

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
"JULIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA DE**  
**GLIMEPIRIDA COMPRIMIDOS**

**RUDY BONFILIO**

**ORIENTADORA: Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado**

**CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Magali Benjamim de Araújo**

**ARARAQUARA - SP**

**2011**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
"JULIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA DE**  
**GLIMEPIRIDA COMPRIMIDOS**

**RUDY BONFILIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

**ORIENTADORA: Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado**

**CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Magali Benjamim de Araújo**

**ARARAQUARA - SP**

**2011**

B713a Bonfilio, Rudy  
Análise químico-farmacêutica de glimepirida comprimidos / Rudy  
Bonfilio. – Araraquara, 2011  
273 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Hérica Regina Nunes Salgado

Coorientador: Magali Benjamin de Araújo

1. Glimepirida. 2. Planejamento experimental. 3. Controle analítico de qualidade. 4. Equivalência farmacêutica. 5. Tecnologia farmacêutica. 6. Polimorfismo. I. Salgado, Hérica Regina Nunes, orient. II. Araújo, Magali Benjamin, coorient.. III. Título.

Rudy Bonfilio

ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA DE GLIMEPIRIDA  
COMPRIMIDOS

Esta tese foi julgada e aprovada para obtenção de grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista.

Araraquara, 03 de Novembro de 2011.

Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado

Presidente/orientadora

Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra

Profa. Dra. Regina Vincenzi Oliveira

Prof. Dr. Marlus Chorilli

Profa. Dra. Patricia de Carvalho Mastroianni

*Dedico este trabalho a Deus, que me iluminou e me guiou em todas as etapas de minha vida e me concedeu saúde, perseverança, paciência e capacidade para realização desta obra.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me proporcionar esta conquista.

Aos meus familiares, principalmente minha mãe e minha irmã, pelo apoio, compreensão e incentivo.

À minha orientadora, professora Doutora Hérica Regina Nunes Salgado, pela confiança, compreensão, amizade, incentivo e colaboração. O compromisso profissional e a empatia da professora Hérica com os alunos sempre permanecerão como exemplos a serem seguidos durante a minha vida profissional.

À minha co-orientadora, professora Dra. Magali Benjamim de Araújo, a responsável por eu ter ingressado no doutorado, pois seu incentivo foi fundamental para que eu seguisse na área acadêmica. Também agradeço o exemplo de dedicação, amizade, colaboração, compreensão e a confiança, sendo que as etapas realizadas no Centro de Equivalência Farmacêutica do Núcleo Controle de Qualidade foram primordiais para execução desta tese de doutorado.

Aos meus amigos e colegas de república, que me acolheram em Araraquara e sempre torceram e me acompanharam durante o meu doutorado. Em especial: Antônio, Felipe, Flávio, Guilherme e Mário.

Aos meus amigos, que mesmo ausentes, souberam manter a presença: Abner, Ana Paula, Anselmo, Beбето, Giuliano, Ivan, José de Lima, Júlio César, Juka, Lukas, Márcio Alexandre, Marcos Paulo, Marcos Gomes, Matheus Gomes, Nádia, Rodolfo, Taciane, Tatá e Valdomiro.

Aos meus colegas de laboratório de Araraquara, que dividiram comigo conhecimentos fundamentais, além das frustrações, tristezas, anseios e, principalmente, as alegrias que a pesquisa nos proporciona: Ana Carolina Kogawa, Aylime, Cristina Laignier, Daniela Vieira, Eliete Von Zuben, Emiliane de Araújo, Flávia Fiorentino, Flávia Lima Ribeiro, Gustavo Rossanezi, Hilris Rocha, Josilene Corrêa, Lucas Chierentin, Lucélia Magalhães, Marcelo, Patrícia Alessio, Paula Lacerda Oliveira, Vanessa dos Santos. Em especial, à Carolina Peres, por ter acompanhado grande parte da minha tese.

À Maria de Fátima Rodrigues, pelo apoio técnico e amizade.

Aos funcionários e pesquisadores que compõem o Centro de Equivalência Farmacêutica do Núcleo Controle de Qualidade da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), pelo auxílio e convívio durante a execução de parte experimental deste trabalho: Profa. Dra. Magali, Adriana, Audrei, Cristiane, Evanusa, Gilmara, Olímpia, Sirléia, Valéria e Zuleica.

Aos Docentes do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, em especial aos professores: Profa. Dra. Adélia Emília de Almeida, Prof. Dr. Georgino Honorato de Oliveira, Profa. Dra. Leila Aparecida Chiavacci, Prof. Dr. Luís Vítor Silva Sacramento, Profa. Dra. Maria Virgínia Scarpa e Prof. Dr. Marlus Chorilli.

À Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass da UFSCar, por disponibilizar o cromatógrafo a líquido acoplado ao detector de massas, utilizado neste trabalho.

À Profa. Dra. Regina Vincenzi de Oliveira da UFSCar, por disponibilizar o cromatógrafo a líquido acoplado ao detector de massas e por realizar as análises de seletividade e identificação de produtos de degradação.

Aos professores da Universidade Federal de Alfenas, pela colaboração e importantes sugestões: Prof. Dr. Antônio Carlos Doriguetto, Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley, Prof. Dr. Eduardo Tonon de Almeida, Profa. Dra. Gislaíne Ribeiro Pereira e Prof. Dr. Person Pereira Neves.

Ao Laboratório Centro de Equivalência Farmacêutica do Núcleo Controle de Qualidade da Universidade Federal de Alfenas, por permitir a realização de todas as análises envolvendo ensaios de dissolução.

Ao Laboratório de Cristalografia da Universidade Federal de Alfenas, pelas análises de difração de raios X.

Ao Laboratório Interdisciplinar de Química da Universidade Federal de Alfenas, pelas análises de espectroscopia na região do infravermelho.

À secretaria de pós-graduação, em especial a Cláudia, Sônia e Laura.

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, sempre solícitos e dispostos a ajudar.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UNESP.

À FAPESP, pelo apoio financeiro concedido.

*"O sábio não é o homem que  
fornece as verdadeiras respostas; é  
o que formula as verdadeiras  
perguntas."*

***Claude Lévi-Strauss***

## RESUMO

A glimepirida é um antidiabético oral do grupo das sulfonilureias, amplamente utilizada no tratamento do diabetes tipo II. Embora existam vários métodos descritos para a determinação deste fármaco, os métodos cromatográficos demandam um considerável tempo de análise, nenhum estudo descreve um método indicador de estabilidade em comprimidos, o ensaio de dissolução preconizado pela USP 2011 não simula as condições do trato gastrointestinal e não há relatos da influência do polimorfismo sobre comprimidos de glimepirida. Com base nestas considerações, este trabalho objetiva desenvolver e validar novos métodos analíticos para quantificação da glimepirida, desenvolver um novo ensaio de dissolução, realizar estudos de estabilidade e de equivalência farmacêutica e avaliar o impacto do polimorfismo na qualidade dos comprimidos. Foi desenvolvido e validado um método espectrofotométrico por derivada de segunda ordem. Todos os parâmetros de validação foram encontrados em concordância às exigências e o método apresentou a vantagem de ser mais fácil de executar e de menor custo, em relação à cromatografia líquida de alta eficiência. O método por cromatografia líquida de alta eficiência foi desenvolvido empregando abordagem multivariada, o que permitiu a separação de glimepirida e seus produtos de degradação em cerca de nove minutos, demonstrando uma vantagem em relação aos métodos indicadores de estabilidade descritos. Todos os parâmetros de validação foram considerados satisfatórios e o método cromatográfico apresentou a vantagem de ser mais seletivo, permitindo a análise de produtos de degradação. Porém, apresenta maior custo e maior geração de resíduos em relação à espectrofotometria. Desenvolveu-se também um método para realização de ensaios e perfis

de dissolução de comprimidos contendo 4 mg de glimepirida. O ensaio de dissolução foi validado e todos os parâmetros foram considerados satisfatórios. Posteriormente, foram realizados estudos de estabilidade acelerada (3 e 6 meses) e de longa duração (3, 6, 9 e 12 meses) em amostras do produto referência (Amaryl<sup>®</sup> 4 mg) e em 3 marcas similares comercializadas no mercado nacional. A partir destes estudos, foi observado que a qualidade físico-química dos produtos analisados foi suscetível à influência de temperatura e umidade. Nos estudos de equivalência farmacêutica, todas as três amostras analisadas foram aprovadas nos ensaios de peso médio, friabilidade, tempo de desintegração, dureza, doseamento e uniformidade de conteúdo. Entretanto, o produto B foi reprovado no teste de dissolução e os produtos B e C não apresentaram semelhança de perfis de dissolução em relação ao produto referência, sendo, portanto, reprovados. Finalmente, as duas formas polimórficas descritas para a glimepirida foram recristalizadas e utilizadas para fabricação de dois lotes de comprimidos de glimepirida, os quais foram submetidos ao ensaio de dissolução sob as condições descritas nesta tese. Os resultados demonstraram uma significativa influência do polimorfismo nos perfis de dissolução de comprimidos de glimepirida. Este trabalho mostra a importância de métodos adequados de controle de qualidade na avaliação de produtos comercializados no mercado brasileiro, pois mesmo com o crescente rigor dos órgãos competentes, os pacientes ainda estão sujeitos a usarem medicamentos com qualidade comprometida.

**Palavras-chave:** glimepirida, planejamento experimental, otimização multivariada, controle analítico de qualidade, dissolução, estudos de estabilidade, equivalência farmacêutica, tecnologia farmacêutica, polimorfismo de sólidos farmacêuticos, validação.

## **ABSTRACT**

Glimepiride is an oral antidiabetic drug widely used in treatment of type 2 diabetes. Although there are several methods described for the determination of this drug, chromatographic methods require considerable time for analysis, none study describes a stability-indicating method for tablets, the dissolution test recommended by the USP 2011 does not simulate gastrointestinal tract conditions and there are no reports of the polymorphism influence of glimepiride on the properties of tablets. Based on these considerations, this work aims to develop and validate new analytical methods for quantification of glimepiride, to develop a new dissolution method, to conduct stability studies and pharmaceutical equivalence tests, and to assess the impact of polymorphism of glimepiride on the quality of tablets. A second order derivative UV spectrophotometric method for quantification of glimepiride was developed and validated. All the data meet the validation acceptance criteria and the method presented the following advantages over the chromatographic method: it does not use polluting reagents, it is simple and has low-cost. The high performance liquid chromatography method was developed using a multivariate approach, which allowed the adequate separation of glimepiride from all degradant peaks in a short analysis time (about 9 min), demonstrating an advantage over those described stability indicating methods. All validation parameters were found in accordance with the validation acceptance criteria and the chromatographic method had the advantage of being more selective, allowing the analysis of degradation products. However, it has a higher cost and waste generation in relation to spectrophotometry. Also, a dissolution method for the assessment of 4 mg glimepiride tablets was developed and validated. The dissolution

method was validated and all parameters were considered satisfactory. Subsequently, accelerated stability studies (3 and 6 months) and long-term studies (3, 6, 9 and 12 months) were performed in samples of the reference product (Amaryl<sup>®</sup> 4 mg) and three similar brands sold in the Brazilian market. From these studies, it was observed that the physical and chemical quality of the tested products was susceptible to the influence of temperature and humidity. In studies of pharmaceutical equivalence, all three samples were passing the tests of average weight, friability, disintegration time, hardness, assay and content uniformity. However, the product B failed the dissolution test and the products B and C showed no similarity of dissolution profiles compared to the reference product. Finally, tablets containing polymorphic forms I and II of glimepiride were prepared and subjected to dissolution testing. The results show a significant influence of polymorphism on the dissolution properties of glimepiride tablets. This work shows the importance of appropriate quality control tests to product evaluation in the Brazilian pharmaceutical market, because even with the increased rigor of the competent bodies, patients are still subject to use drugs with compromised quality.

**Keywords:** glimepiride, experimental design, multivariate optimization, analytical quality control, dissolution, stability studies, pharmaceutical equivalence, pharmaceutical technology, pharmaceutical solid polymorphism, validation.

## SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	15
Lista de Tabelas.....	20
1. CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO.....	25
2. CAPÍTULO II – REVISÃO DA LITERATURA.....	30
2.1. Propriedades farmacológicas.....	30
2.2. Propriedades físico-químicas.....	35
2.3. Métodos analíticos para a determinação de glimepirida.....	38
3. OBJETIVOS.....	47
3.1. Objetivo geral.....	47
3.2. Objetivos específicos.....	47
4. CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	48
4.1. Introdução.....	48
4.1.1. Parâmetros de validação analítica.....	51
4.2. Parte experimental.....	64
4.2.1. Material.....	64
4.2.2. Espectrofotometria na região ultravioleta.....	69
4.2.3. Cromatografia líquida de alta eficiência.....	94
5. CAPÍTULO IV – TESTE DE DISSOLUÇÃO.....	127
5.1. Introdução.....	127
5.2. Parte experimental.....	135

5.2.1.	Material.....	135
5.3.	Teste de dissolução.....	137
5.4.	Validação do método analítico aplicado ao teste de dissolução.....	138
5.5.	Resultados e discussão.....	143
6.	CAPÍTULO V – ESTUDOS DE ESTABILIDADE.....	161
6.1.	Introdução.....	161
6.2.	Parte experimental.....	166
6.2.1.	Material.....	166
6.2.2.	Condições de estudo.....	168
6.3.	Resultados e discussão.....	170
7.	CAPÍTULO VI – EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA.....	296
7.1.	Introdução.....	196
7.2.	Parte experimental.....	198
7.2.1.	Material.....	198
7.2.2.	Condições de estudo.....	201
7.3.	Resultados e discussão.....	205
8.	CAPÍTULO VII – POLIMORFISMO.....	220
8.1.	Introdução.....	220
8.2.	Parte experimental.....	224
8.2.1.	Material.....	224
8.2.2.	Condições de estudo.....	227

8.3.	Resultados e discussão.....	230
9.	CONCLUSÕES.....	247
10.	ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	249
11.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	250
	ANEXO A – PROPOSTA DE MONOGRAFIA FARMACOPEICA.....	269

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química das sulfonilureias.....	26
Figura 2	Estrutura química dos radicais das sulfonilureias.....	27
Figura 3	Estrutura química da glimepirida.....	36
Figura 4	Estrutura química de produtos de degradação da glimepirida.....	37
Figura 5	Espectro de absorção de glimepirida-SR, na concentração de 10 µg mL <sup>-1</sup> e placebos dos produtos Amaryl <sup>®</sup> 1, 2 e 4 mg, utilizando NaOH 5 mmol L <sup>-1</sup> como solvente.....	79
Figura 6	Espectro de absorção de segunda derivada de glimepirida-SR, na concentração de 10 µg mL <sup>-1</sup> e placebos dos produtos Amaryl <sup>®</sup> 1, 2 e 4 mg, utilizando NaOH 5 mmol L <sup>-1</sup> como solvente.....	80
Figura 7	Superfície de resposta de otimização de método analítico para determinação de glimepirida em comprimidos por cromatografia líquida de alta eficiência. As condições selecionadas foram: 34% de tampão fosfato pH 6,5 (27,5 mmol L <sup>-1</sup> ).....	109
Figura 8	Cromatogramas de brancos. (a) mistura de todos os brancos na proporção 1:1:1:1 (v/v/v/v), (b): HCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> , (c): H <sub>2</sub> O (d): NaOH 0,1 mol L <sup>-1</sup> e (e): H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . Os brancos foram submetidos à temperatura constante de 90°C por 360 minutos e diluídos 10 vezes em fase móvel. Fase móvel composta de tampão fosfato de sódio (27,5 mmol L <sup>-1</sup> ; pH 6,5) e metanol (34:66, v/v), coluna C-18 Waters Symmetry <sup>®</sup> como fase estacionária, detecção no UV a 228 nm, volume de injeção 20 µL, temperatura da coluna de 25° C e vazão a 1 mL min <sup>-1</sup> .....	111
Figura 9	Cromatogramas de glimepirida substância de referência contendo todos os possíveis produtos de degradação (a), glimepirida substância de referência submetida à degradação ácida (b), glimepirida substância de referência submetida à degradação neutra (c), glimepirida substância de referência submetida à degradação alcalina (d), glimepirida substância de referência submetida à degradação oxidativa (e). As amostras foram submetidas à temperatura constante de 90°C por 360 minutos e diluídas 10 vezes em fase móvel antes de serem analisadas pelo método cromatográfico. Os possíveis produtos de degradação foram codificados como A, B, C, D, E e F, baseados na ordem de eluição. Fase móvel composta de tampão fosfato de sódio (27,5 mmol L <sup>-1</sup> ; pH 6,5) e metanol (34:66, v/v), coluna C-18 Waters Symmetry <sup>®</sup> como fase estacionária, detecção no UV a 228 nm, volume de injeção 20 µL, temperatura da coluna de 25° C e vazão a 1 mL min <sup>-1</sup> .....	112

