

## CUANTIFICACION DE LAS FORMAS POLIMORFICAS DE NIMODIPINA EN MEZCLAS SÓLIDAS MEDIANTE ESPECTROSCOPIA RAMAN/PLS

Natalia L. Calvo,<sup>a</sup> Marina Antonio,<sup>a</sup> Teodoro S. Kaufman,<sup>a</sup> Naira M. Balzaretti<sup>b</sup> y Rubén M. Maggio<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Química Rosario (IQUIR, CONICET-UNR) y Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Suipacha 531 (S2002LRK), Rosario, Argentina. E-mail: [calvo@iquir-conicet.gov.ar](mailto:calvo@iquir-conicet.gov.ar)

<sup>b</sup> Instituto de Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500 - Caixa Postal 15051, Porto Alegre, RS, Brasil.

### Introducción

El polimorfismo es la capacidad de una sustancia para existir como dos o más fases cristalinas que tienen diferentes conformaciones moleculares en su red cristalina.<sup>1</sup> Los polimorfos pueden diferir en sus propiedades físicas y químicas, incluyendo su punto de fusión, reactividad química, solubilidad aparente y velocidad de disolución.

Estas propiedades tienen impacto en el procesamiento farmacéutico (mezclado, flujo de polvo) y en la calidad o el rendimiento de sus respectivos productos formulados (estabilidad, disolución y biodisponibilidad). Por ello, los entes reguladores vienen manifestando un creciente interés en el desarrollo de metodologías analíticas para detectar y cuantificar polimorfos.

Nimodipina (NIM) es un agente anti-hipertensivo bloqueante de los canales de calcio, que se encuadra en la clase 2 del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica, debido a que presenta baja solubilidad en agua y alta permeabilidad.<sup>2</sup> NIM presenta dos formas polimórficas, conocidas como Modo I y Modo II,<sup>3</sup> siendo la solubilidad del Modo I en agua a 25°C y 37°C el doble de la del Modo II. Debido a esto, el Modo I es el polimorfo de elección para el desarrollo de formas farmacéuticas.

La espectroscopía Raman es una de las técnicas más utilizadas para analizar IFAs en el estado sólido, porque brinda resultados rápidos y presenta capacidad para la identificación química en pequeñas moléculas. En este trabajo proponemos el uso de espectroscopía Raman acoplada a un método quimiométrico como regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS1), para identificar y cuantificar las diferentes formas cristalinas de NIM.

### Materiales y Métodos

Modo I se obtuvo partiendo de una solución saturada de NIM en propanol agitada bajo reflujo durante 2 días, en presencia de un sedimento sólido. Luego se filtró en caliente y se llevó a estufa de vacío a 95°C durante 5 días. El Modo II se generó suspendiendo a temperatura ambiente 1 g de NIM comercial en 10 ml de isopropanol y agitando la suspensión durante 3 días. Luego la mezcla se centrifugó y el sólido se mantuvo en estufa de vacío a 50°C durante 4 días. Los polimorfos se caracterizaron mediante microscopía de barrido electrónico, calorimetría diferencial de barrido (DSC), difracción de rayos-X de polvo (DRX) y espectroscopías Raman e IR.<sup>3,4</sup>

Con el objeto de desarrollar un método cuantitativo para la determinación del Modo I de NIM, se tamizaron mecánicamente muestras de ambos polimorfos, seleccionando las fracciones entre 50 y 100 mesh, las cuales fueron mantenidas en desecador. Luego se procedió a preparar por pesada simple sendos conjuntos de muestras de calibración y validación, conteniendo mezclas de ambos polimorfos en diferentes

proporciones. Dichas muestras fueron homogeneizadas a 30 rpm durante 15 min utilizando un mezclador en Z.

Mediante microscopía de fluorescencia Raman, se obtuvieron un total de 60 espectros (Tabla 1) correspondientes a 10 muestras del conjunto de calibración y 10 muestras del conjunto de validación, a cinco niveles de abundancia (cada nivel fue preparado por duplicado). Todas las muestras fueron analizadas por triplicado.

