

## Artigo

**Estudo do Controle da Degradação do Captopril na Análise de Comprimidos por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência****Paiva, J. F. R.; Lopes, C. C. \*; Lopes, R. S. C.; Albert, A. L. M.; Chantre, L. G. F.; Furtado, A. P. A.; Belisário, M.***Rev. Virtual Quim.*, 2015, 7 (6), 2026-2048. Data de publicação na Web: 29 de agosto de 2015<http://www.uff.br/rvq>**Control Study of Captopril Degradation on Tablets by High Performance Liquid Chromatography Analysis**

**Abstract:** This work proposes a critical alteration in the official methods using high performance liquid chromatography (HPLC) to quantify the active pharmaceutical ingredient captopril and its major degradation product, captopril disulfide, present in captopril tablets. Analytical alternatives were studied to minimize captopril oxidative degradation for a 24-hour period in order to ensure sample solution stability and thereafter the analytical data reliability. Captopril degradation in solution is discussed in detail in this article. Six captopril 25 mg tablets commercial batches were used in this study. The analytical method was based on the official methods described in the Brazilian Pharmacopoeia 5<sup>th</sup> edition and The United States Pharmacopoeia 36<sup>th</sup> edition (USP 36). For the analytical method development, a comparative stability study of captopril tablet commercial batches sample solutions was carried out within a 24-hour period using three different solvents to evaluate sample diluent solution better stability. The results demonstrate that samples prepared in methanol presented the best stability performance within the period studied unlike the samples prepared in diluent system described in the official product monographs.

**Keywords:** Captopril; Captopril disulphide; High-Performance Liquid Chromatography; Stability; Oxidative degradation.

**Resumo**

Este trabalho propõe uma alteração crítica no método analítico oficial por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) para a quantificação de captopril e de seu principal produto de degradação, o dissulfeto de captopril, em comprimidos de captopril. O objetivo desse estudo foi pesquisar alternativas analíticas que garantam que as soluções das amostras permaneçam estáveis, isto é, que seja minimizada a degradação oxidativa do captopril em solução, por um período de 24 horas, assegurando, dessa forma, que os resultados analíticos obtidos dentro desse período sejam confiáveis. A degradação do captopril em solução é discutida detalhadamente neste artigo. Para a condução desse estudo, foram utilizados seis lotes comerciais de captopril comprimidos 25 mg. O método analítico utilizado foi baseado na monografia oficial do produto descrita na Farmacopeia Brasileira (Farm. Bras.) 5ª edição e na Farmacopeia Americana (USP 36). Para o desenvolvimento do método analítico, foi realizado um estudo comparativo da estabilidade das soluções amostra, em três tipos de diluentes, dentro de um período de 24 horas, a fim de se avaliar em qual(is) diluente(s) as soluções amostra apresentam melhor estabilidade. A partir dos resultados obtidos, foi verificado que as amostras preparadas com o diluente metanol apresentaram uma estabilidade ótima dentro do período proposto, mantendo-se estáveis por todo esse tempo, ao contrário das soluções preparadas com o diluente indicado na monografia oficial do produto.

**Palavras-chave:** Captopril; Dissulfeto de captopril; Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE); Estabilidade; Degradação oxidativa.

\* Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Avenida Athos da Silveira Ramos 149, Bloco A, 5º andar, sala 508, CEP 21941-909, Cidade Universitária, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

✉ [claudiosabbatini@uol.com.br](mailto:claudiosabbatini@uol.com.br)

DOI: [10.5935/1984-6835.20150120](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150120)

## Estudo do Controle da Degradação do Captopril na Análise de Comprimidos por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência

Joviana Fabiana R. Paiva,<sup>a</sup> Claudio C. Lopes,<sup>a,\*</sup> Rosangela S. C. Lopes,<sup>a</sup>  
André Luiz M. Albert,<sup>a</sup> Letícia G. F. Chantre,<sup>a</sup> Ana Paula A. Furtado,<sup>a</sup>  
Marciela Belisário<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Avenida Athos da Silveira Ramos 149, Bloco A, 5º andar, sala 508, CEP 21941-909, Cidade Universitária, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

<sup>b</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Avenida Carlos Chagas Filho, 373, CEP 21941-902, Cidade Universitária, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

\* [email](#) correspondente

*Recebido em 20 de outubro de 2014. Aceito para publicação em 26 de agosto de 2015*

### 1. Introdução

### 2. A estabilidade do captopril

2.1. Fatores que favorecem a degradação do captopril

2.2. Influência das propriedades dos solventes na estabilidade de fármacos

### 3. Materiais e Métodos

3.1. Amostras e reagentes

3.2. Instrumentos

3.3. Descrição do método

3.4. Análise estatística dos dados

### 4. Resultados e Discussão

4.1. Tratamento dos dados de performance dos diluentes no período de 24 horas

4.2. Análise em cromatógrafo equipado com câmara de resfriamento da bandeja de vials à temperatura de 4 °C

4.3. Análise comparativa da influência do metanol na estabilidade do captopril

### 5. Conclusão

## 1. Introdução

Atualmente, há cada vez mais necessidade de se demonstrar a qualidade de medições

químicas, por meio de sua reprodutibilidade, rastreabilidade e confiabilidade. Para minimizar os riscos da produção de dados analíticos não confiáveis, as amostras, os padrões e os reagentes utilizados devem,

pelo menos, permanecer estáveis durante o período em que são processadas as análises.<sup>1</sup> Em equipamentos automatizados, como um sistema de cromatografia a líquido, é comum as análises cromatográficas serem realizadas sem interrupção, utilizando-se também o período noturno, com vistas à dinamização do funcionamento do laboratório. Então, todas as soluções preparadas dos padrões e amostras não deverão sofrer alterações durante o tempo de análise, nas condições de temperatura a que são expostas.<sup>2</sup>

No setor de medicamentos, a degradação de um fármaco causa o decréscimo do teor do insumo farmacêutico ativo e o surgimento de produtos de degradação, acarretando um aumento global do risco farmacêutico, ou seja: ineficácia terapêutica, elevação da incidência de efeitos colaterais e o eventual aparecimento de efeitos indesejáveis provenientes da possível ação tóxica dos produtos de degradação. No caso do produto captopril comprimido, uma quantidade elevada de seu produto de degradação, o dissulfeto de captopril, também pode reduzir a adesão terapêutica ao gosto metálico causado por essa substância.<sup>3</sup>

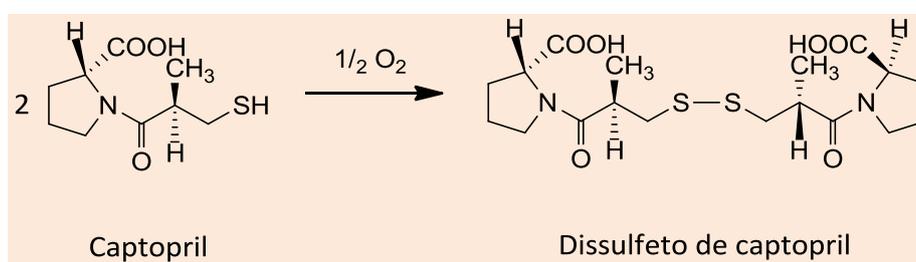
O captopril pertence à classe dos inibidores da Enzima Conversora da Angiotensina (ECA), e essa classe de medicamentos é prescrita com frequência para o tratamento da Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) e da Insuficiência Cardíaca

Congestiva (ICC).<sup>4,5</sup> O captopril é considerado um medicamento de alto valor agregado e de eficácia e segurança clínica comprovadas e evidenciadas em condições clínicas especiais ou secundárias à hipertensão arterial.<sup>6</sup>

Dentro desse contexto, este trabalho tem como objetivo, inibir a formação de dissulfeto de captopril na análise por CLAE, visto que, comprovadamente, os métodos preconizados em compêndios oficiais, tais como: Farmacopeia Brasileira (Farm. Bras.) 5ª edição e a Farmacopeia Americana (USP 36), não asseguram a estabilidade do captopril satisfatoriamente durante as análises de teor e uniformidade de conteúdo, exigindo injeções imediatas após o preparo das soluções.

## 2. A estabilidade do captopril

A estabilidade do captopril é dependente do pH, da concentração de oxigênio, da presença de íons metálicos<sup>7,8</sup> e da concentração desta substância na solução.<sup>8</sup> A estabilidade ótima é em meio ácido, com pH abaixo de 4.<sup>7,9</sup> O dissulfeto de captopril é considerado o seu principal produto de degradação,<sup>10</sup> pois é o mais abundante, já que a hidrólise da amida é insignificante.<sup>7</sup> A reação de degradação do captopril com a formação de seu dímero é demonstrada na Figura 1.



**Figura 1.** Reação de degradação do captopril com a formação de dissulfeto de captopril

## 2.1. Fatores que favorecem a degradação do captopril

Como todo tiol, o captopril está sujeito à degradação oxidativa em seu grupo sulfidril, geralmente ocorrendo em solução aquosa (Figura 1).<sup>7,8,11</sup> Para se estudar a estabilidade do captopril em função do pH da solução, foram determinadas as constantes de velocidade da reação de oxidação do captopril em diversos valores de pH. Foi observado que a taxa de degradação aumentou, significativamente, em valores de pH acima de 4. O captopril é estável em pH abaixo de 3,5 e a sua taxa de oxidação é constante entre pH 2 e 3. Valores de pH baixos retardam a degradação do captopril. Verificou-se, também, que a taxa de degradação é bastante atenuada em outros solventes, tais como o metanol.<sup>8</sup>

A oxidação do captopril ocorre via radicais livres e, como a maioria dos fármacos em sua forma reduzida, apenas 20% de oxigênio atmosférico já significa potencial risco de instabilidade para essas moléculas.<sup>7</sup> O captopril sofre auto-oxidação, uma vez que é degradado por meio de reação de oxidação espontânea, sob condições brandas e inicializada por radicais livres.<sup>7</sup>

## 2.2. Influência das propriedades dos solventes na estabilidade de fármacos

A estabilidade química do captopril, em solução, parece ser dependente das propriedades anfipróticas de solventes polares, tais como: água, etanol, metanol e isopropanol. Solventes anfipróticos são capazes de interagir com os grupos funcionais do soluto por ambos os mecanismos: doador e acceptor de prótons, fazendo e refazendo as interações de forma contínua.<sup>12</sup> Kamlet e colaboradores (1983) observaram que, com o aumento nas propriedades do solvente doador de prótons em Ligações de Hidrogênio (parâmetro  $\alpha$ ), há um aumento linear na constante da

velocidade da reação de degradação ( $k_0$ ) do captopril, bem como, com o aumento nas propriedades do solvente acceptor de prótons em Ligações de Hidrogênio (parâmetro  $\beta$ ), ocorre uma diminuição linear na  $k_0$  do captopril.<sup>13</sup> Assim, a taxa de degradação do captopril aumenta, linearmente, com um aumento da acidez relativa do solvente, demonstrando a importância das propriedades ácido/base relativas do solvente.<sup>12</sup> Isso justifica a afirmação de que a oxidação do captopril ocorre menos rapidamente em metanol ( $\alpha = 0,93$ ;  $\beta = 0,62$ ;  $\pi^* = 0,60$ ) do que em solução aquosa ( $\alpha = 1,17$ ;  $\beta = 0,18$ ;  $\pi^* = 1,09$ ).<sup>8,12</sup> Da mesma forma que a adição de co-solventes melhora a estabilidade do captopril em sistemas aquosos.<sup>14</sup>