- Figura 10 Cromatogramas de glimepirida substância de referência contendo todos os possíveis produtos de degradação (a), soluções placebo dos produtos Amaryl<sup>®</sup> 1 mg (b), soluções placebo dos produtos Amaryl<sup>®</sup> 2 mg (c), soluções placebo dos produtos Amaryl<sup>®</sup> 4 mg (d). Fase móvel composta de tampão fosfato de sódio (27,5 mmol L<sup>-1</sup>; pH 6,5) e metanol (34:66, v/v), coluna C-18 Waters Symmetry<sup>®</sup> como fase estacionária, detecção no UV a 228 nm, volume de injeção 20 µL, temperatura da coluna de 25° C e vazão a 1 mL min<sup>-1</sup>..... 114
- Figura 11 Espectros de massas obtidos no tempo de análise da glimepirida após separação cromatográfica, sob as condições otimizadas. (a) glimepirida substância de referência, (b) glimepirida substância de referência submetida à degradação ácida, (c) glimepirida substância de referência submetida à degradação neutra, (d) glimepirida substância de referência submetida à degradação alcalina, (e) glimepirida substância de referência submetida à degradação oxidativa. m/z 491 = glimepirida (M + H); m/z 513 = glimepirida com aduto de sódio (M+H+Na); m/z 529 = glimepirida com aduto de potássio (M+H+K) e m/z 352 = íon fragmento de 491, formado na fonte. Fase móvel composta de tampão fosfato de sódio (27,5 mmol L<sup>-1</sup>; pH 6,5) e metanol (34:66, v/v), coluna C-18 Waters Symmetry<sup>®</sup> como fase estacionária, detecção no UV a 228 nm, volume de injeção 20 µL, temperatura da coluna de 25° C e vazão a 1 mL min<sup>-1</sup>. Condições do detector de massas: Fonte de ionização: *electrospray* positivo (ESI (+)), divisor de vazão na interface HPLC/MS: 130 µL min<sup>-1</sup>, potencial do capilar: -4500 V, temperatura do gás secante: 300 °C, vazão do gás secante: 8,0 L min<sup>-1</sup>, pressão de nebulização: 30 psi, quantidade de íons acumulados no *Ion-Trap*: 40000, tempo máximo de acúmulo de íons: 200 ms, skimmer: 40 volts, cap exit: 129, 5 volts, Oct 1: 12 volts, Oct 2: volts V, trap drive: 58, 5 volts, oct RF: 189 volts, lens 1: -5,0 volts, Lens 2: - 60,0 volts e intervalo de varredura no modo *full Scan*: 50-500 ou 50-700..... 115
- Figura 12 Critérios de aceitação para ensaios de dissolução aplicados no controle de qualidade de produtos farmacêuticos..... 131
- Figura 13 Perfil de dissolução de comprimidos contendo 4 mg de glimepirida utilizando pá a 50 rpm. (a): tampão fosfato pH 6,8 (50 mmol L<sup>-1</sup>) contendo 0,5% de lauril sulfato de sódio como meio de dissolução, (b): tampão fosfato pH 6,8 (50 mmol L<sup>-1</sup>) como meio de dissolução e (c): tampão fosfato pH 6,8 (50 mmol L<sup>-1</sup>) contendo 0,1% de lauril sulfato de sódio como meio de dissolução. Amostras foram analisadas por CLAE. Fase móvel composta de tampão fosfato de sódio (27,5 mmol L<sup>-1</sup>; pH 6,5) e metanol (34:66 v/v), coluna Waters<sup>®</sup> Symmetry C-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) como fase estacionária, detecção no UV a 228 nm e volume de injeção de 20 µL..... 145

Figura 14	Perfis de dissolução de comprimidos contendo 4 mg de glimepirida utilizando pá a 50, 75 e 100 rpm e tampão fosfato pH 6,8 (50 mmol L <sup>-1</sup> ) contendo 0,1% de lauril sulfato de sódio como meio de dissolução. Amostras foram analisadas por CLAE. Fase móvel composta de tampão fosfato de sódio (27,5 mmol L <sup>-1</sup> ; pH 6,5) e metanol (34:66 v/v), coluna Waters <sup>®</sup> Symmetry C-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) como fase estacionária, detecção no UV a 228 nm e volume de injeção de 20 µL.....	148
Figura 15	Perfis de dissolução de comprimidos contendo 4 mg de glimepirida utilizando cesta a 50, 75 e 100 rpm e tampão fosfato (pH 6,8; 50 mmol L <sup>-1</sup> ) contendo 0,1% de lauril sulfato de sódio como meio de dissolução. Amostras foram analisadas por CLAE. Fase móvel composta de tampão fosfato de sódio (27,5 mmol L <sup>-1</sup> ; pH 6,5) e metanol (34:66 v/v), coluna Waters <sup>®</sup> Symmetry C-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) como fase estacionária, detecção no UV a 228 nm e volume de injeção de 20 µL.....	149
Figura 16	Cromatograma de placebo em tampão fosfato (pH 6,8; 50 mmol L <sup>-1</sup> ) contendo 0,1% de lauril sulfato de sódio. A solução placebo foi submetida ao ensaio de dissolução usando pá por 1 h a 150 rpm. Fase móvel composta de tampão fosfato de sódio (27,5 mmol L <sup>-1</sup> ; pH 6,5) e metanol (34:66 v/v), coluna Waters <sup>®</sup> Symmetry C-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) como fase estacionária, detecção no UV a 228 nm e volume de injeção de 20 µL.....	151
Figura 17	Cromatograma de glimepirida substância química de referência em tampão fosfato (pH 6,8; 50 mmol L <sup>-1</sup> ) contendo 0,1% de lauril sulfato de sódio.....	152
Figura 18	Média das durezas de Amaryl <sup>®</sup> 4 mg, produto A, produto B e produto C, obtidas nos tempos 0, 3 e 6 meses do estudo de estabilidade acelerada. Valores médios que diferem estatisticamente dos valores obtidos no tempo zero, ao nível de significância de 5% (utilizando-se ANOVA), foram marcados com asteriscos.....	172
Figura 19	Média dos percentuais de dissoluções de Amaryl <sup>®</sup> 4 mg, produto A, produto B e produto C, obtidas nos tempos 0, 3 e 6 meses do estudo de estabilidade acelerada. Valores médios que diferem estatisticamente dos valores obtidos no tempo zero, ao nível de significância de 5% (utilizando-se ANOVA), foram marcados com asteriscos.....	174
Figura 20	Média dos teores de Amaryl <sup>®</sup> 4 mg, produto A, produto B e produto C, obtidas nos tempos 0, 3 e 6 meses do estudo de estabilidade acelerada. Valores médios que diferem estatisticamente dos valores obtidos no tempo zero, ao nível de significância de 5% (utilizando-se ANOVA), foram marcados com asteriscos.....	177

Figura 21	Média das áreas de produto de degradação de Amaryl <sup>®</sup> 4 mg, produto A, produto B e produto C, obtidas nos tempos 0, 3 e 6 meses do estudo de estabilidade acelerada. Valores médios que diferem estatisticamente dos valores obtidos no tempo zero, ao nível de significância de 5% (utilizando-se ANOVA), foram marcados com asteriscos.....	179
Figura 22	Média dos valores obtidos nos ensaios de dureza de Amaryl <sup>®</sup> 4 mg, produto A, produto B e produto C, obtidas nos tempos 0, 3, 6, 9 e 12 meses do estudo de estabilidade de longa duração. Valores que apresentam média estatisticamente maior do que valores obtidos no tempo zero, ao nível de significância de 5% (utilizando-se ANOVA), foram marcados com asteriscos vermelhos. Valores que apresentam média estatisticamente menor do que valores obtidos no tempo zero, ao nível de significância de 5% (utilizando-se ANOVA), foram marcados com asteriscos pretos.....	183
Figura 23	Média dos percentuais de dissolução de Amaryl <sup>®</sup> 4 mg, produto A, produto B e produto C, obtidas nos tempos 0, 3, 6, 9 e 12 meses do estudo de estabilidade de longa duração. Valores médios que diferem estatisticamente dos valores obtidos no tempo zero, ao nível de significância de 5% (utilizando-se ANOVA), foram marcados com asteriscos.....	186
Figura 24	Média dos teores de Amaryl <sup>®</sup> 4 mg, produto A, produto B e produto C, obtidas nos tempos 0, 3, 6, 9 e 12 meses do estudo de estabilidade de longa duração. Valores médios que diferem estatisticamente dos valores obtidos no tempo zero, ao nível de significância de 5% (utilizando-se ANOVA), foram marcados com asteriscos.....	188
Figura 25	Média das áreas de produto de degradação de Amaryl <sup>®</sup> 4 mg, produto A, produto B e produto C, obtidas nos tempos 0, 3, 6, 9 e 12 meses do estudo de estabilidade de longa duração. Valores médios que diferem estatisticamente dos valores obtidos no tempo zero, ao nível de significância de 5% (utilizando-se ANOVA), foram marcados com asteriscos.....	191
Figura 26	Varição de peso de vinte comprimidos de Amaryl <sup>®</sup> 4 mg, com eixo y representando limite de $\pm 7,5\%$ em relação ao peso médio.....	206
Figura 27	Varição de peso de vinte comprimidos de produto A, com eixo y representando limite de $\pm 7,5\%$ em relação ao peso médio.....	206
Figura 28	Varição de peso de vinte comprimidos de produto B, com eixo y representando limite de $\pm 7,5\%$ em relação ao peso médio.....	207
Figura 29	Varição de peso de vinte comprimidos de produto C, com eixo y representando limite de $\pm 7,5\%$ em relação ao peso médio.....	207

Figura 30	Perfis de dissolução de Amaryl <sup>®</sup> 4 mg, produto A, produto B e produto C, sob condições otimizadas.....	214
Figura 31	Difratogramas de formas polimórficas de glimepirida.....	231
Figura 32	Espectros de infravermelho de formas polimórficas de glimepirida.....	232
Figura 33	Curvas de DSC de formas polimórficas de glimepirida.....	234
Figura 34	Microscopia eletrônica de varredura de formas polimórficas de glimepirida.....	235
Figura 35	Perfis de dissolução de comprimidos contendo 4 mg de formas polimórficas de glimepirida.....	236
Figura 36	Difratogramas de placebo, de mistura de placebo + forma polimórfica I da glimepirida e de mistura de placebo + forma polimórfica II da glimepirida.....	238
Figura 37	Espectros de infravermelho de placebo, de mistura de placebo + forma polimórfica I da glimepirida e de mistura de placebo + forma polimórfica II da glimepirida.....	240
Figura 38	Curvas de DSC de placebo, de mistura de placebo + forma polimórfica I da glimepirida e de mistura de placebo + forma polimórfica II da glimepirida.....	242

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Métodos para determinação de glimepirida em fluidos biológicos e formas farmacêuticas.....	39
Tabela 2	Concentrações das soluções do teste de recuperação aplicado à amostra de glimepirida usando método de espectrofotometria derivada na região UV 279,0; 257,5 e 256,3 nm para quantificação dos produtos Amaryl <sup>®</sup> 1 mg, Amaryl <sup>®</sup> 2 mg e Amaryl <sup>®</sup> 4 mg, respectivamente.....	73
Tabela 3	Variáveis e seus níveis usados em estudo de robustez, de acordo com teste de robustez de Youden e Steiner.....	74
Tabela 4	Solventes testados no desenvolvimento de método espectrofotométrico para determinação de glimepirida em comprimidos.....	77
Tabela 5	Valores experimentais obtidos na construção da curva analítica para glimepirida em 279,0 nm.....	82
Tabela 6	Valores experimentais obtidos na construção da curva analítica para glimepirida em 257,5 nm.....	83
Tabela 7	Valores experimentais obtidos na construção da curva analítica para glimepirida em 256,3 nm.....	84
Tabela 8	Parâmetros obtidos a partir dos valores experimentais das curvas analíticas de glimepirida.....	85
Tabela 9	Valores obtidos no teste de precisão de método de espectrofotometria derivada de segunda ordem em 279,0; 257,5 e 256,3 nm.....	86
Tabela 10	Valores obtidos no teste de recuperação de glimepirida-SR utilizando espectrofotometria derivada de segunda ordem em 279,0 nm para o produto Amaryl <sup>®</sup> 1 mg.....	87
Tabela 11	Valores obtidos no teste de recuperação de glimepirida-SR utilizando espectrofotometria derivada de segunda ordem em 257,5 nm para o produto Amaryl <sup>®</sup> 2 mg.....	87
Tabela 12	Valores obtidos no teste de recuperação de glimepirida-SR utilizando espectrofotometria derivada de segunda ordem em 256,3 nm para o produto Amaryl <sup>®</sup> 4 mg.....	87
Tabela 13	Valores obtidos no teste de robustez.....	88

Tabela 14	Valores de efeitos obtidos de acordo com o teste de Youden e Steiner.....	89
Tabela 15	Estudo de estabilidade de glimepirida em solução de NaOH 5 mmol L <sup>-1</sup> .....	90
Tabela 16	Análise de variância de respostas analíticas no estudo de estabilidade de glimepirida em solução de NaOH 5 mmol L <sup>-1</sup> .....	91
Tabela 17	Valores experimentais de comprimidos de glimepirida, obtidos por espectrofotometria derivada de primeira ordem na região UV.....	92
Tabela 18	Fatores e níveis empregados na construção de planejamento fatorial completo 2 <sup>3</sup> .....	96
Tabela 19	Planejamento fatorial completo 2 <sup>3</sup> utilizado na otimização de método analítico para determinação de glimepirida em comprimidos por cromatografia líquida de alta eficiência.....	98
Tabela 20	Matriz de Doehlert utilizada na otimização final de método analítico para determinação de glimepirida em comprimidos por cromatografia líquida de alta eficiência.....	100
Tabela 21	Concentrações das soluções do teste de recuperação aplicado à amostra de glimepirida usando método de cromatografia líquida de alta eficiência.....	105
Tabela 22	Variáveis e seus níveis usadas em estudo de robustez, de acordo com teste de robustez de Youden e Steiner.....	106
Tabela 23	Planejamento fatorial completo 2 <sup>3</sup> utilizado na otimização de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de glimepirida em comprimidos.....	107
Tabela 24	Valores experimentais obtidos na construção da curva analítica de glimepirida	117
Tabela 25	Parâmetros obtidos a partir dos valores experimentais da curva analítica de glimepirida.....	118
Tabela 26	Valores obtidos no teste de precisão de método de cromatografia líquida de alta eficiência.....	118
Tabela 27	Valores obtidos no teste de recuperação de glimepirida-SR utilizando cromatografia líquida de alta eficiência para o produto Amaryl <sup>®</sup> 1 mg.....	119
Tabela 28	Valores obtidos no teste de recuperação de glimepirida-SR utilizando cromatografia líquida de alta eficiência para o produto Amaryl <sup>®</sup> 2 mg.....	119

