectroscópica de Ranolazina em solução já não apresenta tantas condicionantes para que a preparação seja feita de forma semelhante entre todos os padrões e amostras. Na obtenção dos dados espectroscópicos corretos uma condicionante é o volume de amostra colocada na célula de quartzo, sendo necessário garantir que o mesmo ocupa toda a área da célula atravessada pelo feixe de radiação, e também é necessário garantir que na solução dentro da célula não existem bolhas gasosas ou partículas em suspensão. A homogeneidade das soluções entre os ensaios é fácil de assegurar por simples agitação suave da solução. Em relação à preparação dos padrões, não sendo tão complexa como nas amostras sólidas, existem alguns passos críticos em que há a possibilidade de ocorrer erros que irão influenciar toda a análise, nomeadamente no que diz respeito à preparação da solução stock. Sendo a dissolução da Ranolazina difícil há possibilidade de não ser completa e a solução stock não ficar

homogénea, como esta solução posteriormente dá origem às soluções dos padrões, no caso de haver dissolução incompleta as concentrações reais dos padrões seriam inferiores ao previsto.

Em resumo, não havendo qualquer método oficial e os trabalhos publicados serem quase exclusivamente em solução, o objetivo deste trabalho seria apenas explorar a possibilidade de desenvolver métodos de quantificação para a Ranolazina, não utilizando solventes e mimetizando a preparação da análise em contexto real. No entanto, relativamente a todos os protocolos propostos para a quantificação de Ranolazina em comprimidos Ranexa 750 mg, para nenhum é possível confirmar a sua completa aplicabilidade no mundo farmacêutico. A conclusão final é de que existe ainda muito trabalho a ser desenvolvido, mas que a maioria dos protocolos testados são bastante promissores e indicam claramente quais as alterações a efetuar nos estudos seguintes de forma a ajustar as condições experimentais para prosseguir com a validação destes métodos de análise.

BIBLIOGRAFIA

1. Couillaud, B.M., Espeau, P., Mignet, N., Corvis, Y. State of the Art of Pharmaceutical Solid Forms: from Crystal Property Issues to Nanocrystals Formulation. *ChemMedChem* **14**, 8–23 (2019).
2. Baker, E.L., Smith, T.J., Landrigan, P.J. The neurotoxicity of industrial solvents: A review of the literature. *Am. J. Ind. Med.* **8**, 207–217 (1985).
3. Mikhail, Philip, Portoghese. Bicyclic Bases. Synthesis of 2,5-Diazabicyclo[2.2.1]heptanes. *J. Org. Chem* **31**, 1059–1062 (1965).
4. Elzein, E., Shenk, K., Ibrahim, P., Marquart, T., Kerwa, S., Meyer, S., Ahmed, H., Zeng, D., Chu, N., Soohoo, D., Wong, S., Leung, K. Novel inhibitors of fatty acid oxidation as potential metabolic modulators. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **14**, 973–977 (2004).
5. Bourbon, M., Miranda, N., Vicente, A. M., Rato, Q. Doenças cardiovasculares. *Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge* vol. 37 (2016).
6. Thomas, A., Diamond, H., Vieco, J., Chaudhuri, A., Shinnar, S., Cromer, E., Perel, S., Mensah, P., Narula, G.A., Johnson, J., Roth, C.O., Moran, G.A. Global Atlas of Cardiovascular Disease 2000-2016: The Path to Prevention and Control. *Glob. Heart* **13**, 143–163 (2018).
7. Prevention for disease control and Other Conditions Related to Heart Disease. Disponível em: https://www.cdc.gov/heartdisease/other_conditions. (2019). (acedido a 23 de Março de 2020)
8. World Health Organization (OMS). What are cardiovascular diseases? Disponível em: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) (2017). (acedido a 23 de Março de 2020)
9. Macedo, R.C.F., Pinto, M.E., Neves, F., Andrade, R.C., Santos, C. Programa Nacional Para As Doenças Cérebro-Cardiovasculares. *Direção-Geral da Saúde* (2017).
10. World Health Organization. The global burden of disease 2004. *Updat. World*

Heal. Organ. 146 (2004)

11. Saúde, O. M. Cardiovascular diseases (CVDs).
Disponível em: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) (2017). (Acedido a 25 de Março de 2020)
12. Tobergte, D. R., Curtis, S. Risco de Morrer 2012. *Instituto Nacional de Estatística* vol. 53 (2013).
13. Instituto Nacional de Estatística, Estatísticas Demográficas – 2018. *Instituto Nacional de Estatística, IP* (2018).
14. Instituto Nacional de Estatística. Causas de Morte. *Instituto Nacional de Estatística* (2020).
15. Mafra, F., Oliveira, H. Avaliação do risco cardiovascular - Metodologias e suas implicações na prática clínica. *Rev. Port. Clínica Geral* **24**, 391–400 (2008).
16. Piepoli, M.F., Hoes, A.W., Agewall, S., Albus, C., Brotons, C., Catapano, A.L., Cooney, M.T., Corra, U., Cosyns, B. *et al.* 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur. Heart J.* **37**, 2315–2381 (2016).
17. Cooney, M. T., Dudina, A. L., Graham, I. M. Value and Limitations of Existing Scores for the Assessment of Cardiovascular Risk. A Review for Clinicians. *J. Am. Coll. Cardiol.* **54**, 1209–1227 (2009).
18. Conroy, R.M., Pyörälä, K., Fitzgerald, A.P., Sans, S., Menotti, A., De Backer, G., Bacquer, D., Ducimetière, P., Jousilahti, P., Keil, U., Njølstad, I., Oganov, R., Thomsen, T., Tunstall-Pedoe, H., Tverdal, A., Wedel, H., Whincup, P., Witheimsen, L., Graham, I.M. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: The SCORE project. *Eur. Heart J.* **24**, 987–1003 (2003).
19. Han, Y. Initial COVID-19 affecting cardiac patients in China. *Eur. Heart J.* 2020 (2020)n.
20. Chow, N., Fleming-Dutra, K., Gierke, R., Hall, A., Hughes, M. Pilishvili, T., Ritchey, M, Roguski, K., Skoff, T. Preliminary Estimates of the Prevalence of

- Selected Underlying Health Conditions Among Patients with Coronavirus Disease 2019 — United States, February 12–March 28, 2020. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **69**, 382–386 (2020).
21. Adão, R., Guzik, T.J. Inside the heart of COVID-19. *Cardiovasc. Res.* 1–3 (2020)
 22. Xiong, T.Y., Redwood, S., Prendergast, B. Coronaviruses and the cardiovascular system: acute and long-term implications. *Eur. Heart J.* 1–3 (2020)
 23. Direção-Geral da Saúde. Abordagem terapêutica farmacológica da angina estável. *Norma da Direção-Geral da Saúde* (2013).
 24. American Heart Association. Angina (Chest Pain).
Disponível em: <https://www.heart.org/en/health-topics/heart-attack/angina-chest-pain> (2015). (Acedido em: 19 - 04 - 2020)
 25. Montalescot, G., Sechtem, U. 2013 ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease. *Eur. Heart J.* **34**, 2949–3003 (2013).
 26. Parker, J N., Parker, P.M. The 2002 official patient’s sourcebook on angina. (2002).
 27. Yasue, H., Kugiyama, K. Coronary Spasm: Clinical Features and Pathogenesis. *Intern. Med.* **36**, 760–765 (1997).
 28. National Heart, Lung and Blood Institute. 2012 NHLBI Morbidity and Mortality Chart Book. (2012).
 29. Yasue, H., Omote, S., Takizawa, A., Nagao, M., Miwa, K., Tanaka, S. Circadian variation of exercise capacity in patients with Prinzmetal’s variant angina: Role of exercise-induced coronary arterial spasm. *Circulation* **59**, 938–948 (1979).
 30. Araki, H., Koiwaya, Y., Nakagaki, O., Nakamura, M. Diurnal distribution of ST-segment elevation and related arrhythmias in patients with variant angina: A study by ambulatory ECG monitoring. *Circulation* **67**, 995–1000 (1983).
 31. Yasue, H., Nakagawa, H., Itoh, T., Harada, E. Coronary artery spasm - Clinical features, diagnosis, pathogenesis, and treatment. *J. Cardiol.* **51**, 2–17 (2008).
 32. Robert, A. Kloner, B. Angina and Its Management. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* **22**, 199–209 (2017).

33. Juul-Möller, S., Edvardsson, N., Jahnmatz, B., Rosén, A., Sørensen, S. Double-blind trial of aspirin in primary prevention of myocardial infarction in patients with stable chronic angina pectoris. *Ned. Tijdschr. Geneeskd.* **340**, 2206–2208 (1992).
34. Gurbel, P.A., Bliden, K.P., Butler, K., Tantry, U.S., Gesheff, T., Wei, C., Teng, R., Antonino, M.J., Patil, S.B., Karunakaran, A., Kereiakes, D.J., Parris, C., Purdy, D., Wilson, V. Randomized double-blind assessment of the ONSET and OFFSET of the antiplatelet effects of ticagrelor versus clopidogrel in patients with stable coronary artery disease: The ONSET/OFFSET study. *Circulation* **120**, 2577–2585 (2009).
35. Yusuf, S., Zhao, F., Mehta, S.R., Chrolavicius, S., Tognoni, G.F. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without st-segment elevation. *N. Engl. J. Med.* **345**, 494–502 (2001).
36. Opie, L.B.G. Nitrates and newer anti-anginals. *Drugs for the Heart, 8th ed* (Elsevier, 2012).
37. Kawanishi, D.T., Reid, C.L., Morrison, E.C. Response of angina and ischemia to long-term treatment in patients with chronic stable angina: A double-blind randomised individualized dosing trial of nifedipine, propranolol and their combination. *J. Am. Coll. Cardiol.* **19**, 409–417 (1992).
38. Steven, E., Nissen, E., Tuzcu, M., Libby, P., Thompson, P.D., Ghali, M., Garza, D., Berman, L., Shi, H., Buebendorf, E. Effect of Antihypertensive Agents on Cardiovascular Events in Patients With Coronary Disease and Normal Blood Pressure The CAMELOT Study: A Randomized Controlled Trial. *J. Am. Soc. Hypertens.* **292**, 2217–2226 (2004).
39. Tardif, J.C., Ford, I., Tendera, M., Bourassa, M.G. Efficacy of ivabradine, a new selective If inhibitor, compared with atenolol in patients with chronic stable angina. *Eur. Heart J.* **26**, 2529–2536 (2005).
40. The IONA Study Group. Effect of nicorandil on coronary events in patients with stable angina: The Impact Of Nicorandil in Angina (IONA) randomised trial. *Lancet* **359**, 1269–1275 (2002).

41. Piatti, F.G, Monti, L., Palloshi, A., Setola, E., Puccetti, P., Calori, G., Lopaschuk G.D. Short- and long-term beneficial effects of trimetazidine in patients with diabetes and ischemic cardiomyopathy. *Am. Heart J.* **146**, (2003).
42. Jerling, M. Clinical pharmacokinetics of ranolazine. *Clin. Pharmacokinet.* **45**, 469–491 (2006).
43. Noman, A., Donald, S.C., Ogston, S., Lang, C. Effect of high-dose allopurinol on exercise in patients with chronic stable angina: a randomised, placebo controlled crossover trial. *Lancet* **375**, 2161–2167 (2010).
44. Yusuf, S., Zucker, D., Peduzzi, P., Fisher, L.D., Takaro, T., Kennedy, K.W., Davis, K., Killip, T., Passamani, E., Morris, C., Mathur, V., Varnauskas, E. Chalmers, T. Effect of coronary artery bypass graft surgery on survival: overview of 10-year results from randomised trials by the Coronary Artery Bypass Graft Surgery Trialists Collaboration. *Lancet* **344**, 563–570 (1994).
45. Loop, F.D., Lytle, B.W., Cosgrove, D.M., Stewart, R.W., Goormastic, M., Williams, G.W., Leonard, A., Golding, R., Gill, C.C., Taylor, P.C., Dheldon, W.C. Influence of the internal-mammary-artery graft on 10-year survival and other cardiac events. *N. Engl. J. Med.* **314**, 1–6 (1986).
46. Fitzgibbon, G.M., Kafka, H.P., Leach, A.J., Keon, W.J., Hooper, G.D. Coronary bypass graft fate and patient outcome: Angiographic follow-up of 5,065 grafts related to survival and reoperation in 1,388 patients during 25 years. *J. Am. Coll. Cardiol.* **28**, 616–626 (1996).
47. Lopez-Ortiz, M., Monsalvo, I., Demare, P., Paredes, C., Mascher, D., Hernandez, C., Hernandez, M. Synthesis of ranolazine derivatives containing the (1S,4S)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptane moiety and their evaluation as vasodilating agents. *Chem. Biol. Drug Des.* **83**, 710–720 (2014).
48. Hanwell, M.D., Curtis, D.E., Lonie, D.C., Vandermeersch, T., Zurek, E. Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J. Cheminform.* **4**, (2012).
49. Network, P.D.R., Montvale, L.L.C. Physicians Desk Reference 65th ed. (2011).
50. National Center for Biotechnology Information. Ranolazine, CID=56959.

PubChem Database.

Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ranolazine>.

(Acedido a 22 - 04 - 2020)

51. Reffelmann, T., Kloner, R.A. Ranolazine: An anti-anginal drug with further therapeutic potential. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* **8**, 319–329 (2010).
52. European Medicines Agency - European Union. Summary of product characteristics. (2013).
53. CCF (Centro de Conferência de Facturas). Dados de consumos de medicamentos no mercado do Serviço Nacional de Saúde. (2020).
54. Sendón, J.L., Lee, S., Cheng, M.L., Ben-Yehuda, O. Effects of ranolazine on exercise tolerance and angina frequency in patients with severe chronic angina receiving maximally-tolerated background therapy: Analysis from the Combination Assessment of Ranolazine in Stable Angina (CARISA) randomized trial. *Eur. J. Prev. Cardiol.* **19**, 952–959 (2012).
55. Tomaselli, G., Roden, D.M. Conceptual Basis for Cardiac Arrhythmology. Molecular and Cellular Basis of Cardiac Electrophysiology, *Elsevier Inc.* (2005).
56. Lester, R.M., Paglialunga, S., Johnson, I.A. QT assessment in early drug development: The long and the short of it. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
57. Hale, S.L., Shryock, J.C., Belardinelli, L., Sweeney, M., KlonerSharon, R.A., Hale, L., Shryock, J.C., Belardinelli, L., Sweeney, M., Klone, R.A. Late sodium current inhibition as a new cardioprotective approach. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **44**, 954–967 (2008).
58. Maier, L.S. A novel mechanism for the treatment of angina, arrhythmias, and diastolic dysfunction: Inhibition of late INa using ranolazine. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **54**, 279–286 (2009).
59. Antzelevitch, C., Burashnikov, A., Sicouri, S., Belardinelli, L. Electrophysiologic basis for the antiarrhythmic actions of ranolazine. *Heart. Rhythm* **8**, 1281–1290 (2011).
60. Burashnikov, A., Diego, J.M.D., Zygmunt, A.C., Belardinelli, L., Antzelevitch,

- A.C. Atrium-selective sodium channel block as a strategy for suppression of atrial fibrillation: Differences in sodium channel inactivation between atria and ventricles and the role of ranolazine. *Circulation* **116**, 1449–1457 (2007).
61. Undrovinas, A.I., Belardinelli, L., Undrovinas, N.A. Ranolazine improves abnormal repolarization and contraction in left ventricular myocytes of dogs with heart failure by inhibiting late sodium current. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **17**, 169–177 (2006).
62. Ritter, J.M., Lewis, L.D., Mant, T., Ferro, A. A Textbook of Clinical Pharmacology and Therapeutics 5th. (2008).
63. FDA. Ranexa[®] (ranolazine extended-release tablets). 1–14 (2006).
64. Rayner-Hartley, E., Sedlak, T. Ranolazine: A contemporary review. *J. Am. Heart Assoc.* **5**, 1–9 (2015).
65. Saad, M., Mahmoud, A., Elgendy, I.Y., Richard, C. Ranolazine in Cardiac Arrhythmia. *Clin. Cardiol.* **39**, 170–178 (2016).
66. Assembleia da República. Decreto-Lei n.º176 de 30 de Agosto de 2006. *Diário da República* 8 (2006).
67. Gorog, S. Ultraviolet-Visible Spectrophotometry in Pharmaceutical Analysis. (2017).
68. Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J. Fundamentals of Analytical Chemistry, 9th Edition. (2014).
69. Banwell, C. N. Fundamentals of Molecular Spectroscopy - 3rd ed. (1983).
70. ChenTodd, Z.G., DeutschHuyen, N., DomenKeith, D., Arnold, E.J., Nicolas, F., Roxanne, G., Clemens, G., Thomas, H., Kleiman, J.A., Eric, S., Kazuhiro, M., Turner, T.J. Chapter 5 - UV-Vis Spectroscopy. *Photoelectrochemical Water Splitting* 49–62 (2013).
71. Caricato, M., Trucks, G.W., Frisch, M.J., Wiberg, K.B. Electronic transition energies: A study of the performance of a large range of single reference density functional and wave function methods on valence and rydberg states compared to experiment. *J. Chem. Theory Comput.* **6**, 370–383 (2010).