Os resultados encontrados por Kristensen e colaboradores (2008) reforçam a hipótese de que o grupo carboxilato que funciona como um acceptor de prótons intramolecular nos mecanismos da degradação oxidativa.<sup>12</sup> A influência das propriedades doadoras de prótons dos solventes na estabilidade do fármaco pode depender, parcialmente, de reações do solvente com o peroxildianion ( $O_2^{2-}$ ), que é produzido durante a auto-oxidação.<sup>11</sup> Acredita-se que a protonação promove a formação do peróxido de hidrogênio ( $O_2^{2-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$ ) e radicais hidroxila ( $H_2O_2 \rightarrow 2OH^\cdot$ ). Essas espécies oxidantes, altamente reativas, propagam as reações oxidativas em cadeia ( $RS^\cdot + OH^\cdot \rightarrow RS + OH^\cdot$ ), o que resulta em maior degradação do fármaco.<sup>15</sup>

A polaridade dos solventes também pode ser importante, visto que as reações radiculares são favorecidas em solventes fortemente polares, tais como a água.<sup>12</sup> O aumento da polaridade do solvente, medida como o parâmetro  $\pi^*$ ,<sup>13</sup> leva a um aumento na  $K_0$ .<sup>12</sup> Conforme observado por Kristensen e colaboradores (2008),<sup>12</sup> essa pode ser uma propriedade importante para a estabilidade do captopril, pois, ao se modificar o solvente de água ( $\pi^* = 1,09$ ) para etanol ( $\pi^* = 0,54$ ), duplica-se o tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ), assim como, ao alterar para isopropanol ( $\pi^* =$

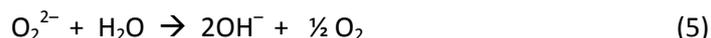
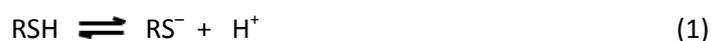
0,48), triplica-se o  $t_{1/2}$ .<sup>12</sup>

Porém, as propriedades anfipróticas (acidez relativa) e as propriedades em eliminar radicais livres que alguns excipientes – que possuem hidrogênio abstraíveis e, portanto, são susceptíveis ao ataque por radicais livres, sofrendo degradação oxidativa – presentes na formulação do produto possuem, são mais importantes do que a influência da polaridade do solvente.<sup>12,16</sup>

A reação de oxidação de tióis por meio de radicais livres envolve um complexo mecanismo.<sup>7</sup> A degradação oxidativa do

captopril é reduzida pela presença de antioxidantes e de agentes quelantes, pelo ajuste do pH da solução em valores baixos, pelo aumento da concentração de captopril, pela utilização de nitrogênio ou pelos baixos níveis de oxigênio em contato com a solução.<sup>8</sup>

O mecanismo de reação postulado para a oxidação não catalítica (auto-oxidação) do captopril, que possui como base a ionização da função tiol (auto-oxidação das mercaptanas), sugere a sequência de reações a seguir:<sup>7</sup>



Reações como a representada pela Equação 1 podem ocorrer em soluções com pH menos ácido, em que haja concentração suficiente de íons hidroxila. Nessas soluções, o grupo tiol se ioniza conforme o pH aumenta ( $\text{pK}_a = 9,8$ ) e com isso forma-se o ânion tiolato ( $\text{RS}^-$ ) para a reação seguinte (Equação 2).<sup>11</sup> Consequentemente, com o aumento da concentração do íon tiolato, a oxidação direta do captopril pelo oxigênio molecular torna-se cada vez mais significativa.<sup>17</sup>

Para valores de pH abaixo de 4, a degradação do grupo tiol é pH-independente. O grupo tiol praticamente não é ionizado nestes valores de pH, já que a concentração de íons hidroxila é muito baixa nessa faixa de pH.<sup>11</sup>

Sendo a razão de oxidação do captopril pH-dependente, a razão da decomposição oxidativa, sob condições de presença de oxigênio, é proporcional a fração da forma aniônica (tiolato) da molécula.<sup>7</sup>

Outra explicação para o mecanismo de degradação oxidativa do captopril baseia-se na transferência intramolecular de prótons como o primeiro passo da reação de

degradação. Como o captopril possui dois grupos funcionais ionizáveis ( $\text{COOH}$  e  $\text{SH}$ ), o mecanismo de reação postulado para auto-oxidação da molécula é baseado na ionização inicial apenas do grupo tiol.<sup>12</sup> Esse grupo tiol poderá reagir com a água, que, embora seja considerada uma base fraca, é sugerida como o aceptor de prótons na reação (Equação 6).<sup>11</sup>



A formação do íon tiolato reativo por uma transferência de prótons intramolecular para o grupo carboxílico deprotonado ( $\text{pK}_a = 3,7$ )<sup>12</sup> pode explicar o perfil da taxa de pH para a oxidação de captopril, em que a estabilidade máxima é obtida em pH inferior a 3,5.<sup>8,11</sup> É provável que ocorra a ligação de hidrogênio intramolecular entre os grupos funcionais tiol e carboxila, o que irá favorecer a reação.<sup>12</sup>

Outro fator que reforça esse mecanismo proposto é a hipótese de formação de ligação de hidrogênio intramolecular entre o hidrogênio do ácido carboxílico e o oxigênio

da carbonila da amida, mas apenas na conformação *trans* da molécula de captopril, já que a ligação de hidrogênio não é possível no conformero *cis*.<sup>18</sup> É provável a ocorrência dessa ligação de hidrogênio intramolecular, uma vez que irá favorecer a formação do íon tiolato pela transferência intramolecular de prótons para o grupo carboxílico deprotonado. Em pH 3, cerca de 17% dos grupos carboxílicos encontram-se deprotonados, o que é suficiente para iniciar a reação de degradação do captopril.<sup>12</sup>

No estudo da formação do complexo de inclusão do captopril com  $\alpha$ - e  $\beta$ -ciclodextrinas em solução aquosa, verificou-se que a inclusão do grupo tiol na cavidade da  $\alpha$ -ciclodextrina protege o captopril da degradação oxidativa, enquanto a inclusão total da molécula do fármaco na cavidade da  $\beta$ -ciclodextrina não altera a taxa de degradação do captopril. Observou-se que a complexação do captopril com a  $\alpha$ -ciclodextrina promove a separação entre os grupos tiol e carboxílico, diminuindo a formação do íon tiolato, pela transferência intramolecular de prótons, enquanto a proteção de um desses grupos polares por meio de ligação intramolecular e subsequente transferência intramolecular de prótons é favorecida na cavidade lipofílica da  $\beta$ -ciclodextrina.<sup>19</sup> Dessa forma, a hipótese da transferência intramolecular de prótons do grupo tiol para a carboxila, como sendo o primeiro passo do mecanismo da degradação oxidativa do captopril, encontra-se embasada por esse estudo.<sup>12</sup>

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Amostras e reagentes

Foram utilizados seis lotes comerciais de comprimidos de captopril com teor nominal de 25 mg:

– Laboratório L, lote 08040007, validade: abril/2010.

– Laboratório L, lote 08040008, validade: abril/2010.

– Laboratório L, lote 11090022, validade: setembro/2013.

– Laboratório X, lote 1666203, validade: janeiro/2014.

– Laboratório Y, lote B12D1173, validade: abril/2014.

– Laboratório W, lote 1203950, validade: julho/2014.

Os produtos utilizados neste trabalho foram quantificados em relação às substâncias químicas de referência (SQR) da *United States Pharmacopeia* (USP):

– Substância química de referência (SQR) USP de Captopril: Lote: H – Teor: 100%

– SQR USP de Dissulfeto de Captopril: Lote: HOF251 – Teor: 99%

Os reagentes utilizados nos experimentos foram:

– Acetato de etila, Sigma-Aldrich.

– Ácido fosfórico, Vetec.

– Água ultrapura – Milli-Q (Millipore).

– Álcool etílico grau UV/HPLC, Vetec.

– Álcool isopropílico, Sigma-Aldrich.

– Álcool metílico grau UV/HPLC, Tedia.

– Dioxano, Sigma-Aldrich.

#### 3.2. Instrumentos

Nos doseamentos de captopril e do dissulfeto, à temperatura ambiente, foi utilizado um cromatógrafo Waters, modelo Alliance 2695, detector UV a 220 nm e software Empower®. Nos experimentos realizados à temperatura de 4 °C, foi utilizado um cromatógrafo Dionex-Thermo, modelo UltiMate 3000, detector UV a 220 nm, resfriamento da bandeja de “vials” do auto-injetor e software Chromeleon®.

Para atestar os parâmetros de adequação dos sistemas cromatográficos, foram realizadas, antes de cada bloco de experimentos, cinco injeções em replicata de solução padrão de captopril  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ , admitindo-se Desvio Padrão Relativo (DPR) para as áreas em cada injeção de, no máximo, 2%.

### 3.3. Método

Os estudos foram conduzidos analisando-se amostras do produto captopril 25 mg comprimido segundo o método analítico descrito na Farm. Bras. 5ª edição e na USP 36, variando-se o diluente das amostras e dos padrões e a temperatura da bandeja de *vials*, a fim de se avaliar a estabilidade das soluções com o decorrer do tempo, conforme descrito abaixo:

Equipamento: cromatógrafo a líquido equipado com detector UV.

Condições cromatográficas: comprimento de onda de 220 nm; coluna 250 x 4,6 mm, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano ( $5 \mu\text{m}$ ), mantida à temperatura ambiente; vazão da fase móvel de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$  e volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ .

Fase Móvel: solução 0,1% v/v de ácido fosfórico: metanol (45:55 v/v).

Solução Padrão de Captopril de Injeção: Foram pesados, analiticamente, cerca de 50 mg de captopril SQR em cerca de 30 mL de fase móvel para dissolução com auxílio de ultrassom, por 10 minutos. O volume foi completado com o mesmo diluente e, a seguir, homogeneizado.

Solução Estoque do Padrão de Dissulfeto de Captopril: Foram pesados, analiticamente, cerca de 25 mg de dissulfeto de captopril SQR para balão volumétrico de 50 mL. Foram adicionados cerca de 30 mL de fase móvel para dissolução, com o auxílio de banho de ultrassom, por 10 minutos. O volume foi completado com o mesmo diluente e, a seguir, homogeneizado.

Solução Padrão de Dissulfeto de Captopril de Injeção: Foram transferidos, volumetricamente, 3 mL da Solução Estoque do Padrão de Dissulfeto de Captopril SQR para um balão volumétrico de 50 mL. O volume foi completado com o mesmo diluente e, a seguir, homogeneizado.

Solução de Resolução: Foram pesados, analiticamente, cerca de 50 mg de captopril SQR para balão volumétrico de 50 mL. Foram adicionados cerca de 30 mL de fase móvel para dissolução, com o auxílio de banho de ultrassom, por 10 minutos. Foram transferidos, volumetricamente, 3 mL da Solução Estoque do Padrão de Dissulfeto de Captopril SQR para o balão volumétrico de 50 mL. O volume foi completado com o mesmo diluente.

Solução Amostra: Pesaram-se 20 comprimidos para cálculo do peso médio. Os comprimidos foram pulverizados. Uma quantidade do pó equivalente a 50 mg de captopril foi pesada e transferida para balão volumétrico de 50 mL. Adicionaram-se cerca de 30 mL de fase móvel para a dissolução, com o auxílio de banho de ultrassom, por 15 minutos. O volume foi completado com o mesmo diluente e, a seguir, homogeneizado e filtrado através de membrana 0,22  $\mu\text{m}$ .