**Tabla 1.** Detalles de la preparación de muestras.

| Conjunto de Muestras | Objetivo                          | Abundancia del Modo I (%P/P) | Nº de Muestras | Nº de Lecturas |
|----------------------|-----------------------------------|------------------------------|----------------|----------------|
| Calibración          | Optimización                      | 100; 95; 90; 85; 75          | 10             | 30             |
| Validación           | Eficiencia, Precisión y Exactitud | 100; 97,5; 92,5; 85; 80      | 10             | 30             |

### Resultados y Discusión

Con el fin de reducir el ruido instrumental y la dispersión inherentes a la espectroscopía Raman, los datos se sometieron a varios pre-tratamientos. Para la corrección de la línea de base se utilizó el software Fityk,<sup>5</sup> y la intensidad de los espectros se normalizó con referencia al pico a 806 cm<sup>-1</sup>. Luego se realizó el promedio de los tres espectros de cada mezcla, obteniéndose un total de 10 espectros promedio tanto para el conjunto de calibración como de validación.

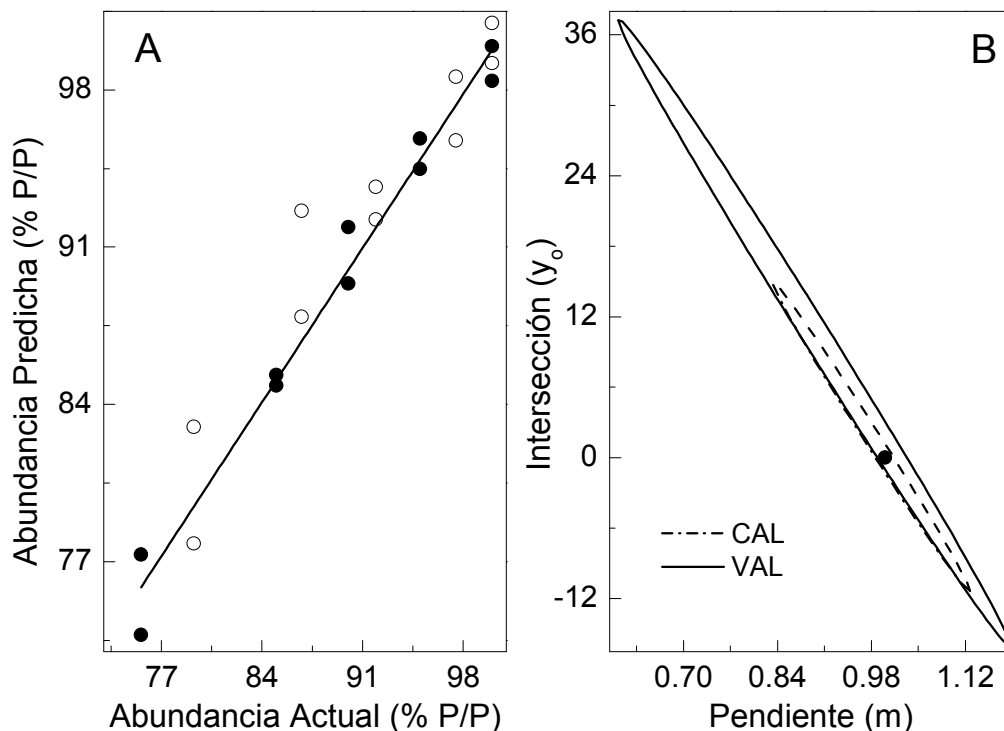
Los espectros promedio fueron dispuestos en forma matricial y procesados mediante rutinas escritas para Matlab para el desarrollo y operación de un modelo de calibración multivariante PLS.

**Tabla 2.** Parámetros de la Calibración.

| Parámetros                              | NIM - Modo I |
|---|--------------|
| Intervalo Espectral (cm <sup>-1</sup> ) | 1896,6-194,5 |
| Intervalo lineal (% P/P de Modo I)      | 75-100       |
| Número de Factores                      | 2            |
| Número de muestras                      | 10           |
| PRESS                                   | 14,04        |
| RMSD (%)                                | 1,18         |
| REC                                     | 1,320        |
| r <sup>2</sup>                          | 0,9802       |
| Selectividad                            | 0,890        |
| Sensibilidad                            | 0,110        |
| Sensibilidad analítica (γ)              | 5,200        |

La optimización de parámetros fue realizada analizando el conjunto de calibración. El número de factores (Tabla 2) se determinó en base a la variancia explicada por los factores PLS. La región espectral óptima ( $1896,6-194,5\text{ cm}^{-1}$ ), fue seleccionada utilizando el algoritmo de ventana móvil de ancho variable.<sup>6</sup> Como pre-procesamiento adicional se utilizó el centrado en la media.