72. Koleżyński, A. *Molecular Spectroscopy - Experiment and Theory: From Molecules to Functional Materials*. vol. 26 (2019).
73. McHale, J.L. *Molecular Spectroscopy, Second Edition*. *CRC Press* (2017).
74. Colthup, N.B., Daly, L.H., Wiberley, S.E. *Introduction to infrared and raman spectroscopy 2nd edition*. (1975).
75. Stuart, B. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. *Analytical Techniques in the Sciences* (2005).
76. Skoog, D.A., Holler, F.J. *Principles of Instrumental Analysis, 6Ed. Conference Record of 51st Asilomar Conference on Signals, Systems and Computers, ACSSC 2017* vols. 2017-October (1998).
77. Aldiyarov, A. Aryutkina, M. Drobyshev, A. Kaikanov, M. Investigation of dynamic glass transitions and structural transformations in cryovacuum condensates of ethanol. *Low Temp. Phys.* **35**, 251–255 (2009).
78. Bhattacharyya, D., Zhang, Y., Elles, C.G., Bradforth, S.E. Electronic Structure of Liquid Methanol and Ethanol from Polarization-Dependent Two-Photon Absorption Spectroscopy. *J. Phys. Chem. A* **123**, 5789–5804 (2019).
79. Willard, H.H. Merritt, L.L. Dean, J.A. *Instrumental Methods of analysis, 7th edition*. (1989).
80. Vargas, W.E., Niklasson, G.A. Applicability conditions of the Kubelka–Munk theory. *Appl. Opt.* **36**, 5580–5586 (1997).
81. Kubelka, P. New Contributions to the Optics of Intensely Light-Scattering Materials. Part I. *J. Opt. Soc. Am.* **38**, 448–457 (1948).
82. Kubelka, P. Munk, F. Ein Beitrag Zur Optik Der Farbanstriche. *Z. Techn. Phys.* **12**, 593–601 (1931).
83. Dahm, D.J., Dahm, K.D. Review : Formulae for absorption spectroscopy - related to idealised cases. *J. near infrared Spectrosc.* **22**, 249–259 (2014).
84. Kortum, G. *Reflectance Spectroscopy - Principles, Methods, Applications*. (1969).
85. Fuller, M.P., Griffiths, P.R. Diffuse Reflectance Measurements by Infrared Fourier Transform Spectrometry. *Anal. Chem.* **50**, 1906–1910 (1978).

86. Myrick, M.L., Simcock, M.N., Baranowski, M., Brooke, H., Morgan, S.L., McCutcheon, J.N. The Kubelka-Munk Diffuse Reflectance Formula Revisited. *Appl. Spectrosc. Rev.* **46**, 140–165 (2011).
87. Abitan, H., Bohr, H., Buchhave, P. Correction to the Beer-Lambert-Bouguer law for optical absorption. *Appl. Opt.* **47**, 5354–5357 (2008).
88. Khoshhesab, Z.M. Reflectance IR Spectroscopy. *Infrared Spectrosc. - Mater. Sci. Eng. Technol.* **11**, 233–244 (2012).
89. Tomellini, S.A., Finn, J.W. Vibrational spectroscopy in drug discovery, development and production. *Encycl. Anal. Chem. Pharm. drugs. John Wiley Sons* 1–23 (2006).
90. Bunaciu, A.A., Aboul-Enein, H.Y., Fleschin, S. Application of Fourier transform infrared spectroscopy in pharmaceutical drugs analysis. *Appl. Spectrosc. Rev.* **45**, 206–219 (2010).
91. Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal. Guia RELACRE 13 validação de métodos internos de ensaio em análise química. (2000).
92. Martins, A.F.S. Implementação e validação de métodos analíticos. (Universidade Coimbra, 2016).
93. Ravisankar, P., Navya, N., Pravallika, D., Sri, N. A review on step-by-step analytical method validation. *IOSR J. Pharm.* **5**, 2250–3013 (2015).
94. Ermer, J.M.M. Method Validation in Pharmaceutical Analysis. A Guide to Best Practice. *WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.* (2005).
95. Currie, L.A. Detection and quantification limits: origins and historical overview. *Anal. Chim. Acta* **391**, 127–134 (1999).
96. Thompson, M., Ellison, S.L.R., Wood, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **74**, 835–855 (2002).
97. Cooper, G. Basic Lessons in Laboratory Quality Control - QC Workbook. *Bio-Rad Lab.* 62 (2008).
98. Orozco, C.A.R., Báez, M.R.R. Uso de la ecuación de horwitz en laboratorios de

- ensayos nmx-ec-17025-imnc-2006. *Simp. Metrol. 2010* 1–8 (2010).
99. Horwitz, W., Kamps, L.V.R., Boyer, K.W. Quality Assurance in the Analysis of Foods for Trace Constituents. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **63**, 1344–1354 (1980).
 100. Wenclawiak, B.W., Koch, M. Quality Assurance in Analytical Chemistry - Training and Teaching. *Journal of Chemical Information and Modeling* vol. 53 (2010).
 101. Heckelman, P.E., Koch, C.B., Roman, K.J. The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. (2006).
 102. Bhongade, B.A., Dhaneshwar, S.R. Diffuse reflectance infrared fourier transform spectroscopy (DRIFTS) application in pharmaceutical analysis: Method for quantification of ranolazine in tablet dosage form. *Vib. Spectrosc.* **93**, 52–56 (2017).
 103. Socrates, G. Infrared and Raman characteristic group frequencies. *Wiley, Chichester* (2004).
 104. Swartz, M.E., Krull, I.S. Handbook of Analytical Validation. (2012).
 105. Vishakha, P., Hasumati, R., A Review on Analytical Methods for Ranolazine determination in synthetic mixture. *Pharma Tutor* **4**, 28–31 (2016).
 106. Vishakha, P., Hasumati, R. Ranolazine: A Review on Analytical Method and Its Determination in Synthetic Mixture. *Int. J. Pharm. Res. Allied Sci.* **5**, 1–7 (2016).
 107. Ugale, J.B., Mulgund, S.V. development and validation of uv spectrophotometric area under curve method for quantitative estimation of ranolazine in api and tablet formulation. *World J. Pharm. Res.* **4**, 2665–2672 (2015).
 108. Sharma, A. Development and validation of new colorimetric method for the estimation of Avanafil in bulk and dosage form. *Bharathi College of Pharmacy* (2010).
 109. Ramesh, J., Rajasekhar, K., Gandhi, K.R., Kumar, S.N. method development and validation for the estimation of ranolazine in bulk and in pharmaceutical. *Ann. Pharma Res.* **1**, 4–7 (2013).
 110. Sowmya, P.S., Nirupama, D., Mamatha, N. Development and validation of hplc

and uv methods for estimation of ranolazine in bulk and marketed formulation.

Int. J. Innov. Pharm. Sci. Res. **2**, 1019–1026 (2014).

111. Bhaumik, U., Ghosh, A., Sarkar, A.K., Bose, A., Selvan, S., Sengupta, P., Chakraborty, U.S., Ghosh, D., Pal, T.K. Determination of ranolazine in human plasma by LC–MS/MS and its application in bioequivalence study. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **48**, 1404–1410 (2008).
112. Patel, R.C., Rathod, D.K., Patel, P.R., Patel, V.S. Estimation of Ranolazine Hydrochloride by Spectrophotometric and RP-HPLC in tablet dosage forms. *Int. J. Pharm. Applied Sci.* **1**, 79–83 (2010).
113. Ye, Y.L., Yang, X.M. Determination of residual solvent in Ranolazine by headspace gas chromatography. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* **28**, 134–135 (2008).
114. Gowda, D.V., Gowrav, M.P., Gangadharappa, H.V., Khan, M.S. Preparation and Evaluation of Mixture of Eudragit and Ethylcellulose Microparticles Loaded with Ranolazine for Controlled Release. *J. Young Pharm.* **3**, 189–196 (2011).

ANEXOS

Anexo 1: Fichas de segurança dos solventes

Safety Data Sheet
according to 29CFR1910/1200 and GHS Rev. 3

Effective date : 01.08.2015 Page 1 of 8

Methanol, Lab Grade, 4L

SECTION 1 : Identification of the substance/mixture and of the supplier

Product name : Methanol, Lab Grade, 4L

Manufacturer/Supplier Trade name:

Manufacturer/Supplier Article number: 525426A

Recommended uses of the product and uses restrictions on use:




Manufacturer Details:
AquaPhoenix Scientific
9 Barnhart Drive, Hanover, PA 17331

Supplier Details:
Fisher Science Education
15 Jet View Drive, Rochester, NY 14624

Emergency telephone number:
Fisher Science Education Emergency Telephone No.: 800-535-5053

SECTION 2 : Hazards identification

Classification of the substance or mixture:

-  **Flammable**
Flammable liquids, category 2
-  **Toxic**
Acute toxicity (oral, dermal, inhalation), category 3
-  **Health hazard**
Specific target organ toxicity following single exposure, category 1

AcTox Dermal. 3
Flammable liq. 2
AcTox Oral. 3
AcTox Inhaln. 3
Stot SE. 1

Signal word : Danger

Hazard statements:
Highly flammable liquid and vapour
Toxic if swallowed
Toxic in contact with skin
Toxic if inhaled
Causes damage to organs

Precautionary statements:
If medical advice is needed, have product container or label at hand
Keep out of reach of children
Read label before use

Safety Data Sheet
according to 29CFR1910/1200 and GHS Rev. 3

Effective date : 01.08.2015 Page 2 of 8



Methanol, Lab Grade, 4L


SECTION 3 : Composition/information on ingredients

Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection
Wash skin thoroughly after handling
Do not eat, drink or smoke when using this product
Avoid breathing dust/fume/gas/mist/vapours/spray
Keep away from heat/sparks/open flames/hot surfaces. No smoking
Do not breathe dust/fume/gas/mist/vapours/spray
Specific treatment (see supplemental first aid instructions on this label)
IF ON SKIN: Wash with soap and water
Call a POISON CENTER or doctor/physician if you feel unwell
Specific measures (see supplemental first aid instructions on this label)
Take off contaminated clothing and wash before reuse
Wash contaminated clothing before reuse
IF SWALLOWED: Immediately call a POISON CENTER or doctor/physician
IF exposed: Call a POISON CENTER or doctor/physician
IF INHALED: Remove victim to fresh air and keep at rest in a position comfortable for breathing
Store locked up
Store in a well ventilated place. Keep cool
Dispose of contents and container as instructed in Section 13


Other Non-GHS Classification:

WHMIS

B2  D1B 

D2B 

NFPA/HMIS

 **HMIS RATINGS (0-4)**

Health	2
Flammability	3
Physical Hazard	0
Personal Protection	X

SECTION 3 : Composition/information on ingredients

Ingredients:		
CAS 67-56-1	Methanol	>90 %

Safety Data Sheet
according to 29CFR1910/1200 and GHS Rev. 3

Effective date : 01.08.2015 Page 3 of 8

Methanol, Lab Grade, 4L

SECTION 4 : First aid measures

Percentages are by weight

Description of first aid measures

After inhalation: Move exposed individual to fresh air. Loosen clothing as necessary and position individual in a comfortable position. Get medical assistance. If breathing is difficult, give oxygen

After skin contact: Wash affected area with soap and water. Rinse/flush exposed skin gently using water for 15-20 minutes. Seek medical attention if irritation persists or if concerned.

After eye contact: Protect unexposed eye. Rinse or flush eye gently with water for at least 15-20 minutes, lifting upper and lower lids. Seek medical attention if irritation persists or if concerned

After swallowing: Rinse mouth thoroughly. Do not induce vomiting. Have exposed individual drink sips of water. Dilute mouth with water or milk after rinsing. Get medical assistance.

Most important symptoms and effects, both acute and delayed:

Poison. Toxic by ingestion, absorption through skin and inhalation, potentially causing irreversible effects. Irritating to eyes, skin, and respiratory tract. Irritation- all routes of exposure. Shortness of breath. Nausea. Headache. May be fatal or cause blindness if swallowed. Cannot be made non-poisonous. May cause gastrointestinal irritation, vomiting, and diarrhea. Central nervous system disorders. Skin disorders, preexisting eye disorders, gastrointestinal tract. Toxic: danger of very serious irreversible effects by inhalation, ingestion or absorption through skin. Experiments have shown reproductive toxicity effects on laboratory animals. May cause adverse kidney and liver effects

Indication of any immediate medical attention and special treatment needed:

If seeking medical attention, provide SDS document to physician. Physician should treat symptomatically.

SECTION 5 : Firefighting measures

Extinguishing media

Suitable extinguishing agents: Dry chemical, foam, dry sand, or Carbon Dioxide. Water spray can keep containers cool.

For safety reasons unsuitable extinguishing agents: Water may be ineffective.

Special hazards arising from the substance or mixture:

Risk of ignition. Vapors may form explosive mixtures with air. Vapors may travel to source of ignition and flash back. Containers may explode when heated

Advice for firefighters:

Protective equipment: Wear protective eyewear, gloves, and clothing. Refer to Section 8.

Additional information (precautions): Remove all sources of ignition. Avoid contact with skin, eyes, and clothing. Ensure adequate ventilation. Take precautions against static discharge.

SECTION 6 : Accidental release measures

Personal precautions, protective equipment and emergency procedures:
Use spark-proof tools and explosion-proof equipment. Provide exhaust ventilation or other engineering controls to keep the airborne concentrations of vapor and mists below the applicable workplace exposure limits (Occupational Exposure Limits-OELs) indicated above. Ensure adequate ventilation.

Environmental precautions:

Prevent from reaching drains, sewer or waterway. Should not be released into environment.

Methods and material for containment and cleaning up:

If necessary use trained response staff or contractor. Remove all sources of ignition. Contain spillage and then

Safety Data Sheet

according to 29CFR1910/1200 and GHS Rev. 3

Effective date : 01.08.2015

Page 4 of 8

Methanol, Lab Grade, 4L

collect. Do not flush to sewer. Absorb with a noncombustible absorbent material such as sand or earth and containerize for disposal. Ventilate area of leak or spill. Use spark-proof tools and explosion-proof equipment. Follow proper disposal methods. Refer to Section 13.

Reference to other sections:

SECTION 7 : Handling and storage

Precautions for safe handling:

Use in a chemical fume hood. Wash hands before breaks and immediately after handling the product. Avoid contact with skin, eyes, and clothing. Take precautions against static discharge.

Conditions for safe storage, including any incompatibilities:

Store in a cool location. Provide ventilation for containers. Avoid storage near extreme heat, ignition sources or open flame. Keep container tightly sealed. Store with like hazards. Protect from freezing and physical damage.

SECTION 8 : Exposure controls/personal protection



Control Parameters:

67-56-1, Methanol, ACGIH: 250 ppm STEL; 200 ppm TWA
67-56-1, Methanol, NIOSH: 250 ppm STEL; 325 mg/m3 STEL
67-56-1, Methanol, NIOSH: 200 ppm TWA; 260 mg/m3 TWA

Appropriate Engineering controls:

Emergency eye wash fountains and safety showers should be available in the immediate vicinity of use or handling. Ensure that dust-handling systems (exhaust ducts, dust collector, vessels, and processing equipment) are designed to prevent the escape of dust into the work area.

Respiratory protection:

Use in a chemical fume hood. If exposure limit is exceeded, a full-face respirator with organic cartridge may be worn.

