

PHELLIPE HONORIO AMARAL

**Identificação dos Produtos de Degradação do Maleato de
Enalapril utilizando a técnica de EASI-MS.**

CAMPINAS

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DO MALEATO DE ENALAPRIL UTILIZANDO A TÉCNICA DE EASI-MS

Phellipe Honorio Amaral

Dissertação de Mestrado apresentado a Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de concentração de Ciências Biomédicas. Sob orientação da Prof^a. Dr^a. Nelci Fenalti Höehr e Co-orientação do Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

Am13i Amaral, Phellipe Honorio, 1983 -
Indentificação dos produtos de degradação do
maleato de enalapril utilizando a técnica de EASI - MS /
Phellipe Honorio Amaral. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : Nelci Fenalti Höehr.
Coorientador : Marcos Nogueira Eberlin.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Espectrometria de massas. 2. Estabilidade de
medicamentos. 3. Enalapril. 4. Produtos farmacêuticos.
I. Höehr, Nelci Fenalti. II. Eberlin, Marcos Nogueira. III.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Indentification of degradation products of enalapril maleate using the
technique EASI-MS.

Palavras-chave em inglês:

Mass Spectrometry

Drug stability

Enalapril

Pharmaceutical products

Titulação: Mestre em Ciências Médicas

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Banca examinadora:

Nelci Fenalti Höehr [Orientador]

Paulo Cesar Pires Rosa

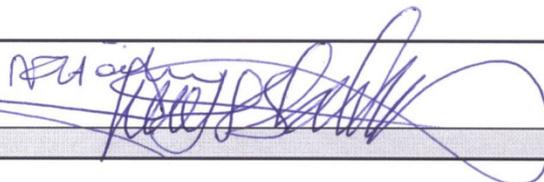
Ildenize Barbosa da Silva Cunha

Data da defesa: 08-02-2012

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

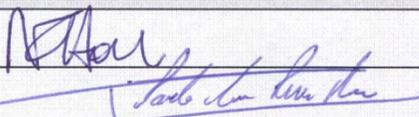
**Banca examinadora da Dissertação de Mestrado
Phellipe Honorio Amaral**

Orientadora: Profa. Dra. Nelci Fenalti Hoehr
Co-Orientador: Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin



Membros:

1. Profa. Dra. Nelci Fenalti Hoehr -



2. Prof. Dr. Paulo Cesar Pires Rosa -



3. Profa. Dra. Ildenize Barbosa da Silva Cunha -

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 08/02/2012

Dedicatória

Á Deus, pela misericórdia e fidelidade, a minha esposa Eliza pelo companheirismo, aos meus filhos Guilherme e Ana Júlia pela paciência e amor, ao meu irmão Pedro e aos meus Pais, Ana e Amaral pelos primeiros ensinamentos.

Agradecimentos Especiais

Ao Prof. Marcos N. Eberlin, pelos ensinamentos técnicos e conselhos cristãos.

À professora Nelci Fenalti Höehr, pela paciência e por acreditar no meu trabalho.

As professoras Iara Tescarollo Dias e Ildenize Barbosa Cunha pela indicação.

Agradecimentos

Agradeço aos Anjos que Deus tem colocado em minha vida ao longo da minha carreira profissional e vida pessoal.

Aos colegas do laboratório Thomson, em especial, Elias, Clécio, Andréia, Deleon, Rosy, Heliara, Núbia, Anna, Raquel e Regina.

Aos funcionários da FCM e do Departamento de Patologia Clínica.

Aos amigos das empresas, Prodome, Medley e EMS.

Aos meus familiares, Mario (Sogro), Lilete (Sogra), Charles e Família, Thomas e Família, Pedro e Família.

Aos que esqueci, fica para a Tese de Doutorado.

RESUMO

Utilizou-se o maleato de enalapril para identificação dos produtos de degradação através da espectrometria de massas utilizando a técnica de ionização EASI (easy ambient sonic-spray ionization). Essa técnica de ionização ambiente torna a espectrometria de massas uma ferramenta mais simples, pois para esse trabalho não houve preparo de amostra, os ensaios foram realizados diretamente da superfície do comprimido. Para conhecermos melhor a rota de degradação do maleato de enalapril na formulação, comparou-se dois processos de fabricação dos comprimidos, a granulação via úmida e a compressão direta. Indicando grandes diferenças no perfil de degradação.

A avaliação dos produtos de degradação foi feita em paralelo utilizando a técnica de separação por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultra violeta, mostrando o comparativo das respostas da técnica EASI-MS e da CLAE –UV. Realizou-se os estudos de acordo com os estudos de estabilidade de longa duração, simulando assim a estabilidade do maleato de enalapril em comprimidos e um estudo de degradação forçada com o ataque ácido e térmico, demonstrando a capacidade da técnica em avaliar os estudos de degradação forçada.

ABSTRACT

We used the enalapril maleate to identify the degradation products by mass spectrometry using the technique of ionization EASI (easy ambient sonic-spray ionization). This technique makes the environment ionization mass spectrometry a more simple tool, as for this study there was no sample preparation, tests were performed directly from the tablet surface. To know the best route of degradation of enalapril maleate formulation, we compared two methods of manufacture of tablets, wet granulation and direct compression. Indicating large differences in degradation profile.

The evaluation of the degradation products was performed in parallel using the technique of separation by high performance liquid chromatography with UV detector, showing the comparison of responses of the art EASI-MS and HPLC-UV. Studies were performed according to the studies of the long term stability, thus simulating the stability of enalapril maleate in a compressed and forced degradation study with heat and acid attack, demonstrating the ability of the technique of evaluating the degradation studies forced.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIATURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xiv
1.Introdução.....	15
1.1. Maleato de Enalapril	16
1.1.1. Mecanismo de ação.....	16
1.1.2. Farmacocinética	16
1.1.3. Farmacodinâmica	17
1.2. Estudo de estabilidade	19
1.2.1. Parâmetros de estabilidade	19
1.2.2. Embalagem.....	20
1.2.3. Condições do Ensaio.....	20
1.2.4. Frequência dos testes efetuados.....	23
1.2.5. Avaliação dos Resultados.....	23
1.3. Estudos de degradação forçada (stress testing)	25
1.3.1. Aspectos práticos na execução de estudos de degradação forçada	27
1.3.1.1. Concentração das soluções.....	27
1.4. Espectrometria de massas: Conceitos gerais	28
1.4.1. Ionização em condições ambiente por EASI MS.....	31
1.4.2. Analisador utilizado: Monoquadrupolar.....	34
1.5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	35
1.5.1. Introdução a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	35
1.5.2. Equipamento.....	36
1.5.3. Sistemas de Detecção	38
1.6. Processos Farmacêuticos para fabricação de comprimidos	39
1.6.1. Métodos de Granulação.....	39
1.6.1.1. Granulação via seca	39

1.6.1.2. Granulação via úmida.....	40
1.6.1.3. Razões para granulação.....	41
1.6.1.3.1. Prevenir segregação dos componentes da mistura.....	41
1.6.1.3.2. Melhorar propriedades de fluidez da mistura de pós.....	42
1.6.1.3.3. Melhorar as características de compactação da mistura dos pós.....	42
1.6.2. Compressão direta.....	43
1.6.2.1. Vantagens da compressão direta.....	46
1.6.2.2. Limitação da compressão direta.....	47
2.Objetivo.....	48
3.Capítulo.....	50
3.1. Título: Direct Monitoring of drug degradation by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry: the casa enalapril.....	51
3.2. Abstract.....	51
3.3. Introduction.....	52
3.4. Experimental.....	53
3.4.1. Chemicals.....	53
3.4.2. Mass Spectrometry.....	53
3.4.3. High performance liquid cromatography.....	54
3.5. Results and Discussion.....	55
3.6. Conclusions.....	63
3.7. Acknowledgements.....	63
3.8. References.....	64
4.Conclusão.....	65
5.Referências.....	67
6.Anexo.....	73

LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIATURAS

μL – Micro-litro

APCI – Atmospheric Pressure Chemical Ionization

ASAP – Atmospheric Pressure Solids Analysis Probe

CCD - Cromatografia em camada delgada

CI – Chemical Ionization

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Da – Dalton

DART – Direct Analysis in Real Time

DESI – Desorption Electrospray Ionization

EASI – Easy Ambient Sonic-Spray Ionization

ECA – Enzima conversora da angiotensina

EI – Electron Ionization

ESI – Electrospray

F.E. – Fase Estacionária

F.M. – Fase Móvel

GC – Cromatografia Gasosa

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

ICH – International Conference on Harmonisation

ICR – Ressonância Ciclotrônica de Íons

IgG – Imunoglobulina G

IT – Ion Trap

IV – Infravermelho

MALDI – Ionização/dessorção a laser assistida por matriz

MALDESI – Matrix-Assisted Laser Desorption Electrospray Ionization

MIMS – Membrane Introduction Mass Spectrometry

MS – Espectrometria de Massas

m/z – Razão massa-carga

pH – Potencial Hidrogeniônico

ppm – Partes por milhão

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SSI – Sonic Spray Ionization

TLC – Thin Layer Chromatography

TOF – Tempo de Voo

UR – Umidade Relativa

UV –VIS – Ultra Violeta - Visível

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tipo de embalagem usada nos ensaios de estabilidade.....	20
Tabela 2. Condições a testar nos ensaios de estabilidade	20
Tabela 3. Freqüência dos testes efetuados em ensaios de estabilidade.....	23

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Perfil de degradação evidenciando a linha correspondente ao limite inferior unilateral a 95% de confiança 24
- Figura 2.** Diagrama esquemático de um espectrômetro de massas..... 29
- Figura 3.** Esquema ilustrativo de resolução em analisadores de massas com (a) resolução unitária e (b) alta resolução 31
- Figura 4.** Esquema do processo de ionização por EASI 33
- Figura 5.** Diagrama esquemático de um analisador monoquadrupolar 34
- Figura 6.** Esquema de um sistema cromatográfico 37

1. INTRODUÇÃO

1.1. Maleato de Enalapril:

O Maleato de Enalapril tem sua administração via oral, é um pró-farmaco utilizado no tratamento da hipertensão e na insuficiência cardíaca. Depois de sua esterificação no fígado e rim transforma-se em enalaprilato. É um dos medicamentos mais utilizados no Brasil, sendo um dos distribuídos pelo SUS (Sistema Único de Saúde), contém mais de 150 apresentações, com relação aos fabricantes e a dosagem terapêutica ⁽¹⁾.

1.1.1. Mecanismo de ação:

A enzima conversora da angiotensina (ECA) é uma peptidil-dipeptidase a qual catalisa a conversão da angiotensina I à substância pressora angiotensina II. Depois da absorção, o enalapril é hidrolisado a enalaprilato o qual inibe a enzima conversora da angiotensina. A inibição da ECA resulta na diminuição da angiotensina II plasmática que aumenta a atividade da renina plasmática (em razão da remoção do feedback negativo de liberação da renina), e diminui a secreção de aldosterona. A enzima conversora da angiotensina é idêntica à cininase II. Portanto, o enalapril pode também bloquear a degradação de bradicinina, um potente vasopressor peptídico. Entretanto, ainda não foi esclarecido como isso gera o efeito terapêutico. Apesar de se acreditar que o mecanismo pelo qual o enalapril diminui a pressão arterial seja essencialmente pela supressão do sistema renina-angiotensina-aldosterona, o qual desempenha importante papel na regulação da pressão arterial, o enalapril é anti-hipertensivo mesmo em pacientes hipertensos com renina baixa ⁽¹⁾.

1.1.2. Farmacocinética:

O maleato de enalapril oral é rapidamente absorvido e as concentrações máximas plasmáticas de enalapril ocorrem em uma hora. Com base na recuperação na urina, a taxa de absorção do enalapril do maleato de enalapril oral

Introdução

é de aproximadamente 60%. Após a absorção, o enalapril oral é rápida e extensivamente hidrolisado a enalaprilato, um potente inibidor da enzima conversora de angiotensina. As concentrações máximas plasmáticas do enalaprilato ocorrem 3 a 4 horas depois de uma dose oral de maleato de enalapril. A excreção do enalapril é principalmente renal. Os principais componentes na urina são: enalaprilato, que contribui com 40% da dose, e enalapril intacto. Exceto pela conversão a enalaprilato, não há evidência de metabolismo significativo do enalapril. O perfil de concentração sérica do enalaprilato exibe uma fase terminal prolongada, aparentemente associado à ligação com a ECA. Em indivíduos com função renal normal, as concentrações séricas em estado de equilíbrio do enalaprilato foram atingidas por volta do quarto dia da administração do maleato de enalapril. A meia-vida efetiva para acúmulo do enalaprilato após múltiplas doses de maleato de enalapril oral é de 11 horas. A absorção do maleato de enalapril oral não é influenciada pela presença de alimentos no trato gastrointestinal. A extensão da absorção e a hidrólise do enalapril são semelhantes para as diversas doses na faixa terapêutica recomendada ^(1,2).

1.1.3. Farmacodinâmica

A administração do maleato de enalapril a pacientes hipertensos resulta na redução da pressão arterial tanto na posição supina como de pé sem aumento significativo da frequência cardíaca. Hipotensão sintomática postural não é freqüente. Em alguns pacientes a redução ideal da pressão arterial pode requerer várias semanas de tratamento. A retirada abrupta de maleato de enalapril não foi associada ao rápido aumento da pressão arterial. A inibição efetiva da atividade da ECA usualmente ocorre 2 a 4 horas depois da administração oral de uma única dose de enalapril. O início da atividade anti-hipertensiva geralmente foi observado em uma hora e as reduções máximas, em 4 a 6 horas após a administração. A duração do efeito é relacionada à dose. Entretanto, nas doses recomendadas, demonstrou-se que os efeitos anti-hipertensivo e hemodinâmico se mantêm durante 24 horas, no mínimo ⁽²⁾.

Introdução

O tratamento anti-hipertensivo com enalapril induz regressão significativa da hipertrofia ventricular esquerda, preservando o desempenho sistólico do ventrículo esquerdo. Em estudos hemodinâmicos que envolveram pacientes com hipertensão essencial, a redução da pressão arterial foi acompanhada de redução da resistência arterial periférica e aumento do débito cardíaco bem como a pequena ou nenhuma alteração da frequência cardíaca. Após a administração do maleato de enalapril o fluxo sanguíneo renal aumentou e a taxa de filtração glomerular não se alterou. Entretanto, em pacientes cujas taxas de filtração glomerular eram baixas antes do tratamento, geralmente ocorreu aumento. A administração crônica do maleato de enalapril para pacientes com hipertensão essencial e insuficiência renal pode estar associada a melhora da função renal, evidenciada pelo aumento da taxa da filtração glomerular⁽¹⁾.

Em estudos clínicos de curta duração envolvendo pacientes nefropatas com e sem diabetes, foram observadas reduções da albuminúria, da excreção de IgG e das proteínas totais na urina após a administração de enalapril⁽¹⁾.

Quando administrado com diuréticos tiazídicos, os efeitos redutores da pressão arterial de maleato de enalapril são, no mínimo, aditivos. Maleato de enalapril pode reduzir ou evitar o desenvolvimento da hipocalcemia induzida pelos tiazídicos^(1,2).