Procedimento para as Soluções Padrão: Após filtração com membrana 0,22  $\mu\text{m}$ , foram injetadas cinco replicatas de 20  $\mu\text{L}$  para cada uma das Soluções Padrão de Injeção e uma replicata da Solução de Resolução.

Critérios cromatográficos: Os tempos de retenção relativos deverão ser de cerca de 0,5 para o captopril e 1,0 para o dissulfeto de captopril. A resolução entre os picos de captopril e dissulfeto de captopril não deverá ser menor do que 2. O DPR das áreas de replicatas dos picos registrados para cada padrão não deverá ser maior que 2,0%.

Procedimento para as amostras: Após filtração através de membrana 0,22  $\mu\text{m}$ , foram injetadas, separadamente, 20  $\mu\text{L}$  das Soluções Padrão e da Solução Amostra. Os cromatogramas obtidos foram integrados. Procederam-se os cálculos dos teores de

captópril e do dissulfeto de captópril nos comprimidos a partir das respostas obtidas com as Soluções Padrão e a Solução Amostra.<sup>10,20</sup>

No estudo, foram utilizados seis lotes de captópril comprimidos, sendo três provenientes de um mesmo laboratório e os outros três oriundos de três laboratórios diferentes.

O delineamento dos experimentos (Figura 2) foi esquematizado da seguinte forma: foram preparadas, para cada lote, três amostras (A, B e C), sendo cada uma injetada em duplicata (A1, A2, B1, B2, C1 e C2), em cromatógrafo a líquido, em intervalos de tempo entre as injeções de 4 horas ( $T_0$ ,  $T_4$ ,  $T_8$ ,  $T_{12}$ ,  $T_{16}$ ,  $T_{20}$  e  $T_{24}$ ), até completar o período de 24 horas. E esse procedimento foi repetido para cada um dos três diluentes testados.

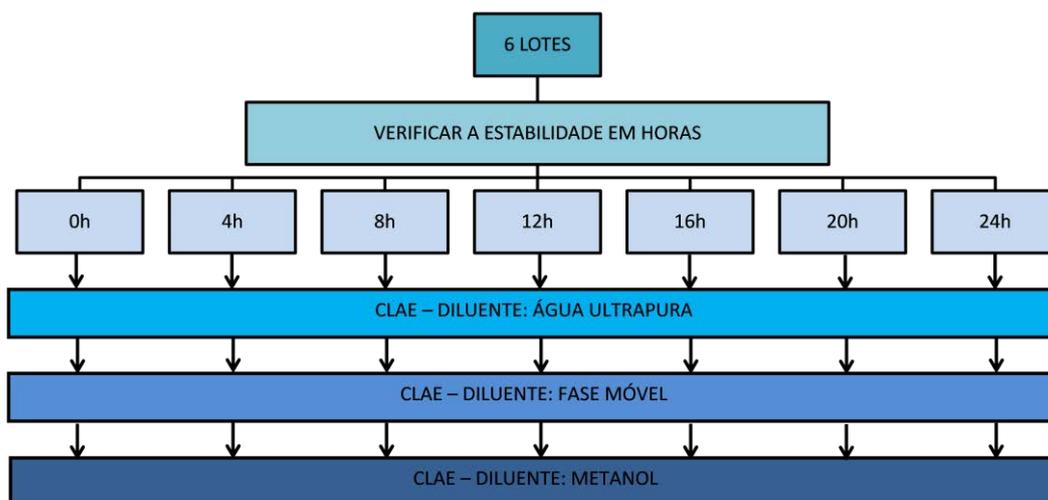


Figura 2. Desenho do experimento

### 3.4. Análise estatística dos dados

Para a análise dos dados obtidos nos experimentos que compõem este projeto, foi utilizada a ferramenta estatística Análise de Variância (ANOVA) de Dois Fatores.

O tratamento dos dados, com o cálculo da ANOVA, foi realizado utilizando-se o *software* Excel®.

Utilizou-se a ANOVA de Dois Fatores, analisou-se o valor de F para a interpretação dos resultados obtidos no tratamento estatístico, ou seja, foram testadas as hipóteses nulas ( $H_0$ ), em que se aceitou ou se rejeitou a  $H_0$  no nível de significância adotado ( $\alpha$ ), comparando o F calculado ( $F_{Cal}$ ) com o F tabelado ( $F_{Tab}$ ).<sup>22</sup> Essa ferramenta foi utilizada para analisar se houve ou não diferença significativa entre as médias

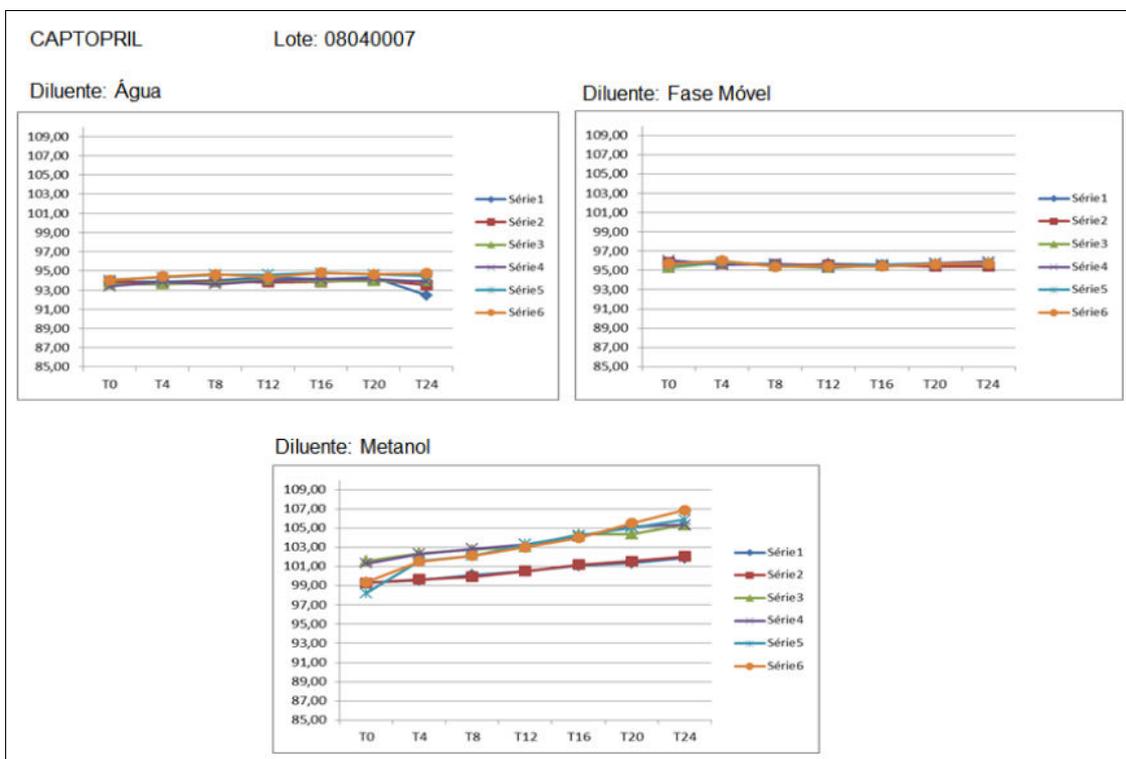
obtidas na análise do teor de captópril (variável dependente) e da quantidade de dissulfeto de captópril (variável dependente) em lotes de produto, quando se utilizou diferentes diluentes (variável independente) em diferentes tempos ( $T_0$ ,  $T_4$ ,  $T_8$ ,  $T_{12}$ ,  $T_{16}$ ,  $T_{20}$ ,  $T_{24}$ ) de análise (variável independente) e se houve interação entre essas variáveis independentes (*diluyente e tempo*).

## 4. Resultados e Discussão

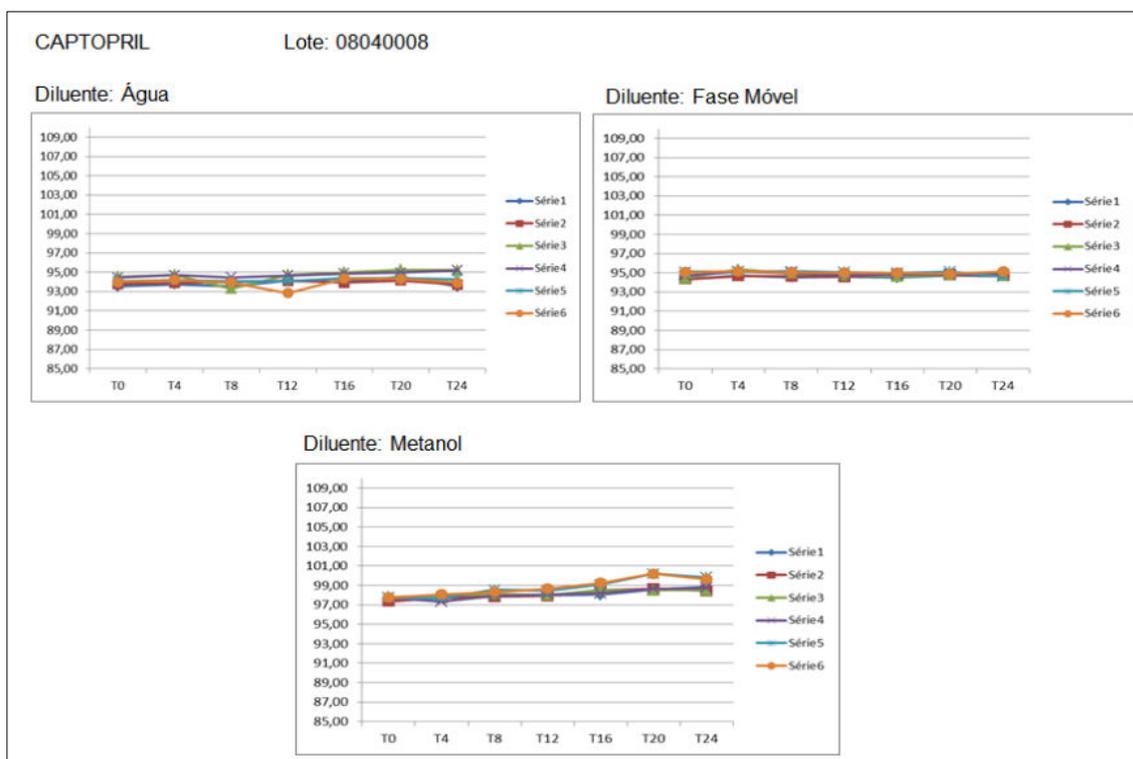
A seguir, são apresentados, graficamente, os dados obtidos nos experimentos para a análise da performance dos diluentes no período de 24 horas.