Protection of skin:

Select glove material impermeable and resistant to the substance. Select glove material based on rates of diffusion and degradation.

Eye protection:

Safety glasses with side shields or goggles.

General hygienic measures:

Wash hands before breaks and at the end of work. Avoid contact with the eyes and skin. Dispose of contaminated gloves after use in accordance with applicable laws and good laboratory practices. Perform routine housekeeping.

SECTION 9 : Physical and chemical properties

Appearance (physical state,color):	Clear colorless liquid	Explosion limit lower:	6
		Explosion limit upper:	31
Odor:	Alcohol	Vapor pressure:	128 hPa @ 20°C
Odor threshold:	Not Available	Vapor density:	1.11
pH-value:	Not Available	Relative density:	0.79
Melting/Freezing point:	-90°C	Solubilities:	Miscible at 20 °C

Safety Data Sheet

according to 29CFR1910/1200 and GHS Rev. 3

Effective date : 01.08.2015

Page 5 of 8

Methanol, Lab Grade, 4L

Boiling point/Boiling range:	64.7°C @ 760mmHg	Partition coefficient (n-octanol/water):	Not Available
Flash point (closed cup):	12°C	Auto/Self-ignition temperature:	455°C
Evaporation rate:	5.2	Decomposition temperature:	Not Available
Flammability (solid,gaseous):	Flammable	Viscosity:	a. Kinematic: Not Available b. Dynamic: Not Available
Density: Not Available			

SECTION 10 : Stability and reactivity

Reactivity: Vapours may form explosive mixture with air.

Chemical stability: Stable under normal conditions.

Possible hazardous reactions: None under normal processing.

Conditions to avoid: Excess heat, Incompatible Materials, flames, or sparks.

Incompatible materials: Oxidizing agents, reducing agents, alkali metals, acids, sodium, potassium, metals as powders, acid chlorides, acid anhydrides, powdered magnesium, and aluminum.

Hazardous decomposition products: carbon monoxide, formaldehyde.

SECTION 11 : Toxicological information

Acute Toxicity:		
Dermal:	(rabbit)	LD-50 15800 mg/kg
Oral:	(rat)	LD-50 5628 mg/kg
Inhalation:	(rat)	LC-50 130,7 mg/l
Chronic Toxicity: No additional information.		
Corrosion Irritation:		
Ocular:		Irritating to eyes
Dermal:		Irritating to skin
Sensitization:		No additional information.
Single Target Organ (STOT):		Classified as causing damage to organs: Eyes, skin, optic nerve, gastrointestinal tract, central nervous system, respiratory system, liver, spleen, kidney, blood
Numerical Measures:		No additional information.
Carcinogenicity:		Teratogenicity : has occurred in experimental animals.
Mutagenicity:		Mutagenetic effects have occurred in experimental animals.

Safety Data Sheet

according to 29CFR1910/1200 and GHS Rev. 3

Effective date : 01.08.2015

Page 6 of 8

Methanol, Lab Grade, 4L

Reproductive Toxicity:	Developmental Effects (Immediate/Delayed) have occurred in experimental animals
-------------------------------	---

SECTION 12 : Ecological information

Ecotoxicity

Freshwater Fish: 96 Hr LC50 Pimephales promelas: 28200 mg/L

Freshwater Fish: 96 Hr LC50 Oncorhynchus mykiss: 19500 - 20700 mg/L

Freshwater Fish: 96 Hr LC50 Pimephales promelas: >100 mg/L

Freshwater Fish: 96 Hr LC50 Oncorhynchus mykiss: 18 - 20 mL/L

Freshwater Fish: 96 Hr LC50 Lepomis macrochirus: 13500 - 17600 mg/L

Persistence and degradability: Not persistent.

Bioaccumulative potential: Not Bioaccumulative.

Mobility in soil: Aqueous solution has high mobility in soil.

Other adverse effects:

SECTION 13 : Disposal considerations

Waste disposal recommendations:

Methanol RCRA waste code U154. Do not allow product to reach sewage system or open water. It is the responsibility of the waste generator to properly characterize all waste materials according to applicable regulatory entities (US 40CFR262.11). Absorb with a noncombustible absorbent material such as sand or earth and containerize for disposal. Provide ventilation. Have fire extinguishing agent available in case of fire. Eliminate all sources of ignition. Use spark-proof tools and explosion-proof equipment. Chemical waste generators must determine whether a discarded chemical is classified as a hazardous waste. Chemical waste generators must also consult local, regional, and national hazardous waste regulations. Ensure complete and accurate classification.

SECTION 14 : Transport information

UN-Number

UN1230

UN proper shipping name

Methanol

Transport hazard class(es)

Class:
3 Flammable liquids

Class:
6.1 Toxic substances

Packing group: II

Environmental hazard:

Transport in bulk:

Special precautions for user:

SECTION 15 : Regulatory information

Safety Data Sheet
according to 29CFR1910/1200 and GHS Rev. 3

Effective date : 01.08.2015 Page 7 of 8

Methanol, Lab Grade, 4L

United States (USA)

SARA Section 311/312 (Specific toxic chemical listings):

Acute, Chronic, Fire

SARA Section 313 (Specific toxic chemical listings):

67-56-1 Methanol

RCRA (hazardous waste code):

67-56-1 Methanol RCRA waste code U154

TSCA (Toxic Substances Control Act):

All ingredients are listed.

CERCLA (Comprehensive Environmental Response, Compensation, and Liability Act):

67-56-1 Methanol 5000 lbs

Proposition 65 (California):

Chemicals known to cause cancer:

None of the ingredients is listed

Chemicals known to cause reproductive toxicity for females:

None of the ingredients is listed

Chemicals known to cause reproductive toxicity for males:

None of the ingredients is listed

Chemicals known to cause developmental toxicity:

67-56-1 Methanol

Canada

Canadian Domestic Substances List (DSL):

All ingredients are listed.

Canadian NPRI Ingredient Disclosure list (limit 0.1%):

None of the ingredients is listed

Canadian NPRI Ingredient Disclosure list (limit 1%):

67-56-1 Methanol

SECTION 16 : Other information

This product has been classified in accordance with hazard criteria of the Controlled Products Regulations and the SDS contains all the information required by the Controlled Products Regulations. Note: The responsibility to provide a safe workplace remains with the user. The user should consider the health hazards and safety information contained herein as a guide and should take those precautions required in an individual operation to instruct employees and develop work practice procedures for a safe work environment. The information contained herein is, to the best of our knowledge and belief, accurate. However, since the conditions of handling and use are beyond our control, we make no guarantee of results, and assume no liability for damages incurred by the use of this material. It is the responsibility of the user to comply with all applicable laws and regulations applicable to this material.

GHS Full Text Phrases:

Abbreviations and acronyms:

IMDG: International Maritime Code for Dangerous Goods

PNEC: Predicted No-Effect Concentration (REACH)

Created by Global Safety Management, Inc. -Tel: 1-813-435-5161 - www.gsmsds.com

Safety Data Sheet
according to 29CFR1910/1200 and GHS Rev. 3

Effective date : 01.08.2015 Page 8 of 8

Methanol, Lab Grade, 4L

CFR: Code of Federal Regulations (USA)
SARA: Superfund Amendments and Reauthorization Act (USA)
RCRA: Resource Conservation and Recovery Act (USA)
TSCA: Toxic Substances Control Act (USA)
NPRI: National Pollutant Release Inventory (Canada)
DOT: US Department of Transportation
IATA: International Air Transport Association
GHS: Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals
ACGIH: American Conference of Governmental Industrial Hygienists
CAS: Chemical Abstracts Service (division of the American Chemical Society)
NFPA: National Fire Protection Association (USA)
HMIS: Hazardous Materials Identification System (USA)
WHMIS: Workplace Hazardous Materials Information System (Canada)
DNEL: Derived No-Effect Level (REACH)

Effective date : 01.08.2015

Last updated : 03.27.2015

Created by Global Safety Management, Inc. -Tel: 1-813-435-5161 - www.gsmsds.com

SAFETY DATA SHEET

Creation Date 27-Jan-2010

Revision Date 28-Nov-2019

Revision Number 7

1. Identification

Product Name Methylene chloride

Cat No. : D37-1; D37-4; D37-20; D37-200; D37-200LC; D37-500; D37FB-19; D37FB-50; D37FB-115; D37FB-200; D37POP-19; D37POPB-50; D37POPB-200; D37RB-19; D37RB-50; D37RB-115; D37RB-200; D37RS-19; D37RS-28; D37RS-50; D37RS-115; D37RS-200; D37SK-4; D37SK-4LC; D37SS-28; D37SS-50; D37SS-115; D37SS-200; D37SS-1350; D37RS1000ASME; NC1485726; D37RE200ASME; NC1568702; NC1641358; XXMECLDOW2000; XXMECLDOW200LI

CAS-No 75-09-2
Synonyms Dichloromethane; DCM

Recommended Use Laboratory chemicals.
Uses advised against This chemical/product is not and cannot be distributed in commerce (as defined in TSCA section 3(5)) or processed (as defined in TSCA section 3(13)) for consumer paint or coating removal.

Details of the supplier of the safety data sheet

Company
Fisher Scientific
One Reagent Lane
Fair Lawn, NJ 07410
Tel: (201) 796-7100

Emergency Telephone Number
CHEMTREC®, Inside the USA:
800-424-9300
CHEMTREC®, Outside the USA:
001-703-527-3887

2. Hazard(s) Identification

Classification
This chemical is considered hazardous by the 2012 OSHA Hazard Communication Standard (29 CFR 1910.1200)

Skin Corrosion/Irritation	Category 2
Serious Eye Damage/Eye Irritation	Category 2
Carcinogenicity	Category 1B
Specific target organ toxicity (single exposure)	Category 3
Target Organs - Central nervous system (CNS).	
Specific target organ toxicity - (repeated exposure)	Category 2
Target Organs - Liver, Kidney, Blood.	

Methylene chloride

Revision Date 28-Nov-2019

Methylene chloride

Revision Date 28-Nov-2019

Label Elements

Signal Word
Danger

Hazard Statements
Causes skin irritation
Causes serious eye irritation
May cause drowsiness or dizziness
May cause cancer
May cause damage to organs through prolonged or repeated exposure



Precautionary Statements

Prevention
Obtain special instructions before use
Do not handle until all safety precautions have been read and understood
Use personal protective equipment as required
Wash face, hands and any exposed skin thoroughly after handling
Wear eye/face protection
Do not breathe dust/fume/gas/mist/vapors/spray
Use only outdoors or in a well-ventilated area

Response
IF exposed or concerned: Get medical attention/advice

Inhalation
IF INHALED: Remove victim to fresh air and keep at rest in a position comfortable for breathing

Skin
IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water
If skin irritation occurs: Get medical advice/attention
Take off contaminated clothing and wash before reuse

Eyes
IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing
If eye irritation persists: Get medical advice/attention

Storage
Store locked up
Store in a well-ventilated place. Keep container tightly closed

Disposal
Dispose of contents/container to an approved waste disposal plant

Hazards not otherwise classified (HNOC)
WARNING: Cancer - <https://www.p65warnings.ca.gov/>.

3. Composition/Information on Ingredients

Component	CAS-No	Weight %
Methylene chloride	75-09-2	>99.5

4. First-aid measures

General Advice If symptoms persist, call a physician.

Eye Contact

Rinse immediately with plenty of water, also under the eyelids, for at least 15 minutes. Get medical attention.

Skin Contact

Wash off immediately with plenty of water for at least 15 minutes. If skin irritation persists, call a physician.

Inhalation

Remove to fresh air. If not breathing, give artificial respiration. Get medical attention if symptoms occur.

Ingestion

Clean mouth with water and drink afterwards plenty of water.

Most important symptoms and effects

Inhalation of high vapor concentrations may cause symptoms like headache, dizziness, tiredness, nausea and vomiting; Causes central nervous system depression; Continued or high exposures by inhalation will cause anaesthetic effects. This may result in a loss of consciousness and could prove fatal; Causes formation of carbon monoxide in the blood. Carbon monoxide may cause adverse effects on the cardiovascular system and the central nervous system

Notes to Physician

Treat symptomatically

5. Fire-fighting measures

Suitable Extinguishing Media

Water spray, carbon dioxide (CO2), dry chemical, alcohol-resistant foam.

Unsuitable Extinguishing Media

No information available

Flash Point

No information available

Method -

No information available

Autoignition Temperature

556 °C / 1032.8 °F

Explosion Limits

Upper 23 vol %
Lower 13 vol %
Sensitivity to Mechanical Impact No information available
Sensitivity to Static Discharge No information available

Specific Hazards Arising from the Chemical

Thermal decomposition can lead to release of irritating gases and vapors. Keep product and empty container away from heat and sources of ignition.

Hazardous Combustion Products

Carbon monoxide (CO) Carbon dioxide (CO2) Hydrogen chloride gas Phosgene
Protective Equipment and Precautions for Firefighters
As in any fire, wear self-contained breathing apparatus pressure-demand, MSHA/NIOSH (approved or equivalent) and full protective gear.

NFPA

Health 2	Flammability 1	Instability 0	Physical hazards N/A
--------------------	--------------------------	-------------------------	--------------------------------

6. Accidental release measures

Personal Precautions Use personal protective equipment as required. Ensure adequate ventilation.
Environmental Precautions Should not be released into the environment.

Methods for Containment and Clean Up Soak up with inert absorbent material. Keep in suitable, closed containers for disposal.

Análise por refletância difusa de formulações farmacêuticas sólidas: aplicação na quantificação de Ranolazina

Methylene chloride Revision Date 28-Nov-2019

7. Handling and storage
Handling Wear personal protective equipment/face protection. Do not get in eyes, on skin, or on clothing. Avoid ingestion and inhalation. Vapors are heavier than air and may spread along floors. Handle product only in closed system or provide appropriate exhaust ventilation. Reacts with aluminum and its alloys.
Storage Keep containers tightly closed in a dry, cool and well-ventilated place. Do not store in aluminum containers.

8. Exposure controls / personal protection

Component	ACGIH TLV	OSHA PEL	NIOSH IDLH	Mexico OEL (TWA)
Methylene chloride	TWA: 50 ppm	(Vacated) TWA: 500 ppm (Vacated) STEL: 2000 ppm (Vacated) Ceiling: 1000 ppm TWA: 25 ppm STEL: 125 ppm	IDLH: 2300 ppm	TWA: 50 ppm

Legend

ACGIH - American Conference of Governmental Industrial Hygienists
 OSHA - Occupational Safety and Health Administration
 NIOSH IDLH: The National Institute for Occupational Safety and Health Immediately Dangerous to Life or Health

Engineering Measures Use only under a chemical fume hood. Ensure that eyewash stations and safety showers are close to the workstation location.

Personal Protective Equipment

Eye/face Protection Wear appropriate protective eyeglasses or chemical safety goggles as described by OSHA's eye and face protection regulations in 29 CFR 1910.133 or European Standard EN166.
Skin and body protection Wear appropriate protective gloves and clothing to prevent skin exposure.
Respiratory Protection Follow the OSHA respirator regulations found in 29 CFR 1910.134 or European Standard EN 149. Use a NIOSH/MSHA or European Standard EN 149 approved respirator if exposure limits are exceeded or if irritation or other symptoms are experienced.
Hygiene Measures Handle in accordance with good industrial hygiene and safety practice.

9. Physical and chemical properties

Physical State Liquid
Appearance Colorless
Odor sweet
Odor Threshold No information available
pH No information available
Melting Point/Range -97 °C / -142.6 °F
Boiling Point/Range 39 °C / 102.2 °F
Flash Point No information available
Evaporation Rate No information available
Flammability (solid,gas) Not applicable
Flammability or explosive limits
 Upper 23 vol %
 Lower 13 vol %
Vapor Pressure 350 mbar @ 20°C
Vapor Density 2.93 (Air = 1.0)

Methylene chloride Revision Date 28-Nov-2019

Specific Gravity 1.33
Solubility No information available
Partition coefficient; n-octanol/water No data available
Autoignition Temperature 558 °C / 1032.8 °F
Decomposition Temperature No information available
Viscosity 0.42 mPas @ 25°C
Molecular Formula C H2 Cl2
Molecular Weight 84.93

10. Stability and reactivity

Reactive Hazard None known, based on information available
Stability Stable under normal conditions. Decomposes on exposure to light.
Conditions to Avoid Excess heat. Protect from direct sunlight.
Incompatible Materials Strong oxidizing agents, Strong acids, Amines
Hazardous Decomposition Products Carbon monoxide (CO), Carbon dioxide (CO₂), Hydrogen chloride gas, Phosgene
Hazardous Polymerization Hazardous polymerization does not occur.
Hazardous Reactions Forms a detonable mixture with nitric acid.