O tratamento com maleato de enalapril geralmente não está associado a efeitos adversos no ácido úrico plasmático. O tratamento com maleato de enalapril foi associado a efeitos favoráveis nas frações lipoprotéicas no plasma e favorável ou sem efeito nos níveis totais de colesterol. Em pacientes com insuficiência cardíaca sob tratamento com digitais e diuréticos, o tratamento com maleato de enalapril foi associado à redução da resistência periférica e da pressão arterial. O débito cardíaco aumentou, enquanto a frequência cardíaca (geralmente elevada em pacientes com insuficiência cardíaca) diminuiu. A pressão capilar pulmonar também foi reduzida^(1,2).

A tolerância ao exercício e a gravidade da insuficiência cardíaca, melhoraram. Esses efeitos se mantiveram durante o tratamento crônico. Em pacientes com insuficiência cardíaca leve a moderada, o enalapril retardou a

dilatação/aumento e insuficiência progressivos, como evidenciado pelos volumes finais diastólico e sistólico do ventrículo esquerdo e pela melhora da fração de ejeção. Os dados clínicos demonstraram que o enalapril reduziu a frequência de arritmias ventricular em pacientes com insuficiência cardíaca, embora os mecanismos subjacentes e a relevância clínica não sejam conhecidos^(1,2).

1.2. Estudo de estabilidade :

1.2.1. Parâmetros de estabilidade

A estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, e de outros relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem. Os testes podem ser divididos em três tipos de estudos:

- Estudo de estabilidade acelerado:

Estudo projetado para acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas de um produto farmacêutico em condições forçadas de armazenamento. Os dados assim obtidos, juntamente com aqueles derivados dos estudos de longa duração, podem ser usados para avaliar efeitos químicos e físicos prolongados em condições não aceleradas e para avaliar o impacto de curtas exposições a condições fora daquelas estabelecidas no rótulo do produto, que podem ocorrer durante o transporte.

- Estudo de estabilidade de acompanhamento:

Estudo realizado para verificar que o produto farmacêutico mantém suas características físicas, químicas, biológicas, e microbiológicas conforme os resultados obtidos nos estudos de estabilidade de longa duração.

- Estudo de estabilidade de longa duração:

Estudo projetado para verificação das características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto farmacêutico durante e,

opcionalmente, depois do prazo de validade esperado. Os resultados são usados para estabelecer ou confirmar o prazo de validade e recomendar as condições de armazenamento⁽³⁾.

1.2.2. Embalagem

Os estudos de estabilidade devem ser conduzidos com os diferentes tipos de embalagem, desde sua matéria-prima até suas embalagens secundárias, definidos na tabela abaixo.

Tabela 1 - Tipo de embalagem usada nos ensaios de estabilidade

Substância ativa	Produto acabado
Os ensaios de estabilidade devem ser conduzidos com a matéria-prima embalada. O tipo de embalagem deve ser semelhante ou simular o que é proposto para o seu armazenamento e distribuição.	Os ensaios de estabilidade devem ser conduzidos com o produto acabado embalado. O tipo de embalagem deve ser semelhante ao proposto para a sua comercialização.

1.2.3. Condições dos ensaios

O prazo de validade de um produto a ser comercializado no Brasil é determinado por um estudo de estabilidade de longa duração de acordo com os parâmetros definidos em tabela abaixo. Por ocasião do registro poderá ser concedido um prazo de validade provisório de 24 meses se aprovado o relatório de estudo de estabilidade de longa duração de 12 meses ou relatório de estudo de estabilidade acelerado de 6 meses acompanhado dos resultados preliminares do estudo de longa duração, conforme parâmetros definidos em tabela abaixo⁽³⁾.

Tabela 2 - Condições a testar nos ensaios de estabilidade

Forma Farmacêutica	Condição de armazenamento*	Embalagem	Temperatura e umidade Acelerado**	Temperatura e umidade Longa Duração **
Sólido	15°C -30°C	Semi-permeável	40°C ± 2°C / 75% UR ± 5% UR	30°C ± 2°C / 75% UR ± 5% UR
Sólido	15°C -30°C	Impermeável	40°C ± 2°C	30°C ± 2°C
Semi-sólido ***	15°C -30°C	Semi-permeável	40°C ± 2°C / 75% UR ± 5% UR	30°C ± 2°C / 75% UR ± 5% UR
Semi-sólido	15°C -30°C	Impermeável	40°C ± 2°C	30°C ± 2°C
Líquidos ***	15°C -30°C	Semi-permeável	40°C ± 2°C / 75% UR ± 5% UR	30°C ± 2°C / 75% UR ± 5% UR
Líquidos	15°C -30°C	Impermeável	40°C ± 2°C	30°C ± 2°C
Gases	15°C -30°C	Impermeável	40°C ± 2°C	30°C ± 2°C
Todas as formas farmacêuticas	2°C - 8°C	Impermeável	25°C ± 2°C	5°C ± 3°C
Todas as formas farmacêuticas	2°C - 8°C	Semi-permeável	25°C ± 2°C / 60% UR ± 5% UR	5°C ± 3°C
Todas as formas farmacêuticas	-20 °C	T o d a s	- 20°C ± 5°C	- 20°C ± 5°C

* Qualquer recomendação de armazenamento em temperatura dentro destas faixas deve constar de bulas e rótulos. A temperatura recomendada não exige de que os testes de estabilidade sejam realizados com as temperaturas definidas nas duas últimas colunas da tabela.

** Os valores de temperatura e umidade são fixos e as variações são inerentes às oscilações esperadas pela câmara climática e por eventuais aberturas para retirada ou colocação de material.

Introdução

*** Líquidos e semi-sólidos de base aquosa devem realizar o estudo com umidade a 25% UR ou 75% UR. Caso se opte por 75% UR, o valor da perda de peso deverá ser multiplicado por 3,0.

Os ensaios de estabilidade acelerada têm como finalidade acelerar a velocidade das reações de degradação química e induzir alterações físicas na substância ativa/produto acabado. Os seus resultados podem ser utilizados para prever tendências de degradação durante os ensaios de longa duração e avaliar o efeito de desvios pontuais às condições de conservação rotuladas como os que podem acontecer durante o transporte de substâncias ativas/produtos acabados. Os ensaios de estabilidade de acompanhamento devem ser realizados sempre que se verificar uma alteração significativa na substância ativa/produto acabado a qualquer tempo de análise ao longo do ensaio de estabilidade acelerada. Para substância ativa entende-se como alteração significativa o não cumprimento das especificações adaptadas. Para produto acabado entende-se como alteração significativa qualquer um dos seguintes pontos:

- Uma variação de 5% no valor inicial do doseamento ou o não cumprimento do critério de aceitação de potência quando se utilizam métodos biológicos ou imunológicos.
- Um produto de degradação a exceder o seu critério de aceitação.
- O não cumprimento dos critérios de aceitação para o aspecto, propriedades físicas e testes de funcionalidade (ex.: cor, separação de fases, resuspendibilidade, dureza, etc.). Em estabilidade acelerada são esperadas algumas alterações físicas como, por exemplo, a redução da dureza de um supositório.
- O não cumprimento dos critérios de aceitação para o pH e para a dissolução em 12 unidades, se apropriado para a forma farmacêutica em estudo.

1.2.4. Frequência dos testes efetuados:

A frequência com que as substâncias ativas/produtos acabados devem ser analisados para averiguação da sua qualidade física, química e quando apropriado biológica e microbiológica, isto é, a sua conformidade com as especificações adaptadas, encontra-se na seguinte tabela: ⁽³⁾

Tabela 3 - Frequência dos testes efetuados em ensaios de estabilidade

Tipo de ensaio	Frequência dos testes efetuados
Longa Duração	0, 3, 6, 12, 15, 18 e 24 meses
Acompanhamento	0 e 12 meses (a cada 12 meses)
Acelerado	0, 3 e 6 meses

1.2.5. Avaliação dos resultados:

A metodologia de avaliação dos resultados dos ensaios de estabilidade considera duas situações:

- Os resultados mostram um grau mínimo de degradação e uma variabilidade entre lotes muito pequena, sendo evidente que o período de re-análise/prazo de validade proposto é válido para lotes futuros. Normalmente, não é necessário proceder à análise estatística dos resultados, desde que a justificação para a sua omissão seja considerada suficiente.
- Os resultados não oferecem garantias relativamente ao período de re-análise/prazo de validade proposto. Será necessário proceder à sua análise estatística, seguindo as seguintes orientações:
 - Utilizando os dados de um atributo quantitativo que evidencia um decréscimo/acrécimo ao longo do tempo (ex.: doseamento/% de produto

de degradação), determinar o tempo para o qual a reta correspondente ao limite inferior/superior unilateral a 95% do perfil de degradação intercepta o critério de aceitação (ex.: 90% para o doseamento), tal como se exemplifica na figura 1.

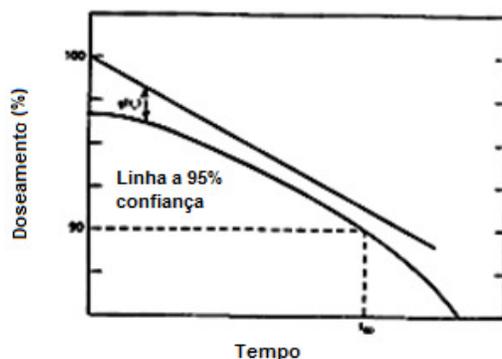


Figura 1 - Perfil de degradação, evidenciando a linha correspondente ao limite inferior unilateral a 95% de confiança.

- Proceder a este tipo de análise para cada um dos lotes e aceitar como período de re-análise/prazo de validade o valor mais baixo encontrado para o tempo em que se espera que um lote se mantenha dentro do critério de aceitação.
- Se os resultados entre lotes evidenciarem uma variabilidade muito pequena, poderá ser vantagem combinar todos os dados numa única estimativa. A análise da variabilidade entre lotes é efetuada através da aplicação dos testes estatísticos apropriados (o nível de significância dos testes, medido pelo valor de p , deve ser superior a 0,25) aos declives e ordenada na origem das retas de regressão de cada lote.
- Se o perfil de degradação não obedecer a uma função linear, outras funções poderão ser usadas como por exemplo funções quadráticas ou cúbicas, em escala aritmética ou logarítmica. Devem ser utilizados métodos estatísticos para testar a qualidade do ajuste dos dados à linha ou curva de degradação calculada.

- A avaliação dos resultados não deverá ser efetuada somente com os resultados do doseamento, mas também com os níveis de produtos de degradação e outros parâmetros adequados⁽³⁾.

1.3. Estudos de degradação forçada (stress testing)

Os estudos de degradação forçada (stress testing) são efetuados com o objetivo de caracterizar a estabilidade inerente a determinada substância ativa, identificar os seus produtos de degradação, estabelecer mecanismos de degradação e validar a capacidade das metodologias analíticas usadas para avaliar a estabilidade química da substância.

De acordo com a guideline ICH Q1AR os estudos de degradação devem ser conduzidos num único lote da substância ativa e devem incluir o efeito da temperatura, em incrementos de 10°C relativamente à temperatura selecionada para os estudos de estabilidade acelerada (ex.: 50°C, 60°C, etc.), umidade (75% de umidade relativa ou superior) quando apropriado, oxidação, hidrólise (em solução ou suspensão numa gama larga de pH) e luz (no estado sólido e/ou em solução/suspensão; várias condições de exposição, dependendo da fotosensibilidade da substância e da intensidade da fonte de luz usada; tal como descrito na guideline ICH Q1B).^(4,5)

Os testes sob ação da luz são conduzidos diretamente na substância e/ou com esta em solução/suspensão e têm por base as condições de exposição sugeridas pela guideline ICH Q1B⁽⁵⁾ para a realização de testes de fotoestabilidade (exposição total de pelo menos 1,2 milhões lux.hr de luz visível e 200watt.hr/m² de luz ultra-violeta próximo). Dado que o objetivo destas experiências é avaliar a formação de produtos de degradação, recomenda-se que se comece por um grau de exposição baixo, sendo este progressivamente aumentado até que se atinja os 1,2 milhões lux.hr. Se mesmo assim se verificar que a substância não se degradou, sugere-se que se aumente a exposição até os 6 milhões de lux.hr.

A degradação da substância via hidrólise é investigada a pH ácido, neutro e

Introdução

alcalino através da preparação de soluções/suspensões da substância em estudo em soluções de HCl, água e soluções de NaOH, respectivamente. Consoante o grau de estabilidade da substância poderá haver necessidade de recorrer a aquecimento (25°C, 40°C ou até mesmo refluxo).

A indução de reações de oxidação pode ser avaliada através da preparação de soluções/suspensões da substância em estudo em soluções de H₂O₂ ou em soluções aquosas contendo um iniciador de radicais ou ions metálicos como o cobre e o ferro^(6,7).

Os estudos de degradação forçada devem ser conduzidos com a preocupação de individualizar a influência de cada um dos parâmetros, razão pela qual se devem tomar precauções para que não ocorra a sobreposição de efeitos. Como exemplo, podemos referir que os testes de fotoestabilidade em solução não devem ser realizados utilizando solventes aquosos uma vez que nestes podem ocorrer reações de hidrólise ou oxidação. A interferência do aquecimento das amostras expostas à luz pode também ser eliminada através do recurso a amostras controle isto é, amostras que são expostas às mesmas condições de luz depois de devidamente protegidas (ex.: envoltas em papel de alumínio). Para cada um dos fatores em causa, a escolha das condições a testar está profundamente relacionada com o grau de degradação pretendido e o tempo disponível para a realização da experiência^(6,7).

De fato, a mesma extensão de degradação pode ser conseguida utilizando condições mais suaves e tempos de reação longos ou condições mais severas e tempos de reação curtos. O uso de condições mais severas pode ter o inconveniente de alterar o mecanismo das reações, causando problemas práticos na utilização de técnicas de cromatografia (TLC, HPLC, GC), ou outras, na análise das amostras. De qualquer forma, a realização de testes de degradação sob condições mais severas pode ser bastante útil quando o que se pretende é isolar os produtos de degradação^(6,7).

1.3.1. Aspectos práticos na execução de estudos de degradação forçada

O estudo de cada condição de stress deve ser conduzido em quatro amostras, sendo uma um branco conservado em condições normais, a segunda um branco submetido à condição de stress, a terceira a substância conservada em condições normais (tempo zero de degradação) e a quarta a substância submetida à condição de stress. Os quatro resultados gerados devem ser analisados e qualquer conclusão será conseqüente de comparações entre os mesmos.

1.3.1.1. Concentrações das soluções:

Um bom ponto de partida para a realização de estudos de degradação forçada consiste em usar concentrações relativamente à substância em estudo da ordem do 1mg/ml. Havendo problemas de solubilização, poderão ser adicionadas determinadas quantidades de um solvente como o metanol ou acetonitrila até que se obtenha uma solução límpida. Quando mesmo assim, não for possível garantir a solubilização total da substância, os estudos devem prosseguir com esta em suspensão. Normalmente, a este nível de concentração e utilizando metodologias instrumentais de sensibilidade adequada (HPLC, GC, etc.) é possível detectar quantidades mínimas de produtos de degradação.