Tabela 29	Valores obtidos no teste de recuperação de glimepirida-SR utilizando cromatografia líquida de alta eficiência para o produto Amaryl <sup>®</sup> 4 mg.....	120
Tabela 30	Valores obtidos no teste de robustez de método por cromatografia líquida de alta eficiência.....	120
Tabela 31	Valores de efeitos obtidos de acordo com o teste de Youden e Steiner.....	121
Tabela 32	Valores experimentais de comprimidos de glimepirida, obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência.....	122
Tabela 33	Variáveis e seus níveis usadas em estudo de robustez, de acordo com teste de robustez de Youden e Steiner.....	143
Tabela 34	Solventes testados na determinação das condições <i>sink</i> para estabelecimento de meio de dissolução para glimepirida comprimidos.....	144
Tabela 35	Valores experimentais obtidos na construção da curva analítica para glimepirida para validação de ensaio de dissolução.....	153
Tabela 36	Parâmetros obtidos a partir dos valores experimentais da curva analítica de glimepirida.....	154
Tabela 37	Valores obtidos no teste de precisão de ensaio de dissolução de comprimidos contendo 4 mg de glimepirida.....	155
Tabela 38	Valores obtidos no teste de recuperação de glimepirida após realização de ensaio de dissolução.....	156
Tabela 39	Valores obtidos no teste de robustez de ensaio de dissolução para comprimidos contendo 4 mg de glimepirida.....	157
Tabela 40	Valores de efeitos obtidos de acordo com o teste de Youden e Steiner.....	157
Tabela 41	Valores encontrados nos ensaios de dureza de comprimidos contendo 4 mg de glimepirida no tempo 0 e após 3 e 6 meses sob condições de degradação acelerada.....	171
Tabela 42	Ensaio de dissolução de comprimidos contendo 4 mg de glimepirida, realizados no tempo 0 e após 3 e 6 meses sob condições de degradação acelerada.....	173
Tabela 43	Ensaio de teor de comprimidos contendo 4 mg de glimepirida, realizados no tempo 0 e após 3 e 6 meses sob condições de degradação acelerada.....	176

Tabela 44	Área média de produto de degradação de comprimidos contendo 4 mg de glimepirida no tempo 0 e após 3 e 6 meses sob condições de degradação acelerada.....	178
Tabela 45	Valores de dureza de comprimidos contendo 4 mg de glimepirida, submetidos a condições de degradação de longa duração por 3, 6, 9 e 12 meses.....	181
Tabela 46	Percentual de dissolução de comprimidos contendo 4 mg de glimepirida, submetidos a condições de degradação de longa duração por 3, 6, 9 e 12 meses.....	185
Tabela 47	Teor de comprimidos contendo 4 mg de glimepirida, submetidos a condições de degradação de longa duração por 3, 6, 9 e 12 meses.....	187
Tabela 48	Área média de produto de degradação de comprimidos contendo 4 mg de glimepirida sob condições de degradação de longa duração após 3, 6, 9 e 12 meses.....	190
Tabela 49	Peso individual dos comprimidos contendo 4 mg de glimepirida, peso médio e respectivos coeficientes de variação.....	205
Tabela 50	Friabilidade de Amaryl <sup>®</sup> 4 mg, produto A, produto B e produto C.....	208
Tabela 51	Tempos de desintegração de Amaryl <sup>®</sup> 4 mg, produto A, produto B e produto C.....	209
Tabela 52	Dureza de Amaryl <sup>®</sup> 4 mg, produto A, produto B e produto C.....	210
Tabela 53	Teor de Amaryl <sup>®</sup> 4 mg, produto A, produto B e produto C.....	210
Tabela 54	Uniformidade de conteúdo de Amaryl <sup>®</sup> 4 mg, produto A, produto B e produto C.....	211
Tabela 55	Dissolução de Amaryl <sup>®</sup> 4 mg, produto A, produto B e produto C.....	212
Tabela 56	Fatores de diferença (f1) e fatores de semelhança (f2) obtidos na comparação entre perfis de dissolução de Amaryl <sup>®</sup> 4 mg e produtos similares (produto A, produto B e produto C).....	215
Tabela 57	Parâmetros estatísticos dos estudos de regressão aplicando modelo de ordem zero e primeira ordem, derivados dos perfis de dissolução dos produtos Amaryl <sup>®</sup> 4 mg, produto A, produto B e produto C após o ensaio de dissolução sob condições otimizadas.....	216

Tabela 58	Valores da constante de velocidade de dissolução (k), meia-vida de dissolução ( $t_{50\%}$ ) e eficiência de dissolução (ED%) para Amaryl <sup>®</sup> 4 mg, produto A, produto B e produto C.....	217
-----------	--	-----

## 1. INTRODUÇÃO

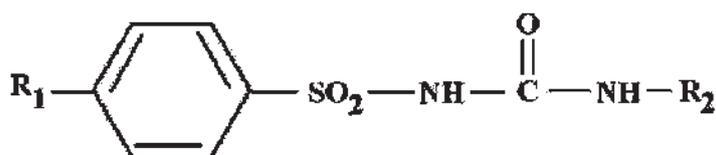
O diabetes mellitus (DM) representa um grupo de doenças metabólicas crônicas caracterizadas por hiperglicemia, resultante de defeitos na secreção de insulina e/ou em sua ação. De uma forma geral, existem dois tipos de diabetes: tipo 1 e tipo 2. O diabetes tipo 1 inclui os casos que podem ser atribuídos a um processo auto imune e/ou destruição das células beta-pancreáticas por mecanismo desconhecido. O tipo 2 representa a forma mais comum, resultante de defeito na secreção de insulina ou resistência à mesma (QUEIROZ et al., 2011). O diabetes do tipo 2 alcançou proporções epidêmicas, afetando 190 milhões de pessoas no mundo, com expectativas de que este número possa exceder 300 milhões de pessoas acometidas até 2025 (JOHNSON et al., 2008).

Várias complicações se desenvolvem como consequência das desordens metabólicas causadas pelo diabetes. Muitas destas são resultantes de doenças dos vasos sanguíneos, como doenças macrovasculares ou microangiopatias. Doenças macrovasculares consistem de aterosclerose acelerada e suas complicações trombóticas. Microangiopatias afetam particularmente as retinas, rins e nervos periféricos (RANG et al., 2004).

O impacto do *diabetes mellitus* na saúde do indivíduo, no sistema de saúde e na sociedade como um todo é significativo e tem continuado a crescer substancialmente (CHENG, LEITER, 2009). Vários pacientes iniciam o tratamento desta doença com dieta e exercício, mas, infelizmente, a maioria dos pacientes não obtém sucesso no controle do diabetes apenas com modificação no estilo de vida e necessitam de farmacoterapia. Os agentes orais são considerados a terapia de primeira escolha entre os medicamentos utilizados no tratamento do diabetes do tipo 2, devido à sua ampla faixa de eficácia,

segurança e variedade de mecanismos de ação (FOWLER, 2007). Dentre os fármacos antidiabéticos orais, as sulfonilureias têm sido amplamente utilizadas, devido ao seu sucesso na maioria dos estudos clínicos (MATTHEWS, WALLACE, 2005).

As sulfonilureias foram descobertas acidentalmente em 1942 por Janbon e colaboradores, ao observarem que algumas sulfonamidas causavam hipoglicemia em animais de laboratório. Pouco depois, a 1-butil-3-sulfonilureia (carbutamida) tornou-se a primeira sulfonilureia clinicamente útil para o tratamento do diabetes e, posteriormente, esta substância levou ao desenvolvimento de toda a classe de sulfonilureias (DAVIS, 2006). As sulfonilureias são os fármacos antidiabéticos orais mais comumente prescritos pela classe médica. Possuem um radical sulfona ligado a um grupo ureia. Todos os membros desta classe são, portanto, arilsulfonilureias substituídas, diferindo por substituições na posição *para* do anel de benzeno ( $R_1$ ) e em um resíduo de nitrogênio do componente ureia ( $R_2$ ) (DAVIS, 2006; SILVA, 2006). Suas relações estruturais estão demonstradas na Figura 1.

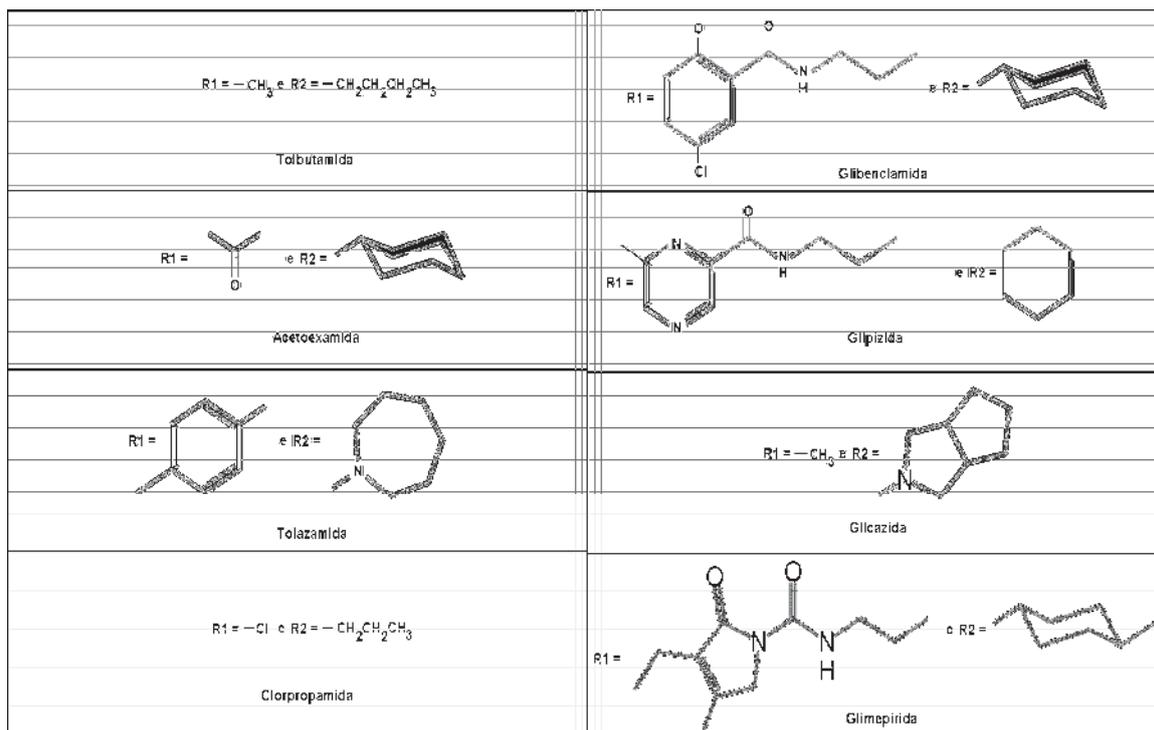


**Figura 1.** Estrutura química das sulfonilureias.

A principal ação das sulfonilureias consiste em aumentar a liberação de insulina do pâncreas, reduzindo, assim o nível plasmático de glicose (RANG et al., 2004). As sulfonilureias são divididas em dois grupos ou gerações de agentes. O primeiro inclui

## CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

tolbutamida, acetoxamida, tolazamida e clorpropamida. A segunda geração, mais potente, inclui gliburida (glibenclamida), glipizida, glicazida e glimepirida (DAVIS, 2006). As estruturas químicas dos seus radicais estão demonstradas na Figura 2.



**Figura 2.** Estrutura química dos radicais das sulfonilureias.

As sulfonilureias de segunda geração são mais frequentemente prescritas, visto que apresentam menos efeitos adversos e menos interações medicamentosas (KATZUNG, 2006; KOROLKOVAS, FRANÇA, 2006).

Uma sulfonilureia de segunda geração que é particularmente importante é a glimepirida, pois este fármaco é amplamente utilizado no tratamento do diabetes do tipo 2 e encontra-se disponível em mais de 60 países (MASSI-BENEDETTI, 2003). A glimepirida

apresenta vantagens sobre as outras sulfonilureias, porque este fármaco produz potente ação redutora da glicose sanguínea em uma menor dosagem, com administração uma vez ao dia (ROBKAMP, 1996).

Apesar da glimepirida não constar em nenhuma lista brasileira de medicamentos essenciais (BOMFIM, 2007), uma busca no site da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) revelou que existem 42 diferentes produtos farmacêuticos contendo o princípio ativo glimepirida registrados no Brasil (BRASIL, 2011). Além disso, foram encontrados alguns estudos que demonstram uma relevante utilização deste fármaco dentre os antidiabéticos orais. Um estudo realizado por Bazote, Silva e Koyashiki (2005) mostrou que a glimepirida é a segunda sulfoniluréia mais utilizada no município de Londrina-PR, sendo seguida pela glicazida, clorpropamida e glipizida. Outro estudo realizado por Balestre e colaboradores (2007) encontrou uma porcentagem de prescrição de glimepirida de 4,2% no município de Atalaia-PR. Outros antidiabéticos orais prescritos foram a glibenclamida (25,0%), clorpropamida (20,8%), metformina (41,7%) e insulina (8,3%).

A literatura descreve vários estudos analíticos para determinação da glimepirida, empregando técnicas como cromatografia líquida de alta eficiência com detectores de absorção no ultravioleta, arranjo de diodos, espectroscopia de massas (utilizando ionização química à pressão atmosférica ou por *electrospray*), evaporativo com espalhamento de luz e aerosol carregado; cromatografia líquida de alta eficiência multi-dimensional; cromatografia eletrocínética micelar; cromatografia em camada delgada de alta eficiência; polarografia e espectrofotometria (BONFILIO, ARAÚJO, SALGADO, 2010). As monografias propostas pela farmacopeia americana (USP, 2011) e farmacopeia europeia (EP, 2008) para análise de matéria-prima são baseadas em dois diferentes métodos: um

---

método para a determinação da impureza glimepirida *cis*-isômero utilizando cromatografia de modo normal e um segundo método para a determinação de glimepirida e outras substâncias relacionadas por cromatografia de fase reversa. Entretanto, as técnicas cromatográficas descritas para análise de glimepirida e seus produtos de degradação demandam um considerável tempo de análise (mais de 20 minutos) e nenhum estudo descreve um método indicador de estabilidade para comprimidos. Além disso, o ensaio de dissolução preconizado pela USP 2011 (900 mL de tampão fosfato pH 7,8 como meio de dissolução e aparato pá a 75 rpm) não simula as condições do trato gastrointestinal e não há relatos da influência do polimorfismo sobre comprimidos de glimepirida.

Considerando a importância da glimepirida no tratamento do diabetes do tipo 2, faz-se necessário novas pesquisas nesta área para desenvolvimento e validação de métodos analíticos para quantificação do fármaco na presença de produtos de degradação, desenvolvimento de ensaio de dissolução para o produto, avaliação da qualidade de produtos farmacêuticos comercializados no mercado nacional e o estudo de equivalência farmacêutica para medicamentos similares, que irão subsidiar os estudos de eficácia clínica destes medicamentos. Sabe-se também que a habilidade de identificar as formas sólidas de um fármaco é um conhecimento crítico para garantir a qualidade dos medicamentos, o que justifica a avaliação do impacto do polimorfismo na qualidade dos comprimidos, também proposta neste trabalho.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Propriedades farmacológicas

O mecanismo de ação primário da glimepirida se deve à sua ligação a um receptor de alta afinidade (denominado subunidade SUR) nos canais de potássio sensíveis ao ATP, na membrana plasmática das células  $\beta$ -pancreáticas. Essa ligação inibe a condutância dos canais aos íons potássio, causando despolarização, o que por sua vez resulta no influxo de cálcio e secreção de insulina pré-formada (PAGE et al., 2004; RANG et al., 2004; KATZUNG, 2006; KOROLKOVAS, FRANÇA, 2006). O receptor de sulfonilureias é composto de duas unidades, compreendendo um canal formador de poro e duas subunidades regulatórias (KRAMER, MULLER, GEISEN, 1996).