11. Toxicological information

Acute Toxicity.
Product Information

Component	LD50 Oral	LD50 Dermal	LC50 Inhalation
Methylene chloride	> 2000 mg/kg (Rat)	> 2000 mg/kg (Rat)	53 mg/L (Rat) 6 h 76000 mg/m ³ (Rat) 4 h

Toxicologically Synergistic Products No information available
Delayed and immediate effects as well as chronic effects from short and long-term exposure.
Irritation Irritating to eyes and skin
Sensitization No information available
Carcinogenicity The table below indicates whether each agency has listed any ingredient as a carcinogen.

Component	CAS-No	IARC	NTP	ACGIH	OSHA	Mexico
Methylene chloride	75-09-2	Group 2A	Reasonably Anticipated	A3	X	A3

IARC: (International Agency for Research on Cancer)
 Group 1 - Carcinogenic to Humans
 Group 2A - Probably Carcinogenic to Humans
 Group 2B - Possibly Carcinogenic to Humans
 Group 3 - Animal Carcinogen
 Group 4 - Not Classified as a Human Carcinogen
 Reasonably Anticipated - Reasonably Anticipated to be a Human Carcinogen

NTP: (National Toxicity Program)
 Known - Known Carcinogen
 Reasonably Anticipated - Reasonably Anticipated to be a Human Carcinogen

ACGIH: (American Conference of Governmental Industrial Hygienists)
 A1 - Known Human Carcinogen
 A2 - Suspected Human Carcinogen
 A3 - Animal Carcinogen
 ACGIH: (American Conference of Governmental Industrial Hygienists)
 Mexico - Occupational Exposure Limits - Carcinogens
 A1 - Confirmed Human Carcinogen
 A2 - Suspected Human Carcinogen
 A3 - Confirmed Animal Carcinogen

Methylene chloride Revision Date 28-Nov-2019

Mutagenic Effects A4 - Not Classifiable as a Human Carcinogen
 A5 - Not Suspected as a Human Carcinogen
 Mutagenic effects have occurred in microorganisms.
Reproductive Effects No information available.
Developmental Effects No information available.
Teratogenicity No information available.
STOT - single exposure Central nervous system (CNS)
STOT - repeated exposure Liver Kidney Blood
Aspiration hazard No information available
Symptoms / effects, both acute and delayed Inhalation of high vapor concentrations may cause symptoms like headache, dizziness, tiredness, nausea and vomiting; Causes central nervous system depression; Continued or high exposures by inhalation will cause anaesthetic effects. This may result in a loss of consciousness and could prove fatal; Causes formation of carbon monoxide in the blood. Carbon monoxide may cause adverse effects on the cardiovascular system and the central nervous system
Endocrine Disruptor Information No information available
Other Adverse Effects Tumorigenic effects have been reported in experimental animals.

12. Ecological information

Ecotoxicity.

Component	Freshwater Algae	Freshwater Fish	Microtox	Water Flea
Methylene chloride	EC50 >660 mg/L/96h	Pimephales promelas: LC50: 193 mg/L/96h	EC50: 1 mg/L/24 h EC50: 2.88 mg/L/15 min	EC50: 140 mg/L/48h

Persistence and Degradability Persistence is unlikely based on information available.
Bioaccumulation/ Accumulation No information available.
Mobility Will likely be mobile in the environment due to its volatility.

Component	log Pow
Methylene chloride	1.25

13. Disposal considerations

Waste Disposal Methods Chemical waste generators must determine whether a discarded chemical is classified as a hazardous waste. Chemical waste generators must also consult local, regional, and national hazardous waste regulations to ensure complete and accurate classification.

Component	RCRA - U Series Wastes	RCRA - P Series Wastes
Methylene chloride - 75-09-2	U080	-

14. Transport information

DOT:
UN-No UN1593
Proper Shipping Name DICHLOROMETHANE
Hazard Class 6.1
Packing Group III
TDG:
UN-No UN1593
Proper Shipping Name DICHLOROMETHANE

Methylene chloride Revision Date 28-Nov-2019

Hazard Class 6.1
Packing Group III
IATA
UN-No UN1593
Proper Shipping Name Dichloromethane
Hazard Class 6.1
Packing Group III
IMDG/IMO
UN-No UN1593
Proper Shipping Name Dichloromethane
Hazard Class 6.1
Packing Group III

15. Regulatory information

United States of America Inventory

Component	CAS-No	TSCA	TSCA Inventory notification - Active/Inactive	TSCA - EPA Regulatory Flags
Methylene chloride	75-09-2	X	ACTIVE	R

Legend:
 TSCA - Toxic Substances Control Act, (40 CFR Part 710)
 X - Listed
 · - Not Listed
 R - Indicates a substance that is the subject of a Section 6 risk management rule under TSCA.

Section 6(a) of the Toxic Substances Control Act (TSCA) This chemical/product is not and cannot be distributed in commerce (as defined in TSCA section 3(5)) or processed (as defined in TSCA section 3(13)) for consumer paint or coating removal.

TSCA 12(b) - Notices of Export Not applicable

International Inventories

Canada (DSL/NDSL), Europe (EINECS/ELINCS/NLP), Philippines (PICCS), Japan (ENCS), Australia (AICS), China (IECSC), Korea (ECL).

Component	CAS-No	DSL	NDSL	EINECS	PICCS	ENCS	AICS	IECSC	KECL
Methylene chloride	75-09-2	X	-	200-838-9	X	X	X	X	KE-23893

U.S. Federal Regulations

SARA 313

Component	CAS-No	Weight %	SARA 313 - Threshold Values %
Methylene chloride	75-09-2	>99.5	0.1

SARA 311/312 Hazard Categories See section 2 for more information

CWA (Clean Water Act)

Component	CWA - Hazardous Substances	CWA - Reportable Quantities	CWA - Toxic Pollutants	CWA - Priority Pollutants
Methylene chloride	-	-	X	X

Clean Air Act

Component	HAPS Data	Class 1 Ozone Depletors	Class 2 Ozone Depletors
Methylene chloride	X	-	-

OSHA - Occupational Safety and Health Administration

Methylene chloride Revision Date 28-Nov-2019

Component	Specifically Regulated Chemicals	Highly Hazardous Chemicals
Methylene chloride	125 ppm STEL 12.5 ppm Action Level 25 ppm TWA	-

CERCLA This material, as supplied, contains one or more substances regulated as a hazardous substance under the Comprehensive Environmental Response Compensation and Liability Act (CERCLA) (40 CFR 302)

Component	Hazardous Substances RQs	CERCLA EHS RQs
Methylene chloride	1000 lb 1 lb	-

California Proposition 65 This product contains the following proposition 65 chemicals

Component	CAS-No	California Prop. 65	Prop 65 NSRL	Category
Methylene chloride	75-09-2	Carcinogen	200 µg/day 50 µg/day	Carcinogen

U.S. State Right-to-Know Regulations

Component	Massachusetts	New Jersey	Pennsylvania	Illinois	Rhode Island
Methylene chloride	X	X	X	X	X

U.S. Department of Transportation

Reportable Quantity (RQ): Y
 DOT Marine Pollutant N
 DOT Severe Marine Pollutant N

U.S. Department of Homeland Security

This product does not contain any DHS chemicals.

Other International Regulations

Mexico - Grade No information available

16. Other information

Prepared By Regulatory Affairs
 Thermo Fisher Scientific
 Email: EMSDS_RA@thermofisher.com

Creation Date 27-Jan-2010
Revision Date 28-Nov-2019
Print Date 28-Nov-2019

Revision Summary This document has been updated to comply with the US OSHA HazCom 2012 Standard replacing the current legislation under 29 CFR 1910.1200 to align with the Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS).

Disclaimer

The information provided in this Safety Data Sheet is correct to the best of our knowledge, information and belief at the date of its publication. The information given is designed only as a guidance for safe handling, use, processing, storage, transportation, disposal and release and is not to be considered a warranty or quality specification. The information relates only to the specific material designated and may not be valid for such material used in combination with any other materials or in any process, unless specified in the text

End of SDS

Anexo 2: SCORE

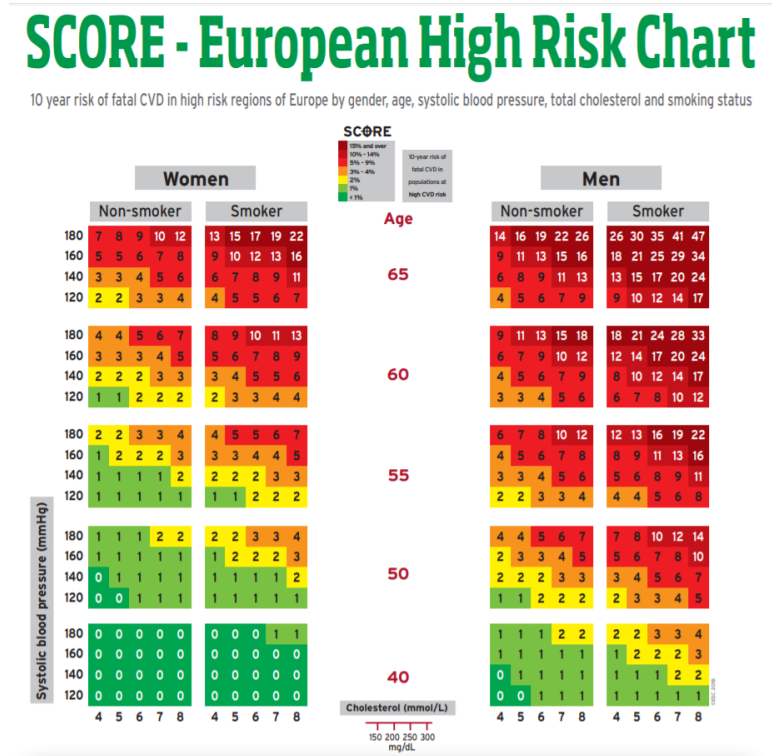


Figura A2-1 - países com alto de risco de desenvolvimento de eventos cardiovasculares. Fonte: European Society of Cardiology

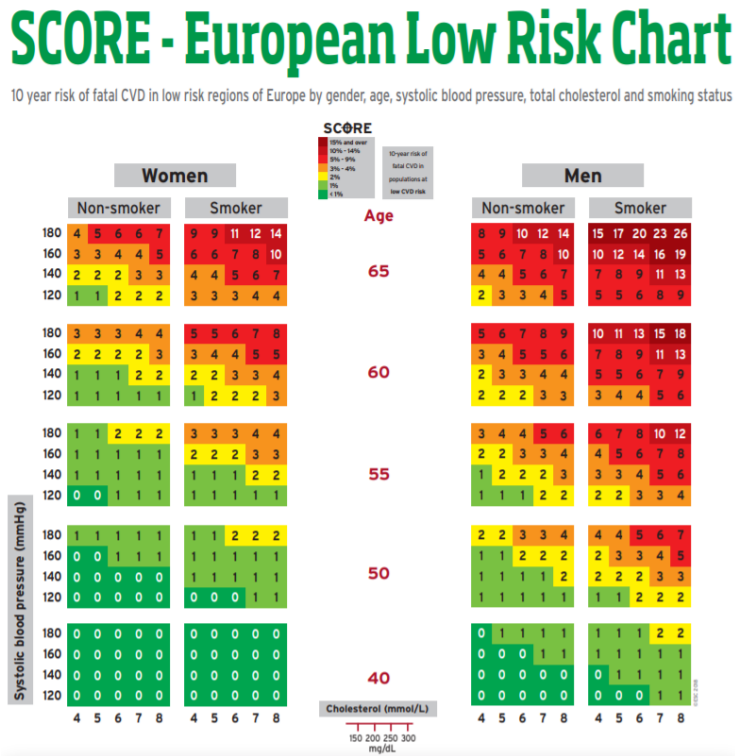


Figura A2-1 - países com baixo de risco de desenvolvimento de eventos cardiovasculares. Fonte: European Society of Cardiology

Very high-risk	<p>Subjects with any of the following:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Documented CVD, clinical or unequivocal on imaging. Documented clinical CVD includes previous AMI, ACS, coronary revascularization and other arterial revascularization procedures, stroke and TIA, aortic aneurysm and PAD. Unequivocally documented CVD on imaging includes significant plaque on coronary angiography or carotid ultrasound. It does NOT include some increase in continuous imaging parameters such as intima-media thickness of the carotid artery. • DM with target organ damage such as proteinuria or with a major risk factor such as smoking or marked hypercholesterolaemia or marked hypertension. • Severe CKD (GFR <30 mL/min/1.73 m²). • A calculated SCORE ≥10%.
High-risk	<p>Subjects with:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Markedly elevated single risk factors, in particular cholesterol >8 mmol/L (>310 mg/dL) (e.g. in familial hypercholesterolaemia) or BP ≥180/110 mmHg. • Most other people with DM (with the exception of young people with type 1 DM and without major risk factors that may be at low or moderate risk). • Moderate CKD (GFR 30–59 mL/min/1.73 m²). • A calculated SCORE ≥5% and <10%.
Moderate-risk	SCORE is ≥1% and <5% at 10 years. Many middle-aged subjects belong to this category.
Low-risk	SCORE <1%.

Figura A2-3 – Categorias de risco cardiovascular. Fonte: 016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice.

Anexo 3 – Plano de preparação dos padrões e das amostras para a análise de Ranolazina

Solução – mãe Ranolazina		
Massa de Ranolazina (mg)	Vol. final (L)	Concentração (ppm)
500,2	0,250	2001

Tabela A3 - 1: Preparação da solução - mãe de Ranolazina para a análise das amostras em solução metanólica.

Solução stock Ranolazina		
Vol. pipetado Sol. Mãe (L)	Vol. final (L)	Concentração (ppm)
0,0025	0,050	100

Tabela A3 - 2: Preparação da solução stock de Ranolazina para a análise das amostras em solução metanólica

Concentração stock amostra			
Massa comprimido (mg)	Massa de Ranolazina (mg)	Vol. final (L)	Concentração (ppm)
922,7	668,0	1,0000	668

Tabela A3 - 3: Preparação da solução stock da amostra para a análise das amostras em solução metanólica

	Vol. balão (mL)	Vol. Sol. Stock de Ranolazina (mL)	Concentração (ppm)
Padrão_0	25	0	0
Padrão_1	25	1	4
Padrão_2	25	2	8
Padrão_3	25	4	16
Padrão_4	25	6	24
Padrão_5	25	8	32
Padrão_6	25	10	40
Padrão_7	25	12	48
	Vol. balão (mL)	Vol Sol. Stock de Amostra (mL)	Concentração (ppm)
Am_1	25	1	26,7
Am_2	25	1	26,7
Am_3	25	1	26,7
Am_4	25	1	26,7
Am_5	25	1	26,7
	Vol. balão (mL)	Vol. Sol. Stock de Ranolazina (mL)	Vol. Sol. Stock de Amostra (mL)
Rec_1	25	1	0,1
Rec_2	25	1	0,1
Rec_3	25	1	0,1
Rec_4	25	1	0,1
Rec_5	25	1	0,1

Tabela A3 - 4: Preparação dos padrões, amostras e ensaios de recuperação em solução para um gama de concentrações mais baixas.

	Vol. balão (mL)	Vol. Sol. Stock de Ranolazina (mL)	Concentração (ppm)
Padrão_0	25,0	0,0	0,0
Padrão_1	25,0	1,0	80,0
Padrão_2	25,0	2,0	160,1
Padrão_3	25,0	3,0	240,1
Padrão_4	25,0	4,0	320,1
Padrão_5	25,0	5,0	400,2
Padrão_6	25,0	6,0	480,2
Padrão_7	25,0	6,5	520,2
	Vol. balão (mL)	Vol Sol. Stock de Amostra (mL)	Concentração (ppm)
Am_1	25,0	10,0	267,2
Am_2	25,0	10,0	267,2
Am_3	25,0	10,0	267,2
Am_4	25,0	10,0	267,2
Am_5	25,0	10,0	267,2
	Vol. balão (mL)	Vol. Sol. Stock de Ranolazina (mL)	Vol. Sol. Stock de Amostra (mL)
Rec_1	50,0	4,0	6,0
Rec_2	50,0	4,0	6,0
Rec_3	50,0	4,0	6,0
Rec_4	50,0	4,0	6,0
Rec_5	50,0	4,0	6,0

Tabela A3 - 541: Preparação dos padrões, amostras e ensaios de recuperação em solução para um gama de concentrações mais altas.