- Preparação das amostras para análise por HPLC:

Vários problemas práticos se colocam quando se pretende analisar as amostras de uma reação química de hidrólise ou oxidação por HPLC, como por exemplo, as elevadas concentrações dos agentes degradativos que podem interferir na análise cromatográfica e os valores extremos de pH a que normalmente não se podem submeter as colunas de HPLC. Desta forma, recomenda-se que as soluções sejam diluídas com um solvente compatível com a fase móvel ou com a própria fase móvel segundo um fator que poderá ser até cerca de 1:100, dependendo da sensibilidade do detector, do volume de injeção e da própria substância^(6,7).

1.4. A espectrometria de massas: Conceitos gerais

A espectrometria de massas (MS) constitui uma das técnicas instrumentais capaz de obter informação estrutural mais utilizada, com amplas aplicações em diversas áreas da química, biologia, farmacêutica e tecnológicas. No que se refere a instrumentação, diversos avanços foram conseguidos nas últimas décadas, tanto no desenvolvimento de novas técnicas de ionização⁽⁸⁾ quanto de separadores de massas. A MS existe há quase um século, entretanto, inicialmente era restrita a análise de gases e substâncias com baixas pressões de vapor e termicamente estáveis. Desde então, foram realizadas muitas inovações, como por exemplo, o desenvolvimento dos analisadores quadrupolo (1953), o acoplamento com cromatografia gasosa (1957) e os analisadores ICR (1974)⁽⁸⁾. O que aumentou a capacidade de aplicação em diversas áreas.

A técnica espectrometria de massas consiste na ionização das moléculas de interesse, e separação dos íons formados de acordo com suas diferentes valores de massa-sobre-carga (m/z) de cada espécie analisada. O valor da razão m/z , atribuída a um íon, é um número adimensional, ou seja, a razão m/z não é uma unidade e sim um adjetivo do íon⁽⁹⁾. Isto é importante ressaltar, pois o que é medido em espectrometria de massas é a razão m/z e não a massa de um íon em Da (Daltons). Apenas para íons monocarregados isto não se aplica a razão m/z reflete a massa física do íon.

A MS não analisa átomos neutros ou moléculas neutras. Antes de discriminar os íons é necessário, primeiramente, gerá-los utilizando um sistema de ionização ou fonte de íons. Os diferentes tipos de fonte de ionização existentes é um dos fatores que determinam a aplicabilidade da MS⁽¹⁰⁾.

A **Figura 2** apresenta um diagrama esquemático de um espectrômetro de massas. Em geral dividido em cinco etapas: (i) a introdução da amostra, (ii) a ionização das moléculas, (iii) a passagem por um analisador de massas que separa os íons formados de acordo com a razão m/z , (iv) o detector que “conta” os íons e transforma o sinal em corrente elétrica e (v) o processador que converte a

magnitude do sinal elétrico em função da razão m/z em dados proporcionando um espectro de massas correspondente⁽⁸⁾.

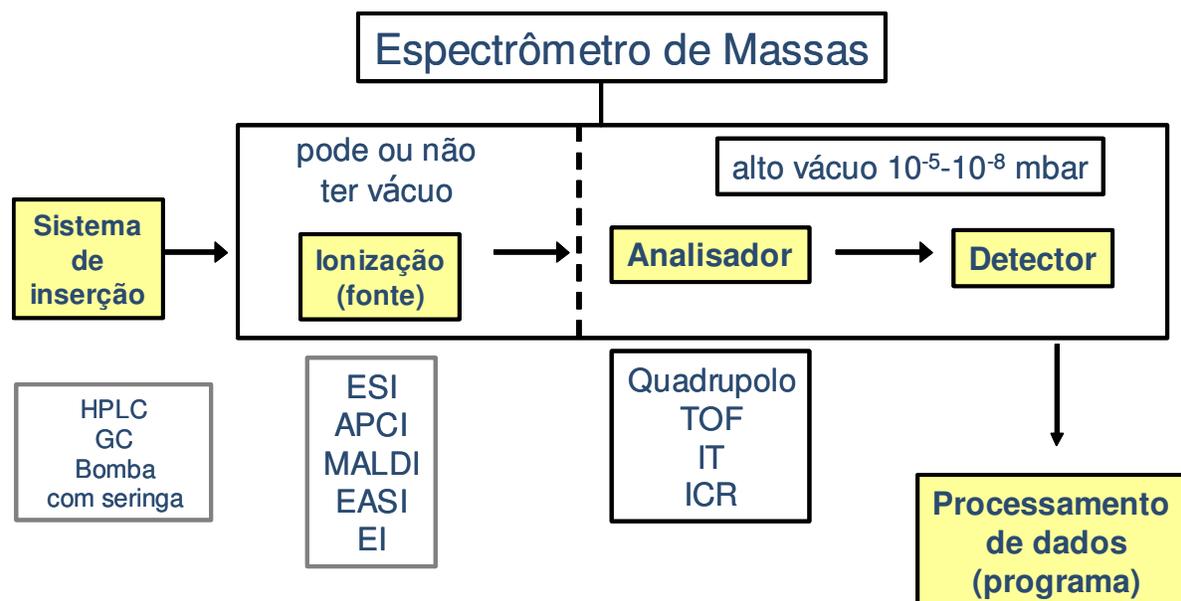


Figura 2. Diagrama esquemático de um espectrômetro de massas.

A **Figura 2** também mostra que o analisador de massas e o sistema de detecção são mantidos sobre alto vácuo, o que não se aplica necessariamente aos sistemas de ionização, pois alguns deles estão à pressão atmosférica, fato que revolucionou a espectrometria de massas.

A técnica principal de ionização sob pressão atmosférica foi a ESI (*electrospray ionization*), com maior aplicabilidade em amostras dissolvidas em solventes líquidos. Os sistemas de ionização tem grande poder de determinar a versatilidade da MS, pois as fontes de íons são responsáveis pelos tipos de analitos que podem ser analisados. Inúmeros métodos para gerar íons foram desenvolvidos ao longo da história da MS, desse modo há métodos de ionização aplicáveis praticamente a todos os tipos de analitos, tanto para moléculas apolares e voláteis como as fontes de ionização por elétrons, *Electron Ionization* (EI) e a ionização química, *Chemical Ionization* (CI), quanto à moléculas polares como

Introdução

ESI, técnica a pressão atmosférica que transfere íons em solução para fase gasosa, à sólidos como MALDI (ionização sob vácuo por dessorção de matriz) e técnicas de ionização ambiente como EASI que tornaram a introdução da amostra em MS mais simples e prática⁽⁸⁾.

Existem diferentes estratégias para se discriminar os íons dependendo do analisador de massas, o mais comum é o monoquadrupolar que possui resolução unitária. Outros que podem ser citados são os analisadores de aprisionamento de íons, ion trap (IT), analisadores por tempo de voo (TOF), ressonância ciclotrônica de íons (ICR), mas existem ainda muitos outros. Cada analisador possui diferenças de resolução e exatidão, sendo utilizado para discriminar as razões m/z medidas⁽⁸⁾.

A **Figura 3** mostra a diferença de resolução entre dois analisadores de massas. O analisador de resolução unitária mede a massa nominal (**Figura 3a**), assim o íon de m/z 249 com resolução unitária pode se referir a fórmula molecular $C_{20}H_9$, $C_{19}H_7N$ ou $C_{13}H_{19}N_3O_2$.

Já um analisador de alta resolução mede a massa exata de cada isótopo mais abundante (**Figura 3b**), assim é possível atribuir fórmulas moleculares para cada sinal de acordo com o seu defeito de massa 249,0700 ($C_{20}H_9$), 249,0580 ($C_{19}H_7N$) e 249,1479 ($C_{13}H_{19}N_3O_2$). Assim, resolução pode ser definida como a capacidade do analisador medir m/z com a menor diferença possível da massa-sobre-carga teórica, o que possibilita inferir uma a fórmula molecular baseada nos defeitos de massa.

Existem analisadores que possuem resolução que vão de 5000 a 1000000. A exatidão é medida pelo erro calculado em ppm do desvio da medida experimental em relação ao valor de massa teórico, ou seja, indica quão próximo o valor experimental está próximo do valor verdadeiro. A alta exatidão de massa oscila de valores entre 0,1 a 50 ppm de erro.

Quanto menor for o erro maior é a probabilidade de a fórmula molecular atribuída ser a verdadeira⁽⁹⁾.

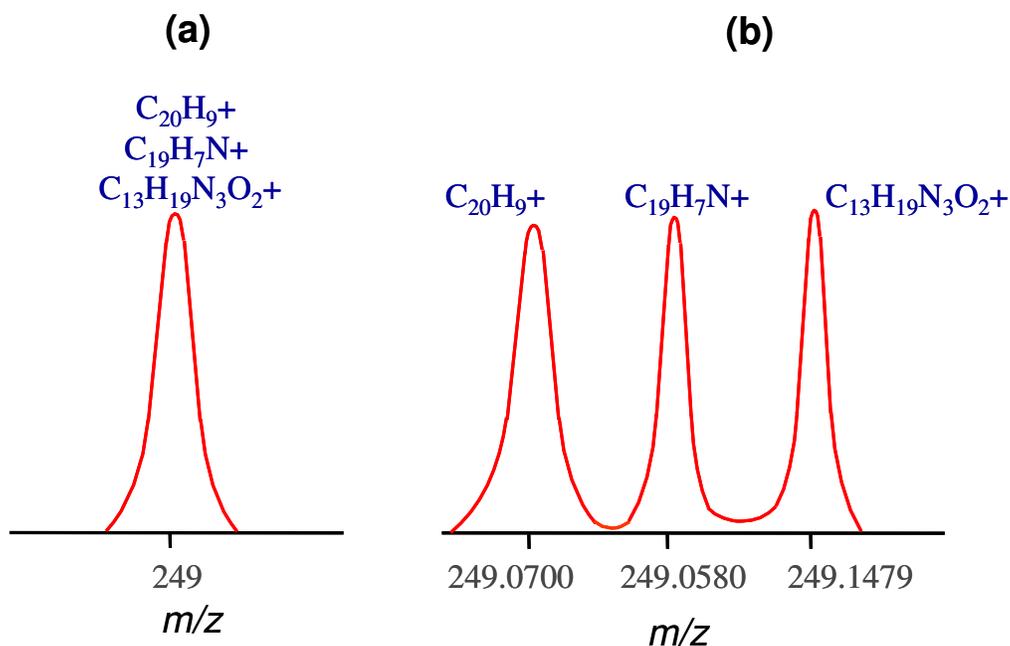


Figura 3. Esquema ilustrativo da resolução em analisadores de massas com (a) resolução unitária e (b) alta resolução.

1.4.1. Ionização em condições ambiente por EASI MS

Ocorreu na MS nos últimos anos a introdução de técnicas de ionização que permitem a dessorção e ionização de moléculas diretamente da superfície de sua matriz original no ambiente^(10,11) (“*Ambient MS*”). Entre estas técnicas destaca-se a ionização/dessorção por eletrospray, *Desorption Electrospray Ionization* (DESI)⁽¹²⁾, a análise direta em tempo real, *Direct Analysis in Real Time* (DART)⁽¹³⁾, a probe de análise de sólidos a pressão atmosférica, *Atmospheric Pressure Solids Analysis Probe* (ASAP)⁽¹⁴⁾ e a ionização por eletrospray com dessorção a laser assistida por matriz, *Matrix-Assisted Laser Desorption Electrospray Ionization* (MALDESI)⁽¹⁵⁾. No Brasil, Eberlin e colaboradores⁽¹⁶⁾ estabeleceram a técnica de ionização ambiente por spray sônico, *Easy Ambient Sonic-Spray Ionization* (EASI), primeiramente denominada de ionização/dessorção por spray sônico, *Desorption*

Introdução

Sonic Spray Ionization (DeSSI) e seu acoplamento com interface de membrana, *Membrane Introduction Mass Spectrometry (MIMS)* ⁽¹⁷⁾ e com cromatografia em camada delgada, *Thin-Layer Chromatography (TLC)* ⁽¹⁸⁾.

Na técnica de ionização por EASI a fonte é de fácil fabricação e ampla aplicabilidade podendo ser utilizada com qualquer analisador de massas. O mecanismo de ionização é baseado em *Sonic Spray Ionization (SSI)* ^(19,20) sem utilização de agentes externos que proporcionem ou auxiliem a ionização, tais como: radiação, voltagem ou mesmo temperatura como na maioria das técnicas de ionização conhecidas ^(21,22). O mecanismo de ionização que melhor explica o fenômeno de ionização por EASI está baseada na possibilidade de gotas carregadas, com desequilíbrio entre as cargas positivas e negativas serem formadas no spray sônico (**Figura 4**). O bombeamento de um solvente polar, através de um capilar de sílica fundida (d.i. 100 μm) com vazão de 20 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ junto com vazão do gás de arraste ($\sim 3 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$), promove um cisalhamento intenso com a liberação no spray de microgotículas. Estas microgotículas têm uma capacidade bem limitada de acomodar carga e assim apresentam baixa densidade de cargas com a probabilidade estatística de ocorrer um desequilíbrio tanto a favor das cargas positivas quanto das cargas negativas. Ao entrar em contato com a amostra, estas microgotículas desorvem moléculas do analito que estão na superfície ⁽²³⁾. A evaporação do solvente é favorecida pela energia térmica do ambiente e por auxílio do gás do spray que age como secante. Após a dessorção, o processo é semelhante à ESI, assim conforme a gota perde solvente, a densidade de cargas aumenta até um ponto que as forças de repulsão vencem a tensão superficial e os íons são ejetados da gota. Depois de formados, os íons agora dessolvatados e na fase gasosa alcançam o orifício (da ordem de poucos micrometros) do cone de amostragem (*skimmer*). Um campo elétrico na entrada do cone é responsável por atrair os íons formados, assim os íons são guiados ao analisador de massas ⁽²⁴⁾.

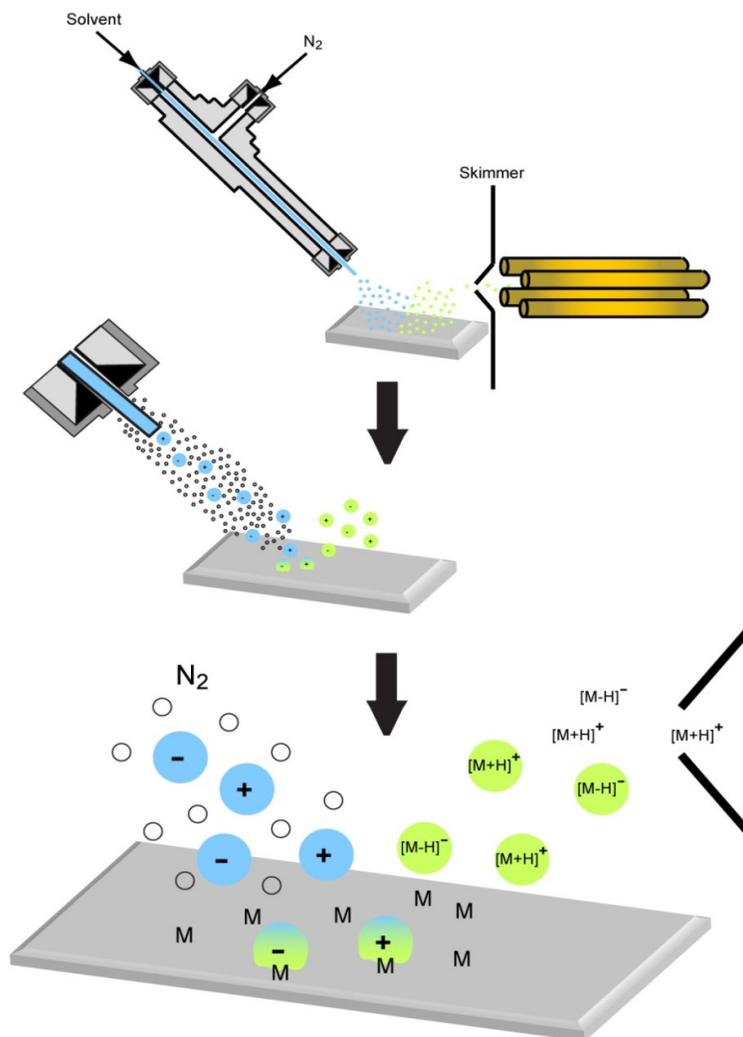


Figura 4. Esquema do processo de ionização por EASI⁽²³⁾.