Os gráficos comparativos de teor permitem a comparação da tendência do

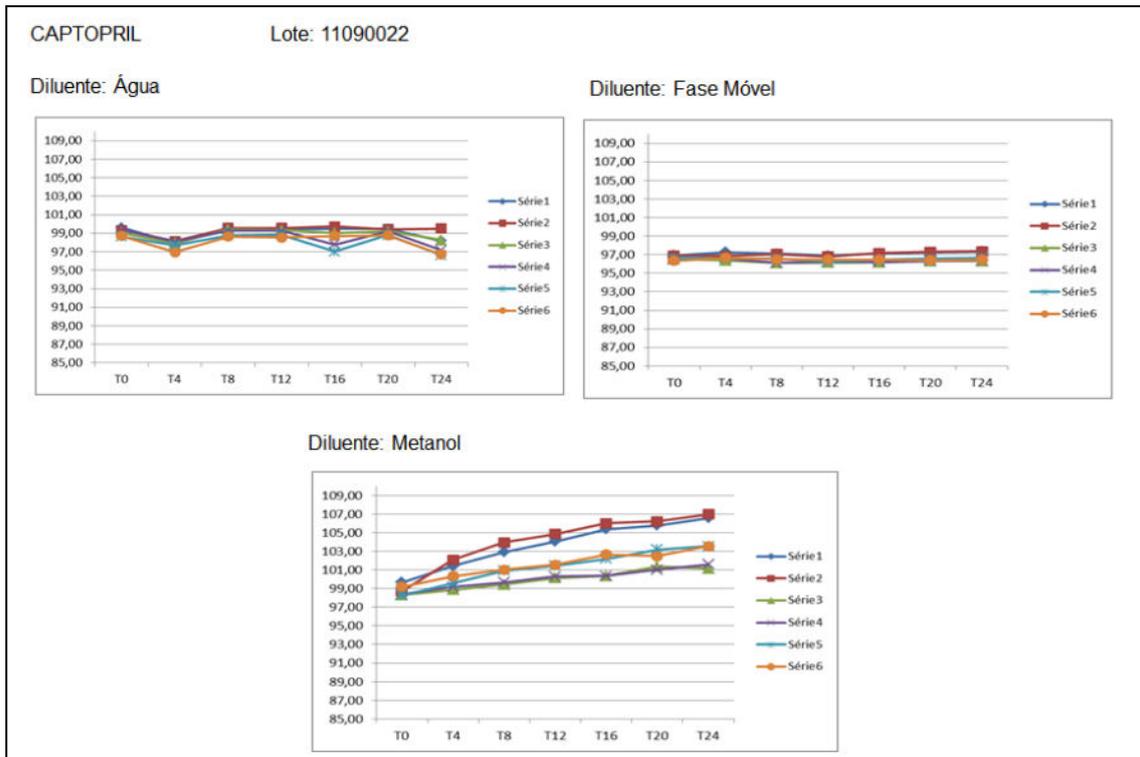
desempenho de cada um dos diluentes utilizados em relação à estabilidade das soluções amostra no decorrer do período de 24 horas.



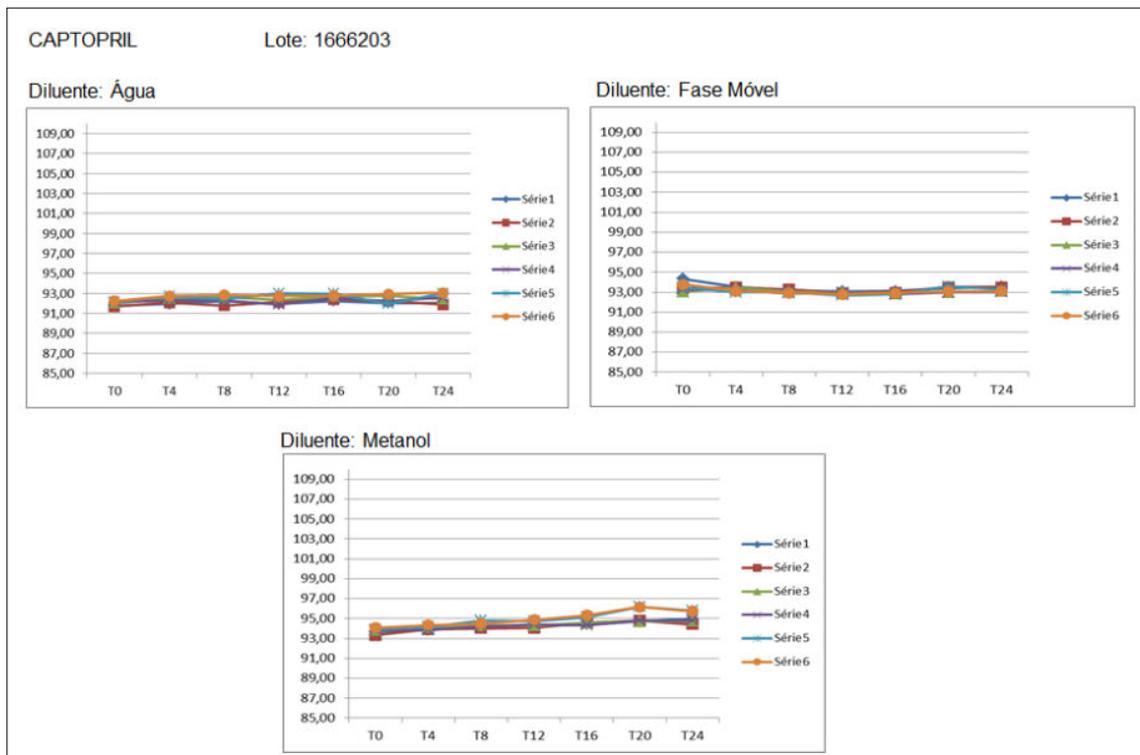
**Gráfico 1.** Gráficos comparativos do teor de captopril em comprimidos de captopril 25 mg, lote 08040007, nos três diluentes e no período de 24 horas



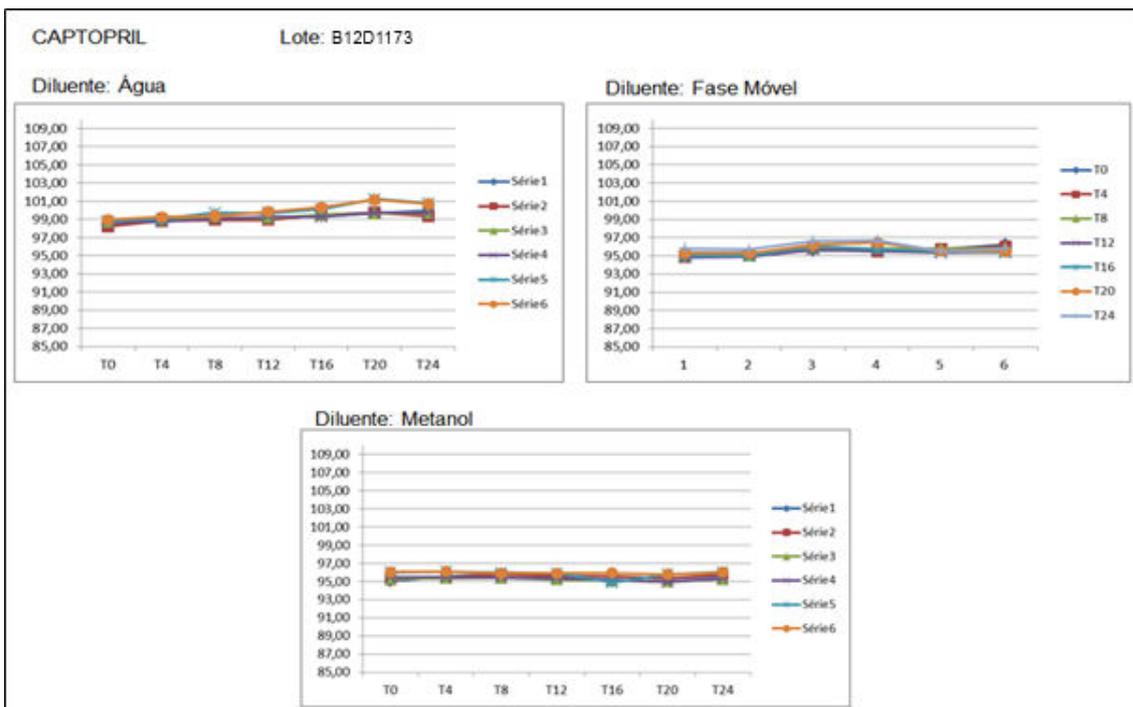
**Gráfico 2.** Gráficos comparativos do teor de captopril em comprimidos de captopril 25 mg, lote 08040008, nos três diluentes e no período de 24 horas



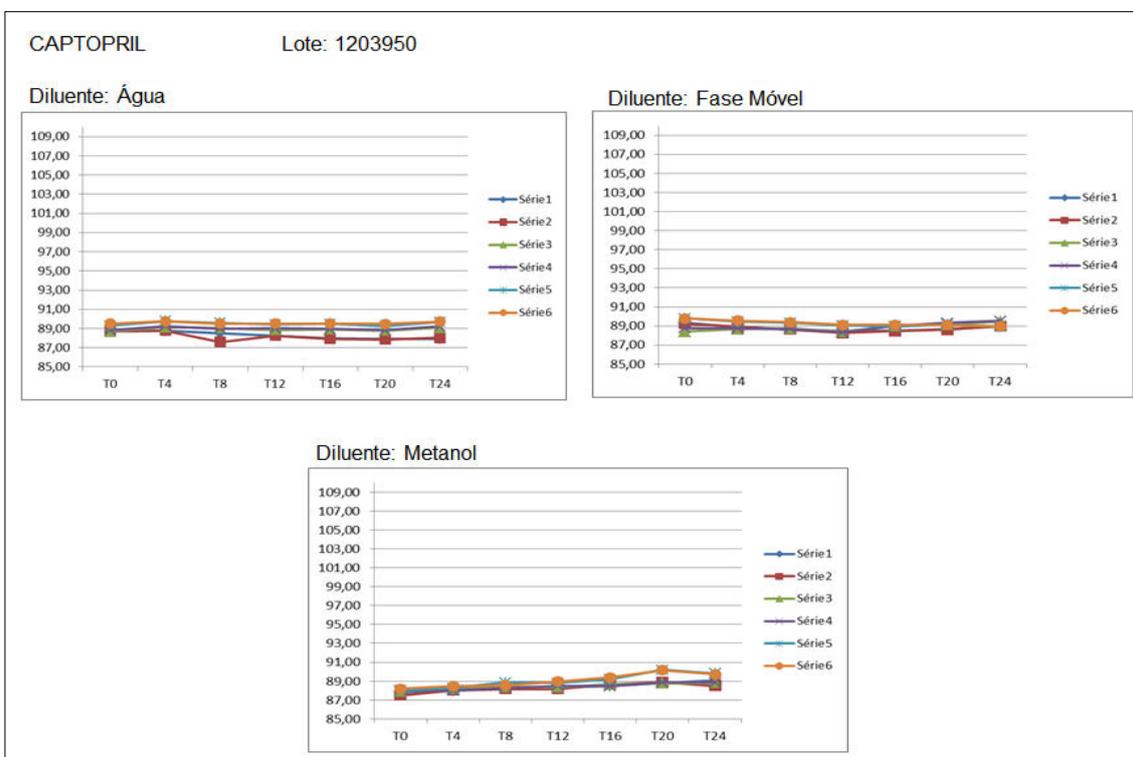
**Gráfico 3.** Gráficos comparativos do teor de captopril em comprimidos de captopril 25 mg, lote 11090022, nos três diluentes e no período de 24 horas