Efeitos extra-pancreáticos podem também desempenhar um papel na atividade de glimepirida. O fármaco melhora a sensibilidade à insulina e também aumenta o número de moléculas transportadoras de glicose na membrana plasmática do tecido adiposo e muscular, melhorando assim a captação de glicose. Além disso, a glimepirida ativa a síntese de glicogênio e a lipogênese, além de inibir a gliconeogênese (MULLER, SATOH, GEISE, 1995; MULLER, 2000; REDDY et al., 2000; HYDRIE et al., 2006). Entretanto, como nas outras sulfonilureias, o mecanismo pelo qual a glimepirida diminui a glicose sanguínea na administração a longo tempo não foi claramente estabelecido. A glimepirida é efetiva no controle da glicose sanguínea sem causar alterações deletérias nos perfis de lipoproteínas plasmáticas dos pacientes (FDA, 2011).

A glimepirida possui benefícios terapêuticos em relação a outras sulfonilureias, como a glibenclamida (HAMAGUCHI et al., 2004). O fármaco apresenta longa duração de ação, com meia-vida de 5 horas, permitindo a sua administração uma vez ao dia, com conseqüente melhora da aderência do paciente ao tratamento. Além disso, alcança controle metabólico com as menores doses de todas as sulfonilureias (1 a 8 mg diariamente) (SONNENBERG et al., 1997). Este fármaco também mantém uma melhor regulação fisiológica de secreção de insulina do que a glibenclamida durante o exercício físico (DRAEGER et al., 1996).

Após a administração oral, a glimepirida é completamente absorvida (100%) após 1 hora e sua absorção não é afetada pela ingestão de alimentos (HARRIGAN, NATHAN, BEATTIE, 2001). O tempo requerido para o fármaco alcançar o efeito máximo é cerca de duas a três horas (FDA, 2011). Após dose intravenosa em indivíduos normais, o volume de distribuição foi 8,8 L (113 mL/kg) e a depuração corporal foi de 47,8 mL/min. A ligação das proteínas foi maior do que 99,5% (FDA, 2011).

Este fármaco é totalmente metabolizado através de biotransformação após dose oral ou intravenosa. O sistema enzimático citocromo P450 2C9 transforma a glimepirida no seu derivado cicloexil hidroximetil (M1), o qual é posteriormente metabolizado pelas enzimas citosólicas ao derivado carboxil (M2) (LEHR, DAMM, 1990). Aproximadamente 60% da glimepirida e seus metabólitos são excretados na urina e 40% são excretados nas fezes (FDA, 2011). Não foram observadas diferenças entre o perfil farmacocinético de pessoas do sexo masculino e o perfil farmacocinético de pessoas do sexo feminino quando a dose de glimepirida foi ajustada pelas diferenças entre os pesos corporais (FDA, 2011). Após

uma única dose, sua meia-vida de eliminação é de 5 horas e aumenta para nove horas após múltiplas doses (CAMPBELL, 1998).

Os efeitos adversos mais comuns são cefaleia e tontura. Hiponatremia, leucopenia, trombocitopenia e anemia são complicações raras. Os efeitos de interação são similares aos observados com as outras sulfonilureias de segunda geração. Entretanto, cimetidina e ranitidina não afetam seu efeito. Existem evidências de que propranolol aumente sua concentração em cerca de 20% (HARRIGAN, NATHAN, BEATTIE, 2001).

Em uma comparação clínica randomizada envolvendo 304 pacientes com diabetes do tipo 2, a administração dose-dependente de glimepirida comparada com placebo reduziu significativamente os níveis de glicose plasmática ( $P < 0,001$ ) (GOLDBERG, HOLVEY, SCHNEIDER, 1996). Em um estudo multicêntrico e randomizado de grupos paralelos, um controle metabólico equivalente foi alcançado com glimepirida e glicazida (MASSI-BENEDETTI, 2003). Uma análise de 6 estudos multicêntricos envolvendo mais de 2400 pacientes, cujo diabetes não foi efetivamente controlada com dieta e exercício, mostrou que glimepirida foi tão efetiva no controle metabólico quanto glipizida e glibenclamida. Entretanto, neste estudo os níveis de glicose sanguínea foram mais rapidamente reduzidos nas primeiras semanas de tratamento com glimepirida comparado à glipizida ( $p < 0,05$ ) (CLARK, GOLDBERG, 1997).

Uma revisão de dados obtidos de triagens clínicas controladas em 2013 pacientes nos Estados Unidos encontrou que a incidência de eventos adversos foi similar entre glimepirida, glibenclamida, glicazida, glipizida e placebo (SCHNEIDER, 1996). Uma revisão de dados de 20 estudos clínicos envolvendo mais de 6500 pacientes mostrou uma

similaridade de eventos adversos durante o tratamento com glimepirida e outras sulfonilureias (SCHNEIDER, 1996).

As sulfonilureias mais antigas, como a glibenclamida, frequentemente induzem a hipoglicemia como consequência do efeito estimulante da secreção de insulina (SHORR et al., 1997). Entretanto, as mais recentes exercem controle glicêmico com menor liberação de insulina e conseqüentemente com menor tendência de produzir hipoglicemia (MASSI-BENEDITTI, 2003). Em uma triagem multicêntrica comparativa de grupos paralelos, duplo-cega e randomizada, realizada por um ano (DILLS, SCHNEIDER, 1996), a ocorrência cumulativa de hipoglicemia sintomática foi de 1,7% no grupo tratado com glimepirida (n = 289) e de 5,0% no grupo tratado com glibenclamida (n = 288).

Uma revisão da literatura realizada por Robkamp e colaboradores (ROBKAMP, WERNICKE-PANTEN, DRAEGER, 1996) não encontrou episódios de hipoglicemia que ameaçam a vida em 4500 pacientes com diabetes do tipo 2 que receberam tratamento com glimepirida. Em um estudo duplo-cego no qual os pacientes receberam 24 semanas de tratamento com glimepirida (n = 230) ou glicazida (n = 229), foi observado um número similar de pacientes com episódios hipoglicêmicos nos dois grupos tratados (TSUMURA, 1995).

O tratamento com insulina ou secretagogos de insulina é frequentemente associado com ganho de peso. No Reino Unido, em um estudo prospectivo de diabetes, todos os pacientes com diabetes do tipo 2 ganharam peso (aproximadamente 5 kg) durante 10 anos de tratamento com insulina ou glibenclamida (UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY, 1995; UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY, 1998). A glimepirida, entretanto, produziu neutralidade de peso ou mesmo perda em alguns estudos. Em um estudo

envolvendo 22045 pacientes foi relatada perda de peso (HERRMANN, KNIRSCH, KRAUTH, 2000). Em estudo envolvendo 1601 pacientes com diabetes do tipo 2, o tratamento com glimepirida por quatro meses resultou em uma perda de peso média de 2,0 kg (LECHLEITNER, WEITGASSER, 1999).

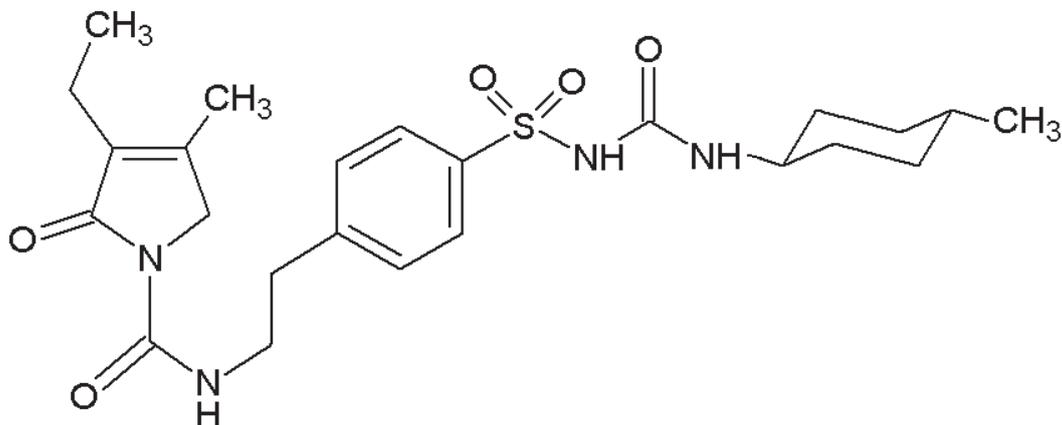
O potencial das sulfonilureias em causar efeitos adversos no sistema cardiovascular foi enfatizado, devido ao tratamento com tolbutamida poder ter sido responsável por um aumento na mortalidade ocasionado por disfunções cardiovasculares (MEINERT et al., 1970). Entretanto, a glimepirida pode estar associada com um reduzido risco de produzir danos no miocárdio, quando comparada com outras sulfonilureias (COLE, MCPHERSON, SONTAG, 1991). Algumas sulfonilureias produzem distúrbios no ritmo cardíaco como consequência de repolarização atrasada do miocárdio (COLE, MCPHERSON, SONTAG, 1991; EL-REYANI et al., 1999). Entretanto, existem evidências de que este fármaco pode prevenir fibrilação ventricular irreversível durante a reperfusão em doses menores do que aquelas usadas rotineiramente para diminuir as concentrações de glicose sanguínea (EL-REYANI et al., 1999). Portanto, ela pode ser mais efetiva em prevenir arritmias cardíacas do que outras sulfonilureias (EL-REYANI et al., 1999; GEISEN et al., 1996; POGATSA, 1996; VEGH, PAPP, 1996).

Em adição à evidência de que glimepirida é uma sulfonilureia efetiva, obtida através de triagens clínicas controladas, uma evidência confirmatória é disponível a partir de um grande número de pacientes que receberam glimepirida na clínica prática diária (MASSI-BENEDITTI, 2003). Um estudo não intervencional de 8 semanas, que incluiu 22045 pacientes, relatou as características demográficas de pacientes que receberam glimepirida, a dose de glimepirida, os valores de HbA<sub>1c</sub> e os eventos adversos (SCHOLZ et al., 2001). As

reduções médias nos níveis de HbA<sub>1c</sub> foi de 1,8% em pacientes que iniciaram recentemente o tratamento, 1,3% em pacientes que mudaram a terapia de outro antidiabético oral para glimepirida e de 1,9% em pacientes obesos que receberam um agente hipoglicemiante pela primeira vez (SCHOLZ et al., 2001). O peso corporal foi reduzido em 1,4 kg em resposta à terapia, sendo que este efeito foi mais pronunciado em pacientes obesos. Um estudo realizado em 30768 pacientes com diabetes do tipo 2 acessou a incidência de hipoglicemia severa induzida por sulfonilureias na prática diária (HOLSTEIN, PLASCHKE, EGBERTS, 2001). Embora glibenclamida e glimepirida foram prescritas com igual frequência durante esse período, os pacientes que receberam glimepirida relataram poucos episódios de hipoglicemia severa (6 episódios com glimepirida e 38 episódios com glibenclamida).

## **2.2. Propriedades físico-químicas**

A glimepirida (CAS 93479-97-1) é um sólido cristalino branco ou branco-amarelado e inodoro, identificada quimicamente como 1-[[[4-[2-(3-etil-4-metil-2-oxo-3-pirrolino-1-carboxamido) etil] fenil] sulfonil]-3-(trans-4-metilcicloexil) ureia (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008). Sua fórmula estrutural está representada na Figura 3.



**Figura 3.** Estrutura química da glimepirida

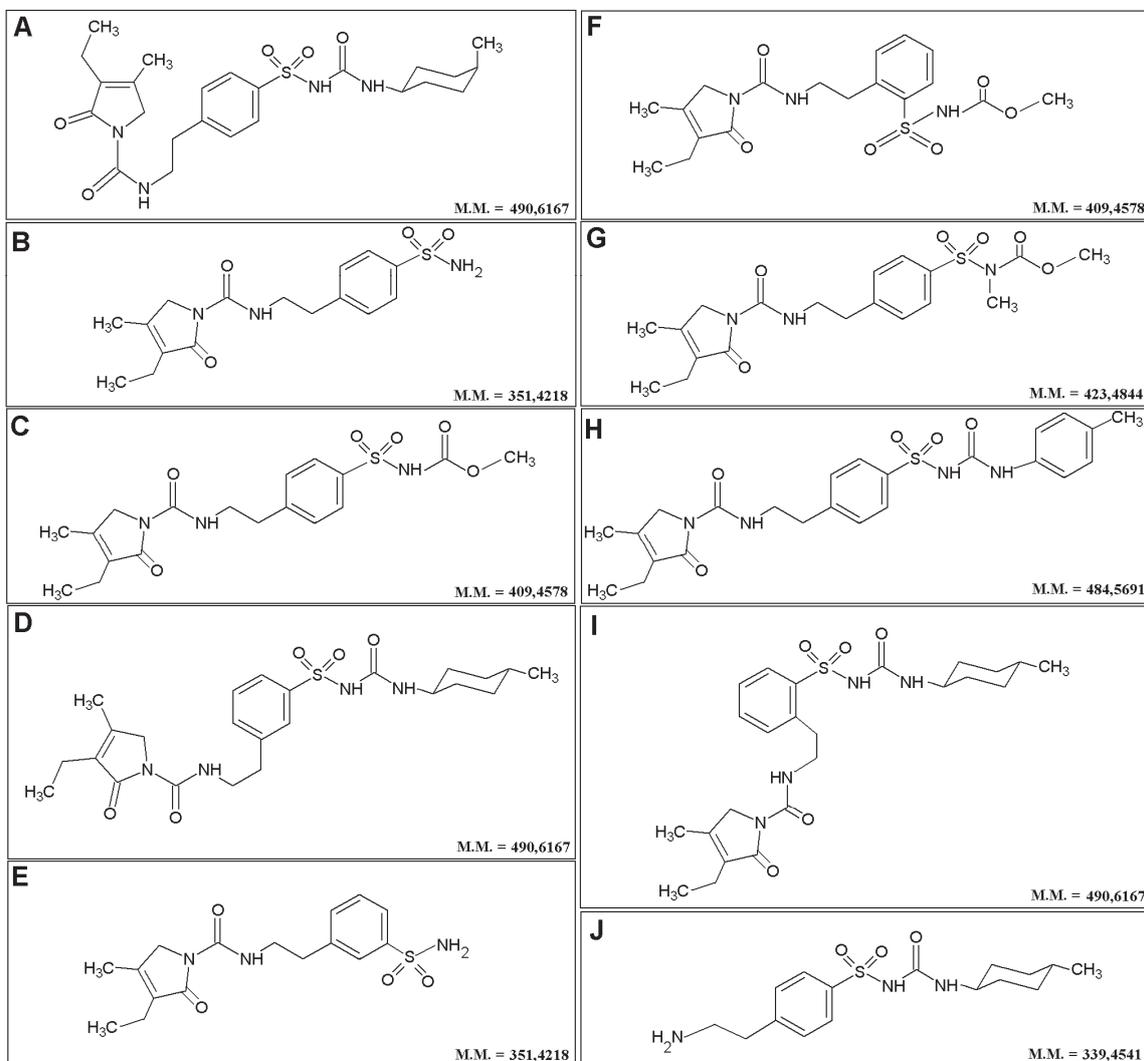
Fonte: adaptado de EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008

Sua fórmula molecular é  $C_{24}H_{34}N_4O_5S$ . Possui peso molecular de 490,62 g/mol (FDA, 2011). É praticamente insolúvel em água, solúvel em dimetilformamida, levemente solúvel em cloreto de metileno e muito pouco solúvel em metanol (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008). Possui pKa de 6,3 e coeficiente de partição óleo-água (log P) de 3,81 (SEEDHER, KANOJIA, 2009). É classificada como fármaco de classe II no sistema de classificação biofarmacêutica (GRBIC et al., 2010).

A estrutura da glimepirida com um grupamento sulfonilureia, um grupo carboxamida, um anel lactâmico e uma carbonila  $\alpha,\beta$ -insaturada favorece a degradação devido à instabilidade destes grupos funcionais frente a hidrólises e fotólises (BANSAL et al., 2008).