A composição do solvente no spray, a superfície de ionização, a pressão do gás de nebulização e a polaridade do solvente são parâmetros importantes no desenvolvimento de um método por EASI MS. Estas variáveis podem afetar a estabilidade do sinal e a repetibilidade das análises. Uma variedade de superfícies tem sido empregada incluindo papel pardo de envelope, placas de cromatografia em camada delgada e vidro. Normalmente são utilizados como solvente o metanol e acetonitrila, puros ou com água em diferentes proporções, com ou sem aditivos (ácido fórmico e hidróxido de amônio) dependendo da característica química do analito e o uso de Etanol como solvente também pode ser aplicado. Emprega-se

N_2 como gás nebulizador ou ar comprimido com pressão média de 7 bar ou 100 psi⁽²³⁾.

1.4.2. Analisador utilizado: Monoquadrupolar

No analisador monoquadrupolar, os íons são separados por sua estabilidade de trajetória em um campo criado por oscilações elétricas aplicadas nos cilindros metálicos⁽²⁵⁾. A **Figura 5** mostra esse analisador que é constituído de quatro cilindros metálicos paralelos nos quais uma corrente elétrica do tipo contínua, *direct current* (DC) e um potencial de rádio frequência (RF) são aplicados alternadamente. Os íons produzidos na fonte de ionização são focalizados no centro da região entre os quatro cilindros e atravessam axialmente o quadrupolo. Suas trajetórias serão dependentes do campo elétrico produzido onde apenas íons de uma razão m/z específica terão uma trajetória estável e chegarão ao detector. A RF é variada para que íons de diferentes razões m/z obtenham uma trajetória estável ao longo do quadrupolo chegando ao detector, gerando assim um espectro de massas⁽²⁶⁾. Apesar da resolução unitária e de não permitir fragmentação, fornece espectros com informação de alta qualidade e fácil interpretação.

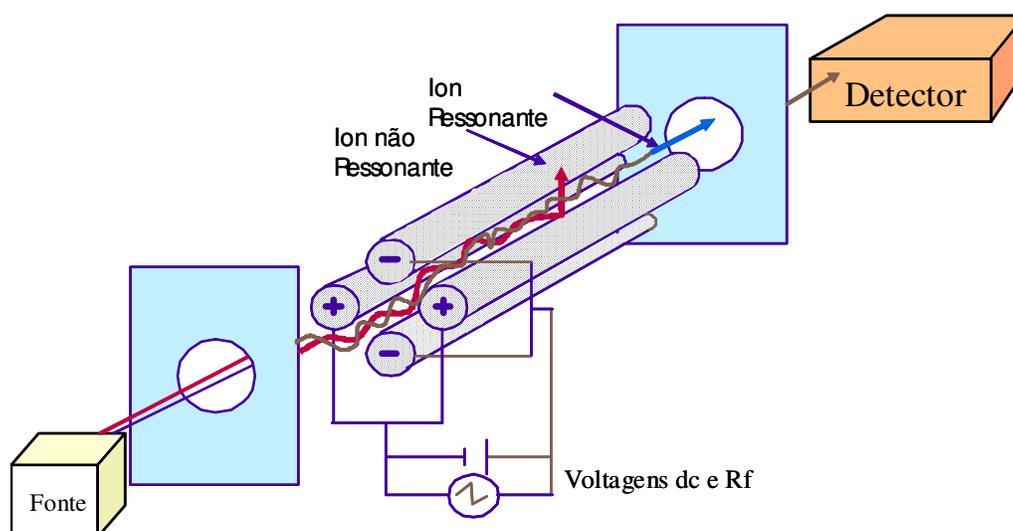


Figura 5. Diagrama esquemático de um analisador monoquadrupolar.

1.5. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE):

1.5.1. Introdução a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição dos mesmos entre duas fases, a estacionária e a móvel. Uma das fases permanece estacionária, enquanto a outra move-se através dela. Devido à diferença nos coeficientes de distribuição de cada um dos analitos nas respectivas fases, obtém-se velocidade de eluições diferentes, de tal modo que o composto menos retido na fase estacionária é eluído primeiramente.

A separação cromatográfica baseia-se na migração diferencial dos compostos de uma mistura que ocorre devido às diferentes interações entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária, e no alargamento de bandas, que é dependente de processos físicos e não da diferença de equilíbrio. A migração diferencial resulta da diferença de equilíbrio dos analitos entre as duas fases imiscíveis e é determinada pelos fatores que afetam o equilíbrio: composição da fase estacionária e temperatura da separação. Alterações nesses parâmetros podem levar a mudanças na migração diferencial. Os principais processos físicos responsáveis pelo alargamento de bandas são a difusão de Eddy, transferência de massa de fase móvel, transferência de massa de fase estacionária e difusão longitudinal ⁽²⁷⁾.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica analítica de separação indispensável e que tem, a cada dia, se solidificado como técnica principal de quantificação entre os laboratórios de mais diferentes ramos. Um exemplo dessa ampla aceitação é a indústria farmacêutica e alimentícia brasileira que conta hoje com diferentes marcas e modelos de equipamento configurados com detectores específicos e universais, injetores com resfriamento, bombas quaternárias e software capazes de monitorar a aquisição de dados e processá-los de forma simples e eficiente⁽²⁷⁾. Alguns dos fatores que têm influenciado o rápido desenvolvimento da aplicação da CLAE podem ser o estudo contínuo de

novas fases estacionárias (FE) para aplicações específicas para uma determinada classe de compostos, o fácil manuseio do equipamento, a disponibilidade de material didático e publicações variadas sobre cromatografia.

A CLAE apresenta algumas vantagens frente às outras técnicas analíticas que também são aplicadas no desenvolvimento de métodos e na rotina de um laboratório de controle de qualidade. O uso de fases móveis (FM) com a utilização de uma menor quantidade de componente orgânico e o rápido equilíbrio da coluna após alteração de fase móvel, seja no modo gradiente quanto no isocrático, permite uma análise com economia de custos e tempo de análise e também com melhores separações. Os equipamentos atuais de CLAE possibilitam estabilidade rápida da análise com excelente repetibilidade do tempo de retenção, volume injetado e valores de área. Outra vantagem seria o amplo campo de aplicação devido à separação de compostos de diferentes polaridades, massas molares e funcionalidades. Atualmente há um forte desenvolvimento na validação dos métodos analíticos por CLAE não tão observado para outras técnicas, sendo o campo da seletividade do método e os limites de quantificação e detecção as áreas de maior estudo como por exemplo os métodos indicadores de estabilidade que tem sido estudados e aplicados na verificação de possíveis compostos de degradação. Uma importante aplicação da CLAE é a análise de compostos não voláteis ou termicamente instáveis, que são solúveis na fase móvel, nessa classe de compostos são encontrados grande parte dos fármacos⁽²⁷⁾.

1.5.2. Equipamento

Um sistema de CLAE (**Figura 6**) é composto basicamente por uma bomba, recipientes com fase móvel injetor, coluna cromatográfica e detector. Em um sistema de CLAE a fase móvel é bombeada sob alta pressão a uma vazão controlada e uma pequena quantidade de amostra é introduzida através da válvula de injeção. A amostra passa a ser arrastada pela fase móvel, passando pela coluna, onde ocorre o processo de separação cromatográfico. Além desses itens básicos, porém não menos importantes, estão disponíveis outros mais específicos

Introdução

como: desgaseificador para retirada de gases presentes na FM; injetores com sistema de resfriamento para conservação da amostra, forno para as colunas que podem aquecer e também resfriar a coluna, diferentes detectores ou o uso de detectores em série sendo mais comum o uso dos detectores de fluorescência e ultra-violeta/vísivel (UV-VIS) usados em sequência por exemplo para determinação de hormônios em anti-concepcionais; sistemas de derivatização usados após a coluna para análise por exemplo de uma mistura de aminoácidos⁽²⁷⁾.

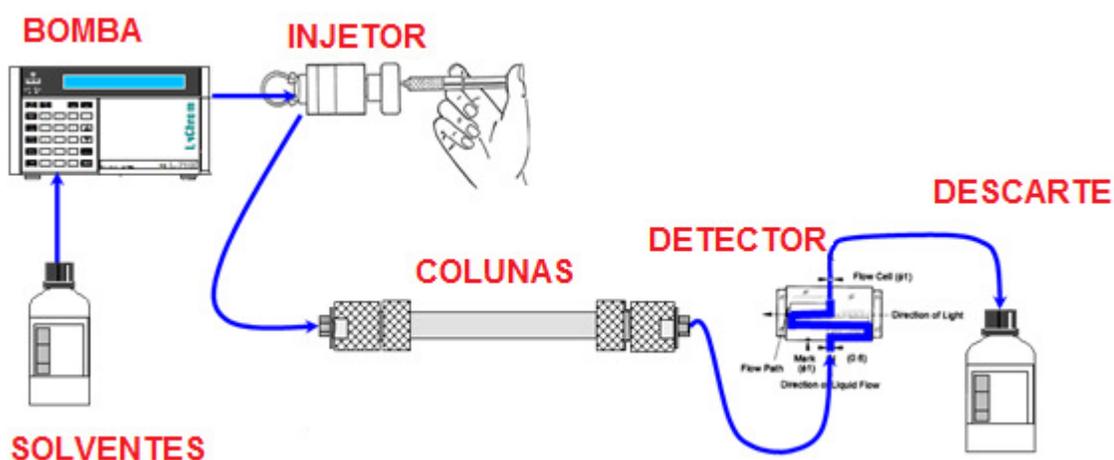


Figura 6. Esquema de um sistema cromatográfico.

Os sistemas de CLAE disponíveis atualmente e encontrados na maioria dos laboratórios são fabricados, principalmente, pelas marcas Waters, Merck, Shimadzu e Agilent. Alguns desses sistemas apresentam em comum, bombas quaternárias com a opção de um quinto canal usado com a solução de lavagem da seringa e que também pode ser desgaseificado como os outros canais, injetores automáticos com opção de resfriamento e detectores para as mais variadas aplicações. Dentre as variáveis possíveis para uma melhor separação em um sistema de CLAE as propriedades da amostra, fase móvel, fase estacionária e sistema de detecção são consideradas as mais importantes^(27,28).

1.5.3. Sistemas de Detecção

Os sistemas de CLAE podem ser utilizados com diferentes tipos de detectores conforme a necessidade da aplicação desejada. O detector mede de forma contínua alguma propriedade física ou físico-química da amostra, ou da solubilidade que a contém, e envia um sinal para registro, geralmente, diretamente proporcional à concentração do componente na amostra. Uma classificação geral que pode ser aplicada aos detectores é com relação ao tipo de amostras aplicadas. Os detectores classificados como universais são aqueles em que podem ser aplicados a todos os tipos de amostras e detectores seletivos são aqueles que respondem a uma classe ou tipo de substâncias.

Os principais detectores usados em CLAE são: UV-VIS, fluorescência, índice de refração, eletroquímico, espectrometria de massas, espalhamento de luz. Existem outros tipos de detectores com aplicação em CLAE que não possuem aplicação como os citados anteriormente, dentre eles estão o de infravermelho, dicroísmo circular e condutividade elétrica^(27,28).

Na avaliação cromatográfica para se ter bons resultados analíticos é necessária atenção na seleção do comprimento de onda usado na detecção. Para isso é necessário o pleno conhecimento do espectro UV do composto individualmente. Se há a disponibilidade do padrão do analito pode-se medir o espectro do composto através de um espectrofotômetro UV-VIS comum, entretanto, nem sempre é possível obter o padrão de compostos provenientes da degradação dessas substâncias. Nesse caso o uso do detector de arranjo de diodos é muito útil por permitir a aquisição do espectro de todos os componentes separados em diferentes comprimentos de onda durante a análise. O espectro obtido de cada componente separado pode ser usado para selecionar o comprimento de onda de máxima absorção e também a interferência de outros compostos presentes nas amostras que absorvam na mesma faixa do espectro de 190 a 800 nm. Dentre os dados que podem ser obtidos com detector de arranjo de diodo estão a pureza de pico e a similaridade de espectros. A pureza de pico é

avaliada pela comparação dos espectros obtidos no início, meio e final do pico cromatográfico. Para a avaliação da pureza de pico é necessária a condição básica de que os compostos presentes na mistura tenham a separação mínima necessária. Outras técnicas de detecção como infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (MS) podem ser usados para garantir a pureza do pico cromatográfico⁽²⁸⁾.

1.6. Processos Farmacêuticos para fabricação de comprimidos

1.6.1. Métodos de Granulação

Os Métodos de granulação podem ser divididos em dois tipos: Via Úmida, que utiliza um líquido no processo e Via Seca, que não utiliza nenhum tipo de líquido.

Na maioria das formulações, além das matérias primas tradicionais, diferentes aditivos podem ser utilizados para proporcionar certas propriedades ou fatores que inibam (ou não) algumas importantes características durante o processo industrial. Pode-se citar plasticidade da massa granulada, boa compressibilidade, permeabilidade, facilidade de secagem, favorecimento da resistência mecânica, reatividade, coloração, entre outras. Esses aditivos podem ser empregados na forma de pó, homogeneizados à massa ou diluídos na água utilizada para a granulação⁽²⁹⁾.

1.6.1.1. Granulação via Seca

A granulação de partículas ocorre através de altas pressões. Há dois processos principais:

- Prensagem: Uma mistura de pós é compactada dentro de um molde por uma prensa, formando um briquete.
- Rolos compactadores: A mistura de pós é comprimida entre dois rolos para produzir uma folha laminada de material (escamas).

Em ambos os casos, no passo seguinte, utilizam-se técnicas de desintegração desses materiais compactados (procedimentos de moagem) para a obtenção de grânulos que, normalmente, são peneirados (classificação granulométrica) para separar a fração de tamanho desejada. O material, fino e indesejado, via de regra, retorna ao processo de mistura e compactação⁽³⁰⁾.

Esse método, por via seca, é utilizado para formulações de produtos que não comprimem bem após a granulação via úmida ou quando as formulações são sensíveis à umidade.