Análise por refletância difusa de formulações farmacêuticas sólidas: aplicação na quantificação de Ranolazina

	mKBr (mg)		mRan (mg)	Concentração (mg/Kg)
Padrão_0	299,7		0	0,0
Padrão_1	299,5		20,5	64,1
Padrão_2	300,1		41,2	120,7
Padrão_3	299,8		51,4	146,4
Padrão_4	300		61,2	169,4
Padrão_5	300,3		80,6	211,6
Padrão_6	300,3		103,2	255,8
Padrão_7	300,1		121,6	288,4
	mKBr(mg)	mComp (mg)		Concentração (mg/Kg)
Am_1	300,3	50,5		103,0
Am_2	299,8	52,4		106,7
Am_3	299,7	50,7		106,5
Am_4	300	50		102,5
	mKBr (mg)	mComp (mg)	mRan (mg)	Concentração (mg/Kg)
Rec_1	300,1	19,7	39,6	155,3
Rec_2	300,3	20,8	40,5	151,9
Rec_3	300	19,7	40,3	153,2
Rec_4	300,1	20,1	40,5	158,0
Rec_5	300,3	21,7	40,5	154,2

Tabela A3 - 542: Preparação dos padrões, amostras e ensaios de recuperação de misturas mecânicas para o método de padrão externo para a análise por DRIFT.

Análise por refletância difusa de formulações farmacêuticas sólidas: aplicação na quantificação de Ranolazina

	mMatriz (mg)		mRan (mg)	Concentração (mg/Kg)
Padrão_0	300,1		0	0,0
Padrão_1	300,5		20,4	63,6
Padrão_2	300,1		40,1	117,9
Padrão_3	300,1		49,9	142,6
Padrão_4	300,5		60,4	167,4
Padrão_5	300,2		80,1	210,6
Padrão_6	300,1		99,9	249,8
Padrão_7	300,1		120,2	286,0

	mMatriz (mg)	mComp (mg)		Concentração (mg/Kg)
Am_1	299,8	49,5		100,3
Am_2	300,1	51,5		104,0
Am_3	300,4	51,4		103,6
Am_4	300,4	49,2		99,1

	mMatriz (mg)	mComp (mg)	mRan (mg)	Concentração (mg/Kg)
Rec_1	300	23	40,2	151,9
Rec_2	300,1	19,6	40,4	148,3
Rec_3	300,2	20,6	40,6	150,3
Rec_4	299,9	23,4	40,2	153,8
Rec_5	299,7	21	40,5	149,7

Tabela A3 - 7: Preparação dos padrões, amostras e ensaios de recuperação de misturas mecânicas para o método de padrão interno para a análise por DRIFT.

	mKBr (mg)	mPI (mg)	m Total (mg)
Matriz	5000	502,7	5502,7

Tabela A3 - 8: Preparação da Matriz do método de padrão interno para a análise por DRIFT de misturas mecânicas.

	mBase (mg)		mRan (mg)	Concentração (mg/Kg)
Padrão_0	600,1		0	0,0
Padrão_1	600		32	50,6
Padrão_2	600,2		40,5	63,2
Padrão_3	600,2		50,4	77,5
Padrão_4	599,9		60,5	91,6
Padrão_5	600		73,2	108,7
Padrão_6	600,1		92,3	133,3
Padrão_7	600,2		102,8	146,2
Padrão_8	600,1		120	166,6
	mBase (mg)	mComp (mg)		Concentração (mg/Kg)
Am_1	600,2	104,9		108,7
Am_2	600	109,7		112,9
Am_3	599,9	123,3		124,6
Am_4	599,9	108,8		112,2
	mBase (mg)	mComp (mg)	mRan (mg)	Concentração (mg/Kg)
Rec_1	599,9	44,5	60,9	132,4
Rec_2	600,1	47,1	62,1	136,1
Rec_3	599,9	30,5	61,4	121,0
Rec_4	600,1	30,1	62,2	121,6
Rec_5	600	31,3	59,8	119,6

Tabela A3 - 943: Preparação dos padrões, amostras e ensaios de recuperação de misturas mecânicas para o método de padrão externo para a análise por DRUV.

Concentração Stock Ranolazina		
massa de Ranolazina (mg)	Vol. final (L)	Concentração (ppm)
200,1	0,1	2001,0

Tabela A3 - 10: Preparação da solução stock de Ranolazina para a análise dos padrões por adsorção.

	Vol. adicionado Stock (microL)	mBase (g)	Concentração (ppm)
Padrão_0	0,0	0,2503	0,0000
Padrão_1	250,0	0,2503	1998,6
Padrão_2	300,0	0,2497	2404,1
Padrão_3	350,0	0,2502	2799,2
Padrão_4	400,0	0,2501	3200,3
Padrão_5	450,0	0,2501	3600,4
Padrão_6	500,0	0,2501	4000,4
Padrão_7	750,0	0,2498	6007,8
Padrão_8	1000,0	0,2501	8000,8
Padrão_9	1250,0	0,2499	10009,0
Padrão_10	1500,0	0,2502	11996,4
Padrão_11	2000,0	0,2499	16014,4
Padrão_12	2500,0	0,2499	20018,0
Padrão_13	3000,0	0,2497	24040,8

Tabela A3 - 1144: Preparação dos padrões por adsorção para o método de padrão externo para a análise por DRUV.

	Vol. adicionado Stock (mL)	mBase (g)	V metanol	Concentração (w/w)
Padrão 0	0,2506	0,2503	5,0000	0,0000
Padrão 1	0,2504	0,2504	4,0000	3,9976
Padrão 2	0,2501	0,2503	3,0000	8,0048
Padrão 3	0,2502	0,2503	2,0000	12,0024
Padrão 4	0,2500	0,2503	1,0000	16,0160
Padrão 5	0,2500	0,2503	0,0000	20,0200

Tabela A3 - 12: Preparação dos padrões de Ranolazina por adsorção para a análise por DRUV

	Massa do composto a testar (mg)	Vol. Final (L)	Concentração (mg/L)
Eritrosina	100,8	0,1	1008,0
Tartrazina	100,8	0,1	1008,0
Ranolazina	100,1	0,1	1008,0

Tabela A3 - 1345: Preparação das Soluções Stock para a preparação dos padrões por adsorção para a análise por DRUV.

Anexo 4: Repetibilidade do método

Padrões	Concentração	Absorvência			CV (%)		
		204,5nm	228,0nm	272,5nm	204,50nm	228,00nm	272,50nm
P0_1	0,000	0,006	0,001	0,000	-	-	-
P0_2		0,009	0,002	0,001			
P0_3		0,014	0,001	0,000			
P1_1	4,000	0,324	0,097	0,026	0,644	3,500	10,657
P1_2		0,321	0,100	0,028			
P1_3		0,325	0,104	0,032			
P2_1	8,000	0,603	0,176	0,046	0,761	0,876	2,547
P2_2		0,597	0,173	0,044			
P2_3		0,606	0,174	0,046			
P3_1	16,010	1,137	0,347	0,084	0,405	0,671	0,000
P3_2		1,131	0,343	0,084			
P3_3		1,128	0,343	0,084			
P4_1	24,010	1,464	0,512	0,123	0,142	0,195	1,229
P4_2		1,465	0,513	0,126			
P4_3		1,461	0,514	0,124			
P5_1	32,010	1,625	0,691	0,166	0,128	0,381	0,346
P5_2		1,629	0,695	0,167			
P5_3		1,626	0,696	0,167			
P6_1	40,020	1,692	0,876	0,209	0,223	0,521	0,988
P6_2		1,699	0,885	0,213			
P6_3		1,698	0,879	0,210			
P7_1	18,030	1,724	1,020	0,246	0,089	0,247	1,259
P7_2		1,723	1,017	0,242			
P7_3		1,721	1,015	0,240			
P8_1	90,030	1,823	1,710	0,409	0,127	0,310	0,425
P8_2		1,819	1,708	0,409			
P8_3		1,819	1,700	0,406			
P9_1	160,060	1,940	3,036	0,834	0,154	0,125	0,434
P9_2		1,943	3,037	0,829			
P9_3		1,946	3,030	0,827			
P10_1	240,100	2,010	3,293	1,217	0,057	0,229	0,426
P10_2		2,012	3,308	1,217			
P10_3		2,012	3,302	1,226			
P11_1	320,130	2,074	3,386	1,648	0,268	0,221	1,302
P11_2		2,081	3,386	1,679			
P11_3		2,085	3,399	1,690			
P12_1	400,160	2,111	3,452	2,005	0,072	0,435	0,333
P12_2		2,108	3,477	1,994			
P12_3		2,110	3,450	2,006			
P13_1	480,190	2,131	3,513	2,335	0,221	0,171	0,348
P13_2		2,138	3,501	2,337			
P13_3		2,140	3,507	2,350			
P14_1	520,210	2,147	3,528	2,475	0,635	0,525	0,230
P14_2		2,164	3,492	2,472			
P14_3		2,137	3,517	2,483			

Tabela A4 - 146: Repetibilidade do sinal medido dos padrões para a análise da Ranolazina em metanol.

Amostras	Concentração		Média		Desvio padrão		%CV		Massa de Ranolazina por comprimido (mg)	
	228,00 nm	272,50 nm	228,00 nm	272,50 nm	228,00 nm	228,00 nm	228,00 nm	272,50 nm	228,00 nm	272,50 nm
Am1_1	33,6								941,7	
Am1_2	32,6		32,8		0,559		0,183		914,0	
Am1_3	32,2								904,8	
Am2_1	32,1								902,1	
Am2_2	31,6		31,9		0,230		0,073		886,3	
Am2_3	31,9								894,2	
Am3_1	29,7								833,5	
Am3_2	29,9		29,8		0,102		0,030		840,1	
Am3_3	29,9								838,8	
Am4_1	31,8								891,6	
Am4_2	31,3		31,6		0,197		0,062		878,4	
Am4_3	31,6								887,6	
Am5_1	31,4								881,0	
Am5_2	31,6		31,5		0,123		0,039		887,6	
Am5_3	31,3								879,7	
Média global			31,5		0,242		0,078			
Am6_1		310								871
Am6_2		312		311,7		1,071		3,339		877
Am6_3		313								877
Am7_1		318								893
Am7_2		322		320,8		1,793		5,754		903
Am7_3		322								905
Am8_1		274								769
Am8_2		322		305,8		22,473		68,718		903
Am8_3		321								902
Am9_1		323								908
Am9_2		324		323,7		0,246		0,795		908
Am9_3		324								909
Am10_1		320								898
Am10_2		322		321,3		0,886		2,847		904
Am10_3		322								903
Média global				316,7		5,294		16,290		

Tabela A4 - 2: Parâmetros do método correspondentes à repetibilidade do sinal medido das amostras.

Anexo 4: Equações utilizadas no método dos mínimos quadrados

Parâmetros	Equação
S_{xx}	$S_{xx} = \sum Cran^2 - \frac{(\sum Cran)^2}{N}$
S_{yy}	$S_{yy} = \sum Sabs^2 - \frac{(\sum Sabs)^2}{N}$
S_{xy}	$S_{xy} = \sum Sabs \times Cran - \frac{(\sum Cran) \times (\sum Sabs)}{N}$
S_y	$S_y = \sqrt{\frac{S_{yy} - (m^2 \times S_{xx})}{N - 2}}$
S_m (com um grau de confiança de 95%)	$S_m = \frac{S_y}{\sqrt{S_{xx}}} \times t_{(n-2;0,95)}$
S_b (com um grau de confiança de 95%)	$S_b = S_y \times \sqrt{\frac{1}{N - \frac{(\sum Cran)^2}{\sum Cran^2}}} \times t_{(n-2;0,95)}$
R^2	$R^2 = \left(\frac{S_{xy}}{\sqrt{S_{xx} \times S_{yy}}} \right)^2$
m	$m = \frac{S_{xy}}{S_{xx}}$
b	$b = \overline{Cran} - (m \times \overline{Sabs})$

Tabela A4 – 1: Quadro resumo das equações para o cálculo dos parâmetros do método dos mínimos quadrados.

Anexo 5: Espectros de Ranolazina

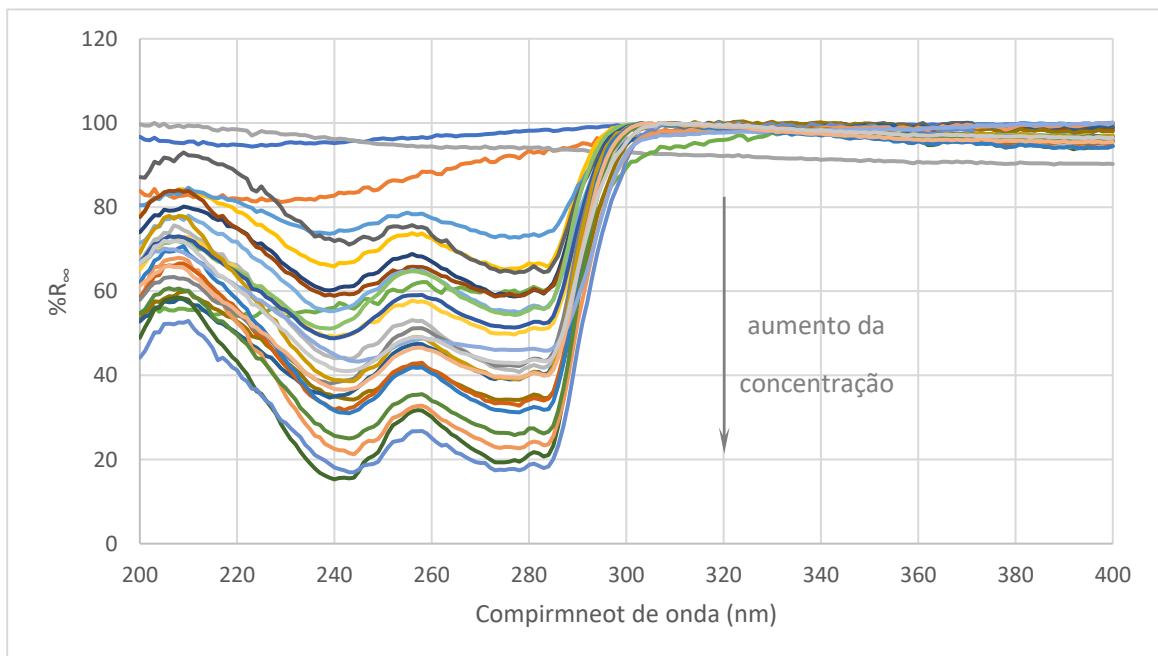
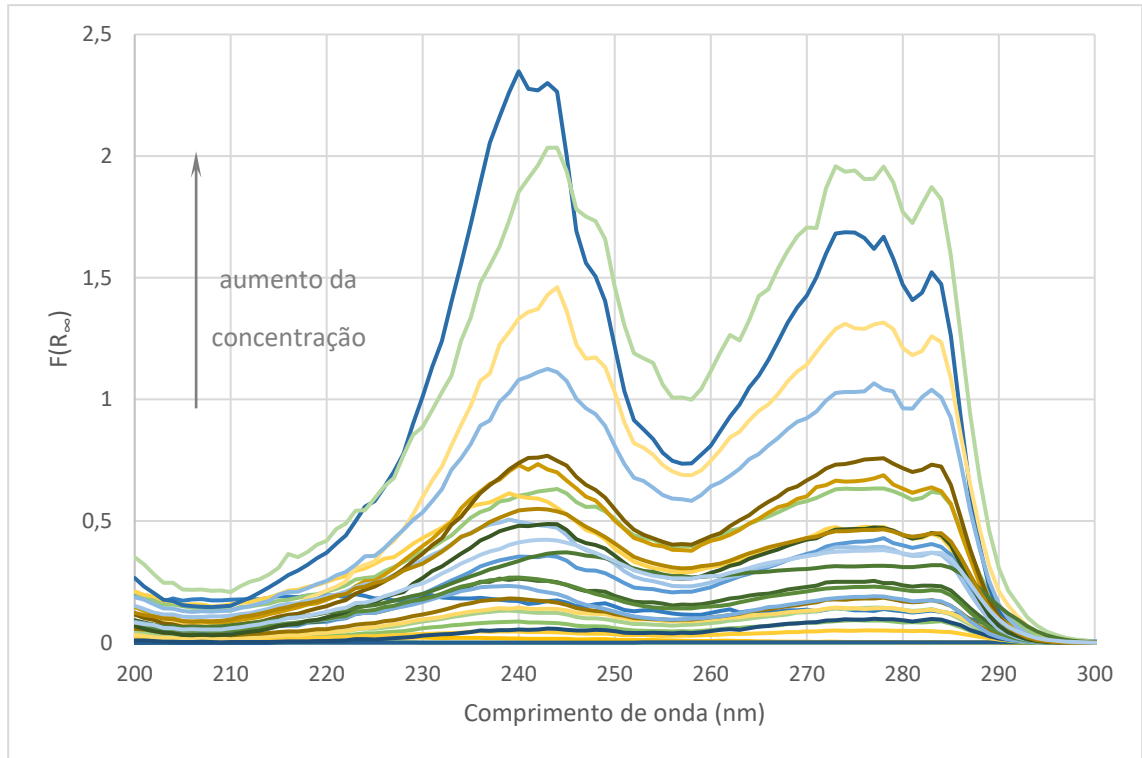


Figura A5 – 1: Totalidade dos espectros DRUV da Ranolazina em mistura mecânica com PROSOLV®, na gama espectral de 200 a 300 nm.