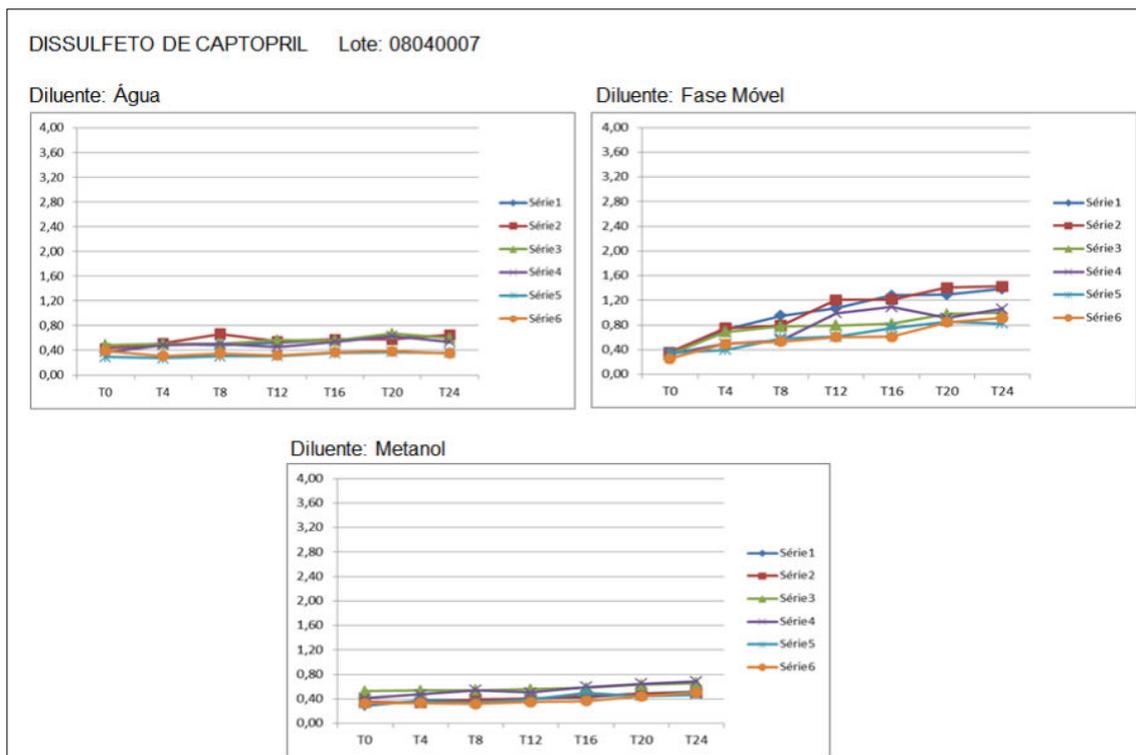
**Gráfico 4.** Gráficos comparativos do teor de captopril em comprimidos de captopril 25 mg, lote 1666203, nos três diluentes e no período de 24 horas



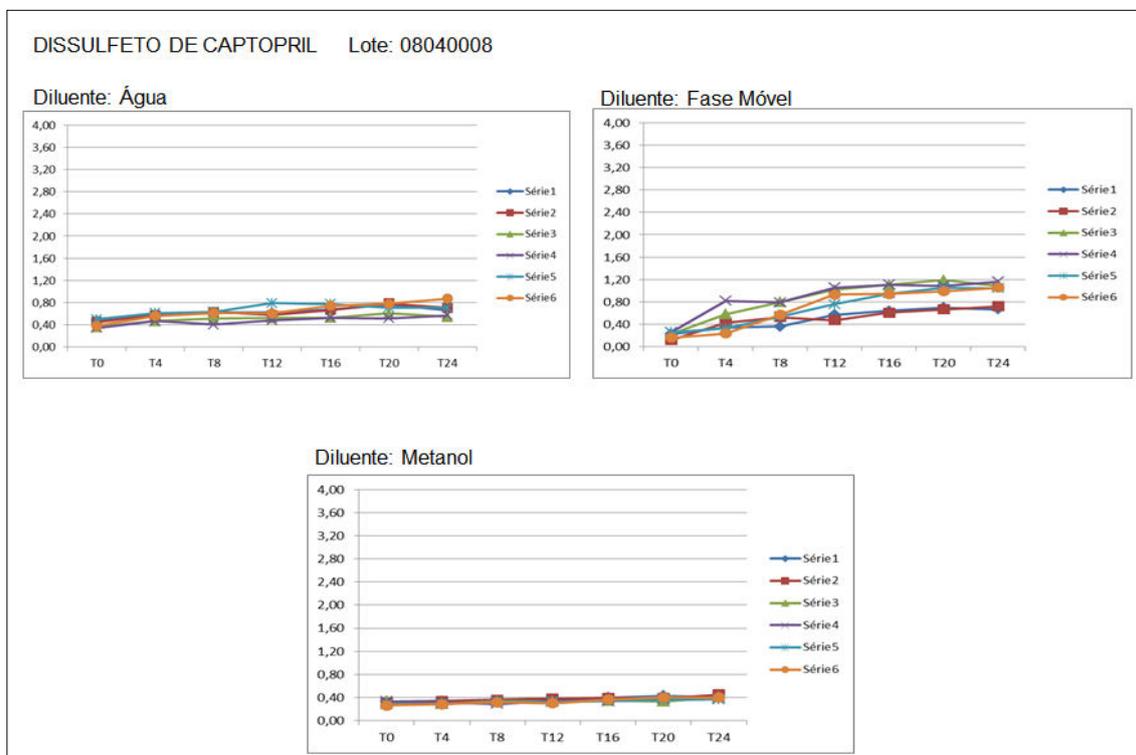
**Gráfico 5.** Gráficos comparativos do teor de captopril em comprimidos de captopril 25 mg, lote B12D1173, nos três diluentes e no período de 24 horas



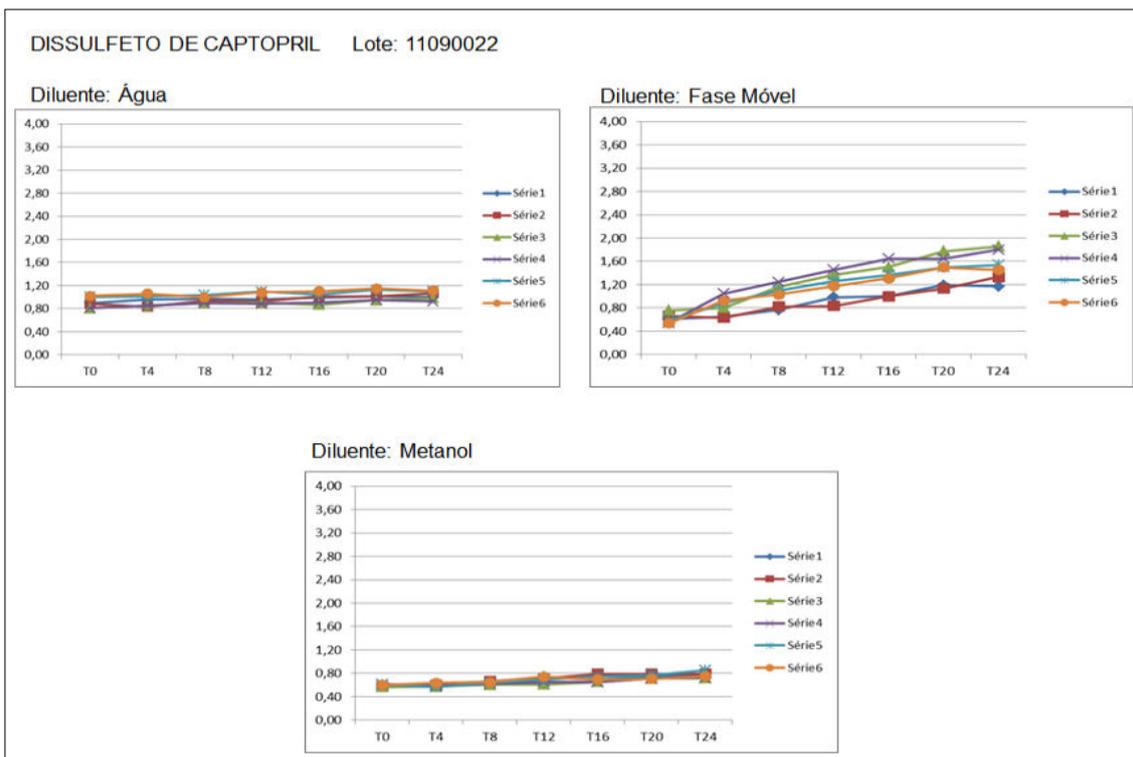
**Gráfico 6.** Gráficos comparativos do teor de captopril em comprimidos de captopril 25 mg, lote 1203950, nos três diluentes e no período de 24 horas



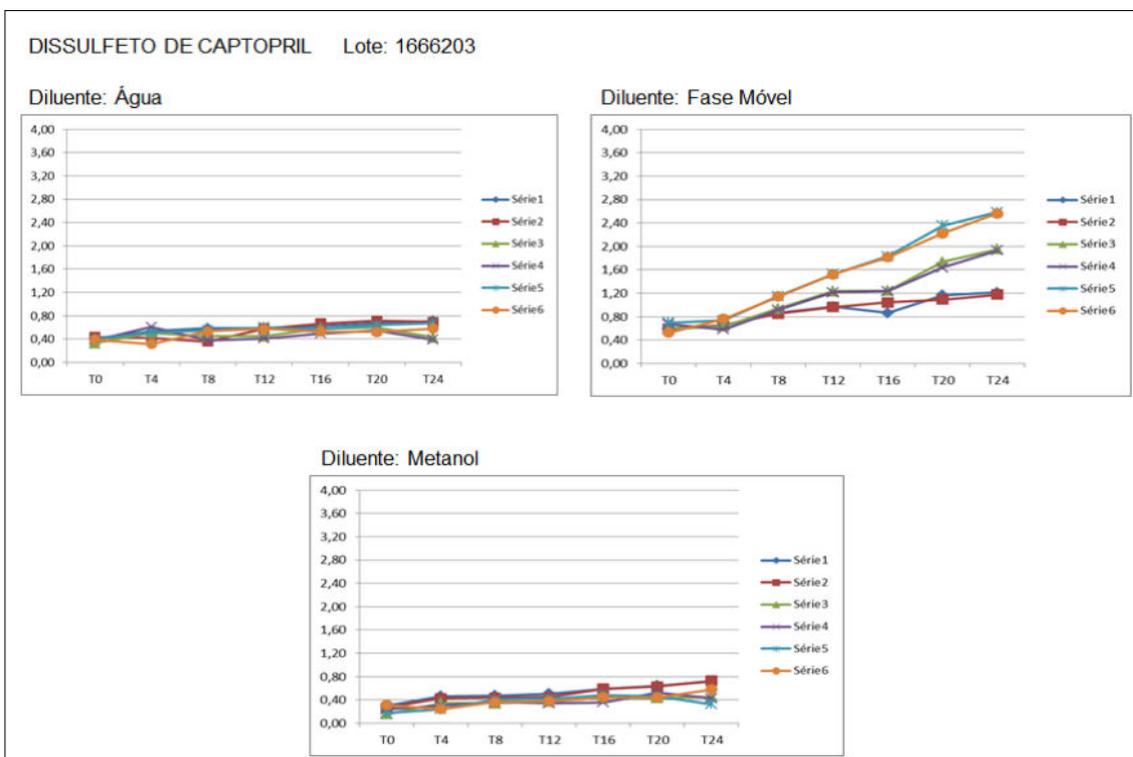
**Gráfico 7.** Gráficos comparativos do teor de dissulfeto de captopril em comprimidos de captopril 25 mg, lote 08040007, nos três diluentes e no período de 24 horas