1.6.1.2. Granulação via úmida

Esse método envolve a aplicação de um líquido sobre o pó, ou mistura de pós secos, resultando numa massa úmida ou em grânulos com uma adequada umidade. Na maioria dos processos, o líquido utilizado é água, podendo ser empregado o álcool etanol ou isopropanol, até uma combinação destes. Obviamente, esse líquido não pode ser tóxico, ou incompatível com a formulação, e deve ser volátil o suficiente para ser removido facilmente em um processo de secagem. O líquido de granulação pode ser usado sozinho ou, mais comumente, com aditivos dissolvidos em seu meio (também chamado de adesivo, ligante ou agente de ligação) e que são utilizados para promover uma adesão entre as partículas quando ocorrer a secagem dos grânulos.

Solventes orgânicos são utilizados quando as formulações processadas são sensíveis à água, como uma alternativa da granulação via seca, ou quando necessita de um tempo de secagem muito rápido^(29,30).

No método de granulação via úmida tradicional, a massa umedecida é forçada através de uma peneira (malha) para produzir grânulos úmidos, que posteriormente sofrem o processo de secagem. Então, uma classificação granulométrica é realizada para separar os tamanhos de grânulos desejados; os grânulos rejeitados podem ser reutilizados no processo. A massa úmida deve ser suficientemente plástica e rígida para formar grânulos distintos. Se líquido em

excesso é adicionado, material na forma de macarrão pode ser formado. E se a mistura é muito seca, não ocorrerá a formação de grânulos.

Os grânulos obtidos podem ser coletados em bandejas e transferidos para um secador, com três desvantagens:

- O tempo de secagem é longo;
- Materiais dissolvidos podem migrar para a superfície superior da massa granulada, ocasionando uma remoção do solvente (geralmente líquido) somente na superfície mais externa da massa; e
- Grânulos podem se agregar devido à formação de pontes nos pontos de contato (dos grânulos).

As desvantagens desse processo tradicional de granulação são o tempo longo para obtenção do produto final, a necessidade de vários tipos de equipamentos e ferramentas, além da excessiva perda de massa gerada durante as transferências de fases do procedimento.

Após a secagem, é necessária uma desagregação dos aglomerados, que pode ser realizada através de peneiras rotativas ou vibratórias.

Um método alternativo é a utilização de secadores de leito fluidizado, que é bastante rápido, mantêm os grânulos separados durante a operação (reduzindo ou inibindo os problemas de agregação), além de evitar a indesejada migração intergranular. Muito utilizado quando se requer uma umidade controlada no grânulo final, por exemplo, 6% de umidade na massa granulada para fabricação de pisos e revestimentos cerâmicos ^(29,30).

1.6.1.3. Razões para Granulação

1.6.1.3.1. Prevenir segregação dos componentes da mistura

A segregação pode ocorrer devido a diferenças nos tamanhos de partículas ou densidades de componentes da mistura. Geralmente, partículas menores e/ou mais densas se concentram na base de um recipiente, sendo que as partículas maiores e/ou com menor densidade se concentram no topo desse mesmo

recipiente. Uma granulação ideal conterá todos os componentes da mistura na proporção correta em cada grânulo, dificultando a segregação dos ingredientes. Também é muito importante controlar a distribuição do tamanho dos grânulos, pois, embora os componentes individuais não apresentem segregação, se ocorrer uma larga distribuição granulométrica na massa granulada, pode ocorrer segregação. Se isto acontecer nos equipamentos que fazem o enchimento de moldes para a prensagem de pisos cerâmicos, resultarão produtos com grandes variações de peso e espessura.

Isto porque estas máquinas são controladas e fazem o enchimento através de volume em lugar de peso. Se regiões diferentes no silo de armazenamento (ou no alimentador do equipamento) apresentarem grânulos de tamanhos diversos - provavelmente com densidades diferentes - um determinado volume em cada região vai conter um peso diferente de grânulos ⁽²⁹⁾.

1.6.1.3.2. Melhorar propriedades de fluidez da mistura dos pós

Muitos pós, devido a seu tamanho pequeno, forma irregular ou características de superfície, são muito aderentes (coesivos) e não permitem uma boa fluidez.

Baixa fluidez resultará, freqüentemente, numa variação de peso indesejável no produto final (influenciando a densidade aparente de prensagem), devido ao abastecimento variável dentro dos moldes na produção de revestimentos cerâmicos. A granulação da mistura desses pós, em determinadas faixas granulométricas, permite uma melhoria significativa nas propriedades de fluidez desses materiais ⁽²⁹⁾.

1.6.1.3.3. Melhorar as características de compactação da mistura dos pós

Alguns pós, ou misturas de pós, são difíceis de compactar, mesmo quando um bom aditivo (adesivo ou ligante) é incluído na mistura. Porém, grânulos desses

pós ou misturas de pós são, freqüentemente, mais facilmente compactados e produzem peças mais resistentes.

Essa propriedade está associada com a distribuição do adesivo dentro do grânulo e em função do método empregado para produzir o grânulo. Geralmente, ocorre uma migração de aditivos (água, por exemplo) após a granulação, durante o processo de “descanso” dos grânulos, resultando numa camada exterior (no grânulo) rica em aditivo ligante. Isto conduz, na compactação dos granulados, a um contato direto entre ligantes (camadas externas) o que ajuda na compactação desses materiais⁽²⁹⁾.

Outras razões:

- Granulação de materiais tóxicos pode reduzir o perigo associado com a geração de pós tóxicos, principalmente na manipulação dos mesmos. Evidentemente que precauções devem ser tomadas durante o processo de granulação (enclausuramento do equipamento) e devem ser obtidos grânulos não friáveis e com boa resistência mecânica;
- Materiais que são ligeiramente higroscópicos podem aderir (grudar) e formar grumos dentro de silos de armazenamento. A granulação pode reduzir este perigo, grânulos podem absorver menos umidade e continuarem com uma boa fluidez, necessária para o prosseguimento do processo industrial; e
- Grânulos, sendo mais densos que o pó ou mistura de pós que os originaram, ocupam menos volume por unidade de peso. Esse fator é muito conveniente em casos de armazenamento e transporte.

1.6.1. Compressão direta

O termo compressão direta foi usado inicialmente para a compressão de compostos, normalmente sais inorgânicos, sob a forma de cristais cúbicos como: cloreto de sódio, brometo de sódio e brometo de potássio, capazes de serem compactados sem a adição de outras substâncias. Atualmente, o termo compressão direta é empregado para definir o processo pelo qual misturas de

Introdução

princípios ativos e excipientes adequados são comprimidas diretamente, sem a necessidade de um pré-tratamento, como ocorre na granulação via úmida ou seca⁽³¹⁾.

O desenvolvimento da compressão direta só foi possível a partir do momento em que agentes de compressão direta, os quais possuem boa fluidez e compressibilidade, tornaram-se comercialmente disponíveis, sobretudo, a partir da década de 60. O surgimento de novos excipientes, diluentes para compressão direta e superdesintegrantes^(32,33), ou o aprimoramento das tecnologias de obtenção destes⁽³⁴⁾ tem proporcionado novas e boas alternativas para o desenvolvimento dos processos de compressão direta. Contudo, o maior avanço ocorreu em virtude das inovações relacionadas às máquinas de compressão. A introdução de sistemas de alimentação forçada das matrizes e de estágios de pré-compressão têm facilitado a tarefa de obtenção de comprimidos por compressão direta⁽³¹⁾.

O método em questão está baseado em duas etapas: mistura e compressão. A compressão direta vem ganhando uma importância muito grande devido as suas vantagens: simplificação e redução de etapas, equipamentos, validação de processos e consumo de energia. A vantagem mais significativa, em termos de qualidade dos comprimidos obtidos, está no fato do método não necessitar de umidade e aquecimento, inerentes aos processos de granulação úmida, nem altas pressões de compressão, inerentes ao processo de granulação⁽³¹⁾.

O sucesso no desenvolvimento de formulações de comprimidos por compressão direta também depende de considerações cuidadosas em relação às propriedades dos excipientes, visando otimização da compressibilidade e fluidez da mistura de pós. A escolha dos excipientes é extremamente crítica. Fatores tais como: compressibilidade, fluidez, tamanho e distribuição das partículas, umidade, densidade aparente, compatibilidade com o fármaco, solubilidade no trato gastrointestinal, estabilidade, custo e disponibilidade, influenciam na escolha dos diluentes para a compressão direta. Em muitos casos, estes excipientes são mais caros quando comparados com os diluentes empregados na granulação via

úmida. Portanto, estudos de pré-formulação são essenciais para alcançar bons resultados⁽³¹⁾.

Formulações de comprimidos de liberação convencional devem ser desenvolvidas com o objetivo de se alcançar dureza adequada, sem a necessidade de força de compressão excessiva e, ao mesmo tempo, assegurar rápida desintegração e dissolução dos ativos. Ou seja, as misturas destinadas à compressão direta devem possuir compressibilidade adequada^(31,35).

Em função do menor tamanho das partículas encontradas em misturas para compressão direta, a fluidez passa a ser um problema mais sério do que na granulação úmida, onde o próprio formato do granulado já proporciona maior fluidez. Quando a quantidade de substância ativa é pequena, o problema pode ser superado pela escolha adequada de um diluente que possua fluidez adequada. Entretanto, quando a quantidade de princípio-ativo corresponde a maior parte do peso final do comprimido, o uso de deslizante ou promotores de escoamento, além da escolha cuidadosa do diluente, se faz necessária⁽³¹⁾.

Weels e Aulton⁽³⁶⁾ afirmaram que as propriedades de compressão da maioria das substâncias ativas são extremamente pobres e necessitam da adição de auxiliares de compressão. Os autores salientam que quando a dose é inferior a 50mg, os comprimidos podem ser normalmente preparados por compressão direta com a adição de modernos agentes de compressão, entretanto, para doses maiores, o método preferido é a granulação úmida.

A lubrificação de misturas de pós para compressão direta é uma etapa mais complicada do que na granulação clássica. Segundo Shangraw⁽³¹⁾, os problemas associados com a lubrificação podem ser divididos em duas categorias: a) o tipo e a quantidade necessária para produzir lubrificação adequada; b) o efeito softening dos lubrificantes, ou seja, a redução da dureza dos comprimidos causada pelo uso de estearatos alcalinos como lubrificantes. Em função do menor tamanho das partículas das misturas para compressão direta, concentrações maiores de lubrificantes são necessárias, aumentando a magnitude do efeito softening, no caso dos diluentes não apresentarem fragmentação ou comportamento plástico na compressão.

Weels e Aulton⁽³⁶⁾ argumentam que o material a ser comprimido deve ser plástico, ou seja, ser capaz de sofrer deformação permanente, além de certo grau de fragmentação. O mesmo autor apresenta um procedimento para a avaliação das propriedades de compressão de fármacos.

Shangraw⁽³¹⁾ conclui que a duração da lubrificação é muito mais crítica na compressão direta do que na granulação úmida, e que a lubrificação de misturas para compressão direta é um dos problemas mais complexos e difíceis encontrados pelo farmacêutico formulador. O autor recomenda ainda que o uso de estearatos alcalinos como único lubrificante para algumas formulações de compressão direta seja evitado, e que o tempo de lubrificação não exceda a cinco minutos para se evitar o efeito de impermeabilização e o efeito softening destes lubrificantes sobre os comprimidos.

Banker e Anderson⁽³⁵⁾ citam que, embora o processo de compressão direta apresente importantes vantagens, alguns fatores podem limitar o emprego deste método como: a) diferenças de tamanho entre as partículas ou as densidades aparentes do fármaco e adjuvantes podem levar a segregação ou estratificação, principalmente quando o fármaco se apresenta em pequenas dosagens; b) misturas para compressão direta com baixa compressibilidade podem originar comprimidos com baixa dureza e alta friabilidade; c) misturas para compressão direta com baixa fluidez podem causar variações no peso médio dos comprimidos ou mesmo inviabilizar a operação de compressão.

1.6.2.1. Vantagens da compressão direta

Gohel *et. al*⁽³⁴⁾ descrevem uma revisão sobre as principais vantagens da compressão direta, dentre elas figuram a economia, pois requer menos etapas no processo, ou seja, menos equipamentos, menor espaço e menos tempo, o que leva a uma redução nos gastos de fabricação dos comprimidos. A compressão direta é apropriada para princípios ativos sensíveis à umidade e ao calor, pois elimina as etapas de molhagem e secagem, aumentando a estabilidade dos mesmos. Comprimidos produzidos por compressão direta têm menor

probabilidade de mudanças no seu perfil de dissolução e no seu armazenamento, quando comparados com os comprimidos produzidos por granulação por via úmida. Isto é extremamente importante porque os compêndios oficiais exigem especificações da dissolução da maioria dos fármacos.

A desintegração ou a dissolução limita a absorção no caso dos princípios ativos pouco solúveis preparados por granulação via úmida. Os comprimidos preparados por compressão direta desintegram o princípio ativo em partículas, em vez de grânulos, que entram diretamente em contato com o líquido dissolutor, levando, em alguns casos, a uma dissolução mais rápida. Por ser um processo mais ágil, reduz-se a possibilidade de contaminação cruzada, estando em melhor acordo com as Boas Práticas de Fabricação. Devido às poucas operações, a validação e as exigências da documentação são reduzidas. A possibilidade de crescimento microbiano é mínima nos comprimidos preparados por compressão direta, devido ausência de água⁽³⁴⁾.

1.6.2.2. Limitações da compressão direta

A compressão direta é mais propensa à segregação devido à diferença na densidade entre os princípios ativos e os excipientes. O estado seco do material durante a mistura pode induzir uma carga estática e conduzi-lo a segregação. Isto pode favorecer problemas como: variação do peso e uniformidade de conteúdo. Os excipientes diretamente compressíveis são produtos especialmente produzidos, patenteados e co-processados, obtidos pela secagem em pulverizador (atomização), secagem em leito fluidizado, rolo ou por co-cristalização. Isto resulta em produtos relativamente mais caros do que os produtos originais. A maioria dos excipientes para compressão direta pode acomodar somente 30-40% dos princípios ativos mal compressíveis, o que significa um grande aumento no peso final do comprimido e os comprimidos grandes podem gerar dificuldade na momento da administração via oral⁽³⁴⁾.

2. OBJETIVO

2. Objetivo:

- Estudar os produtos de degradação do maleato de enalapril direto do comprimido;
- Estudar diferentes processos de fabricação de comprimidos;
- Aplicar uma metodologia rápida;
- Obter informações estruturais dos produtos de degradação;
- Avaliar a capacidade da técnica EASI no estudo dos produtos de degradação forçada;

3. CAPÍTULO

3.1. Título:**Direct Monitoring of Drug Degradation by Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry: The case of Enalapril**

*Phellipe H. Amara^a, Raquel Fernandes^b, Marcos N. Eberlin^{*b} and Nelci F. Höehr^{a*}*

^aDepartament of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas - UNICAMP, SP, Brazil

^bThoMSon Mass Spectrometry Laboratory, Institute of Chemistry, State University of Campinas, 13084-971, Campinas SP, Brazil

3.2. Abstract

Using enalapril maleate as a test case, the ability of ambient mass spectrometry, namely via easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry (EASI-MS), to perform direct monitoring of drug degradation has been tested. Two manufacturing processes were investigated (direct compression and wet granulation) and the formation of degradation products were measured via both EASI-MS and HPLC-UV for a total period of 18 months. Both techniques provide comparable results which indicates that direct analysis by ambient mass spectrometric techniques presents a viable alternative for drug degradation monitoring with superior simplicity, throughput and reliability (no sample manipulation) and comparable quantitative results. In terms of qualitative monitoring, the full mass spectra with intact species provided by EASI-MS allows for comprehensive monitoring of known and unknown (or unexpected) degradation products.