Se realizó una validación interna analizando el conjunto de calibración, donde se examinaron las estadísticas, las cifras de mérito y la recta abundancia actual vs predicha (Figura 1).



**Figura 1.** A) Abundancia Actual vs. Predicha para el conjunto de calibración (●) y validación (○). B) Elipse de confianza para la calibración y validación.

Seguidamente, se evaluó el desempeño del método desarrollado (Raman/PLS) analizando el conjunto de validación, donde se examinó el nivel de recuperación para cada nivel, la dispersión de los resultados (Tabla 3) y la recta de regresión entre abundancia real vs predicha. Además, se realizó la prueba de la elipse de confianza conjunta (Figura 1).

La exactitud fue evaluada a 5 niveles de abundancia, calculando la recuperación de las muestras en el conjunto de validación (Tabla 3), que en todos los casos no se apartó significativamente del 100%. La precisión del método fue evaluada determinando la dispersión de los datos en los distintos niveles; las desviaciones estándar relativas fueron menores de 10%.

Las elipses de confianza conjunta para la ordenada al origen y la pendiente fueron evaluadas para el conjunto de calibración y validación. En todos los casos, éstas contuvieron al punto ( $y_0=0$ ;  $m=1$ ).

**Tabla 3.** Validación del método Raman/PLS.

| Parámetros                 | Nivel 1 | Nivel 2 | Nivel 3       | Nivel 4 | Nivel 5 |
|----------------------------|---------|---------|---------------|---------|---------|
| Abundancia (% P/P)         | 79,3    | 86,8    | 91,9          | 97,5    | 100,0   |
| Nº Muestras                | 2       | 2       | 2             | 2       | 2       |
| Recuperación (% P/P)       | 101,44  | 104,05  | 101,14        | 99,65   | 100,08  |
| SD                         | 4,63    | 3,84    | 1,11          | 2,05    | 1,26    |
| Recuperación total (% P/P) |         |         | 101,27        |         |         |
| SD                         |         |         | 2,72          |         |         |
| REP (% P/P)                |         |         | 2,769         |         |         |
| Real vs Predicho           |         |         |               |         |         |
| $r^2$                      |         |         | 0,9127        |         |         |
| Intersección ( $y_0$ )     |         |         | 0,895 ± 0,098 |         |         |
| Pendiente (m)              |         |         | 10,63 ± 8,94  |         |         |
| ANOVA                      |         |         |               |         |         |
| SS Entre grupos            |         |         | 23,571        |         |         |
| SS Dentro de los grupos    |         |         | 43,248        |         |         |
| $F_{obs}$                  |         |         | 0,681         |         |         |
| $F_{crit}$                 |         |         | 5,192         |         |         |

### Conclusiones

La metodología desarrollada, empleando espectroscopía Raman con análisis multivariante PLS, demostró ser exacta y precisa cuando se evaluó sobre muestras de validación. La misma es plausible de ser aplicada para el control de calidad rutinario del tenor de Modo I de NIM en IFA a granel.

### Referencias

1. Brittain, H. G., *Polymorphism in pharmaceutical solids*. Dekker: NY, 1999; p 1-31.
2. Papageorgiou, G. Z.; Bikiaris, D.; Karavas, E.; Politis, S.; Docoslis, A.; Park, Y.; Stergiou, A.; Georgarakis, E., Effect of physical state and particle size distribution on dissolution enhancement of nimodipine/PEG solid dispersions prepared by melt mixing and solvent evaporation. *The AAPS journal* **2006**, *8*, E623-E631.
3. Grunenber, A., Keil, B., & Henck, J. O., Polymorphism in binary mixtures, as exemplified by nimodipine. *Int. J. Pharm.* **1995**, *118*, 11-21.
4. Riekes, M. K.; Pereira, R. N.; Rauber, G. S.; Cuffini, S. L.; de Campos, C. E.; Silva, M. A.; Stulzer, H. K., Polymorphism in nimodipine raw materials: development and validation of a quantitative method through differential scanning calorimetry. In *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2012; Vol. 70, pp 188-193.
5. Wojdyr, M., Fityk: a general-purpose peak fitting program. *Journal of Applied Crystallography* **2010**, *43*, 1126-1128.
6. Maggio, R. M.; Castellano, P. M.; Vignaduzzo, S. E.; Kaufman, T. S., Alternative and improved method for the simultaneous determination of fexofenadine and pseudoephedrine in their combined tablet formulation. *J. Pharm. Biomed. Anal* **2007**, *45*, 804-810.