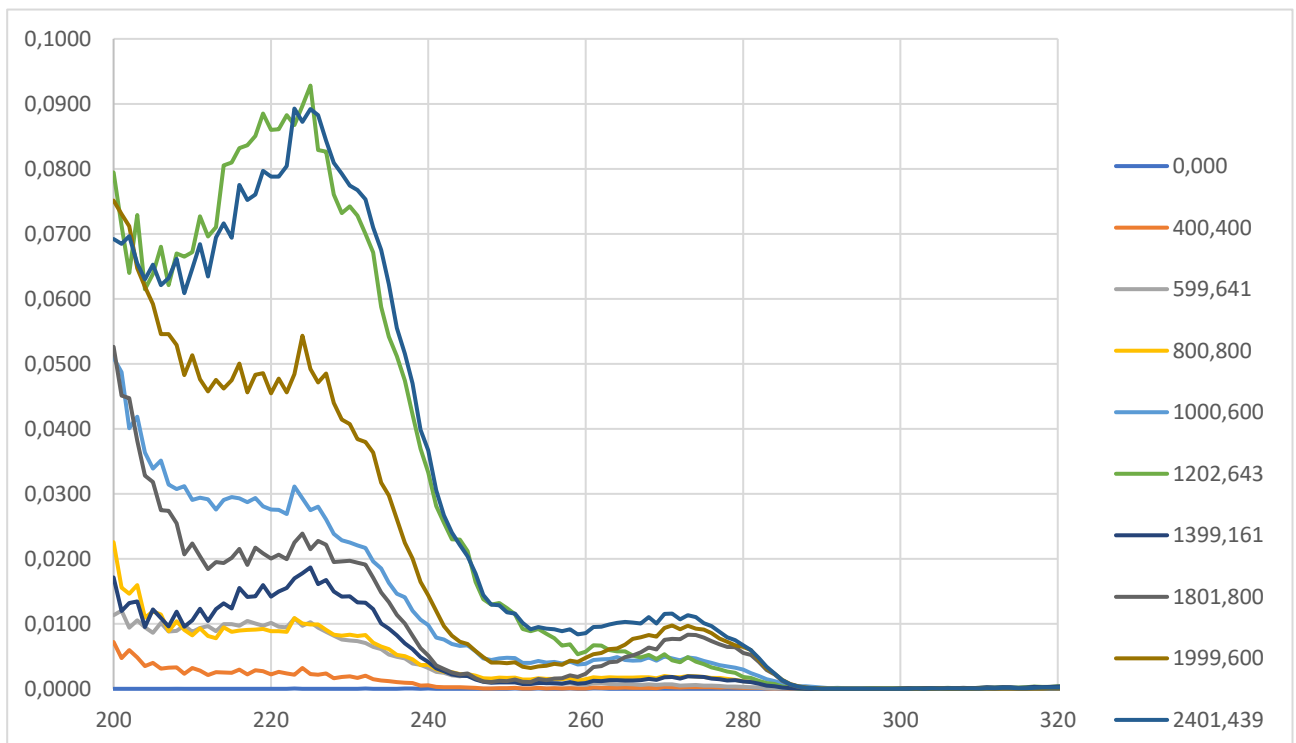
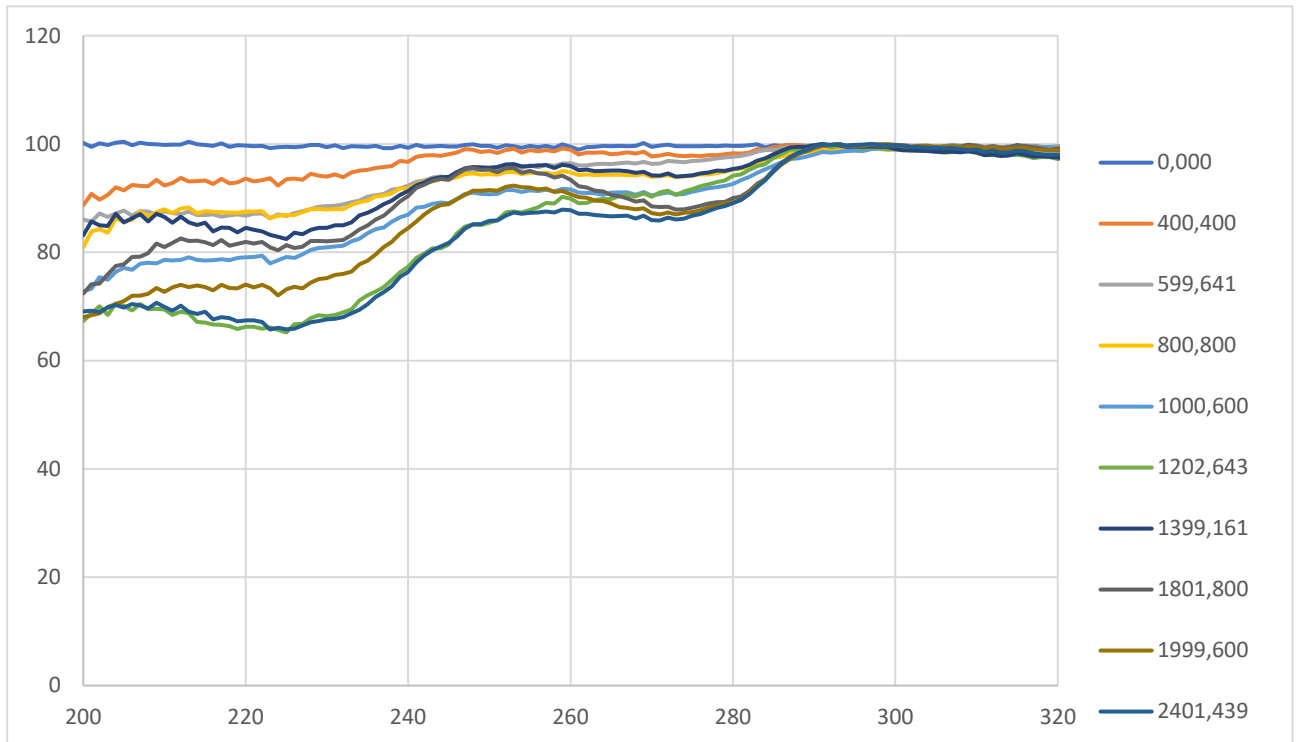


Figura A5 - 1: Espectros DRUV da 1ª série de leituras de Ranolazina adsorvida em matriz de PROSOLV, para a gama de concentrações mais baixas (especificadas no gráfico em ppm) na gama espectral de 200 a 300 nm

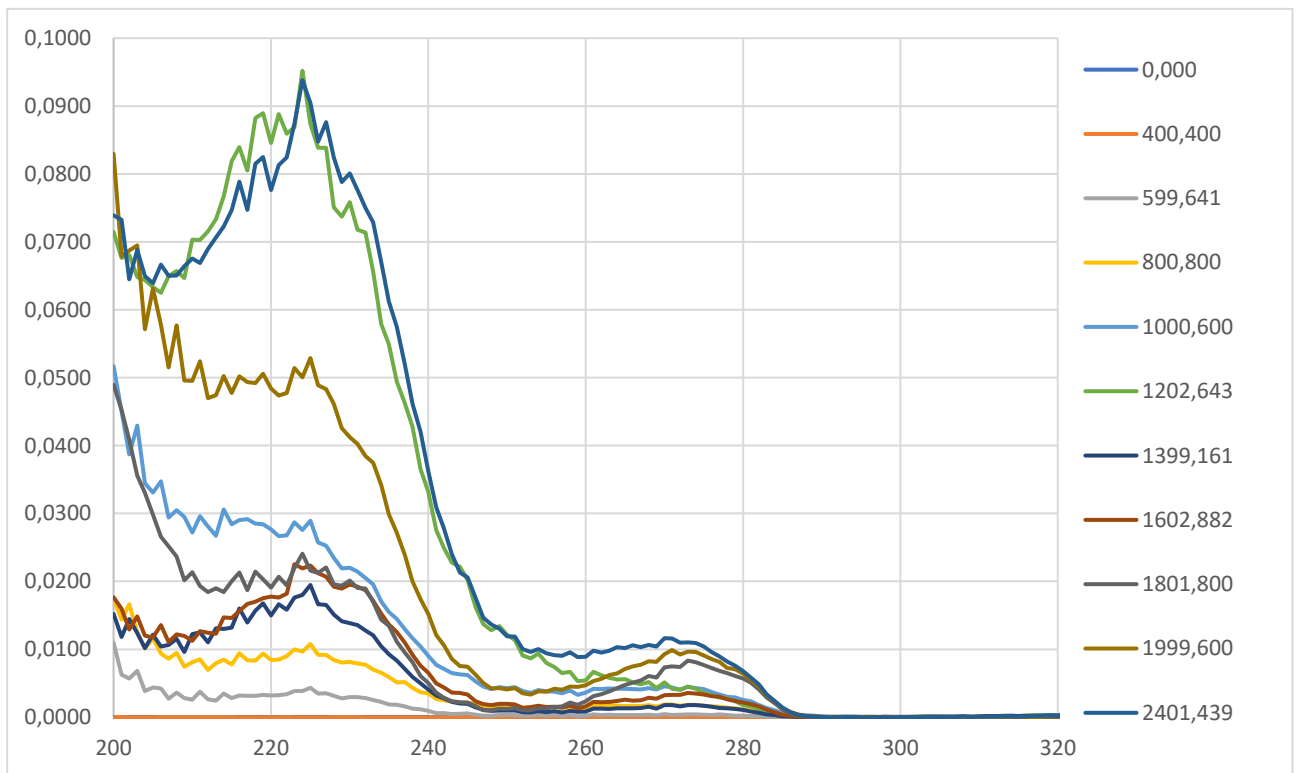
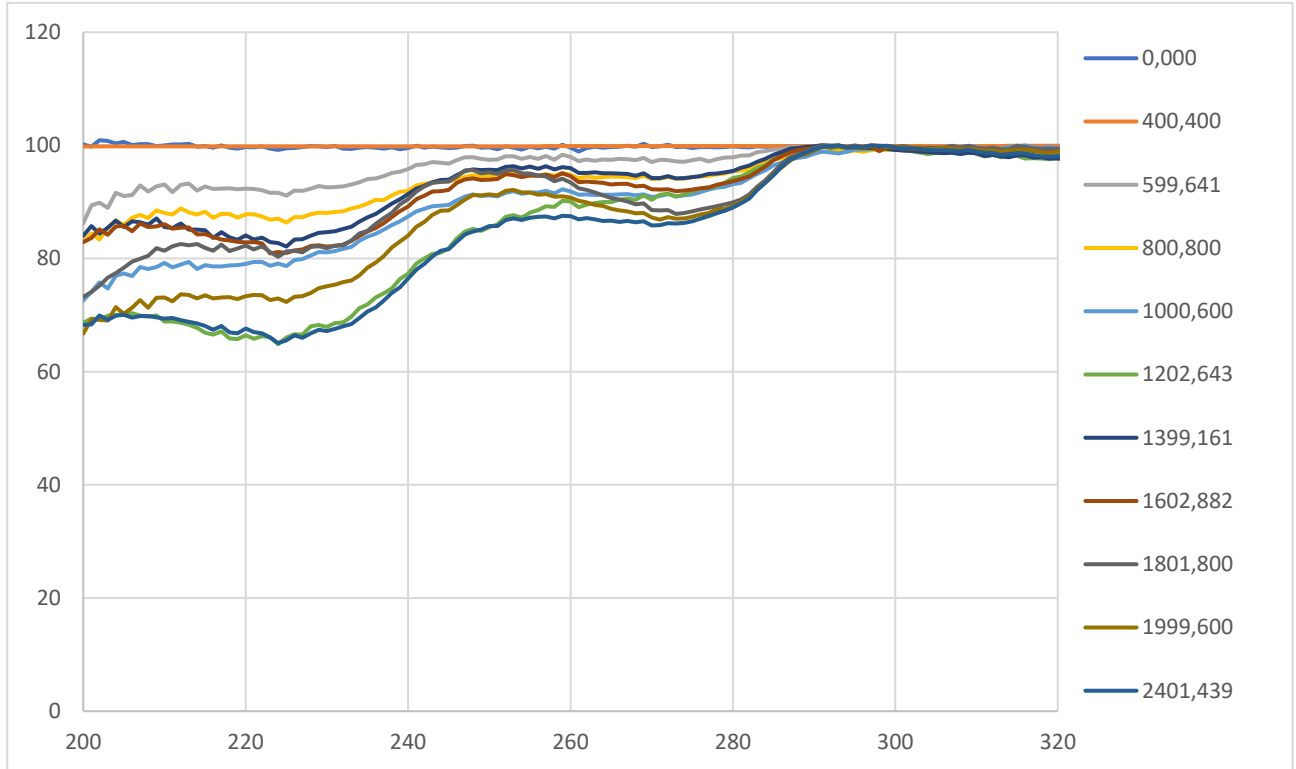


Figura A5 - 2: Espectros DRUV da 2ª Serie de leituras de Ranolazina adsorvida em matriz de PROSOLV, para a gama de concentrações mais baixas (especificadas no gráfico em ppm) na gama espectral de 200 a 300 nm