KEYWORDS Ambient mass spectrometry, sonic spray ionization, drugs, drug degradation products.

3.3. Introduction

Stability of a pharmaceutical formulation is a major factor affecting the quality of drug products and their efficacy.¹ Drug stability is mainly affected by the exposure of the product to environmental conditions such as temperature, humidity and light. Its chemical composition and the physical-chemical properties of excipients and active ingredients and their relative quantities in the formulation as well as the manufacturing process and conditions of storage and transportation are also major factors influencing drug stability. Metabolites created in the human body are also crucial for overall efficacy and safety of a drug. In modern pharmaceutical drug discovery and development, it is of crucial importance to identify unknown compounds arising from impurities or degradation with the highest possible confidence because of their potential pharmacologic effects on humans.^{2, 3}

Recently, a set of techniques known collectively as ambient ionization mass spectrometric techniques⁴ have been developed and applied with success to the direct analysis of drug formulations.⁵ We have also introduced an ambient ionization technique, namely easy ambient sonic-spray⁶ ionization (EASI)⁷ and tested it for direct drug analysis with superior simplicity and signal-to-noise ratios.⁸ EASI produces a bipolar stream of charged droplets and is also attractive for being inherently free from electrical or discharge interferences and of greater simplicity since it requires no voltage, temperature or irradiation assistance, and with Venturi-pumping.⁹ Herein we tested whether ambient ionization mass spectrometry, as exemplified by EASI, applied direct to the drug formulation without any sample preparation or pre-separation, would provide reliable monitoring of drug

degradation as compared to the more conventional monitoring performed via HPLC-UV using drug extracts. Enalapril maleate, a drug that acts as angiotensin converting enzyme inhibitor and constitute one of the major drugs used to treat essential and renovascular hypertension and congestive heart failure,¹⁰ as used in commercial formulations as a test case. Two manufacturing processes were also compared.

3.4. Experimental

3.4.1. Chemicals

Formic acid, methanol, acetonitrile and phosphoric acid were purchased from Sigma-Aldrich (São Paulo, Brazil) and used without further purification. Deionized water was obtained from a MilliQ (Millipore, Billerica, MA. USA) purification unit.

3.4.2. Mass spectrometry

The EASI-MS experiments were performed in a mass spectrometer (LCMS-2010EV-Shimadzu Corp., Japan) equipped with a home-made EASI source described in detail elsewhere.⁸ To produce the sonic spray, an acidic solution of methanol (0.1 v%) at 20 $\mu\text{L min}^{-1}$, and N_2 (100 psi) were used. Experiments were performed in the positive ion mode.

3.4.3. High Performance Liquid Chromatography

The HPLC – UV is equipped with a 215-nm detector and a 4,6-mm x 25-cm column that contains 5 μm packing L7. The column temperature was maintained at 50 °C, and the flow rate was of 2 mL min^{-1} . The injection volume was 50 μL . The buffer solution was prepared as follows: 1,38 g of monobasic sodium phosphate in was dissolved in about 800 mL of water, and the pH was adjusted to 2.2. with phosphoric acid, followed by dilution with water to 1000 mL, and mixing. The mobile phase was a mixture of the buffer solution and acetonitrile (75:25). 10 tablets were used to prepare a ca. 0,2 mg mL^{-1} aqueous solution of enalapril maleate. The buffer solution was added in a 2:1 ratio, the mixture was sonicated for 15 min, and shaken by mechanical means for 30 min, followed by dilute with the buffer solution to volume, shaken again, and sonicated for additional 15 mins. The resulting mixture was filtered (0.45 μm filter). HPLC quantitation of enalaprilat and diketopiperazine (DKP) were done using USP standards.

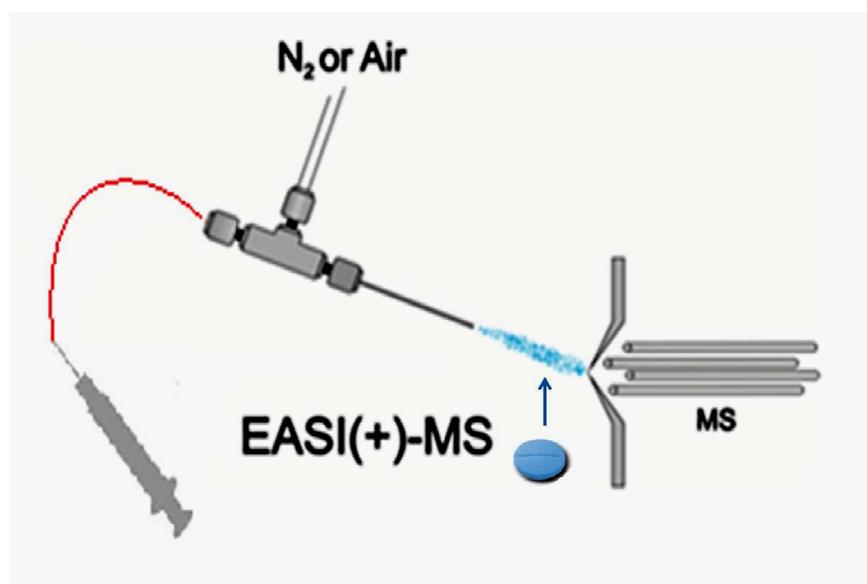


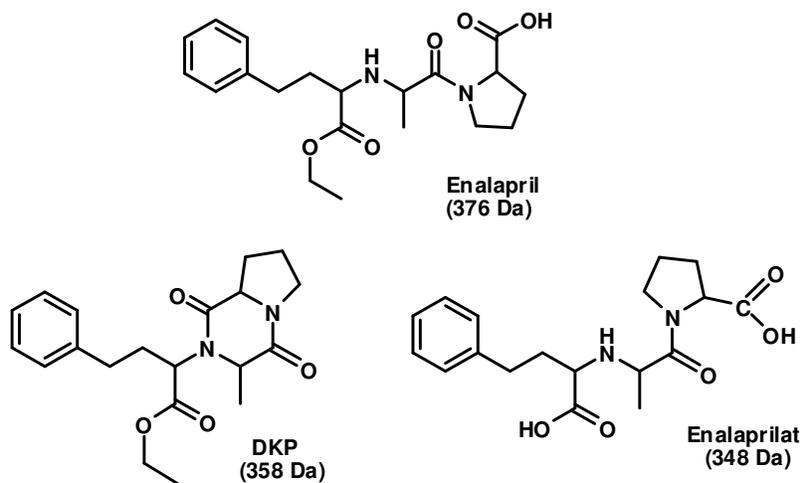
Figure 1. Schematic illustration of the EASI-MS monitoring of drug degradation.

3.5. Results and Discussion

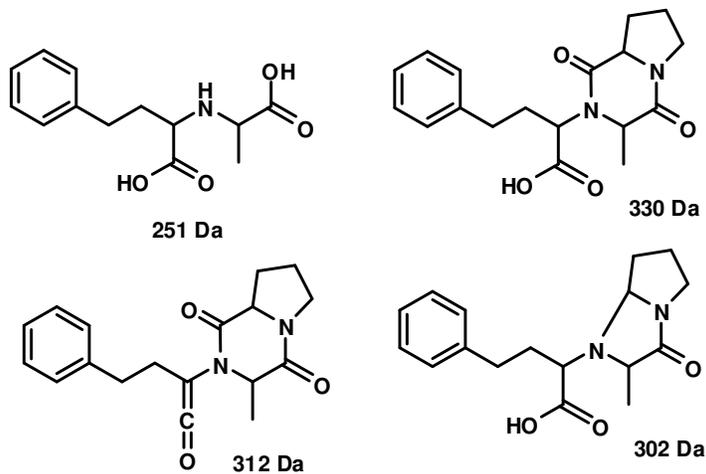
Drug degradation was followed for a total period of 18 months, and analysis was performed every 3 months. **Figure 2** shows the EASI(+)-MS for a fresh enalapril tablet (20 mg of enalapril maleate in a 200 mg \pm 5 % total weight) as well as representative spectra for a tablet after 12 and 18 months during natural aging at controlled conditions (climatic chamber at 40 °C and 75% relative humidity). For the fresh tablet (**Figure 2a**), the active drug, namely the protonated enalapril molecule $[M + H]^+$ of m/z 377 as well as its sodiated molecule $[M + Na]^+$ of m/z 399 are the two predominant ions. But two known degradation products of enalapril (**Scheme 1**),¹¹ namely enalaprilat as the $[M + H]^+$ ion of m/z 349 and diketopiperazine (DKP) as $[M + Na]^+$ of m/z 381 are also detected for the fresh formulation indicating degradation by hydrolysis and dehydration during manufacturing by the wet granulation process. Lactose, the major excipient, is also detected as $[M + Na]^+$ of m/z 365, which is also beneficial for the monitoring of formulation and its stability. The other excipients (sodium bicarbonate, amide, silicon dioxide, magnesium stearate and iron oxide) are not detected by EASI(+)-MS.

After an year inside a climate chamber at 40 °C and 75% relative humidity, as expected, the abundance of the enalapril ions of m/z 377 and 399 decreases, with the subsequent increase of the relative abundances of the ions of m/z 381 and 349, whereas that from the lactose excipient (m/z 365) remained quite unaltered. After 18 months (**Figure 2**), however, degradation is quite severe and the enalapril ions of m/z 377 and 399 are much reduced in abundance whereas those for elaprilat (m/z 349) and diketopiperazine (m/z 381) are now dominant. Interesting,

EASI-MS is also able at this point to detected further degradation products via the ions of m/z 252 and 331. **Scheme 2** depicts two possible structures for these products of 251 and 330 Da.



Scheme 1



Scheme 2

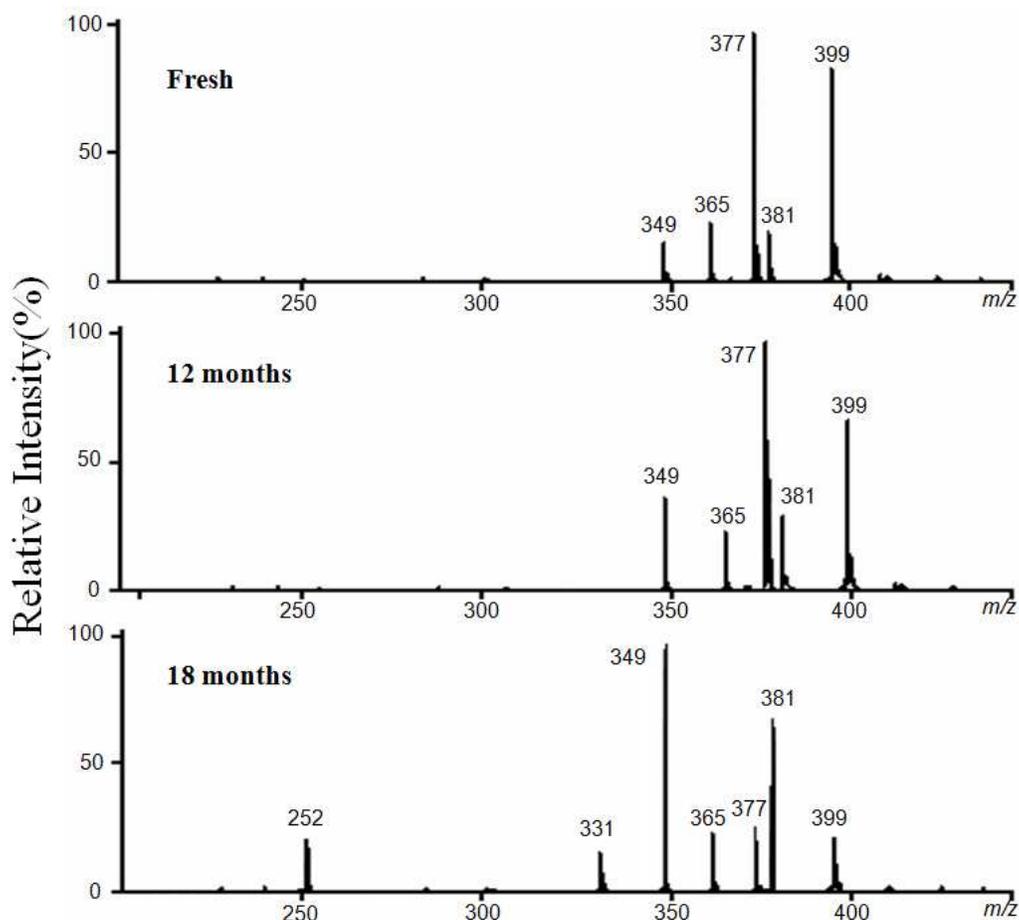


Figure 2. EASI-MS for enalapril manufactured by the wet granulation process at different periods of stability in a climatic chamber at 40 ° C and 75% relative humidity.

Figure 3 shows the EASI-MS data for degradation monitoring for tablets manufactured by the direct compression process, via which the formulation is not exposure to high temperature or humidity. As compared to **Figure 2**, very similar spectra were obtained, but with some substantial differences in terms of degradation extent. For the fresh sample, only the enalapril (m/z 377 and 399) and lactose (m/z 365) ions are detected with no signs of degradation. After 18 months of prolonged exposition to humidity and heat (climate chamber at 40 ° C and 75%

relative humidity), the relative abundances of the enalapril ions decrease and those of the degradation products enalaprilat (m/z 349) and DKP (m/z 381) increase, but to lesser extents than those observed for the tablets manufactured by the wet granulation process. Note that the further degradation products detected via the ions of m/z 331 and 252 in **Figure 2** (18 months) are not seen in **Figure 3** (18 months).