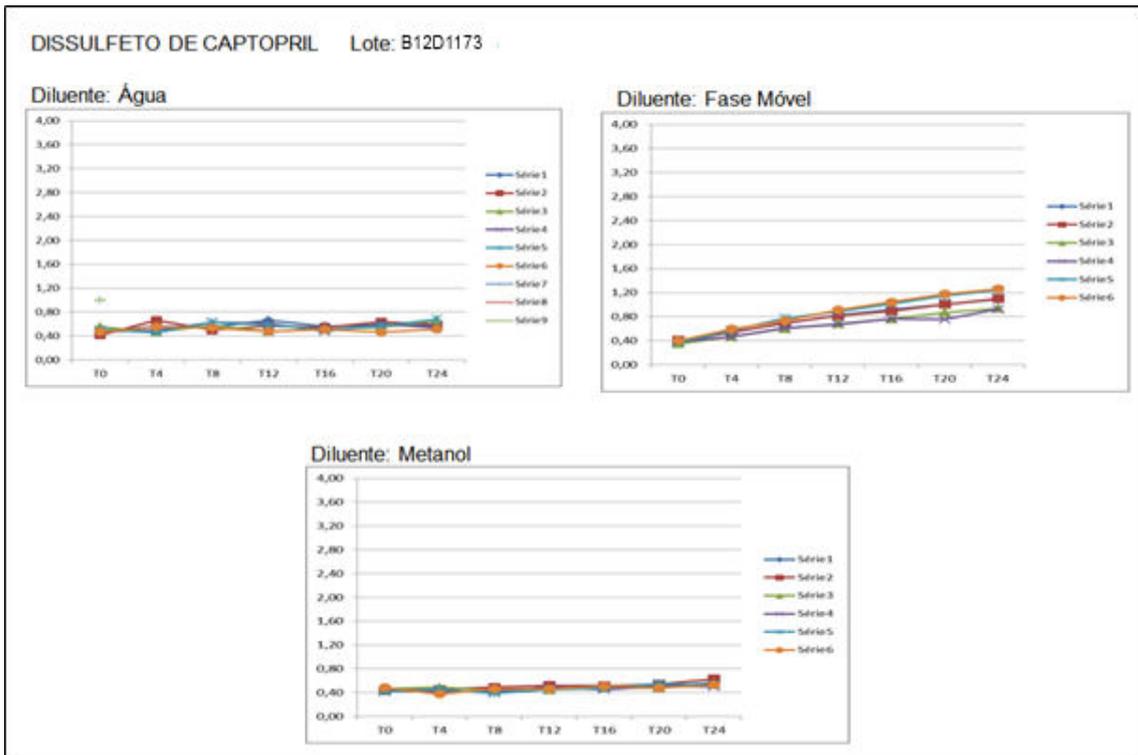
**Gráfico 8.** Gráficos comparativos do teor de dissulfeto de captopril em comprimidos de captopril 25 mg, lote 08040008, nos três diluentes e no período de 24 horas



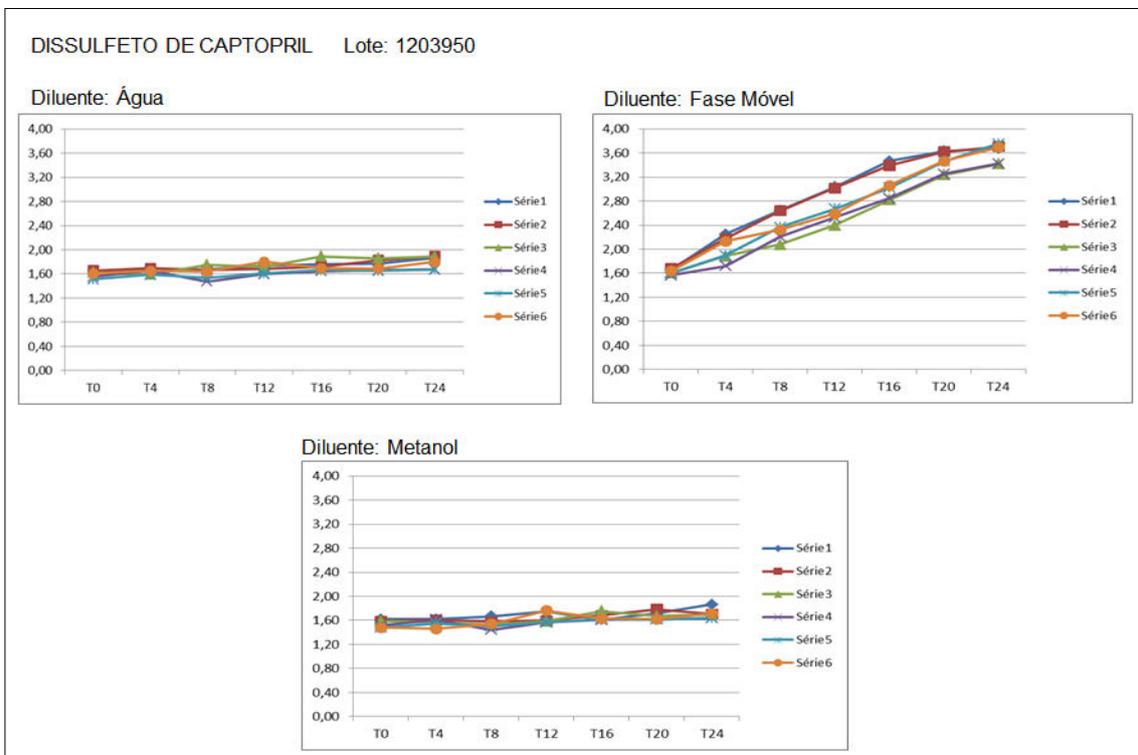
**Gráfico 9.** Gráficos comparativos do teor de dissulfeto de captopril em comprimidos de captopril 25 mg, lote 11090022, nos três diluentes e no período de 24 horas



**Gráfico 10.** Gráficos comparativos do teor de dissulfeto de captopril em comprimidos de captopril 25 mg, lote 1666203, nos três diluentes e no período de 24 horas



**Gráfico 11.** Gráficos comparativos do teor de dissulfeto de captopril em comprimidos de captopril 25 mg, lote B12D1173, nos três diluentes e no período de 24 horas



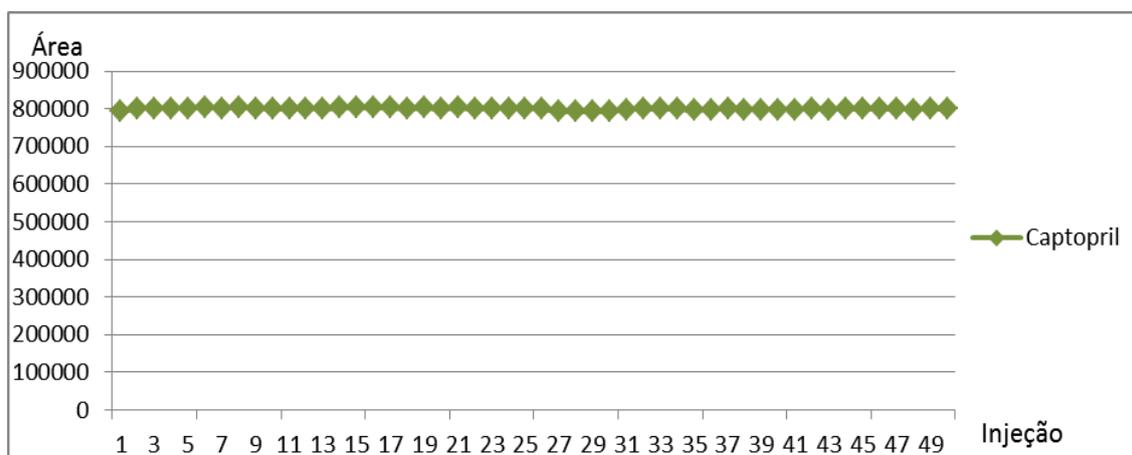
**Gráfico 12.** Gráficos comparativos do teor de dissulfeto de captopril em comprimidos de captopril 25 mg, lote 1203950, nos três diluentes e no período de 24 horas

Por meio dos gráficos acima, verifica-se que o fator *diluyente* e o fator *tempo* impactaram na estabilidade das amostras. Considerando-se a variação da concentração de dissulfeto de captopril com o tempo, pode ser observado que a estabilidade do captopril em fase móvel foi significativamente menor do que em água. Isso sugere que, seguindo rigidamente a metodologia preconizada na Farmacopéia, haverá um erro crescente em função do intervalo de tempo entre a preparação das soluções e as respectivas injeções. Isto é, os resultados dos ensaios limite para o dissulfeto ficarão comprometidos caso não se faça o preparo das soluções seguido de injeção imediata. Nos casos em que o teor de dissulfeto de captopril em um determinado medicamento já esteja nas cercanias do limite permitido, os resultados poderão ser contestados.

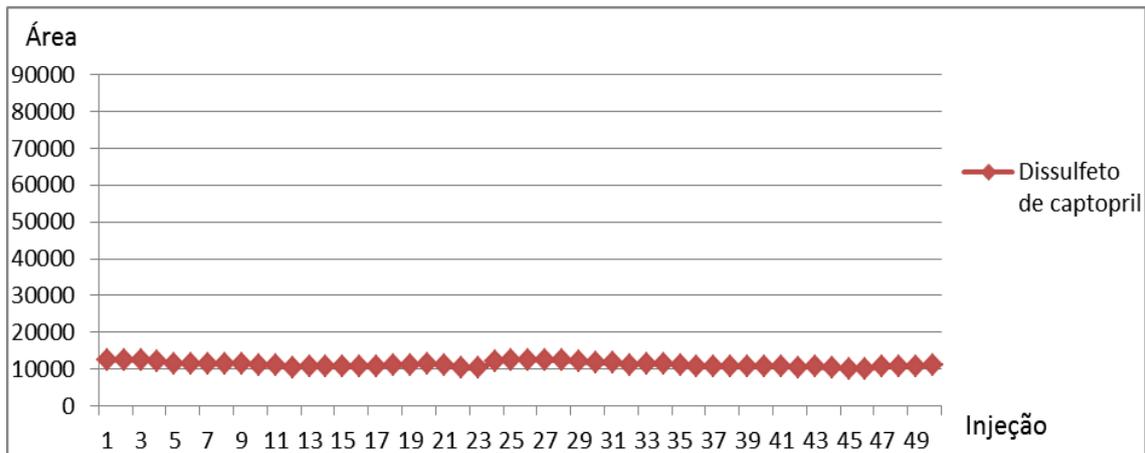
No caso do metanol, observou-se um comportamento anômalo. A concentração de dissulfeto aumentou com o tempo nas injeções consecutivas em 24 horas. Contudo, um experimento paralelo para confirmar ou não essa tendência foi realizado. A mesma solução preparada no balão volumétrico foi injetada de imediato, isto é, transferida para um “vial” de tempos e tempos e injetada. Os resultados foram constantes com o tempo, indicando que a concentração de dissulfeto permaneceu constante em 24 horas. Assim,

em metanol, não houve degradação aparente. O aumento de concentração obtido acima aconteceu devido à evaporação progressiva após a primeira injeção, com o septo já perfurado. Além disso, esses resultados foram obtidos utilizando-se um auto-injetor sem resfriamento da bandeja de “vials” por efeito Peltier. Essa concentração da amostra não foi observada quando utilizados os diluentes água e fase móvel, devido à taxa de evaporação desses diluentes ser bem inferior do que a do metanol.