Na monografia da matéria-prima da glimepirida da farmacopeia europeia, são descritas dez substâncias relacionadas (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008). Destas, quatro impurezas são também mencionadas na monografia da matéria-prima da glimepirida

da Farmacopeia Americana (USP, 2011). As estruturas químicas destas substâncias estão demonstradas na Figura 4.



**Figura 4.** Estrutura química de produtos de degradação da glimepirida.

Fonte: adaptado de EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008.

A glimepirida possui duas formas polimórficas cristalinas, que foram caracterizadas por difração de raios-X e espectroscopia no infravermelho, sendo designadas como forma I

e forma II. Através da difração de raios-X e da calorimetria exploratória diferencial, confirmou-se que a forma II se transforma na forma I somente acima de 140°C e que cada polimorfo apresenta diferente solubilidade e perfil de dissolução, sendo que a forma II é cerca de 3,5 vezes mais solúvel que a forma I em solventes aquosos (ENDO et al., 2003).

### **2.3. Métodos analíticos para a determinação de glimepirida**

A Tabela 1 apresenta os métodos descritos na literatura para determinação de glimepirida em fluidos biológicos e formas farmacêuticas.

**Tabela 1.** Métodos para determinação de glimepirida em fluidos biológicos e formas farmacêuticas

Método	Condições	Sistema de detecção	Matrizes	Tempo de corrida aproximado	Referência
CLAE	Coluna analítica C-18 como fase estacionária e uma mistura de metanol e solução fosfato de potássio monobásico 0,5 mol L <sup>-1</sup> como fase móvel, usando modo gradiente para determinação dos compostos em soro e modo isocrático para determinação dos metabólitos na urina	Ultravioleta em 350 nm	Soro humano e urina	Não encontrado	LEHR, DAMM, 1990
CLAE	Colunas LiChroCART <sup>®</sup> (125 mm x 2 mm) e Superspher <sup>®</sup> 60 RP Select B. Formato de amônio (0,005 mol L <sup>-1</sup> , pH 3,0) e acetonitrila usados como fase móvel em eluição por gradiente. Vazão de fase móvel em modo de gradiente	Ionização química à pressão atmosférica/ espectrometria de massas	Plasma humano	7 minutos	MAURER et al., 2002
CLAE	Coluna analítica C-18 Capcell Pak (2,0 x 150 mm, 5,0 µm). Acetonitrila e acetato de amônio 0,005 mol L <sup>-1</sup> (60:40 v/v, pH 3,0) como fase móvel	Ionização por eletrospray e espectrometria de massas em tandem	Plasma humano	3 minutos	KIM et al., 2004a
CLAE	Coluna C-18 Capcell Pak (150 mm x 2,0 mm, 5,0 µm). Acetonitrila e água deionizada (pH 3,5) (80:20 v/v) como fase móvel. Vazão de fase móvel a 0,2 mL min <sup>-1</sup>	Ionização por eletrospray e espectrometria de massas em tandem	Plasma humano	2,6 minutos	KIM et al., 2004b

Continua na próxima página

**Tabela 1 (continuação).** Métodos para determinação de glimepirida em fluidos biológicos e formas farmacêuticas

CLAE	Coluna C-18 X-Terra (50 mm × 2,1 mm, 5.0 µm). Tampão acetato de amônio (0,02 mol L <sup>-1</sup> , pH = 3,5); acetonitrila: metanol 40:35:25 (v/v/v) como fase móvel. Vazão de fase móvel a 0,28 mL min <sup>-1</sup>	Ionização por eletrospray e espectrometria de massas em tandem	Plasma humano	2 minutos	SALEM, IDREES, AL TAMIMI, 2004
CLAE	Coluna analítica YMC-Pack Pro C-18 (50 mm x 4,0 mm). Acetonitrila e ácido acético 0,02 mol L <sup>-1</sup> (80:20 v/v) como fase móvel. Vazão de fase móvel a 0,6 mL min <sup>-1</sup>	Ionização por eletrospray e espectrometria de massas em tandem	Plasma humano	1,3 minutos	DOTSIKAS et al., 2005
CLAE	Coluna Hypersil ODS (250 mm × 4,6 mm, 5 µm). Ácido fórmico 0,05 mol L <sup>-1</sup> e acetonitrila (28:72, v/v) como fase móvel. Vazão de 0,3 mL min <sup>-1</sup> e temperatura controlada de 25°C	Ionização por eletrospray e espectrometria de massas em tandem	Plasma humano	4 minutos	PISTOS, KOUTSOPOULOU, PANDERI, 2005
CLAE	Coluna Hypurity C-18 (150 mm x 2,1 mm, 5 µm) e temperatura de 30 °C. Acetonitrila e ácido fórmico em água purificada (50:50 v/v) como fase móvel. Vazão de 0,3 mL min <sup>-1</sup>	Ionização por eletrospray e espectrometria de massas em tandem	Plasma humano	7 minutos	HOIZEY et al., 2005

Continua na próxima página

**Tabela 1 (continuação).** Métodos para determinação de glimepirida em fluidos biológicos e formas farmacêuticas

CLAE	Coluna ACE 5 C-18 (50 mm x 4 mm, 5 µm) a 30 °C. Água, acetonitrila, metanol e ácido acético glacial 20:45:35:0,06 (v/v/v/v) como fase móvel e vazão de 0,5 mL min <sup>-1</sup>	Ionização por eletrospray e espectrometria de massas em tandem	Plasma humano	2 minutos	YÜZÜAK et al., 2007
CLAE	Coluna YMC Propack C-18 (50 mm x 4,6 mm). Tampão acetato de amônio, acetonitrila e metanol (30:60:10, v/v) como fase móvel a 0,5 mL min <sup>-1</sup>	Ionização por eletrospray e espectrometria de massas em tandem	Plasma humano	Não encontrado	CHAKRADHAR et al., 2008
CLAE	Coluna Peerless Basic C-18 (33 mm x 4,6 mm, 5 µm) mantida à temperatura ambiente. Metanol e água (contendo 0,5% de ácido fórmico) 80:20 v/v como fase móvel e vazão de 0,6 mL min <sup>-1</sup>	Ionização por eletrospray e espectrometria de massas em tandem	Plasma humano	6 minutos	SENGUPTA et al., 2009
CLAE Semi-microbore	Extrato injetado diretamente em uma pré-coluna Capcell Pak MF Ph-1 (10 mm x 4,0 mm) usando uma mistura de acetonitrila e tampão fosfato 0,01 Mol L <sup>-1</sup> (pH 2,18) (20:80, v/v) contendo 0,04% de trietilamina. Coluna intermediária: Capcell Pak C-18 UG120 U (35 mm x 2,0 mm). Coluna analítica: Capcell Pak MG C-18 (250 mm x 1,5 mm, 5 µm) usando uma mistura de acetonitrila e tampão fosfato de potássio 10 mMol L <sup>-1</sup> (52:48, v/v, pH 2,18) contendo 0,04% de trietilamina como fase móvel e vazão de 0,1 mL min <sup>-1</sup>	Ultravioleta em 228 nm	Plasma humano	40 minutos	SONG et al., 2004

Continua na próxima página

**Tabela 1 (continuação).** Métodos para determinação de glimepirida em fluidos biológicos e formas farmacêuticas

CEM	Capilares de polimida empacotados com sílica fundida de 50 $\mu\text{m}$ i.d., e 27 ou 47 cm de comprimento	Detecção por arranjo de diodos ou ultravioleta em 200 nm	Plasma humano	10 minutos	NÚÑEZ et al., 1995
CEM	Capilares de sílica de 48,5 cm de comprimento total e 50 $\mu\text{m}$ i.d	Ultravioleta em 200 nm	Plasma humano	5 minutos	MAIER et al., 2009
CLAE	Coluna C-18 (250 mm x 4,0 mm). Tampão fosfato de sódio, pH 2,1 a 2,7 e acetonitrila (50:50, v/v) como fase móvel. Acetonitrila e água (4:1) como solvente e vazão de fase móvel a 1 mL min <sup>-1</sup>	Ultravioleta em 228 nm	Matéria-prima	Não descrito	EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008; USP, 2009
EAM no UV por derivadas	Dimetilformamida como solvente	Métodos pico a pico ( $\Delta_{\text{DMF}} = 263,3\text{--}268,2$ nm), pico a zero ( $\Delta_{\text{DMF}} = 268,2$ nm) e tangente ( $\Delta_{\text{DMF}} = 263,3\text{--}271,8$ nm)	Comprimidos	Não de aplica	ALTINÖZ, TEKELI, 2001
EAM por derivadas	Formação de um complexo entre o fármaco e 2,3,5-trifenil-2H-cloreto de tetrazólio em meio básico. Metanol foi usado como solvente	413,5 nm	Comprimidos	Não se aplica	KHAN et al., 2009
CLAE	Acetonitrila e solução de ácido fórmico a 2%, pH 3,5 (80:20 v/v) como fase móvel e vazão de 0,5 mL min <sup>-1</sup> . Coluna analítica C-18 (250 mm x 4,6 mm, 5 $\mu\text{m}$ )	Ultravioleta em 228 nm	Comprimidos	7 minutos	KHAN et al., 2009

Continua na próxima página

**Tabela 1 (continuação).** Métodos para determinação de glimepirida em fluidos biológicos e formas farmacêuticas

EAM	Solução de hidróxido de sódio (0,1 mol L <sup>-1</sup> ) como solvente	Equações simultâneas, dois comprimentos de onda e espectrofotometria por derivadas	Comprimidos	Não se aplica	GOYAL, SINGHVI, 2007
CLAE	Coluna Phenomenex RP-18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm). Acetonitrila e tampão fosfato (pH 3,0) (65: 35 v/v) como fase móvel. Vazão de fase móvel a 0,5 mL min <sup>-1</sup>	Ultravioleta em 228 nm	Comprimidos	9 minutos	LAKSHMI et al., 2009
EAM no UV por derivadas	Metanol como solvente	260,1; 280,7 e 251,5 nm para detecção de metformina, pioglitazona e glimepirida, respectivamente	Comprimidos	Não se aplica	LAKSHMI et al., 2009
Polarografia	Determinação de glimepirida realizada através de polarografia de varredura linear na presença de K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	Medidas em eletrodo de Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> -KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 6,24 ± 0,1) 0,09 mol L <sup>-1</sup>	Comprimidos	Não se aplica	MA et al., 2005
CCD de alta eficiência	Fase estacionária contendo sílica gel 60 F <sub>254</sub> e tolueno: acetato de etila e metanol (50:45:5 v/v/v) como fase móvel	Ultravioleta em 230 nm	Matéria-prima, comprimidos	Não descrito	PATEL, SUHAGIA, PATEL, 2006

Continua na próxima página

**Tabela 1 (continuação).** Métodos para determinação de glimepirida em fluidos biológicos e formas farmacêuticas

CLAE	Coluna C-18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm). Acetonitrila e tampão fosfato (pH 3,5, 0,03 Mol L <sup>-1</sup> ) (48:52, v/v) como fase móvel. Vazão a 1,0 ml min <sup>-1</sup>	Ultravioleta em 228 nm	Matéria-prima	20 minutos	KOVAŘÍKOVÁ et al., 2004
CLAE	Coluna Cosmosil C-18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm). Citrato de amônio 0,01 mol L <sup>-1</sup> (pH 6,95), acetonitrila e metanol (45:35:20 v/v) como fase móvel. Vazão de 1,0 mL min <sup>-1</sup>	Ultravioleta em 228 nm	Comprimidos	7 minutos	SANE et al., 2004
CLAE	Coluna C-18 Agilent Zorbax XDB (150 x 4,6 mm, 5 µm). Tampão fosfato de sódio contendo dodecil sulfato de sódio pH 7,5 e acetonitrila (68:32, v/v). Vazão de fase móvel a 1 mL min <sup>-1</sup>	Ultravioleta em 228 nm	Comprimidos	9 minutos	KOLTE et al., 2005
CLAE	Coluna Waters Symmetry (50 × 4,6 mm, 3,5 µm). Água e tetraidrofurano (75:25 v/v) como fase móvel. Vazão a 1 mL min <sup>-1</sup>	Ultravioleta em 228 nm	Matéria-prima	6 minutos	PATHARE, JADHAV, SHINGARE, 2007
CLAE	Coluna Nucleosil 100-5SA (250 mm × 4,6 mm, 5 µm). Fase móvel composta de tampão fosfato de amônio monobásico 1,7 % (pH 3,0) e acetonitrila (70:30 v/v). Vazão de fase móvel 1,0 mL min <sup>-1</sup>	Ultravioleta em 228 nm	Comprimidos	12 minutos	PAWAR, MESHRAM, PHADKE, 2008
CLAE	Coluna Phenomenex Luna C8 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm). Fase móvel consistindo de tampão fosfato (pH 7,0), acetonitrila e tetraidrofurano (73:18:09 v/v/v). Vazão de fase móvel a 1,0 mL min <sup>-1</sup>	Ultravioleta em 228 nm	Matéria-prima	53 minutos	KHAN et al., 2005

Continua na próxima página

**Tabela 1 (continuação).** Métodos para determinação de glimepirida em fluidos biológicos e formas farmacêuticas

CLAE	Coluna Inertsil-ODS-3 C-18 (250 mm × 4,60 mm, 5 µm). Fase móvel composta de metanol e tampão fosfato (pH 4,3) (75:25 v/v). Vazão de fase móvel a 1,0 mL min <sup>-1</sup>	Ultravioleta em 258 nm	Comprimidos	11 minutos	JAIN et al., 2008
CLAE	Coluna analítica C8 (150 mm × 4,6 mm, 5 µm). Acetonitrila e acetato de amônio (pH 3,0; 0,02 Mol L <sup>-1</sup> ) (20:80, v/v) como fase móvel. Vazão de 1,0 mL min <sup>-1</sup>	Ultravioleta em 235 nm e espectrometria de massas	Matéria-prima	32 minutos	BANSAL et al., 2008
CLAE	Coluna Inertsil ODS (250 × 4,6 mm, 5 µm). Acetonitrila e acetato de amônio (pH 4,5; 20 mmol L <sup>-1</sup> ) 60:40 (v/v) como fase móvel. Vazão de fase móvel a 1,0 mL min <sup>-1</sup>	Ultravioleta em 230 nm	Matéria-prima, comprimidos	11 minutos	KARTHIK et al., 2008
CLAE	Coluna Alltima C-18 (150 mm × 4,6 mm, 5 µm). Fase móvel composta de metanol e tampão fosfato (pH 3,0; 0,01 mol L <sup>-1</sup> ) (70:30, v/v). Vazão de fase móvel a 1,0 mL min <sup>-1</sup>	Ultravioleta em 230 nm	Comprimidos e suplementos alimentares	22 minutos	YAO et al., 2007
CLAE	Coluna Chromolith Performance RP-18e (100 mm × 4,6 mm) e várias condições cromatográficas	Ultravioleta em 214, 292, 210, 228 e 214 nm para pilocarpina, propranolol glibenclamida, glimepirida e insulina	Matéria-prima	7 minutos	DEEB, PREU, WÄTZIG, 2007

Continua na próxima página

**Tabela 1 (continuação).** Métodos para determinação de glicepirida em fluidos biológicos e formas farmacêuticas

CLAE	Acetonitrila e tampão formato de amônio 0,01 mol L <sup>-1</sup> (pH 3,0) como fase móvel em modo gradiente. Separação realizada em coluna Superspher 100 RP-18 (125 mm × 3 mm x 5 µm). Vazão de 0,3 mL min <sup>-1</sup>	Ionização por eletrospray e espectrometria de massas em tandem	Soluções farmacêuticas, comprimidos e cápsulas	30 minutos	BOGUSZ et al., 2006
CLAE	Coluna GraceSmart RP-18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm). Fase móvel composta de 35% de A (90% de água + 0,1% de ácido fórmico + 10% de acetonitrila) e 65% de B (90% de acetonitrila + 10% de água)	Ultravioleta em 210 nm, evaporativo com espalhamento de luz e aerosol carregado	Suplementos alimentares e comprimidos	6 minutos	SHAODONG et al., 2010

CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência, CCD = cromatografia em camada delgada, CEM = cromatografia eletrocínica micelar, EAM = espectrofotometria de absorção molecular.