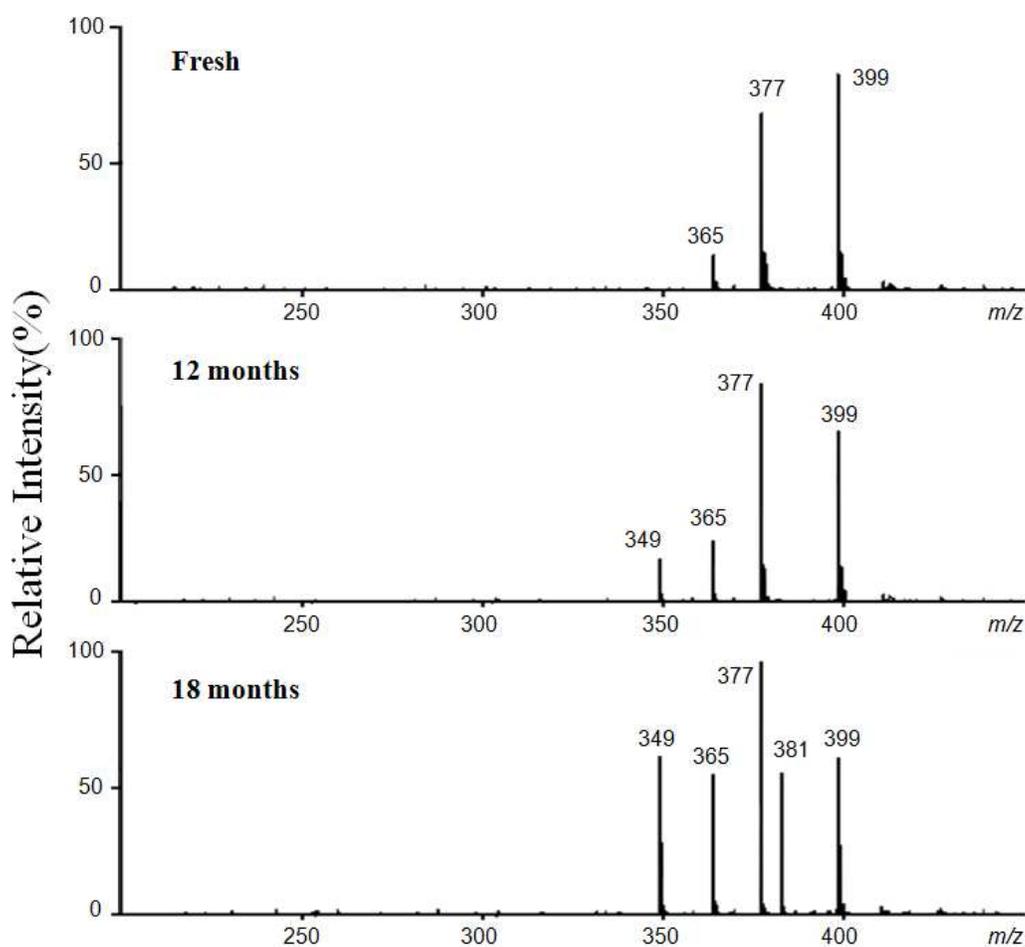


Figure 3. EASI-MS for enalapril manufactured by the direct granulation process at different periods of stability in a climatic chamber at 40 °C and 75% relative humidity.

Figure 4 shows a typical HPLC-UV chromatogram for an extract from a pool of 10 tablets of enalapril manufactured via the wet granulation process after 12 months of prolonged degradation. Note the peak for enalapril at 3.8 min and those for its widely known degradation products enalaprilat at 1.9 min and DKP at 11.7 min. The peak at ca 1 min is due to maleic acid. Using USP standards and by constructing the corresponding calibration curves, quantitation was performed and the results are summarized in Figure 5, see below.

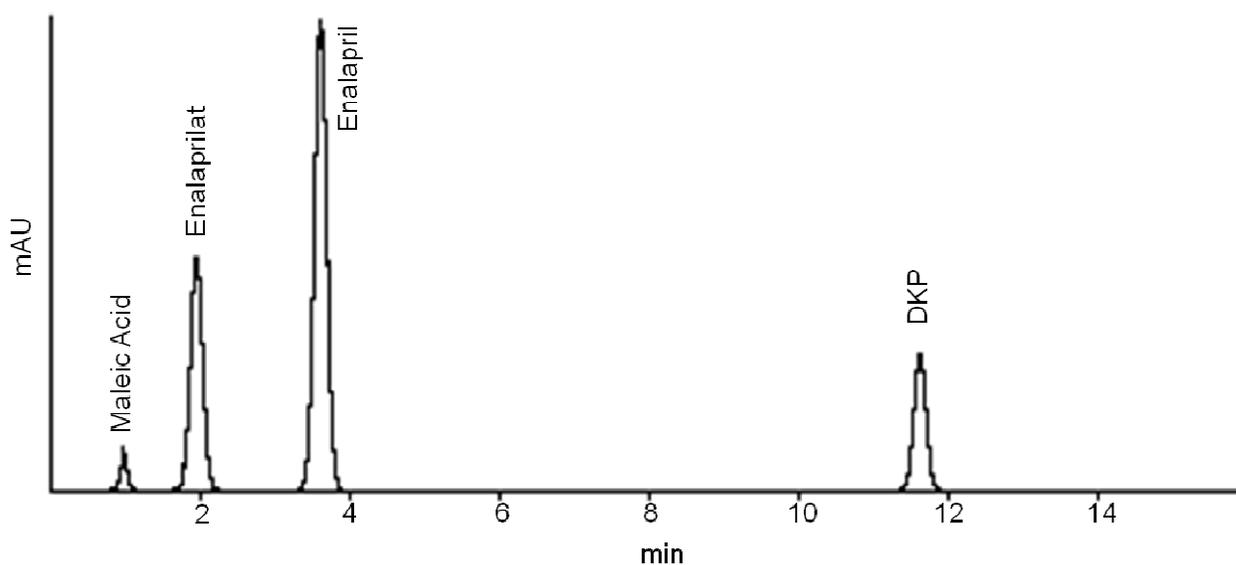


Figure 4. HPLC-UV chromatogram for a methanolic extract from a pool of 10 tablets of enalapril maleate produced by the wet granulation process after 12 months of prolonged degradation in a climatic chamber at 40 ° C and 75% relative humidity.

Figure 5 compares the degradation profiles obtained by both the HPLC-UV and EASI-MS monitoring. Note that for HPLC-UV, quantitation was performed via classical procedures using USP standards for the degradation products. For EASI-MS, semi-quantitation is performed via direct comparison of relative abundances assuming equal ionization efficiencies. Although there is a small quantitative

difference, qualitatively both profiles are quite similar indicating the usefulness of EASI-MS for direct monitoring of the degradation profile of this drug.

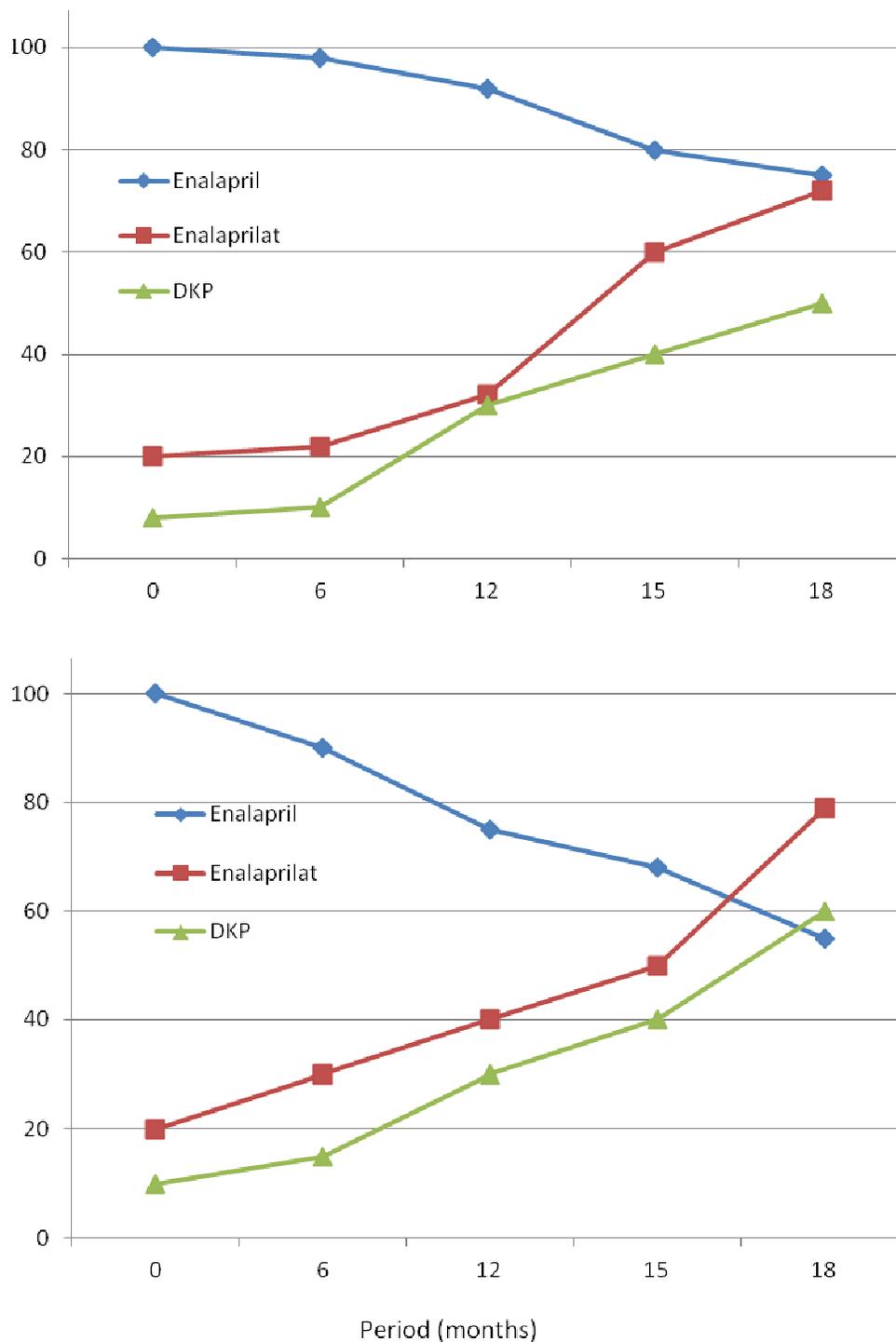


Figure 5. Comparison of degradation profiles obtained by HPLC-UV (upper panel) and EASI-MS (lower panel) monitoring.

Figure 6 shows EASI-MS data for tablets manufactured using the wet granulation process and exposed to accelerated and severe degradation conditions, that is: a) high acidic media as simulated by dropping a drop of an aqueous 1N HCl solution directly on the top of the tablet and letting it dry at ambient conditions and b) high temperature as simulated by exposing the tablet to 100 °C for 4 hs. As compared to the prolonged degradation (**Figures 2** and **3**), EASI(+)-MS is able to detect two additional degradation products via the ions of m/z 313 and 303. Although secure characterization of these degradation products would require a more extensive structural investigation, Scheme 2 depicts two possible structures corresponding to $[M - H_2O - EtOH]$ of 312 Da and $[M - CO - EtOH]$ of 312 Da.

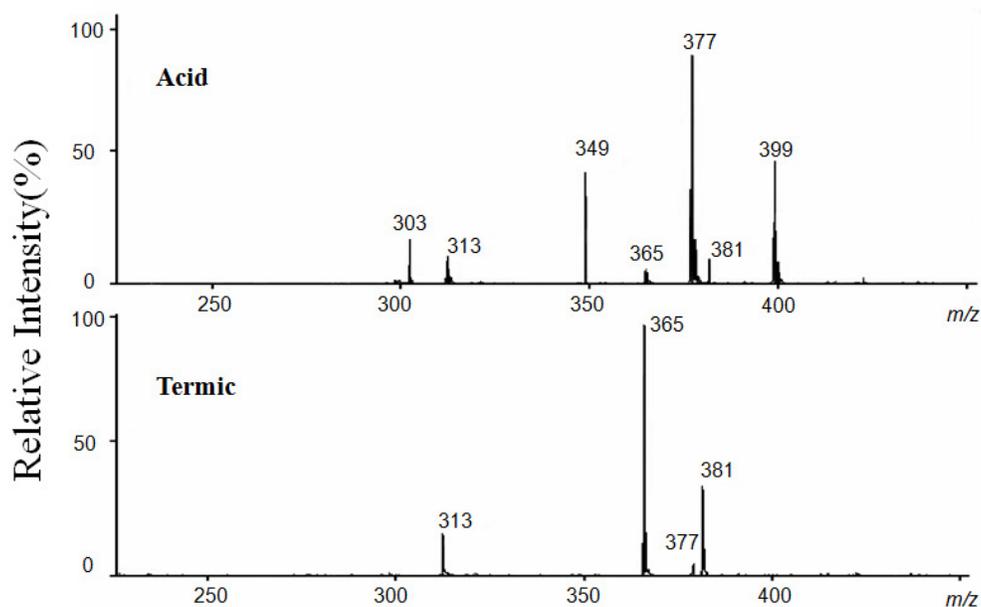


Figure 6. EASI-MS for enalapril manufactured by the wet granulation process and submitted to accelerated and drastic acid (concentrated HCl) and thermal (100 °C for 4 h) degradation.

3.6. Conclusions

Using enalapril maleate as a test case, the ability of EASI-MS to monitor drug degradation directly from intact tablets has been demonstrated. As compared to classical HPLC-UV monitoring, EASI-MS has been shown to be able to provide similar qualitative and quantitative results with much superior speed and simplicity and with no need of sample preparation and pre-separation, and without inherent risks of contamination and artifacts associated with these procedures. Although the test case evaluated herein points to the viability of ambient ionization mass spectrometry to directly monitor drug degradation, the generality and robustness of the approach should be ideally tested with a comprehensive set of chemicals from different classes of drugs such as antibiotics, steroidal hormones and vitamins. For most commercial drugs, however, a simple preliminary test could be easily performed by analyzing an extensively degraded tablet and evaluating the ionization efficiencies of known degradation products. Due to ion suppression effects, it is also predictable that EASI-MS should work best for polar drugs forming as polar or more polar degradation products. Fortunately this seems to be a common feature of many commercial drugs.

3.7. Acknowledgements

The authors thank the Brazilian science foundations FAPESP, CNPq and CAPES for financial assistance.

3.8. References

-
- ¹ M.A.M. Shehata, M. A. El Sayed, M.F. El Tarras, M. G. El-Bardicy. Stability indicating methods for determination of vincamine, *J.Pharm.Biomed.Anal.* **2005** ,*38*, 72-78.
 - ² M. M. Al-Omari, Abdelah, A. A. Badwan, A. M. Y. Jaber. Effect of the drug-matrix on the stability of enalapril maleate in tablet formulations, *J. Pharmac. Biomed. Analysis.* **2001**, *25*, 893-902.
 - ³ ICH Harmonised Tripartite Guidelines, Impurities in New Drug Substances Q3A(R1), International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for human use. 7 Feb, **2002**.
 - ⁴ For recent reviews see: a) G. A. Harris; A. S. Galhena. F. M. Fernandez Ambient Sampling/Ionization Mass Spectrometry: Applications and Current Trends *Anal. Chem.***2011**, *83*, 4508. b) R. M. Alberici, R. C. Simas, G. B. Sanvido, W. Romão, P. M. Lalli, M. Benassi, I. B. S. Cunha, M. N. Eberlin *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *398*, 265-294. c) D. R. Ifa, C. P. Wu, Z. Ouyang, R. G. Cooks *Analyst* **2010**, *135*, 669-681. d) H. Chen, G. Gamez, R. Zenobi *J. Am. Soc Mass Spectrom.* **2009**, *20*, 1947-1963.
 - ⁵ a) Z. Takáts; J. M. Wiseman, B. Gologan, R. G. Cooks, *Science.* **2004**, *306*, 471-473. b) R. B. Cody, J. A. Laramee, H. D. Durst *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 2297-2302 c) J.J. Perez, G. A. Harris, J. E. Chipuk, J. S. Brodbelt, M. D. Green, C. Y. Hampton, F. M. Fernandez *Analyst* **2010**,*135*, 712-719. d) J. S. Sampson, A. M. Hawkridge, D. C. Muddiman *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2008**, *19*, 1527-1534. e) Y. Y. Liu, Z. Q. Lin, S. C. Zhang, , C. D. Yang, X. R. Zhang *Anal. Bional. Chem.* 2009, *395*, 591-599.
 - ⁶ A. Hirabayashi, M. Sakairi, H. Koizumi, Sonic Spray Ionization Method for Atmospheric Pressure Ionization Mass Spectrometry, *Anal Chem.* **1994**, *66*, 4557-4559.