Com a finalidade de se verificar se a concentração da solução amostra está realmente relacionada com a evaporação do metanol, foi realizado outro experimento com metanol como diluente, utilizando-se cromatógrafo equipado com resfriamento. Para a verificação dessa hipótese, analisou-se um dos seis lotes de captopril, o lote 11090022, por um período de 24 horas, utilizando-se cromatógrafo equipado com câmara de resfriamento da bandeja de *vials*, a uma temperatura de 4 °C. Para fins de comparação dos resultados obtidos, as amostras foram preparadas utilizando-se a água e o metanol como diluentes. Os resultados foram apresentados em valores absolutos da área dos picos cromatográficos referentes ao captopril e ao seu dissulfeto e plotados em gráfico de acompanhamento da área com o tempo.



**Gráfico 13.** Gráfico de acompanhamento da concentração (área) de captopril em comprimidos de captopril 25 mg, lote 11090022, em metanol, no período de 24 horas em cromatógrafo para CLAE com resfriamento da bandeja de *vials* à 4 °C



**Gráfico 14.** Gráfico de acompanhamento da concentração (área) de dissulfeto de captopril em comprimidos de captopril 25 mg, lote 11090022, em metanol, no período de 24 horas em cromatógrafo para CLAE com resfriamento da bandeja de vials à 4 °C

Analisando-se o Gráfico 13, pode-se observar que não houve um aumento significativo do teor de captopril com o decorrer do tempo, o DPR, entre injeções, foi de 0,3%. A concentração permaneceu constante. Isso se torna evidente quando se compara esse DPR com o DPR de 2,0% encontrado quando o mesmo lote foi analisado em equipamento sem a câmara de resfriamento da bandeja de vials.

Com o diluente metanol, o teor de dissulfeto de captopril também permaneceu

constante durante todo o período (Gráfico 14), confirmando a estabilidade da solução amostra nesse diluente, isto é, o metanol confere uma apreciável estabilidade para as soluções amostra de captopril.

Para a avaliação estatística da performance dos três diluentes propostos no estudo, foi montada a matriz de dados dos experimentos com as respectivas Análises de Variância (ANOVA), conforme as tabelas apresentadas a seguir (Tabelas 1 a 12):

**Tabela 1.** ANOVA de Dois Fatores – resultados referentes ao teor de captopril – Lote: 08040007

ANOVA							
	Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Amostra		1636,232	2	818,1162	915,906	3,47E-67	3,082852
Colunas		33,75685	6	5,626142	6,298637	1,11E-05	2,186134
Interações		63,45545	12	5,287954	5,920025	8,94E-08	1,845515
Dentro		93,78933	105	0,893232			
Total		1827,234	125				

**Tabela 2.** ANOVA de Dois Fatores – resultados referentes ao teor de dissulfeto de captopril – Lote: 08040007

ANOVA							
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>	
Amostra	3,186457	2	1,593229	73,89662	9,27E-21	3,082852	
Colunas	1,841907	6	0,306984	14,23846	8,2E-12	2,186134	
Interações	1,208125	12	0,100677	4,669571	4,77E-06	1,845515	
Dentro	2,263825	105	0,02156				
Total	8,500313	125					

**Tabela 3.** ANOVA de Dois Fatores – resultados referentes ao teor de captopril – Lote: 08040008

ANOVA							
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>	
Amostra	413,9851	2	206,9925	1140,042	6,22E-72	3,082852	
Colunas	7,287955	6	1,214659	6,689916	5,11E-06	2,186134	
Interações	7,479505	12	0,623292	3,432874	0,000285	1,845515	
Dentro	19,0644	105	0,181566				
Total	447,8169	125					

**Tabela 4.** ANOVA de Dois Fatores – resultados referentes ao teor de dissulfeto de captopril – Lote: 08040008

ANOVA							
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>	
Amostra	2,651363	2	1,325681	81,12031	5,01E-22	3,082852	
Colunas	2,015429	6	0,335905	20,55449	8,53E-16	2,186134	
Interações	1,27447	12	0,106206	6,498884	1,52E-08	1,845515	
Dentro	1,715927	105	0,016342				
Total	7,657188	125					

**Tabela 5.** ANOVA de Dois Fatores – resultados referentes ao teor de captopril – Lote: 11090022

ANOVA							
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>	
Amostra	560,8874	2	280,4437	197,0968	2,84E-36	3,082852	
Colunas	39,08619	6	6,514365	4,578318	0,000363	2,186134	
Interações	96,02393	12	8,001994	5,623828	2,25E-07	1,845515	
Dentro	149,4017	105	1,422873				
Total	845,3992	125					

**Tabela 6.** ANOVA de Dois Fatores – resultados referentes ao teor de dissulfeto de captopril – Lote: 11090022

ANOVA							
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>	
Amostra	4,491857	2	2,245929	120,932	5,68E-28	3,082852	
Colunas	2,407115	6	0,401186	21,60185	2,14E-16	2,186134	
Interações	1,836137	12	0,153011	8,238899	9,69E-11	1,845515	
Dentro	1,950042	105	0,018572				
<b>Total</b>	<b>10,68515</b>	<b>125</b>					

**Tabela 7.** ANOVA de Dois Fatores – resultados referentes ao teor de captopril – Lote: 1666203

ANOVA							
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>	
Amostra	99,57767	2	49,78884	393,7994	1,59582E-49	3,082852	
Colunas	4,313953	6	0,718992	5,686791	3,77703E-05	2,186134	
Interações	9,206926	12	0,767244	6,068431	5,64967E-08	1,845515	
Dentro	13,27536	105	0,126432				
<b>Total</b>	<b>126,3739</b>	<b>125</b>					

**Tabela 8.** ANOVA de Dois Fatores – resultados referentes ao teor de dissulfeto de captopril – Lote: 1666203

ANOVA							
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>	
Amostra	15,35698	2	7,67849	157,5008	2,46472E-32	3,082852	
Colunas	5,29329	6	0,882215	18,09595	2,52781E-14	2,186134	
Interações	3,983129	12	0,331927	6,808477	5,99915E-09	1,845515	
Dentro	5,118969	105	0,048752				
<b>Total</b>	<b>29,75237</b>	<b>125</b>					

**Tabela 9.** ANOVA de Dois Fatores – resultados referentes ao teor de captopril – Lote: B12D1173

ANOVA							
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>	
Amostra	419,0182	2	209,5091	1226,808	1,55656E-73	3,082852	
Colunas	5,504215	6	0,917369	5,371777	7,15036E-05	2,186134	
Interações	8,627707	12	0,718976	4,210057	2,15054E-05	1,845515	
Dentro	17,93145	105	0,170776				
<b>Total</b>	<b>451,0815</b>	<b>125</b>					

**Tabela 10.** ANOVA de Dois Fatores – resultados referentes ao teor de dissulfeto de captopril – Lote: B12D1173

ANOVA							
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico	
Amostra	1,896673	2	0,948337	176,4042	2,67021E-34	3,082852	
Colunas	1,240663	6	0,206777	38,46352	2,18715E-24	2,186134	
Interações	1,202268	12	0,100189	18,63659	6,45202E-21	1,845515	
Dentro	0,564473	105	0,005376				
Total	4,904078	125					

**Tabela 11.** ANOVA de Dois Fatores – resultados referentes ao teor de captopril – Lote: 1203950

ANOVA							
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico	
Amostra	3,045798	2	1,522899	6,61072	0,001976	3,082852	
Colunas	2,434349	6	0,405725	1,761202	0,11421	2,186134	
Interações	9,130806	12	0,7609	3,302977	0,00044	1,845515	
Dentro	24,18865	105	0,230368				
Total	38,7996	125					

**Tabela 12.** ANOVA de Dois Fatores – resultados referentes ao teor de dissulfeto de captopril – Lote: 1203950

ANOVA							
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico	
Amostra	30,54855	2	15,27428	856,4268	9,67377E-66	3,082852	
Colunas	9,118473	6	1,519745	85,21194	4,51037E-38	2,186134	
Interações	10,94195	12	0,91183	51,12617	2,85161E-38	1,845515	
Dentro	1,872663	105	0,017835				
Total	52,48164	125					

Analisando-se os resultados obtidos a partir dos dados tratados pela ANOVA de Dois Fatores, constatou-se que, estatisticamente, para os fatores isolados *diluyente* e *tempo*, houve diferença significativa entre as médias tanto dos níveis do fator *tempo*, quanto para os níveis do fator *diluyente*, no nível de confiança de 95%. Assim como para o efeito da interação *tempo* x *diluyente* constatou-se que, estatisticamente, houve interação significativa entre as médias dos níveis do fator *tempo* e as médias dos níveis do fator

*diluyente*, no nível de confiança de 95%.

De acordo com as propriedades de dois dos diluentes testados: água ultrapura e metanol, foi possível analisar os prováveis mecanismos para justificar a menor taxa de degradação do captopril encontrada com a utilização do metanol quando comparado com a água e com a fase móvel.

Sendo o metanol e a água considerados solventes anfipróticos, isto é, ora funcionam como aceptores, ora como doadores de prótons, e sendo a taxa da velocidade de

degradação do captopril ( $k_0$ ) influenciada pelas propriedades doadoras ( $\alpha$ ) e receptoras ( $\beta$ ) de prótons do diluente, pode-se analisar o desempenho comparativo entre a água e o metanol da seguinte forma: o metanol ( $\beta = 0,62$ ) é, significativamente, melhor receptor de prótons do que a água ( $\beta = 0,18$ ) e isso leva a uma diminuição linear da  $k_0$ , pois o metanol apresenta melhor capacidade em retirar prótons do meio, impedindo, assim, que o  $H^+$  – proveniente da ionização do grupamento carboxílico –, fique disponível e venha a reagir com o  $O_2^{2-\bullet}$  proveniente do processo de auto-oxidação do fármaco, formando o  $H_2O_2$  e radicais  $OH\bullet$ , espécies oxidantes altamente reativas. Dessa forma, a degradação oxidativa do captopril, desencadeada por radicais livres, fica minimizada.

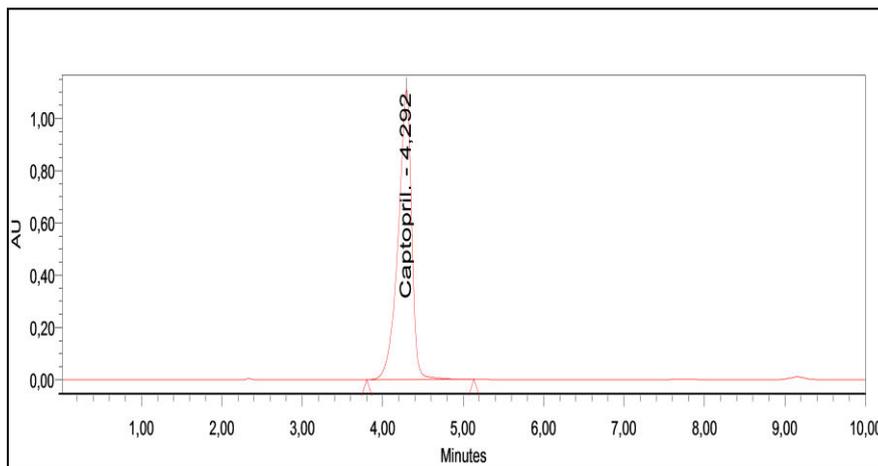
Já a água apresenta maior propriedade doadora de prótons ( $\alpha = 1,17$ ) do que o metanol ( $\alpha = 0,93$ ), nesse sentido, a água disponibiliza prótons ao meio, os quais podem reagir com o  $O_2^{2-\bullet}$ , também formando espécies oxidantes altamente reativas. Essas espécies propagam as reações em cadeia, via radicais livres, que resulta em uma maior taxa de degradação do captopril. Desse modo, tem-se o mecanismo que justifica a maior estabilidade do captopril em metanol do que em água.