Fonte: BONFILIO, de ARAÚJO, SALGADO, 2010.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Desenvolver e validar métodos analíticos e ensaio de dissolução para determinação de glimepirida em comprimidos e avaliar a qualidade de produtos comercializados no mercado brasileiro.

#### **3.2. Objetivos específicos**

Padronizar e validar métodos analíticos para análise de glimepirida na forma farmacêutica comprimidos utilizando a espectrofotometria no UV e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Padronizar um ensaio de dissolução para a glimepirida comprimidos e validar o método analítico de quantificação deste ensaio.

Aplicar os métodos validados e o ensaio de dissolução nos estudos de estabilidade.

Aplicar o ensaio de dissolução para estudo de equivalência farmacêutica de medicamentos similares comparados ao medicamento referência Amaryl<sup>®</sup>.

Avaliar a possível influência do polimorfismo na liberação do produto acabado, utilizando a técnica de difração de raios-X, análise térmica e espectrofotometria na região do infravermelho.

Elaborar monografia farmacopeica para o produto acabado.

## 4. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

### 4.1. Introdução

Métodos analíticos empregados em análises de produtos farmacêuticos são consideravelmente menos complexos do que métodos utilizados em análises de fármacos e seus metabólitos em matrizes biológicas. Entretanto, a determinação inequívoca de um analito em formulações farmacêuticas é tão importante quanto a determinação em matrizes mais complexas, porque a qualidade de um produto farmacêutico está diretamente relacionada com a saúde dos pacientes. Esta consideração é evidenciada pelo trabalho de NAKASHIMA, IKEDA, WADA (2009), no qual os autores apontam que um método de análise prático e preciso pode ser o primeiro passo para o uso racional de medicamentos.

Durante o desenvolvimento de um novo método analítico devem ser considerados diversos fatores, tais como: detecção e separação de todos os compostos de interesse, rapidez de análise e reduzida necessidade de pré-tratamento da amostra e baixo custo (WATZIG, 2008). Além disso, um método deve ser confiável, ou seja, garantir que os resultados estejam exatos, reprodutíveis e que possa ser aplicado em qualquer laboratório, desde que este esteja apto e possua a instrumentação adequada. Para que se possa atingir tais objetivos, é necessário considerar todas as características do composto a ser analisado e de similares disponíveis no mercado (VOGT, KORD, 2011).

No desenvolvimento de um método analítico existem vários atributos como exatidão, precisão, especificidade e sensibilidade que devem ser considerados ao selecionar um que seja apropriado para uma situação específica. Nem sempre é possível ou mesmo desejável

### CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

otimizar todos estes atributos simultaneamente. De forma resumida, o analista deve avaliar toda a informação disponível e decidir considerando o nível de incerteza aceitável (PINTO; KANEKO; PINTO, 2010). Além disso, com a finalidade de obter confiabilidade em resultados analíticos, todo trabalho de desenvolvimento deve ser adequadamente planejado e realizado segundo planos de estudo documentados, atendendo as boas práticas de laboratórios (BRASIL, 2010).

Após o desenvolvimento do método, uma atividade fundamental que tradicionalmente deve ser realizada é a validação analítica. O exercício de validação é uma atividade tipicamente separada e contínua, que difere do desenvolvimento que ocorre apenas uma vez (VOGT, KORD, 2011).

Tendo em vista estas considerações, observa-se que a validação de métodos analíticos, que é o processo documentado de demonstrar que o método é adequado ao uso pretendido (JIMIDAR, HEYLEN, SMET, 2007), é um aspecto vital da garantia da qualidade analítica, o qual tem recebido considerável atenção na literatura.

Todas as técnicas analíticas usadas no desenvolvimento de produtos farmacêuticos e para a determinação de suas características relacionadas com a qualidade devem ser validadas (RAVICHANDRAN et al., 2010). No caso de utilização de métodos descritos em farmacopeias, não é necessário proceder à validação desde que as análises sejam conduzidas com estrita observação do texto. Na maioria dos casos, especialmente quando há modificações na composição do medicamento, na rota sintética ou no procedimento analítico, é necessário revalidar a técnica analítica (WATZIG, 2008).

Antes de iniciar qualquer trabalho prático de validação analítica, um protocolo de validação escrito deve ser estabelecido descrevendo pelo menos as diferentes características

### CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

de validação a serem avaliadas com os critérios de aceitação esperados, referência ou descrição do método analítico, e como a validação será realizada (JIMIDAR, HEYLEN, SMET, 2007).

É essencial que os estudos de validação sejam representativos e conduzidos de modo que a variação da faixa de concentração e os tipos de amostra sejam adequados. Um método para um composto majoritário requer um critério de aceitação e uma abordagem diferente de um método desenvolvido para análise de traços (RIBANI, 2004).

Para registro de novos produtos, todos os órgãos regulatórios do Brasil e de outros países exigem a validação de metodologia analítica e, para isso, a maioria deles tem estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo de validação. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às exigências regulatórias evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado (BRASIL, 2003a; RIBANI, 2004; SWARTZ, KRULL, 2009).

No Brasil, há duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, como a Resolução RE nº 899, de 29/05/2003 da ANVISA e o documento DOQ-CGCRE-008 (revisão 03) do INMETRO, de fevereiro/2010 (BRASIL, 2003a; INMETRO, 2010; RIBANI, 2004).

A Resolução RE nº 899, de 29/05/2003 (BRASIL, 2003a) determina que a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve

apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, limite de detecção e exatidão adequados à análise.

Além dos órgãos nacionais, vários guias internacionais que tratam de validação servem de base em todo o mundo para autoridades regulatórias e para o setor industrial. Dentre esses, os principais guias são: *World Health Organization* (WHO, 1999; WHO, 2006), *Food and Drug Administration* (FDA, 2000), *Eurachem* (EURACHEM, 1998; EURACHEM, 2000), *International Standard Organization* (ISO 2004; ISO 2008), *International Union of Pure and Applied Chemistry* (THOMPSON, ELLISON, WOOD, 2002), *Association of Official Analytical Chemist* (AOAC, 2000), *International Conference on Harmonisation* (ICH, 2005) e *United States Pharmacopoeia* (USP, 2011).

#### 4.1.1. Parâmetros de validação analítica

Uma descrição dos parâmetros que podem ser avaliados na validação de um método, segundo a literatura nacional e internacional é dada a seguir:

**Especificidade e Seletividade:** Alguns autores consideram seletividade e especificidade como termos diferentes, pois o termo seletivo refere-se ao método que pode determinar um analito particular em uma mistura complexa com a mínima interferência dos outros componentes desta mistura. A seletividade, portanto, pode ser classificada como alta, baixa, parcial, etc. Já o termo específico se refere sempre a um método que apresenta 100% de seletividade (ARAUJO, 2009). Entretanto, alguns autores consideram ambos os

### CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

termos equivalentes (TAVERNIERS, LOOSE, BOCKSTAELE, 2004; WHITMIRE et al., 2010).

A seletividade de um método analítico é demonstrada através de dados que comprovem a ausência de interferência de produtos de degradação, solventes, impurezas, intermediários de síntese, matriz, etc (WATZIG, 2008; RAVICHANDRAN et al., 2010).

A seletividade pode ser acessada de vários modos. O primeiro é pela comparação entre a matriz sem o analito e a matriz adicionada do analito. Neste caso, os possíveis interferentes não devem afetar o resultado do ensaio, pois qualquer contribuição da matriz na resposta leva a erros sistemáticos constantes ou proporcionais (WATZIG, 2008).

Se a matriz sem o analito não é disponível, a determinação da seletividade pode ser realizada através da comparação entre a inclinação de duas curvas analíticas. Uma das curvas deve ser construída com a amostra (incluindo a matriz) e a outra curva deve ser construída sem a matriz (utilizando apenas matéria-prima ou padrão). A seletividade é então confirmada se a inclinação das duas curvas é similar e, portanto, a matriz não causa interferência no método (BRUCE, MINKKINEN, RIEKKOLA, 1998).

Um modo adicional de acessar a seletividade de métodos cromatográficos é pela medida da pureza do sinal analítico usando o detector de arranjo de díodos ou o detector de massas (TIWARI, TIWARI, 2010). Nesta abordagem, adicionam-se apropriados níveis de impureza na substância em análise e a pureza do sinal é acessada para confirmar que nenhum outro composto coeluiu com o analito. Quando impurezas não estão disponíveis, o analito pode ser exposto a várias condições de estresse, que forcem a criação de produtos de degradação (por exemplo: luz, calor, umidade, hidrólise ácida/básica, oxidação) (CHANDRAN, SINGH, 2007).

### CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

Quando o método não demonstra seletividade adequada, isto frequentemente indica que o método não foi adequadamente desenvolvido. Como consequência, é provável que os critérios para estabelecidos para precisão, linearidade e exatidão não sejam preenchidos (JIMIDAR, HEYLEN, SMET, 2007).

Para determinação de seletividade de métodos aplicados à ensaios de dissolução, a USP 2011 recomenda que qualquer interferência não deve exceder 2,0%.

**Linearidade:** É a capacidade de um método analítico demonstrar que os resultados obtidos são diretamente (ou indiretamente, através de uma transformação matemática bem definida) proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (ICH, 2005; RAVICHANDRAN et al., 2010). Frequentemente, a linearidade é medida pelo coeficiente de correlação ( $r$ ) e pelo intercepto da equação produzida, quando se correlaciona a resposta em função da concentração. Um alto coeficiente de correlação significa que os dados se ajustam bem com a linha de regressão e, em análises farmacêuticas, um coeficiente de correlação maior do que 0,999 é geralmente considerado aceitável (FDA, 2000). Entretanto, segundo a ANVISA (Brasil, 2003a), um coeficiente de correlação de 0,99 é considerado aceitável. Além disso, o intercepto não deve ser estatisticamente diferente de zero (TAVERNIERS, LOOSE, BOCKSTAELE, 2004).

Em análises farmacêuticas, as curvas analíticas são usualmente construídas utilizando somente um padrão de referência diluído em solvente adequado. Entretanto, se o intercepto é diferente de zero, a curva analítica deve ser preparada por adição de padrão na matriz (WHITMIRE et al., 2010). A principal vantagem deste recurso é que fornece uma melhor correspondência com a composição da amostra. Esta técnica também é utilizada na

### CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

construção de curvas analíticas, para quantificar amostras que apresentam interferência de matriz. Entretanto, apesar de se obter uma calibração mais confiável com o método de superposição da matriz, ele não elimina problemas analíticos típicos, pois a intensidade de um efeito na matriz pode diferir de uma matriz para outra (RIBANI, 2004).

Na prática, a linearidade é avaliada através do preparo de soluções contendo a substância a ser quantificada em diversas concentrações, cobrindo toda a faixa de trabalho. A farmacopeia americana (USP, 2011) e o ICH (ICH, 2005) recomendam um mínimo de cinco concentrações cobrindo de 80 até 120% da concentração utilizada no ensaio. Entretanto, a IUPAC (THOMPSON, ELLISON, WOOD, 2002) recomenda seis ou mais concentrações cobrindo de 50 a 150% da concentração utilizada no ensaio. A AOAC (AOAC, 2000) recomenda que quatro níveis de concentração devam ser utilizados durante três diferentes dias. Estas concentrações são  $\frac{1}{2}x$ ,  $1x$ ,  $\frac{3}{2}x$ ,  $2x$  da concentração utilizada no ensaio.

**Intervalo:** O intervalo especificado é a faixa entre as maiores e menores concentrações esperadas para o analito, onde são requeridos exatidão, linearidade e precisão (WATZIG, 2008). A literatura descreve diferentes termos que se referem a este parâmetro: intervalo (ou faixa) linear, intervalo (ou faixa) analítico (a), intervalo (ou faixa) de calibração, intervalo (ou faixa) dinâmico (a) e intervalo (ou faixa) de trabalho (ARAUJO, 2009). Normalmente, este parâmetro é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método (BRASIL, 2003a).

### CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

**Precisão:** A precisão é definida como a proximidade de resultados quantitativos obtidos em uma série de medidas, sob condições especificadas (ISO, 2004). Esta é considerada em três níveis: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade:

- **Repetitividade:** é definida como a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação (ICH, 2005). É expressa através do desvio padrão relativo (D.P.R.) ou coeficiente de variação (C.V.) entre as respostas analíticas (JIMIDAR, HEYLEN, SMET, 2007; WHITMIRE et al., 2010). Subdivide-se em repetitividade do sistema e repetitividade das análises:

*Repetitividade do sistema:* É avaliada através de múltiplas análises da mesma solução.

*Repetitividade das análises:* Está relacionada com todos os aspectos do método, incluindo a preparação da amostra. A repetitividade das análises é verificada por, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada (ISO, 2008) ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste (ICH, 2005). A IUPAC, entretanto, especifica que pelo menos 7 soluções devam ser analisadas para se obter uma boa estimativa de precisão (THOMPSON, ELLISON, WOOD, 2002).

- **Precisão intermediária:** concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes (JIMIDAR, HEYLEN, SMET, 2007). Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes. Nessa abordagem, não menos que seis soluções independentes devem ser preparadas nas concentrações

### CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

próximas à concentração utilizada no ensaio a ser validado (ÉPSHTEIN, 2004). Para se demonstrar que a média dos resultados obtidos com dois analistas, em dois ou mais dias, ou utilizando equipamentos diferentes são equivalentes, pode-se utilizar uma análise de variância ou teste *t*. Entretanto, de acordo com Épshtein, 2004, é mais conveniente demonstrar a precisão intermediária em termos de desvio padrão relativo.

- Reprodutibilidade (precisão interlaboratorial): concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão do método em farmacopeias. Estes dados não precisam ser apresentados para a concessão de registro (BRASIL, 2003a). Uma busca na literatura revela que os estudos utilizam oito ou mais laboratórios para demonstrar equivalência estatística entre os resultados obtidos (HSU, HUANG, 1992; HORWITZ, 1994; BUCHHEIT, DAAS, JÖNSSON, 2002).

Os critérios de aceitação de precisão de métodos utilizados em análises farmacêuticas variam de acordo com a referência. Segundo a RE nº 899 (BRASIL, 2003a), o valor máximo de desvio padrão relativo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5%. Segundo Épshtein (2004) e Ravichandran et al. (2010), o desvio padrão relativo entre os resultados deve ser inferior a 1,0% para matérias-primas, inferior a 2,0% para produtos acabados e inferior a 10% para impurezas. Segundo o INMETRO (2010), pode-se estimar um limite de repetitividade para cada método, que é calculado através do desvio padrão amostral em cada concentração, multiplicado pela raiz quadrada de dois, multiplicado por um valor *t*, com n-1 graus de liberdade e 99% de confiança.

### CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

Para determinação de precisão de métodos aplicados a ensaios de dissolução, a USP 2011 recomenda um desvio padrão relativo inferior a 10,0% nos pontos de amostragem com menos de 85,0% de dissolução e um desvio padrão relativo inferior a 5,0% nos pontos de amostragem com mais de 85,0% de dissolução. Porém, a farmacopeia especifica que o critério de aceitação pode ser produto-específico e outros testes estatísticos e limites devem ser usados.

**Exatidão:** A exatidão de um método analítico é a proximidade entre os resultados médios obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (ICH, 2005; WHITMIRE et al., 2010). A exatidão deve ser determinada por toda a faixa do procedimento analítico (ICH, 2005) e é expressa em termos de porcentagem de recuperação, erro relativo ou desvio em relação ao valor teórico (WHITMIRE et al., 2010).