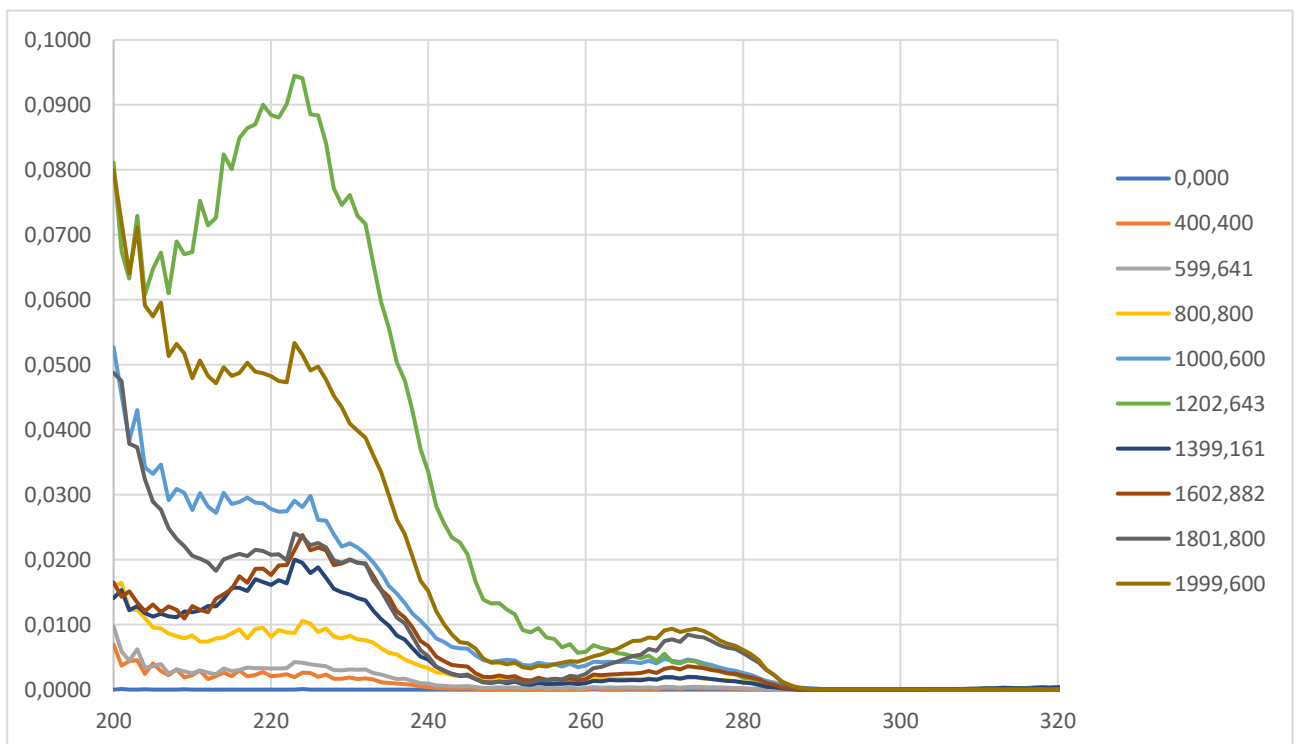
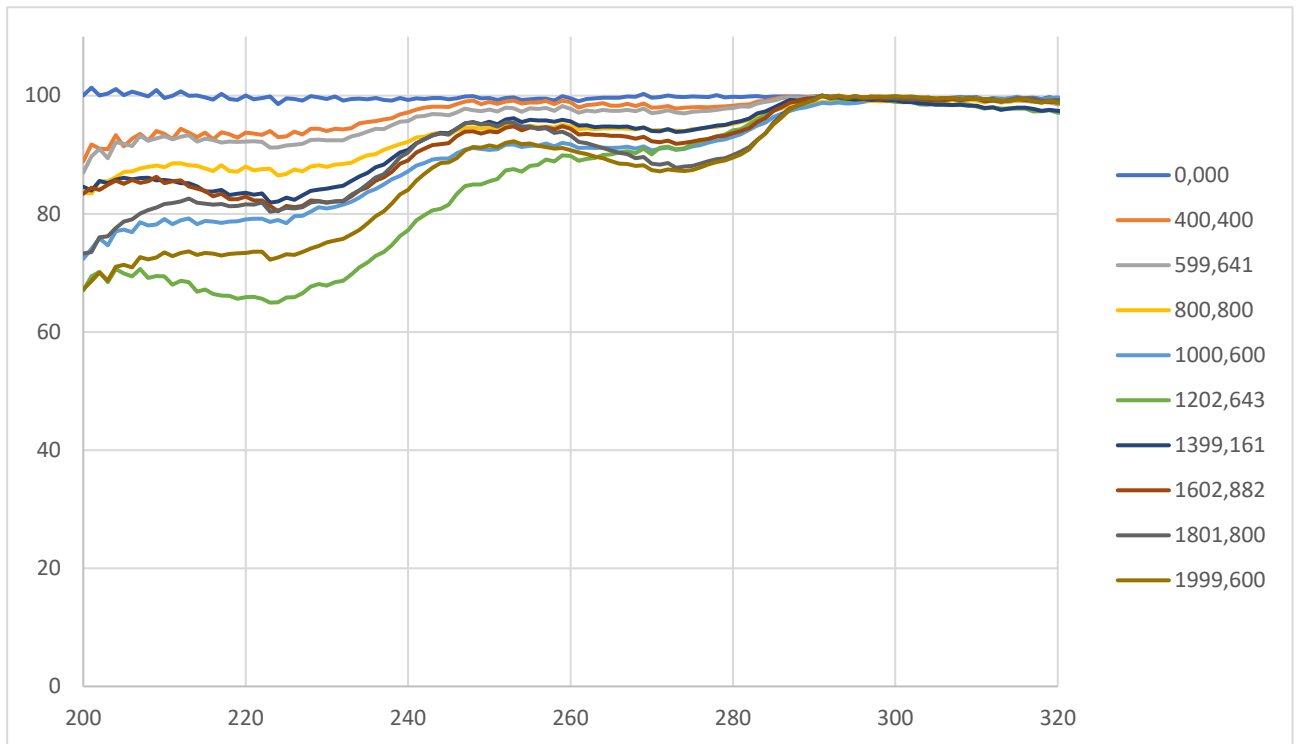


Figura A5 - 3: Espectros DRUV da 3ª Serie de leituras de Ranolazina adsorvida em matriz de PROSOLV, para a gama de concentrações mais baixas (especificadas no gráfico em ppm) na gama espectral de 200 a 300 nm

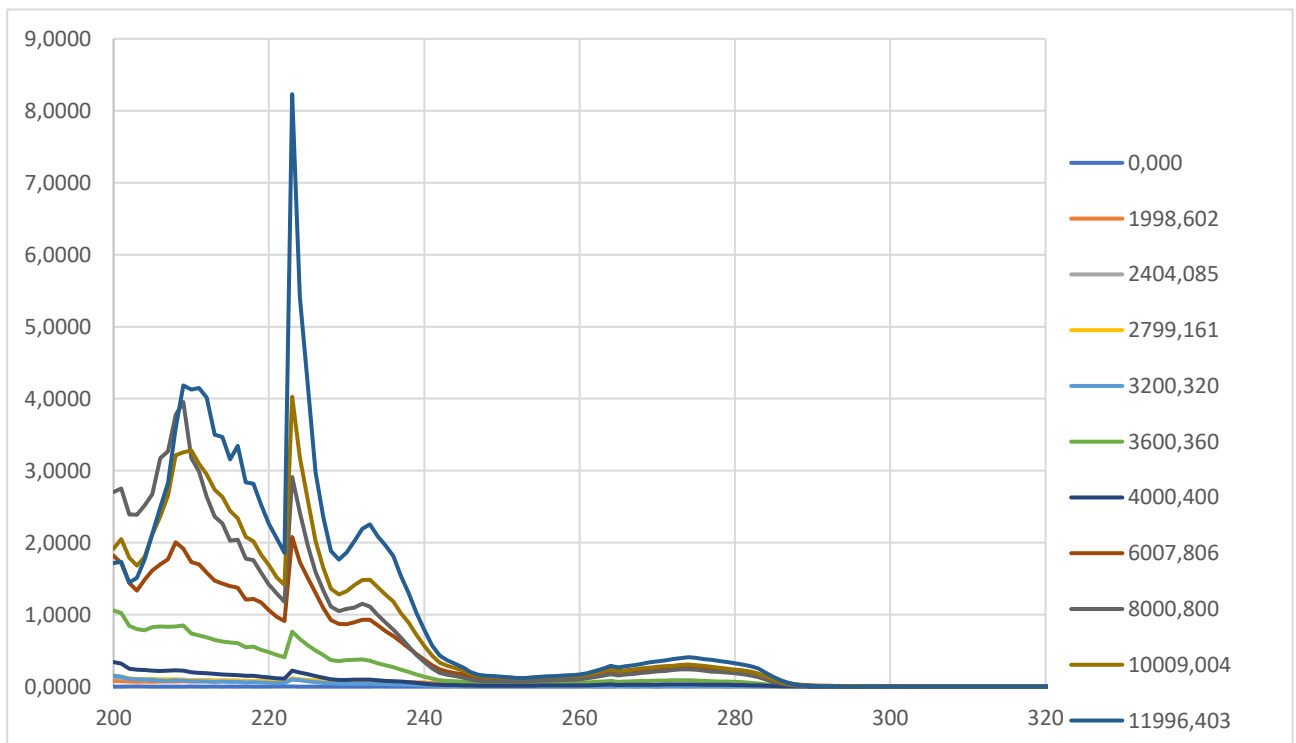
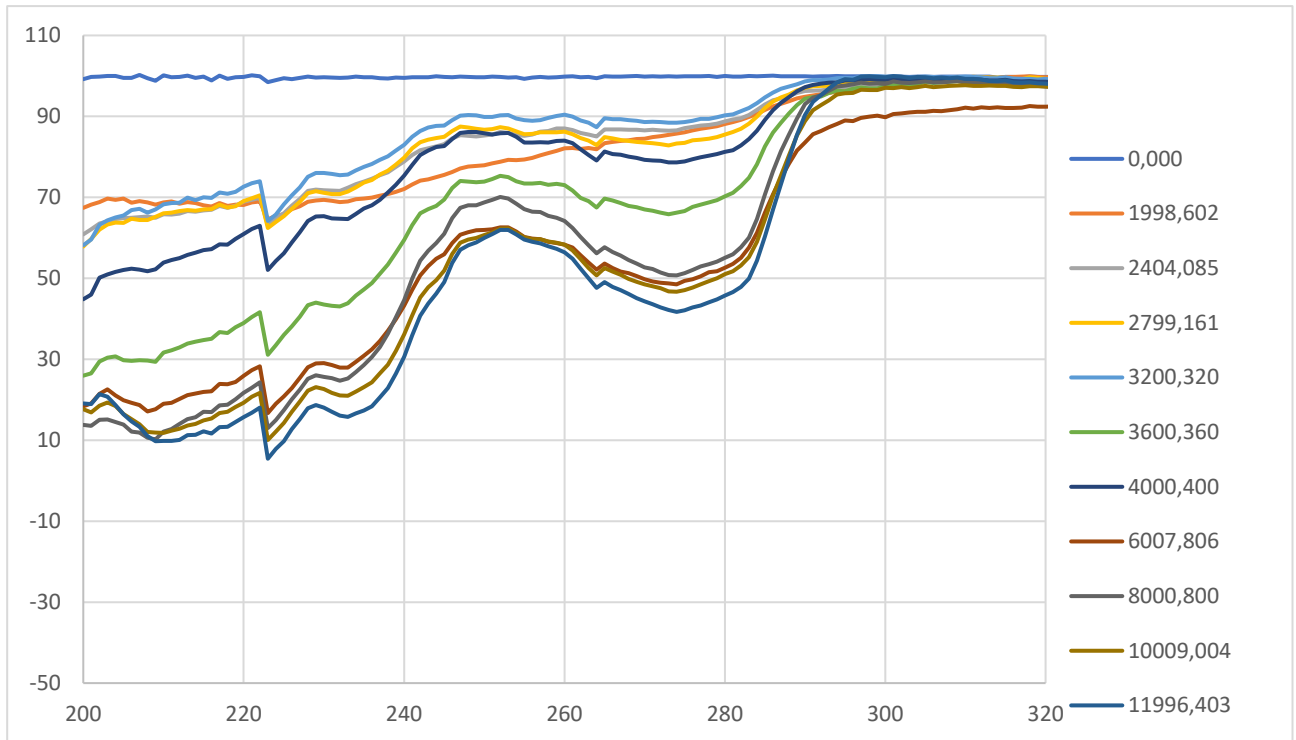


Figura A5 - 4: Espectros DRUV da 1ª Serie de leituras de Ranolazina adsorvida em matriz de PROSOLV, para a gama de concentrações mais altas (especificadas no gráfico em ppm) na gama espectral de 200 a 300 nm

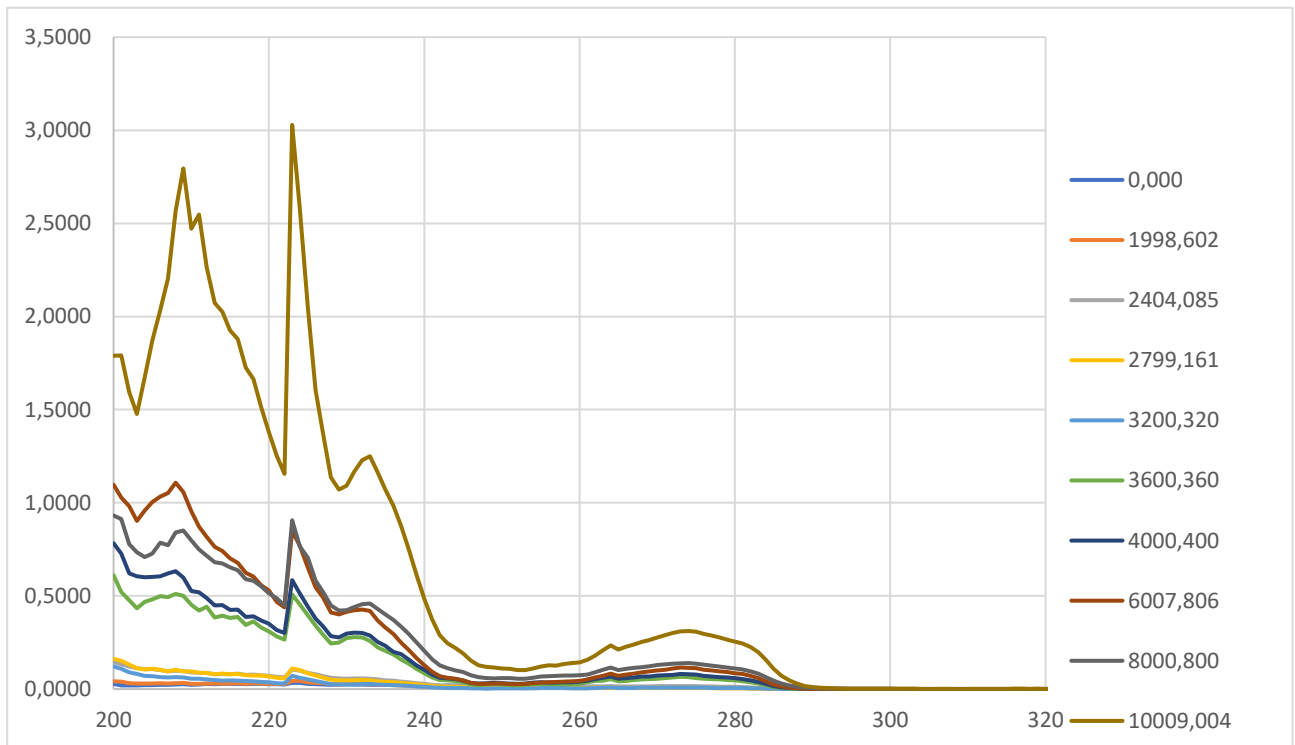
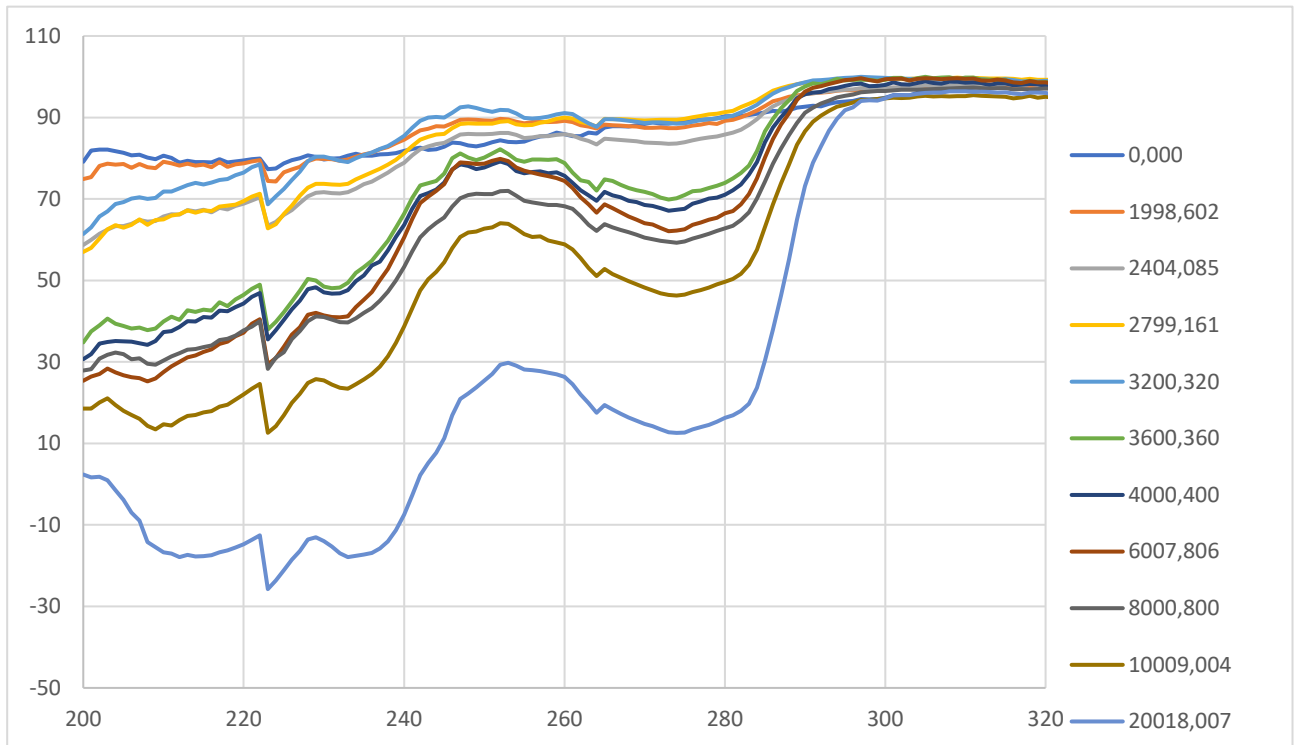