-
- ⁷ R. Haddad, R. Sparrapan, T. Kotiaho, M. N. Eberlin, Easy Ambient Sonic-Spray Ionization-Membrane Interface Mass Spectrometry for Direct Analysis of Solution Constituents, *Anal. Chem.* **2007**, *80*, 898.
- ⁸ R. Haddad, R. Sparrapan, M. N. Eberlin, Desorption sonic spray ionization for (high) voltage-free ambient mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 2901-2905.
- ⁹ V. G. Santos, T. Regiani, F. F. G. Dias, W. Romão, C. F. Klitzke, F. Coelho, M. N. Eberlin, Venturi Easy Ambient Sonic-Spray Ionization, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 1375-1380.
- ¹⁰ J. Biollaz, J.L. Schelling, B. Jacot Des Combes, D. B. Brunner, G. Desponds, H.R. Brunner, E.H. Ulm, M. Hichens, H.J Gomez, Enalapril maleate and lysine analogue (MK-521) in normal volunteers; relationship between plasma drug levels and the rennin angiotensin system, *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1982**, *14*, 363-368.
- ¹¹ S. Pérez, P. Eichhorn, D. Barcelo, Structural characterization of photodegradation products of enalapril and its metabolite enalaprilat obtained under simulated environmental conditions by hybrid quadrupole-linear ion trap-MS and quadrupole-time-of-flight-MS, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 8293-8300.

4. CONCLUSÃO GERAL

4. Conclusão Geral:

Assim concluí-se que a espectrometria de massas com a fonte de ionização EASI é capaz de avaliar o perfil de degradação do maleato de enalapril em comprimidos tanto em um estudo de estabilidade quanto nos estudos de degradação forçada, sem a necessidade de qualquer preparo prévio das amostras. O estudo foi realizado diretamente do comprimido, mostrando que o método de fabricação de comprimidos mais eficiente na estabilidade do maleato de enalapril comprimidos é a compressão direta, por não envolver o processo de aquecimento e umedecimento prévio da formulação necessários na granulação via úmida, assim os produtos de degradação formados apresentou-se intensidades menores, promovendo maior estabilidade química da substância ativa. Os resultados obtidos pela técnica EASI-MS foram comparados com os dados de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultra violeta, mostrando resultados similares Portanto o estudo dos princípios ativos e de seus processos e suas formulações é de extrema importância na fabricação de produtos com qualidade.

5. REFERÊNCIAS

5. Referências:

1. Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics. 11 ed.; Artmed; 2006.
2. Cohn J.N, et al. A comparison of enalapril with hydrazine – isosorbide dinitrate in the treatment of chronic congestive heart failure. The New England Journal of Medicine. 1991 Aug 1; 325(5) : 302-10.
3. ANVISA, Resolução - RE Nº 01 de 29 de julho de 2005.
4. ICH Q1 AR, International Conference on Harmonization; Stability Testing of New Drug Substances and Products, (CPMP/ICH/2736/99), 2003.
5. ICH Q1 B, International Conference on Harmonization; Stability Testing: Photostability testing of new drug Substances and Products, (CPMP/ICH/279/95), 1996.
6. ICH Q3A – R2, International Conference on Harmonization; Impurities in new Drug Substances, (CPMP/ICH/142/95), 2006.
7. ICH Q3B – R2, International Conference on Harmonization; Impurities in new Drug Products, (CPMP/ICH/2738/99), 2006.
8. Dass C (2007) Fundamental of contemporary mass spectrometry. New Jersey: John Wiley & Sons.
9. Watson JT, Parkman OD (2007) Introduction to mass spectrometry: instrumentation, application and strategies for data interpretation. West Sussex: John Wiley & Sons.

Referências

- 10.** Harris GA, Nyadong L, Fernandez FM (2008) Recent developments in ambient ionization techniques for analytical mass spectrometry. *Analyst* 133:1297-1301.
- 11.** Chen H, Gamez G, Zenobi R (2009) What can we learn from ambient ionization techniques? *J Am Soc Mass Spect.* 20:1947-1963.
- 12.** Takats Z, Wiseman JM, Cooks RG (2005) Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology. *J Mass Spect.* 40:1261-1275.
- 13.** Haefliger OP, Jeckelman N (2007) Direct mass spectrometric analysis of flavors and fragrances in real applications using DART. *Rapid Comm Mass Spect.* 21:1361-1366.
- 14.** McEwen C, Gutteridge S (2007) Analysis of the inhibition of the ergosterol pathway in fungi using the atmospheric solids analysis probe (ASAP) method. *J Am Soc Mass Spect.* 18:1274-1278.
- 15.** Sampson JS, Hawkridge AM, Muddiman DC (2006) Generation and detection of multiply-charged peptides and proteins by matrix assisted laser desorption electrospray ionization (MALDESI) Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectr.* 17:1712-1716.
- 16.** Haddad R, Sparrapan R, Eberlin MN (2006) Desorption sonic spray ionization for (high) voltage-free ambient mass spectrometry. *Rap Comm Mass Spectr.* 20:2901-2905.
- 17.** Haddad R, Sparrapan R, Kotiaho T, Eberlin MN (2008) Easy ambient sonic-spray ionization-membrane introduction mass spectrometry for direct analysis of solution constituents. *Anal Chem.* 80:898-903.

Referências

- 18.** Haddad R, Milagres HMS, Catharino RR, Eberlin MN (2008) Easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry combined with thin-layer chromatography. *Anal Chem.* 80:2744-2750.
- 19.** Hirabayashi A, Sakairi M, Koizumi H (1994) Sonic spray ionization method for atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *Anal Chem.* 66:4557-4559.
- 20.** Hirabayashi A, Sakairi M, Koizumi H (1995) Sonic spray mass spectrometry. *Anal Chem.* 67:2878-2882.
- 21.** Cooks RG, Ouyang Z, Takáts Z, Wiseman JM (2006) Ambient mass spectrometry. *Science.* 311:1566-1570.
- 22.** Watson JT, S Parkman OD (2007) Introduction to mass spectrometry: instrumentation, application and strategies for data interpretation. West Sussex: John Wiley & Sons.
- 23.** Alberici RM, Simas RC, Sanvido GB, Romão W, Lalli PM, Benassi M, Cunha IBS, Eberlin MN (2010) Ambient Mass Spectrometry: Bringing MS into the Real World. *Anal Bio Chem.* 398:265-294.
- 24.** Hirabayashi A, Hirabayashi Y, Sakairi M, Koizumi H (1996) Multiply-charged ion formation by sonic spray. *Rapid Comm Mass Spect.* 10:1703-1705.
- 25.** Leary JJ, Schmidt RL (1996) Quadrupole mass spectrometers: intuitive look at the math *J Chem Edu.* 73:1141-1144.
- 26.** Miller PE, Denton MB (1986) The quadrupole mass filter: basic operating concepts. *J Chem Edu.* 63:617-623.

Referências

- 27.** Rosa PCP. Preparação, caracterização da fase estacionária C8, com grupo polar uréia embutido e aplicações na análise e no desenvolvimento e validação de métodos para determinação de fármacos. [Tese – Doutorado]. Campinas (SP) : Universidade Estadual de Campinas; 2010.
- 28.** Faria A.M. Desenvolvimento de Fases Estacionárias para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa a partir da Adsorção e Imobilização do Poli(metiltetradecilsiloxano) sobre Sílica Metalizada. [Tese – Doutorado]. Campinas (SP) : Universidade Estadual de Campinas; 2006.
- 29.** Parikh, D. M. Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology. 2 ed. New York: Marcel Dekker INC, 2005.
- 30.** Couto, A.G.; Gonzalez Ortega, G; Petrovick, P.R.; Granulação; Caderno de Farmácia, v. 16, n. 1, p. 13-20, 2000.
- 31.** Shamgraw, R.F. Compressed tablets by direct compression. In: LIEBERMAN, H.A.; LACHMAN, L.; SCHWARTZ, J.B., eds. Pharmaceutical dosage forms: tablets. 2. ed.rev.exp. New York: Marcel dekker, 1989. p.195-246.
- 32.** Chang, R.-K.; SHINWARI, M.; LEONZIO, M.; WU, L.-S.; PANG, J.; HUSSAIN, M.A. Evaluation of the disintegrant properties for an experimental cross linked polyalkylammonium polymer. Int. j. Pharm., Amsterdam, v.173, p.87-92, 1998.
- 33.** Armstrong, N.A. Características de compressão direta do lactitol granulado. Pharm. Technol., Ed. Bras., São Paulo, v.2, n.3, p. 35-40, 1998.
- 34.** Gohel, M.C.; Pranav D.J. Uma investigação sobre as características de compressão direta de lactose co-processada: celulose microcristalina por meio de um modelo estatístico. Pharm. Technol.; Ed. Bras., São Paulo, v.4, n.1, p.12-18, 2001.

Referências

35. Banker, G.S.; Anderson, N.R. Comprimidos. In: Lachman, L.; Lieberman, H.A.; Kanig, J.L. Teoria e prática na indústria farmacêutica. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.p.509-596.

36. Wells, F.I.; Aulton, M.E. Preformulation. In: Aulton, M.E., ED. Pharmaceutics: the science of dosage form design. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1998. p.223-253.

6. ANEXO

**JOHN WILEY AND SONS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Mar 16, 2012

This is a License Agreement between Philippe Amaral ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by John Wiley and Sons, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	2870860673114
License date	Mar 16, 2012
Licensed content publisher	John Wiley and Sons
Licensed content publication	Journal of Mass Spectrometry
Licensed content title	Direct monitoring of drug degradation by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry: the case of enalapril
Licensed content author	Phillipe H. Amaral,Raquel Fernandes,Marcos N. Eberlin,Nekli F. Höehr
Licensed content date	Dec 1, 2011
Start page	1269
End page	1273
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author of this Wiley article
Format	Print and electronic
Portion	Full article
Will you be translating?	No
Order reference number	
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a "Wiley Company") or a society for whom a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular journal (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your Rightslink account (these are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>)

Terms and Conditions

1. The materials you have requested permission to reproduce (the "Materials") are protected by copyright.
2. You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sublicensable, non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Materials for the purpose specified in the licensing process. This license is for a one-time use only with a maximum distribution equal to the number that you identified in the licensing process. Any form of republication granted by this licence must be completed within two years of the date of the grant of this licence (although copies prepared before may be distributed thereafter). The Materials shall not be used in any other manner or for

any other purpose. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Material. Any third party material is expressly excluded from this permission.

3. With respect to the Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Materials without the prior permission of the respective copyright owner. You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Materials, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.

4. The Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc or one of its related companies (WILEY) or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest in any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you shall not assert any such right, license or interest with respect thereto.

5. NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED BY YOU.

6. WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.

7. You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.

8. IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.

9. Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.

10. The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.

11. This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by you

without WILEY's prior written consent.

12. Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days from receipt.

13. These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives, and authorized assigns.

14. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall prevail.

15. WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

16. This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.

17. This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

Wiley Open Access Terms and Conditions

All research articles published in Wiley Open Access journals are fully open access: immediately freely available to read, download and share. Articles are published under the terms of the [Creative Commons Attribution Non-Commercial License](#), which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes. The license is subject to the Wiley Open Access terms and conditions: Wiley Open Access articles are protected by copyright and are posted to repositories and websites in accordance with the terms of the [Creative Commons Attribution Non-Commercial License](#). At the time of deposit, Wiley Open Access articles include all changes made during peer review, copyediting, and publishing. Repositories and websites that host the article are responsible for incorporating any publisher-supplied amendments or retractions issued subsequently. Wiley Open Access articles are also available without charge on Wiley's publishing platform, **Wiley Online Library** or any successor sites.

Use by non-commercial users

For non-commercial and non-promotional purposes individual users may access, download, copy, display and redistribute to colleagues Wiley Open Access articles, as well as adapt, translate, text- and data-mine the content subject to the following conditions:

- The authors' moral rights are not compromised. These rights include the right of "paternity" (also known as "attribution" - the right for the author to be identified as such) and "integrity" (the right for the author not to have the work altered in such a way that the author's reputation or integrity may be impugned).
 - Where content in the article is identified as belonging to a third party, it is the obligation of the user to ensure that any reuse complies with the copyright policies of the owner of that content.
 - If article content is copied, downloaded or otherwise reused for non-commercial research and education purposes, a link to the appropriate bibliographic citation (authors, journal, article title, volume, issue, page numbers, DOI and the link to the definitive published version on Wiley Online Library) should be maintained. Copyright notices and disclaimers must not be deleted.
 - Any translations, for which a prior translation agreement with Wiley has not been agreed, must prominently display the statement: "This is an unofficial translation of an article that appeared in a Wiley publication. The publisher has not endorsed this translation."
- Use by commercial "for-profit" organisations

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee. Commercial purposes include:

- Copying or downloading of articles, or linking to such articles for further redistribution, sale or licensing;
- Copying, downloading or posting by a site or service that incorporates advertising with such content;
- The inclusion or incorporation of article content in other works or services (other than normal quotations with an appropriate citation) that is then available for sale or licensing, for a fee (for example, a compilation produced for marketing purposes, inclusion in a sales pack)
- Use of article content (other than normal quotations with appropriate citation) by for-profit organisations for promotional purposes
- Linking to article content in e-mails redistributed for promotional, marketing or educational purposes;
- Use for the purposes of monetary reward by means of sale, resale, licence, loan, transfer or other form of commercial exploitation such as marketing products
- Print reprints of Wiley Open Access articles can be purchased from: corporatesales@wiley.com

Other Terms and Conditions:

BY CLICKING ON THE "I AGREE..." BOX, YOU ACKNOWLEDGE THAT YOU HAVE READ AND FULLY UNDERSTAND EACH OF THE SECTIONS OF AND PROVISIONS SET FORTH IN THIS AGREEMENT AND THAT YOU ARE IN AGREEMENT WITH AND ARE WILLING TO ACCEPT ALL OF YOUR OBLIGATIONS AS SET FORTH IN THIS AGREEMENT.

v1.7

If you would like to pay for this license now, please remit this license along with your payment made payable to "COPYRIGHT CLEARANCE CENTER" otherwise you will be invoiced within 48 hours of the license date. Payment should be in the form of a check or money order referencing your account number and this invoice number RLNK500741063.

Once you receive your invoice for this order, you may pay your invoice by credit card. Please follow instructions provided at that time.

Make Payment To:
Copyright Clearance Center
Dept 001
P.O. Box 843006
Boston, MA 02284-3006

For suggestions or comments regarding this order, contact RightsLink Customer Support: customercare@copyright.com or +1-877-622-5543 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Gratis licenses (referencing \$0 in the Total field) are free. Please retain this printable license for your reference. No payment is required.