Existem vários modos de determinar a exatidão de um método analítico. Quando o material de referência certificado é disponível, a exatidão deve ser determinada pela comparação do valor medido com o valor declarado pelo material de referência (RAVICHANDRAN, 2010). Neste caso, a exatidão deve ser expressa como a diferença entre a média obtida e o valor declarado, juntamente com o intervalo de confiança (ICH, 2005). A exatidão pode também ser determinada através da comparação dos resultados de um procedimento analítico proposto com os resultados obtidos utilizando um segundo método de referência bem caracterizado (TAVERNIERS, LOOSE, BOCKSTAELE, 2004). Quando um material de referência certificado ou um método referência não é disponível, um estudo de recuperação deve ser realizado. Esse procedimento é realizado pela adição de quantidade conhecida do analito (por peso ou volume) no branco (matriz)

### CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

(RAVICHANDRAN, 2010). A recuperação é então calculada pela divisão da quantidade encontrada pelo método pela quantidade teórica adicionada e multiplicando-se o valor por 100. Quando a matriz não é disponível, o analito é então adicionado na amostra (RAVICHANDRAN, 2010), e a recuperação é calculada utilizando a Equação 1:

$$R(\%) = \frac{(C1 - C2)}{(C3)} \times 100\% \quad (1)$$

em que:  $C1$  = concentração do analito na amostra fortificada,  $C2$  = concentração do analito na amostra não fortificada e  $C3$  = concentração do analito adicionada à amostra fortificada (INMETRO, 2010).

De acordo com a ICH (ICH, 2005), a exatidão deve ser estimada por meio de nove medidas em pelo menos três diferentes concentrações (três réplicas de uma concentração baixa, três réplicas de uma concentração média e três réplicas de uma concentração alta). Entretanto, o FDA (FDA, 2000) recomenda que a exatidão deva ser determinada em três níveis de concentração em cinco réplicas de cada nível.

Os limites de porcentagem de recuperação aceitáveis dependem da faixa de concentração da amostra a ser medida, do tipo de matriz e do nível de qualidade requerido pelo método. Segundo a literatura, os seguintes limites são aceitáveis: 99,0 a 101,0% para análise quantitativa de matérias-primas ou medicamentos com uma alta quantidade de componente ativo (acima de 98%); de 98,0 a 102,0% para análise de medicamentos

### CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

contendo menos de 98% de substância ativa; 90,0 a 110,0% para determinação de impurezas presentes acima de 1% na amostra; de 75,0 a 125,0% para determinação quantitativa de impurezas presentes de 0,1 a 1% na amostra e de 50,0 a 150,0% para determinação quantitativa de impurezas presentes a uma porcentagem inferior a 0,1% em relação à amostra (ÉPSHTEIN, 2004).

Para determinação de exatidão de métodos aplicados a ensaios de dissolução, a USP 2011 recomenda valores entre 95,0% e 105,0%.

**Limite de Detecção:** Limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (ICH, 2005).

Várias abordagens para determinação do limite de detecção são possíveis. Para métodos analíticos que exibem ruído, pode-se determinar o limite de detecção pela relação sinal/ruído. Essa abordagem é realizada pela comparação do sinal medido a partir do branco com baixas concentrações conhecidas do analito. De acordo com Ravichadran (2010), uma relação sinal/ruído de 3:1 ou 2:1 é geralmente considerada adequada para se estabelecer o limite de detecção.

Entretanto, o modo mais comum de se determinar o limite de detecção é baseado na inclinação e no desvio padrão da resposta analítica ao nível de concentração zero. A inclinação pode ser estimada a partir da curva analítica obtida no estudo de linearidade. Entretanto, é recomendado determinar a inclinação utilizando uma curva analítica construída em concentrações próximas ao limite de detecção (ÉPSHTEIN, 2004). O valor

### CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

do desvio padrão pode ser determinado utilizando-se dez análises sequenciais do analito em concentrações correspondendo a 0,01% a 0,05% da concentração teórica do teste (ÉPSHTEIN, 2004). Uma alternativa é construir várias curvas analíticas em concentrações próximas ao limite de detecção e determinar o desvio padrão entre as interseções das curvas. O limite de detecção é então expresso pela Equação 2:

$$LD = 3(DP/a) \quad (2)$$

em que: DP é o desvio padrão das respostas e  $a$  é a inclinação da curva analítica, os quais podem ser calculados de acordo com o parágrafo acima.

Outro modo de se determinar o limite de detecção é a partir da concentração mínima em que o desvio padrão relativo entre cinco determinações analíticas sequenciais não exceda 20% (ÉPSTHEIN, 2004).

**Limite de Quantificação:** É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis (ICH, 2005). O limite de quantificação é um parâmetro determinado principalmente para ensaios quantitativos de impurezas, produtos de degradação em fármacos e produtos de degradação em formas farmacêuticas (RAVICHANDRAN, 2010).

O limite de quantificação pode ser calculado baseado na relação sinal/ruído. De acordo com esse método, é encontrada uma solução referência inicial do composto analisado que produza uma relação sinal/ruído próxima de 30. Essa solução é então

### CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

sequencialmente diluída até que se obtenha uma relação sinal/ruído de 10. Essa concentração é então considerada o limite de quantificação (ÉPSTHEIN, 2004).

No entanto, o limite de quantificação também pode ser determinado baseado no desvio padrão das respostas e na inclinação, pela Equação 3:

$$LQ = 10(DP/a) \quad (3)$$

em que:  $\sigma$  é o desvio padrão das respostas e  $S$  é a inclinação da curva analítica.

O desvio padrão das respostas e a inclinação das curvas analíticas podem ser calculados do mesmo modo como apresentado no cálculo do limite de detecção, usando a curva analítica do estudo de linearidade ou uma curva construída em concentrações próximas ao limite de quantificação (ICH, 2005).

Entretanto, as duas primeiras abordagens descritas apresentam a desvantagem de não levar em conta os requerimentos de precisão e exatidão, que devem ser preenchidos para cálculo de limite de quantificação. O limite de quantificação, porém, pode ser obtido a partir de estudos de precisão e exatidão. Nesta abordagem, concentrações decrescentes do analito adicionado na matriz são analisadas repetidamente. As recuperações e desvios padrões relativos são então calculados em cada concentração. Se os limites de exatidão e precisão pré-definidos são excedidos, a concentração correspondente é estabelecida como o limite de quantificação (TSIKAS, 2009; SHRIVASTAVA, GUPTA, 2011).

### CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

**Robustez:** A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal (DEJAEGHER, VANDER HEYDEN, 2007).

A robustez é usualmente estudada por meio de variações de parâmetros típicos que são capazes de influenciar os resultados da análise. Segundo a RE nº 899 (BRASIL, 2003a) os fatores que devem ser levados em consideração na determinação de robustez de um método espectrofotométrico são: variação do pH da solução, temperatura e diferentes fabricantes de solventes. Com relação a métodos cromatográficos as variações recomendadas são: conteúdo de solvente orgânico na fase móvel ( $\pm 2\%$ ), quantidade de aditivos utilizados na fase móvel (sais, reagentes de par iônico, etc) ( $\pm 10\%$ ), pH do tampão utilizado na fase móvel ( $\pm 0,5$ ), temperatura da coluna cromatográfica ( $\pm 5\text{ }^\circ\text{C}$ ), tempo de extração do composto ( $\pm 20\%$ ), composição da solução utilizada na extração ( $\pm 5\%$ ), proporção do gradiente da fase móvel ( $\pm 2\%$ ), vazão da fase móvel e tipo e/ou fabricante da coluna cromatográfica (ÉPSHTEIN, 2004). Para ensaios de dissolução, além dos parâmetros que devem ser variados no método usado para quantificação, a robustez deve ser ensaiada variando-se a composição do meio (concentração de tampão e/ou surfactante), pH, volume e temperatura do meio de dissolução e velocidade de agitação dos aparatos (USP, 2011). A Eurachem (EURACHEM, 1998) recomenda que cada mudança deva ser realizada separadamente e os efeitos na precisão e exatidão do método sejam avaliados para cada condição experimental.

Uma alternativa para avaliação de robustez é a abordagem multivariada. Youden e Steiner (YOU DEN, STEINER, 1975) propuseram um teste no qual a ideia básica é introduzir várias mudanças simultaneamente de tal forma que os efeitos individuais possam

### CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

ser avaliados. Este teste consiste na avaliação de sete variáveis que podem influenciar no resultado, se os seus valores nominais forem levemente alterados. O efeito de cada variável é investigado em dois níveis: o nível alto, representado por letras maiúsculas (A, B, C, D, E, F e G), e o nível mais baixo, representado por letras minúsculas (a, b, c, d, e, f e g). Uma matriz proposta pelos autores indica a combinação dos sete níveis em um total de oito experimentos. A partir dos resultados de cada experimento, é possível estimar o efeito de cada variável pela diferença entre a média dos resultados obtidos com as quatro análises realizadas no nível mais alto e a média dos resultados obtidos com as quatro análises realizadas no nível mais baixo. Se a diferença for maior do que o critério desvio padrão multiplicado por raiz quadrada de dois, a variável tem um efeito significativo e, portanto, influencia no método analítico, devendo desta forma ser controlada. Apesar de ter sido proposta em 1975, vários trabalhos publicados recentemente empregaram esta metodologia na determinação da robustez (NEVADO et al., 2005; CÉSAR, PIANETTI, 2009; FORTI, SCORTICHINI, 2009; GAMBA et al., 2009; LUTEROTTI, KORDIĆ, 2011).

Outras abordagens multivariadas utilizadas para determinação de robustez de método analítico são planejamentos fatoriais completos, planejamentos fatoriais fracionários, planejamentos *Plackett–Burman* e metodologias de superfície de respostas. Estas abordagens apresentam as vantagens de possibilidade de análise de vários fatores (ou variáveis) simultaneamente com um reduzido número de experimentos (DEJAEGHER, VANDER HEYDEN, 2007).

## 4.2. Parte experimental

### 4.2.1. Material

#### 4.2.1.1. Substância de referência

A substância utilizada como padrão de referência (padrão secundário) foi a matéria-prima glimepirida (CAS 93479-97-1), adquirida da empresa Zhejiang Xianju Huakang Pharmaceutical & Chemical Co., Ltd. (Xianju, China), quimicamente descrita como 1-[[4-[2-(3-etil-4-metil-2-oxo-3-pirrolino-1-carboxamido) etil] fenil] sulfonyl]-3-(*trans*-4-metilcicloexil) ureia. O teor de glimepirida padrão secundário foi estimado pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência, desenvolvido durante a parte experimental deste trabalho. Foi obtido um valor de 100,1% em relação ao padrão primário.

O padrão primário utilizado na padronização foi a glimepirida adquirida da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA), teor declarado de 100,0%.

#### 4.2.1.2. Produtos farmacêuticos

Os produtos usados no desenvolvimento e validação dos métodos foram comprimidos contendo 1, 2 e 4 mg de glimepirida (teor rotulado), sob o nome comercial de Amaryl<sup>®</sup>, do laboratório Sanofi Aventis, adquiridos comercialmente em Araraquara/SP.

Fórmulas unitárias:

- Amaryl<sup>®</sup> 1 mg: Glimepirida (1 mg), lactose monoidratada, amidoglicolato de sódio, povidona K25, celulose microcristalina, estearato de magnésio e corante óxido de ferro vermelho. Lote 800825.
- Amaryl<sup>®</sup> 2 mg: Glimepirida (2 mg), lactose monoidratada, amidoglicolato de sódio, povidona K25, celulose microcristalina, estearato de magnésio, corante óxido de ferro amarelo e indigotina laca de alumínio (corante índigo carmim). Lote 900477.
- Amaryl<sup>®</sup> 4 mg: Glimepirida (4 mg), lactose monoidratada, amidoglicolato de sódio, povidona K25, celulose microcristalina, estearato de magnésio e indigotina laca de alumínio (corante índigo carmim). Lote 902570.

#### 4.2.1.3. Placebos

No desenvolvimento e avaliação de seletividade dos métodos foram preparados placebos, utilizando quantidades de excipientes normalmente presentes em um comprimido. Entretanto, as concentrações de alguns excipientes que são utilizados em baixas quantidades (polivinilpirrolidona e estearato de magnésio) foram aumentadas, a fim de se observar se estes excipientes realmente não interferem nas respostas analíticas dos

### CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

métodos. A preparação destes placebos foi realizada através de mistura física dos excipientes, nas proporções descritas a seguir:

#### Placebo de Amaryl<sup>®</sup> 1 mg:

Lactose monoidratada.....	50%
Amido glicolato de sódio.....	25%
Povidona K25.....	10%
Celulose microcristalina.....	7%
Estearato de magnésio.....	8%
Óxido férrico vermelho.....	q.s.

#### Placebo de Amaryl<sup>®</sup> 2 mg:

Lactose monoidratada.....	50%
Amido glicolato de sódio.....	25%
Povidona K25.....	10%
Celulose microcristalina.....	7%
Estearato de magnésio.....	8%
Óxido férrico amarelo.....	q.s.
Indigotina laca de alumínio.....	q.s.

CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS

---

Placebo de Amaryl<sup>®</sup> 4 mg:

Lactose monoidratada.....	50%
Amido glicolato de sódio.....	25%
Polivinilpirrolidona.....	10%
Celulose microcristalina.....	7%
Estearato de magnésio.....	8%
Indigotina laca de alumínio.....	q.s.

#### 4.2.1.4. Equipamentos

- Aparelho de ultrassom Unique<sup>®</sup> modelo USC2800A (Indaiatuba, Brasil);
- Balança analítica Kern<sup>®</sup> modelo 410 (Kern, Alemanha);
- Balança analítica Mettler<sup>®</sup> modelo H10 (Barueri, Brasil);
- Coluna Waters Symmetry<sup>®</sup> C-18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) e pré-coluna Waters Symmetry<sup>®</sup> C-18 (20 mm x 3,9 mm, 5 µm) (Milford, EUA);
- Coluna Zorbax ODS Agilent<sup>®</sup> C-18, (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) (Santa Clara, EUA);
- Cromatógrafo a líquido da marca Waters<sup>®</sup> (Milford, EUA), composto de bomba cromatográfica gradiente binária Waters<sup>®</sup> 1525, injetor manual Rheodyne<sup>®</sup> 7725i (Califórnia, EUA) e detector UV-Vis Waters<sup>®</sup> 2487 (Milford, EUA);
- Cromatógrafo a líquido Shimadzu<sup>®</sup>, modelo LC-20AD (Kyoto, Japão), equipado com duas bombas LC-20AD, válvula seletora de solvente FCV-10 ALvp, degaseificador de

### CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

membrana DGU-20A5, auto-injetor SIL-20A, interface CBM-20A, detector UV-Vis e *software* Class-VP;

- Espectrômetro de massas do tipo “ion-trap” Bruker Daltonics GmbH<sup>®</sup> (Bremen, Alemanha);
- Destilador Nova Técnica<sup>®</sup> modelo NT 425 (São Paulo, Brasil);
- Espectrofotômetro UV/Vis Shimadzu<sup>®</sup> (Kyoto, Japão), duplo-feixe, modelo 1601PC, equipado com modo de derivação interna, com *software* UVPC 3.1 (Shimadzu<sup>®</sup>, Kyoto, Japão) e cubetas de quartzo de 1 cm;
- Filtros de politetrafluoretileno (PTFE) hidrofílicos com 0,45 µm de poro (Millipore<sup>®</sup>, Bedford, EUA).
- Membranas de politetrafluoretileno (PTFE) hidrofílicas com 0,45 µm de poro e 47,0 mm de diâmetro (Millipore<sup>®</sup>, Bedford, EUA);
- Papel de filtro quantitativo isento de cinzas Vetec<sup>®</sup> (Rio de Janeiro, Brasil);
- Peagômetro Marconi<sup>®</sup> modelo PA 200 (Piracicaba, Brasil);
- Peagômetro Mettler<sup>®</sup> modelo Delta 345 (Barueri, Brasil);
- Sistema de filtração à vácuo Nova Técnica<sup>®</sup> (São Paulo, Brasil);
- Sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore<sup>®</sup>, Bedford, EUA).