Figura A5 - 5: Espectros DRUV da 2ª Serie de leituras de Ranolazina adsorvida em matriz de PROSOLV, para a gama de concentrações mais altas (especificadas no gráfico em ppm) na gama espectral de 200 a 300 nm

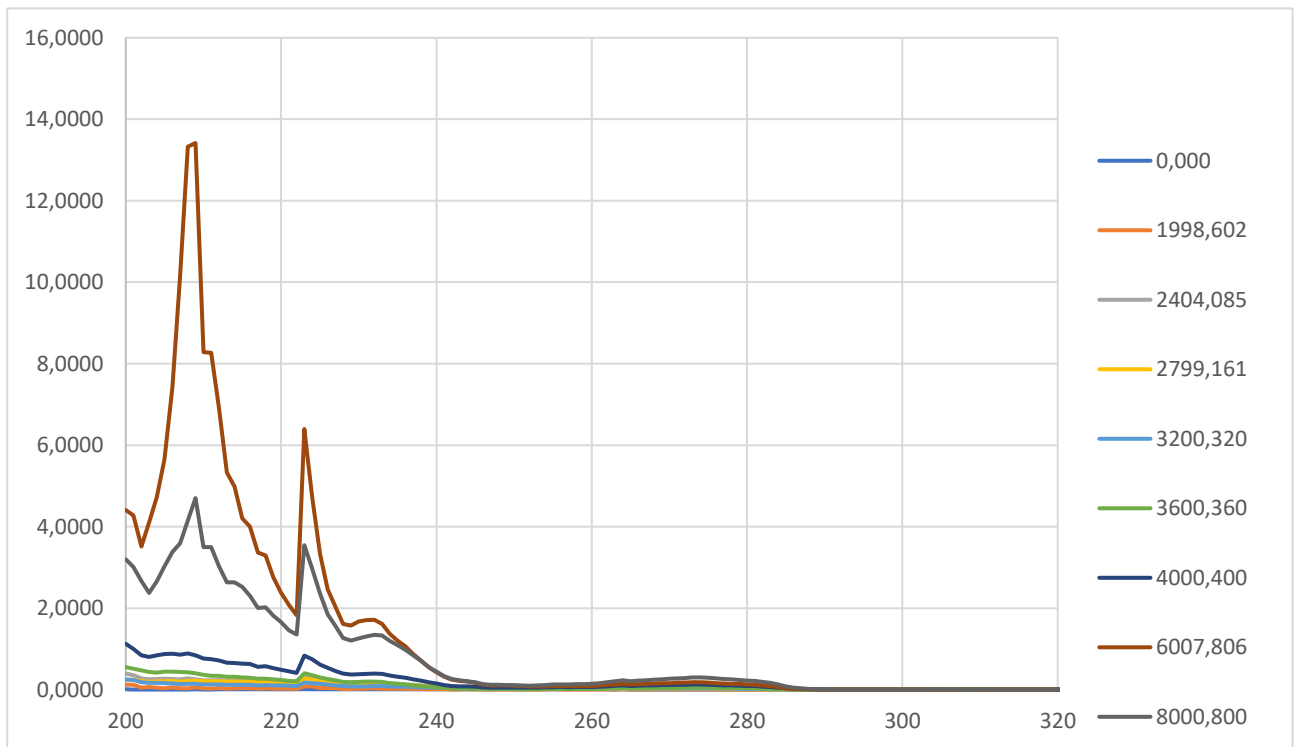
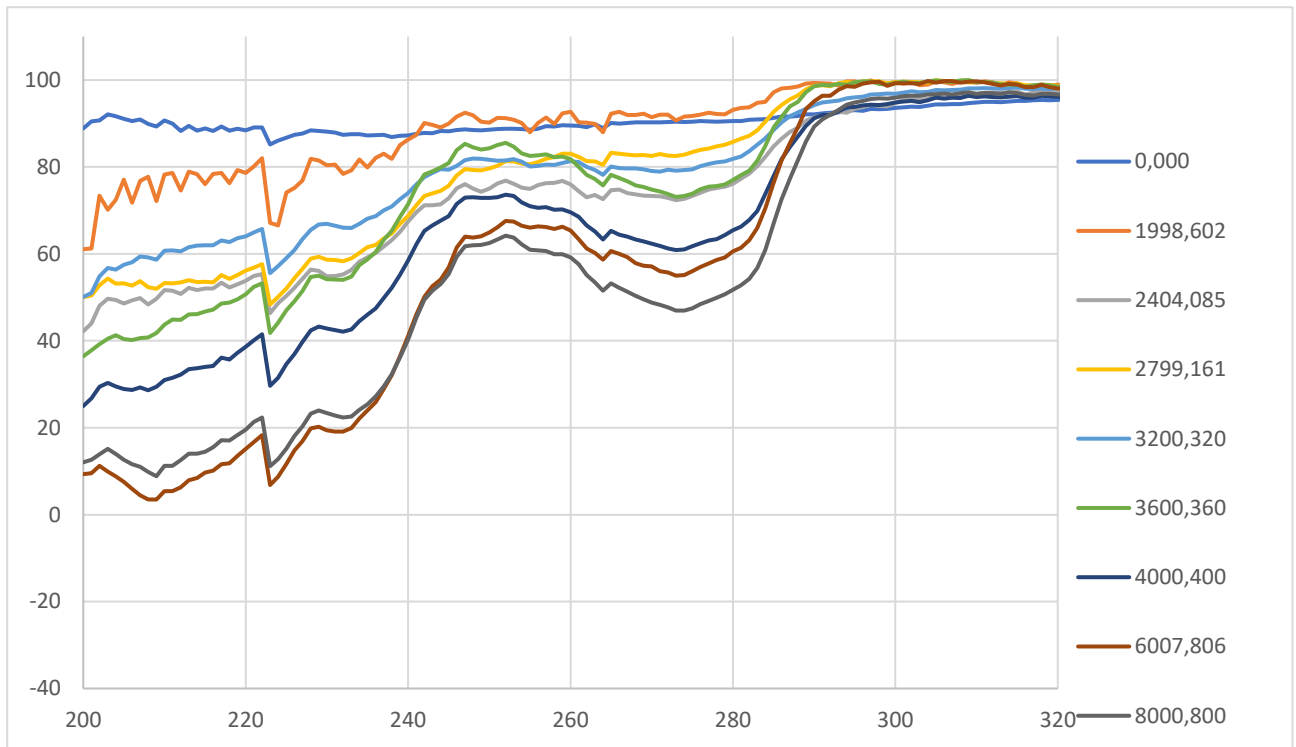


Figura A5 - 6: Espectros DRUV da 3ª Serie de leituras de Ranolazina adsorvida em matriz de PROSOLV, para a gama de concentrações mais altas (especificadas no gráfico em ppm) na gama espectral de 200 a 300 nm

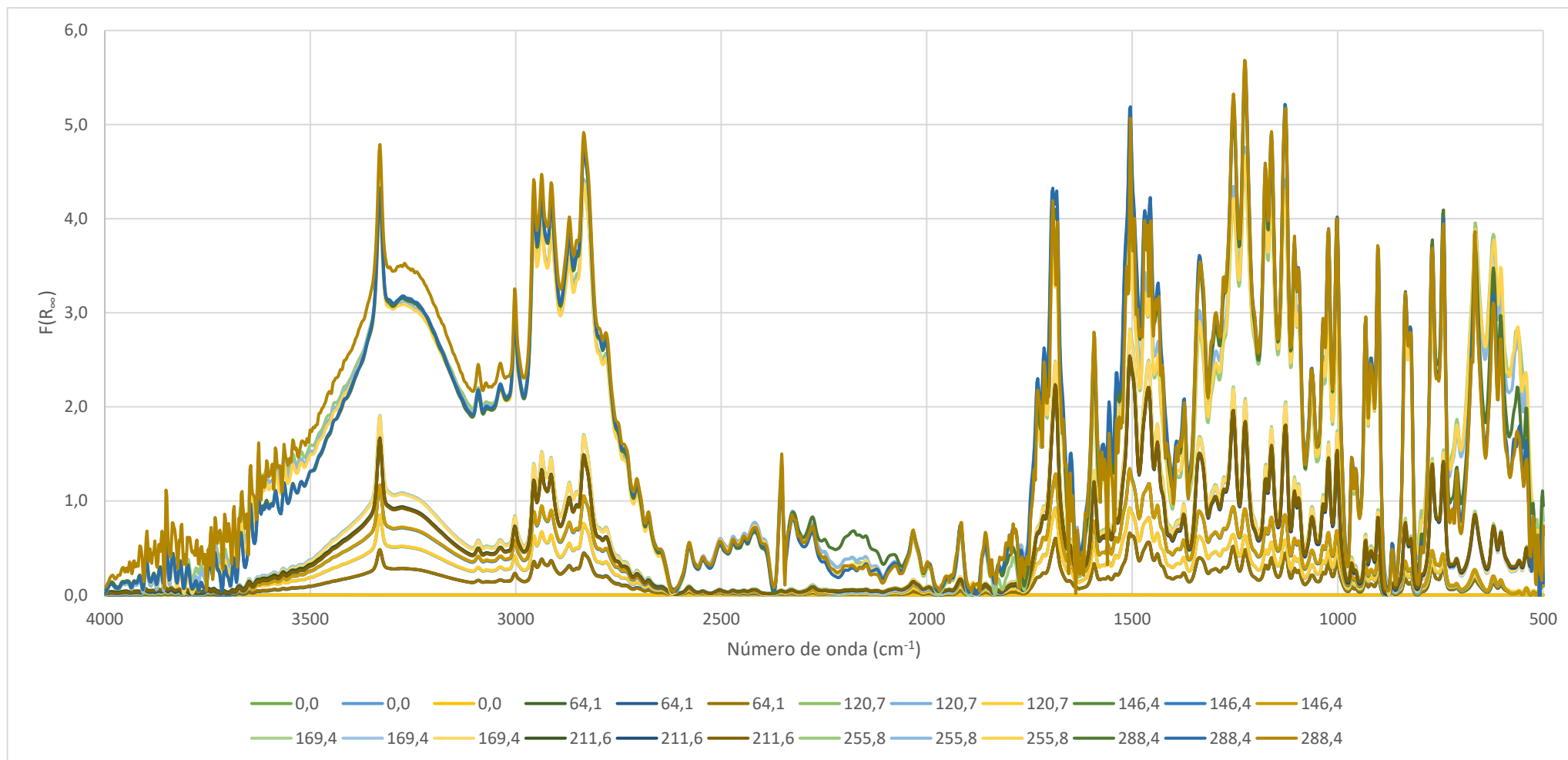


Figura A5 – 7: Totalidade dos espectros de DRIFT da Ranolazina para o método analítico do padrão externo, para as concentrações expressas no gráfico em ppm, na gama espectral de 4000 e 500 cm^{-1} .

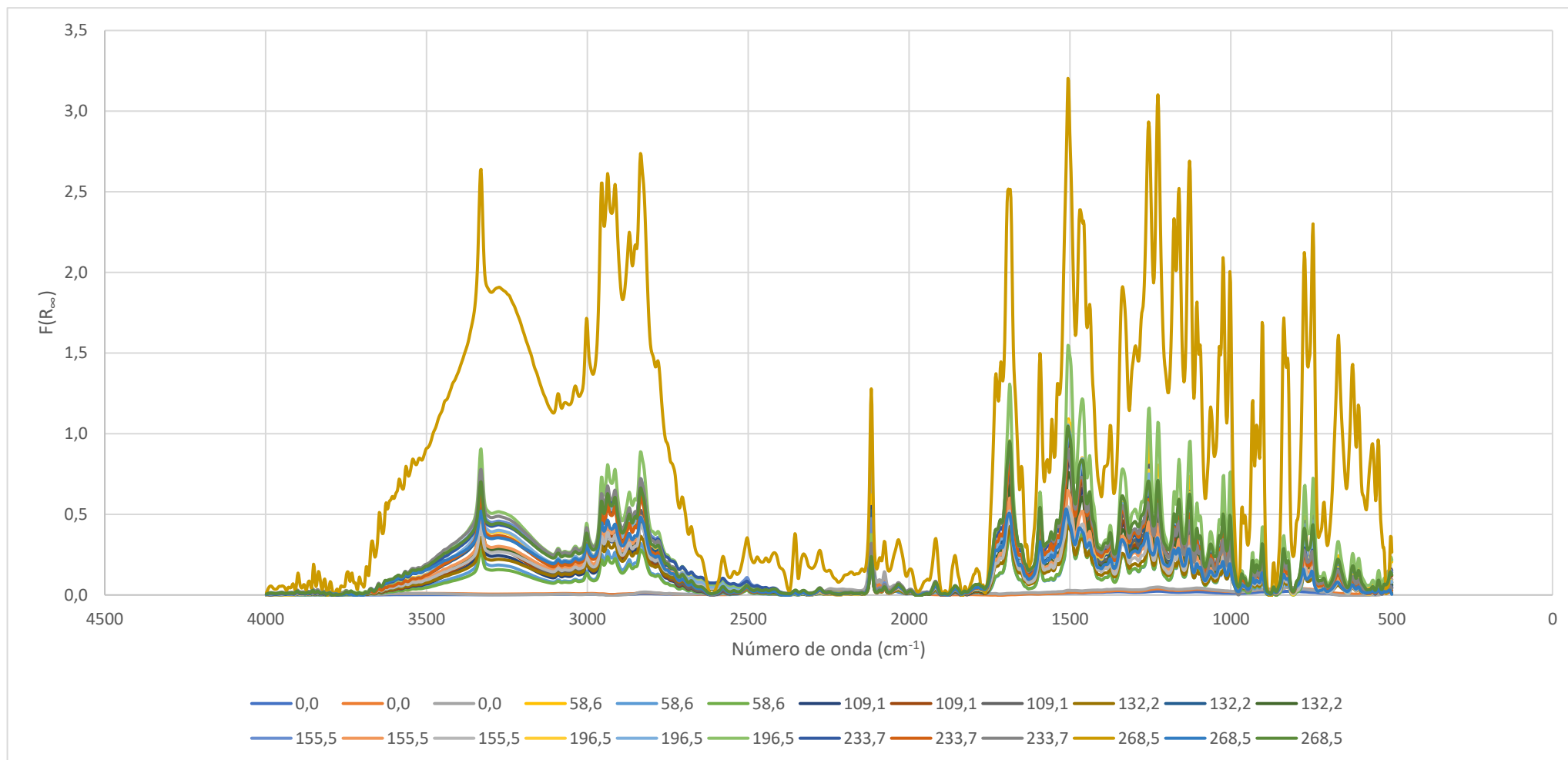


Figura A5 – 7: Totalidade dos espectros de DRIFT da Ranolazina para o método analítico do padrão interno, para as concentrações expressas no gráfico em ppm, na gama espectral de 4000 e 500 cm^{-1} .