Além do mecanismo proposto, o metanol possui  $pK_a$  ( $pK_a = 15,20$ ) ligeiramente menor do que o da água ( $pK_a = 15,74$ ) e isso o torna ligeiramente mais ácido do que a mesma. Dessa forma, o captopril apresenta maior estabilidade em metanol, pois, em condições

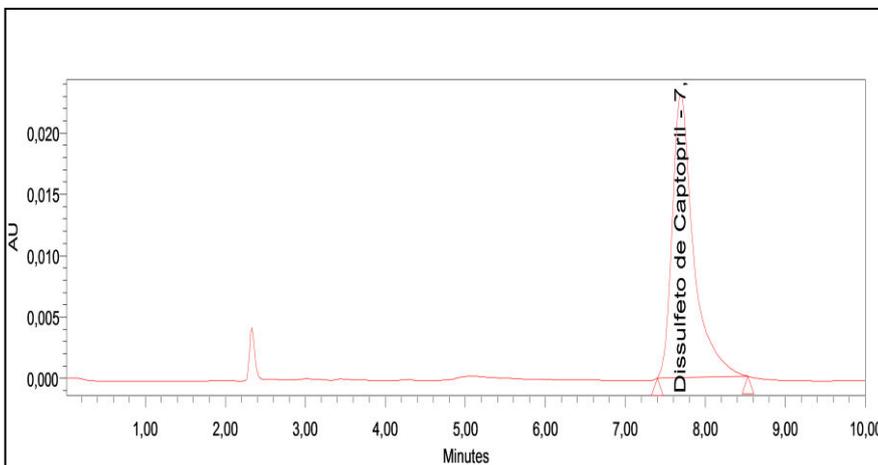
de pH mais baixos ( $pH < 3,5$ ), o grupo carboxila ( $pK_a = 3,7$ ) apresenta-se protonado em sua maior parte, minimizando o processo de degradação oxidativa do captopril. Isso pode ser explicado pelo mecanismo em que o ânion carboxilato funciona como receptor de prótons intramolecular, o que favorece a formação do íon tiolato (ocorre o deslocamento do próton do grupo sulfidril para o íon carboxilato), que reage com o  $O_2$ , sofrendo oxidação com a formação de radicais livres que irão promover uma maior degradação do captopril. Provavelmente, isso ocorre devido a uma ligação de hidrogênio intramolecular. Dessa forma, se o grupo carboxila apresentar-se protonado, o deslocamento do próton do grupo tiol para o ânion carboxilato e a consequente formação do íon tiolato estará desfavorecida, minimizando, assim, o processo de degradação do captopril.

Do ponto de vista da polaridade ( $\pi^*$ ) desses diluentes, a água ( $\pi^* = 1,09$ ) é mais polar do que o metanol ( $\pi^* = 0,60$ ), portanto a água favorece a degradação do captopril, pois as reações radiculares são favorecidas em meio a diluentes fortemente polares, como é o caso da água.

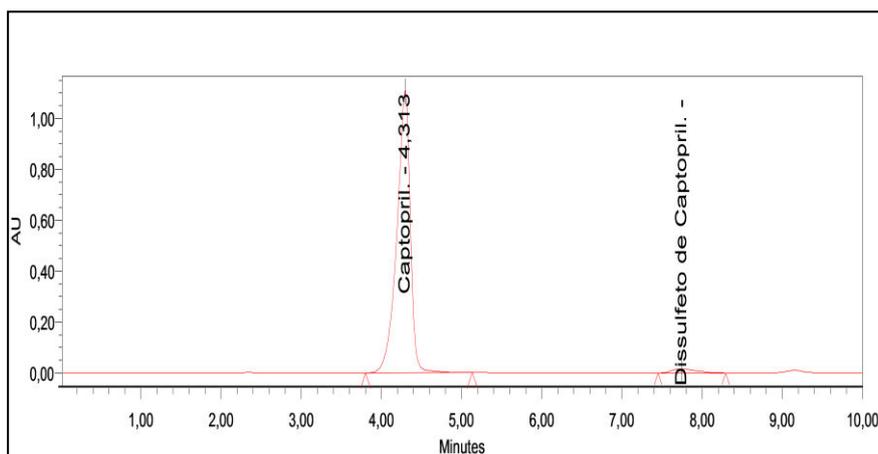
Quanto ao diluente da fase móvel, trata-se de um caso de adição de co-solventes com a finalidade de melhorar a estabilidade do fármaco em soluções aquosas. Portanto, há um aumento da estabilidade do captopril em fase móvel (ácido fosfórico 0,11% : metanol (45:55) (v/v)), porém esse aumento não supera o obtido com o metanol (Figuras 3, 4 e 5).



**Figura 3.** Cromatograma do padrão de captopril em diluente fase móvel



**Figura 4.** Cromatograma do padrão de dissulfeto de captopril em diluente fase móvel



**Figura 5.** Cromatograma da solução de resolução em diluente fase móvel

## 5. Conclusão

Nas condições analíticas propostas nos compêndios oficiais – Farmacopeia Brasileira 5ª edição e Farmacopeia Americana 36 – o método de análise descrito demonstrou ser inadequado em termos de estabilidade da solução, tanto para o doseamento do captopril, quanto para a quantificação de seu produto de degradação, o dissulfeto de captopril. Tal fato pode ser observado a partir dos resultados analíticos apresentados neste trabalho, em que se constatou uma queda significativa no teor de captopril com um aumento importante na quantidade de seu dissulfeto, no decorrer de 24 horas. Para o desenvolvimento deste estudo, optou-se pela manutenção da metodologia de análise por CLAE, por se tratar de um método rápido, preciso e estável, alterando-se apenas o diluente empregado na diluição das amostras e dos padrões.

Finalmente, constatou-se que o diluente metanol, dentre os diluentes testados, foi o que promoveu estabilidade mais apreciável das soluções amostra de captopril, as quais se mantiveram estáveis durante todo o período proposto de 24 horas. O aumento da estabilidade do captopril em solução por um período razoável de tempo garante que os resultados analíticos obtidos sejam confiáveis, o que interessa à indústria farmacêutica, que opera 24 horas por dia, cujas análises são realizadas em equipamentos automatizados capazes de receber um grande número de amostras que podem ser analisadas muitas horas depois de seu preparo.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo suporte financeiro e ao Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq) pelas bolsas de

Produtividade Desenvolvimento Tecnológico e Extensão Inovadora do CNPq - Nível 2.

## Referências Bibliográficas

- <sup>1</sup> Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova* **2004**, *27*, 771. [CrossRef]
- <sup>2</sup> Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Glajch, J. L. *Practical HPLC method development*, 2nd ed., Wiley-Interscience: New York, 1997. [CrossRef]
- <sup>3</sup> Souza, J. A. L.; Albuquerque, M. M.; Grangeiro-Junior, S.; Pimentel, M. F.; Santana, Simões, S. S. Quantification of captopril disulphide as a degradation product in captopril tablets using near infrared spectroscopy and chemometrics. *Vibrational Spectroscopy* **2012**, *62*, 35. [CrossRef]
- <sup>4</sup> Xaubet Oliveira, C.M.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, 2009. [Link]
- <sup>5</sup> Sítio do Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://w3.datasus.gov.br/hiperdia/captopril.php>>. Acesso em: 15 agosto 2013.
- <sup>6</sup> Pfeffer, M. A.; Braunwald, E.; Moyé, L. A.; Basta, L.; Brown, E. J.; Cuddy, T. E.; Davis, B. R.; Geltman, E. M.; Goldman, S.; Flaker, G. C.; Klein, M.; Lamas, G. A.; Packer, M.; Rouleau, J.; Rouleau, J. L.; Rutherford, J.; Wertheimer, J.; Hawkins, C. M. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. results on the survival and ventricular enlargement trial. the SAVE investigators. *The New England Journal of Medicine* **1992**, *327*, 669. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>7</sup> Connors, K. A.; Amidon, G. L.; Stella, V. J.; *Chemical stability of pharmaceuticals: a handbook for pharmacists*. 2nd ed., Wiley-Interscience: New York, 1986.
- <sup>8</sup> Kadin, H. Em *Analytical profiles of drug substances*; Florey, K., ed.; Academic Press: New York, 1982, vol. 11.
- <sup>9</sup> Hillaert, S.; Van Den Bossche, W. Determination of captopril and its

degradation products by capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **1999**, *21*, 65. [CrossRef]

<sup>10</sup> *United States Pharmacopeia 36 - National Formulary 31*, The United States Pharmacopeial Convention: Rockville, 2013.

<sup>11</sup> Timmins, P.; Jackson, I. M.; Wang, Y. J. Factors affecting captopril stability in aqueous solution. *International Journal of Pharmaceutics* **1982**, *11*, 329. [CrossRef]

<sup>12</sup> Kristensen, S.; Lao, Y.E.; Brustugun, J.; Braenden, J.U. Influence of formulation properties on chemical stability of captopril in aqueous preparations. *Pharmazie* **2008**, *63*, 872. [PubMed]

<sup>13</sup> Kamlet, M. J.; Abboud, J. L. M.; Abraham, M. H.; Taft, R. W. Linear solvation energy relationships. 23. a comprehensive collection of the solvatochromic parameters,  $\pi^*$ ,  $\alpha$ , and  $\beta$ , and some methods for simplifying the generalized solvatochromic equation. *Journal of Organic Chemistry* **1983**, *48*, 2877. [CrossRef]

<sup>14</sup> Mathew, M.; Das Gupta, V. The stability of captopril in aqueous systems. *Drug Stability* **1996**, *1*, 161. [CrossRef]

<sup>15</sup> Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C.; *Free radicals in biology and medicine*, 3rd ed., Oxford University Press: Oxford, 1999.

<sup>16</sup> Moore, D. E. Em *Photostability of drugs and drugs formulation*; TØNNESEN, H. H. ed.; 2nd ed., CRC Press: Florida, 2004, cap. 2.

<sup>17</sup> Lee, T.; Notari, R. E. Kinetics and mechanism of captopril oxidation in aqueous solution under controlled oxygen partial pressure. *Pharmaceutical Research* **1987**, *4*, 98. [CrossRef] [PubMed]

<sup>18</sup> Rabenstein, D. L.; Isab, A. A. Conformational and acid-base equilibria of captopril in aqueous solution. *Analytical Chemistry* **1982**, *54*, 526. [CrossRef]

<sup>19</sup> Ikeda, Y.; Motoune, S.; Matsuoka, T.; Arima, H.; Hirayama, F.; Uekama, K. Inclusion complex formation of captopril with  $\alpha$ - and  $\beta$ -cyclodextrins in aqueous solution: NMR spectroscopic and molecular dynamic studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2002**, *91*, 11. [CrossRef] [PubMed]

<sup>20</sup> *Farmacopeia Brasileira*, 5. ed., Agência Nacional de Vigilância Sanitária: Brasília, 2010.

<sup>21</sup> Sítio do Portal Action. Disponível em: <<http://www.portalaction.com.br/content/2-anova-dois-fatores>>. Acesso em: 06 janeiro 2013.

<sup>22</sup> Fonseca, J. S.; Martins, G. A.; *Curso de estatística*, 6. ed., Atlas: São Paulo, 2010.