#### 4.2.1.5. Solventes e reagentes

- Acetato de sódio triidratado Synth<sup>®</sup> (Diadema, Brasil);
- Ácido acético glacial Vetec<sup>®</sup> (Rio de Janeiro, Brasil).

## CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

- Ácido clorídrico Quemis<sup>®</sup> (Araraquara, Brasil);
- Água ultrapura – água Milli-Q;
- Etanol Synth<sup>®</sup> (Diadema, Brasil);
- Fosfato de potássio monobásico Merck<sup>®</sup> (Rio de Janeiro, Brasil);
- Fosfato de sódio monobásico monoidratado Reagen<sup>®</sup> (Colombo, Brasil);
- Hidróxido de sódio PA Dinâmica<sup>®</sup> (São Paulo, Brasil);
- Hidróxido de sódio PA Impex<sup>®</sup> (Diadema, Brasil);
- Lauril sulfato de sódio Henrifarma<sup>®</sup> (São Paulo, Brasil);
- Metanol grau HPLC Sigma-Aldrich<sup>®</sup> (St. Louis, EUA);
- Metanol grau HPLC Tedia company<sup>®</sup> (Fairfield, EUA);
- Peróxido de hidrogênio Merck<sup>®</sup> (Darmstadt, Alemanha);
- Polissorbato 80 Vetec<sup>®</sup> (Rio de Janeiro, Brasil);

### **4.2.2. Espectrofotometria na região ultravioleta**

#### 4.2.2.1. Seleção de solvente

A solubilidade de glimepirida foi testada em diversos solventes pesando-se exatamente 1,0 mg de glimepirida SR, que foi transferida para balão volumétrico de 10 mL. Em seguida o volume foi completado com o solvente testado.

#### 4.2.2.2. Espectro de absorção de glimepirida

O espectro de absorção de glimepirida-SR foi obtido em solução de hidróxido de sódio 5 mmol L<sup>-1</sup>, na concentração de 10 µg mL<sup>-1</sup> de glimepirida. As leituras foram realizadas entre 200–800 nm em espectrofotômetro Shimadzu UV-1601, utilizando-se cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico, com banda espectral de 2 nm, velocidade de varredura de 3200 nm/min e intervalo de agrupamento de dados de 0,2 nm. O *software* UVPC 3.1 permitiu a diferenciação para obtenção do espectro de segunda derivada, utilizando delta lambda ( $\Delta\lambda$ ) de 8 nm. Os valores de amplitude foram obtidos a partir do espectro de segunda derivada em unidades de distância dos picos em relação à linha de base nos comprimentos de onda de 279,0; 257,5 e 256,3 nm para quantificação dos produtos Amaryl<sup>®</sup> 1 mg, Amaryl<sup>®</sup> 2 mg e Amaryl<sup>®</sup> 4 mg, respectivamente. Todas as respostas analíticas obtidas a partir dos espectros de segunda derivada foram multiplicadas por 100 (fator de escala de 100) utilizando um recurso do *software* UVPC 3.1 e todas as medidas foram efetuadas utilizando-se solução de hidróxido de sódio 5 mmol L<sup>-1</sup> como branco.

#### 4.2.2.3. Validação

A validação do método espectrofotométrico foi realizada de acordo com especificações do ICH (ICH, 2005) onde foram determinadas as seguintes características:

Seletividade: foi avaliada pela possível interferência dos excipientes na determinação quantitativa de glimepirida, comparando-se os espectros de absorção de segunda derivada

### CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

obtidos do fármaco com os espectros dos excipientes presentes nos produtos farmacêuticos. Foi preparada solução de glimepirida na concentração de  $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  em NaOH  $5 \text{ mmol L}^{-1}$ . Paralelamente, uma solução contendo os excipientes dos produtos Amaryl<sup>®</sup> 1, 2 e 4 mg, presentes nos comprimidos, foi preparada em NaOH  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  utilizando diluição equivalente à solução de glimepirida-SR, em conformidade com o peso médio dos comprimidos. As soluções preparadas para o teste foram colocadas em banho de ultrassom por 30 minutos. Os espectros de absorção foram comparados, verificando a possível interferência dos excipientes na determinação do teor de glimepirida.

Linearidade: foi avaliada pela análise de regressão de três curvas analíticas autênticas, construídas em três diferentes dias. Sete níveis de concentração foram obtidos (2 a  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Para a obtenção da curva analítica, foram pesados 12,5 mg de glimepirida-SR, transferidos para balão volumétrico de 250 mL, dissolvidos em NaOH  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  e mantidos em aparelho de ultrassom por 30 minutos, para melhor solubilização. Com a utilização de bureta foram obtidas soluções com concentrações de 2,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 30,0 e  $40,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  de glimepirida-SR. Foi feita a varredura entre 220-300 nm, obtendo-se o espectro de segunda derivada das soluções e posterior leitura em 279,0; 257,5 e 256,3 nm, utilizando NaOH  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  como branco. Foram construídas três curvas analíticas utilizando o programa Microsoft Excel.

Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ): foram determinados pelas equações 2 e 3, indicadas pelo ICH (ICH, 2005):

$$\text{LD} = 3(\text{DP}/a) \quad (2)$$

### CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

$$LQ= 10(DP/a) \quad (3)$$

em que DP = desvio padrão das intersecções e  $a$  é a inclinação média das três curvas analíticas obtidas no estudo de linearidade.

Precisão: foi analisada aos níveis de repetitividade e precisão intermediária. A repetitividade foi avaliada pela análise de seis soluções de glimepirida-SR, com concentração teórica de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ , preparadas no mesmo dia e sob as mesmas condições experimentais. Estas soluções foram preparadas pesando-se exatamente 10,0 mg de glimepirida-SR e transferindo-se para balão volumétrico de 100 mL e completando-se o volume com NaOH 5 x mmol L<sup>-1</sup>. Em seguida, 1 mL da solução foi transferido com auxílio de micropipeta para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado utilizando o mesmo solvente. Calculou-se o desvio padrão relativo entre as determinações. A precisão intermediária foi avaliada pela repetição do procedimento em dois diferentes dias, por dois diferentes analistas.

Exatidão: Foi avaliada pelas medidas de recuperação de glimepirida-SR adicionadas em amostras de Amaryl<sup>®</sup> 1, 2 e 4 mg em triplicata, em três níveis de concentração: 80, 100 e 120% da concentração teórica do método, adicionados no começo do procedimento, de acordo com recomendações do ICH (ICH, 2005). Foi preparada solução estoque de glimepirida-SR em NaOH 5 mmol L<sup>-1</sup> com concentração de  $50,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Esta solução foi preparada pesando-se exatamente 10,0 mg de glimepirida-SR, transferindo-se para balão volumétrico de 200 mL e completando-se o volume com NaOH 5 mmol L<sup>-1</sup>. A partir do peso médio das amostras de Amaryl<sup>®</sup> 1, 2 e 4 mg, foram preparadas soluções da amostra em NaOH 5 mmol L<sup>-1</sup> com concentração de  $50,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Esta solução foi preparada

CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS

pesando-se exatamente 2,5 pesos médios de comprimidos contendo glimepirida, transferindo-se para balão volumétrico de 200 mL e completando-se o volume com NaOH 5 mmol L<sup>-1</sup>. Os adicionados foram então preparados, transferindo-se as soluções estoques para balão volumétrico de 10 mL com auxílio de micropipeta, completando-se o volume com NaOH 5 mmol L<sup>-1</sup>. A Tabela 2 relaciona as concentrações das soluções obtidas para o teste de recuperação de glimepirida-SR usando método de espectrofotometria derivada na região UV.

**Tabela 2.** Concentrações das soluções do teste de recuperação aplicado à amostra de glimepirida usando método de espectrofotometria derivada na região UV 279,0; 257,5 e 256,3 nm para quantificação dos produtos Amaryl<sup>®</sup> 1 mg, Amaryl<sup>®</sup> 2 mg e Amaryl<sup>®</sup> 4 mg, respectivamente

	Volume de solução amostra a 50 µg mL <sup>-1</sup> adicionado em balão volumétrico de 10 mL (mL)	Volume de solução padrão a 50 µg mL <sup>-1</sup> adicionado em balão volumétrico de 10 mL (mL)	Concentração teórica final (µg mL <sup>-1</sup> )
P	-	1	5
A	1	-	5
R <sub>1</sub> (80%)	1	0,6	8
R <sub>2</sub> (100%)	1	1	10
R <sub>3</sub> (120%)	1	1,4	12

**Robustez:** Foi avaliada através do teste de robustez de Youden e Steiner (YOU DEN, STEINER, 1975), no qual sete variáveis que podem interferir no resultado analítico foram alteradas, com posterior análise dos dados. As sete variáveis selecionadas foram: concentração de hidróxido de sódio, fornecedor de hidróxido de sódio, comprimento de onda, tempo de sonicação, marca de cubeta, delta lambda ( $\Delta\lambda$ ) e velocidade de varredura. As condições normais das variáveis foram denotadas por letras maiúsculas A, B, C, D, E, F

CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS

e G e seus valores alternativos foram denotados pelas correspondentes letras minúsculas a, b, c, d, e, f e g. Um total de oito experimentos foram conduzidos, como indicado na Tabela 3. A partir destes resultados, o efeito de cada variável foi estimado pela diferença entre a média dos resultados das quatro análises com letra maiúscula e a média dos resultados das quatro análises com letra minúscula. Considerando o desvio padrão entre os oito resultados, os valores de efeito maior do que o produto do desvio padrão pela raiz quadrada de dois ( $s\sqrt{2}$ ) foram considerados significantes e, portanto, alteram a resposta analítica.

**Tabela 3.** Variáveis e seus níveis usados em estudo de robustez, de acordo com teste de robustez de Youden e Steiner (YOU DEN, STEINER, 1975)

Variável	Condições nominais	Condições alternativas	Condição experimental							
			1	2	3	4	5	6	7	8
Concentração de NaOH	5 mmol L <sup>-1</sup> (A)	4 mmol L <sup>-1</sup> (a)	A	A	A	A	a	a	a	a
Fornecedor de NaOH	Impex (B)	Dinâmica (b)	B	B	b	b	B	B	b	b
Comprimento de onda	Ótimo (C)	Aumento de 2 nm (c)	C	c	C	c	C	c	C	c
Tempo de sonicação	30 min (D)	20 min (d)	D	D	d	d	d	d	D	D
Cubeta	Marca 1 (E)	Marca 2 (e)	E	e	E	e	e	e	E	E
Delta lambda	8 nm (F)	4 nm (f)	F	f	f	F	F	f	f	F
Velocidade de varredura	Rápida (G)	Lenta (g)	G	g	g	G	g	G	G	g

Letras maiúsculas representam condições nominais

Letras minúsculas representam condições alternativas

#### 4.2.2.4. Estabilidade de glimepirida em solução de NaOH 5 mmol L<sup>-1</sup>

Foi preparada solução estoque de glimepirida-SR na concentração de 50,0 µg mL<sup>-1</sup>, utilizando-se NaOH 5 mmol L<sup>-1</sup> como solvente. Procedeu-se às varreduras espectrais das soluções nos tempos 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas do preparo, aplicando-se o método de espectrofotometria derivada de segunda ordem na região UV com leituras em 279,0; 257,5

### CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

e 256,3 nm para os produtos Amaryl<sup>®</sup> 1 mg, Amaryl<sup>®</sup> 2 mg e Amaryl<sup>®</sup> 4 mg, respectivamente.

#### 4.2.2.5. Determinação de glimepirida nos comprimidos

A partir do peso médio das amostras de Amaryl<sup>®</sup> 1, 2 e 4 mg, pesou-se o equivalente a 2 mg, o qual foi transferido para balão volumétrico de 100 mL. Foram adicionados 80 mL de NaOH 5 mmol L<sup>-1</sup> e a solução foi mantida em aparelho de ultrassom por 30 minutos. O volume foi completado para a obtenção de solução com concentração de 20,0 µg mL<sup>-1</sup>. A solução foi filtrada em papel de filtro quantitativo. Posteriormente, foram transferidas alíquotas de 5,0 mL para balões volumétricos de 10 mL e o volume completado com NaOH 5 mmol L<sup>-1</sup> (concentração teórica de 10,0 µg mL<sup>-1</sup>). Este procedimento foi realizado em quintuplicata. Os teores, em relação ao valor rotulado, foram obtidos por comparação das medidas espectrofotométricas das amostras (n = 5), com os valores obtidos a partir de soluções padrão (n = 5), nos mesmos níveis de concentração.

#### 4.2.2.6. Resultados e discussão

As técnicas analíticas para determinação de glimepirida relatadas na literatura que utilizam a CLAE demandam uma grande quantidade de tempo e são expressivamente onerosas. Além disso, os métodos espectrofotométricos relatados requerem o uso de solventes tóxicos e poluentes como a dimetilformamida (ALTINÖZ, TEKELI, 2001) e o metanol (KHAN et al., 2009). Por esta razão, a fim de se obter um solvente menos tóxico e

### CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

poluente, a solubilidade da glimepirida foi testada em diversos solventes. A Tabela 4 mostra os solventes utilizados na tentativa de solubilização da glimepirida no desenvolvimento de método espectrofotométrico.

CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS

**Tabela 4.** Solventes testados no desenvolvimento de método espectrofotométrico para determinação de glimepirida em comprimidos

Solvente	Resultado
Água ultrapura	Precipitação
Água ultrapura e sonicação por 5 minutos	Precipitação
Água ultrapura e sonicação por 10 minutos	Precipitação
Água ultrapura e sonicação por 20 minutos	Precipitação
Água ultrapura e sonicação por 30 minutos	Precipitação
Água ultrapura + 0,1% de polissorbato 80	Precipitação
Água ultrapura + 2,0% de polissorbato 80	Precipitação
Água ultrapura + 0,1% de polissorbato 80 e sonicação por 5 minutos	Precipitação
Água ultrapura + 0,5% de polissorbato 80 e sonicação por 5 minutos	Precipitação
Ácido clorídrico 0,1 mol L <sup>-1</sup>	Precipitação
Ácido clorídrico 0,01 mol L <sup>-1</sup>	Precipitação
Água ultrapura + 0,05% de lauril sulfato de sódio	Precipitação
Água ultrapura + 0,5% de lauril sulfato de sódio	Precipitação
Água ultrapura + 1,0% de lauril sulfato de sódio	Precipitação
Água ultrapura + 1,5% de lauril sulfato de sódio	Precipitação
Água ultrapura + 2,0% de lauril sulfato de sódio	Precipitação
Água ultrapura + 2,5% de lauril sulfato de sódio	Precipitação
Ácido clorídrico 0,1 mol L <sup>-1</sup> + 2,5% de lauril sulfato de sódio	Precipitação
Ácido clorídrico 0,01 mol L <sup>-1</sup> + 2,5% de lauril sulfato de sódio	Precipitação
Tampão fosfato pH 6,8 (50 mmol L <sup>-1</sup> )	Precipitação
Tampão fosfato pH 6,8 (50 mmol L <sup>-1</sup> ) + 0,5% de lauril sulfato de sódio	Turvação
Tampão fosfato pH 6,8 (50 mmol L <sup>-1</sup> ) + 1,0% de lauril sulfato de sódio	Turvação
Tampão fosfato pH 6,8 (50 mmol L <sup>-1</sup> ) + 1,5% de lauril sulfato de sódio	Turvação
Tampão fosfato pH 6,8 (50 mmol L <sup>-1</sup> ) + 2,0% de lauril sulfato de sódio	Turvação
Tampão fosfato pH 6,8 (50 mmol L <sup>-1</sup> ) + 2,5% de lauril sulfato de sódio	Turvação
Tampão fosfato pH 7,4 (50 mmol L <sup>-1</sup> )	Precipitação
Tampão fosfato pH 7,4 (50 mmol L <sup>-1</sup> ) + 1,0% de lauril sulfato de sódio	Turvação
Tampão fosfato pH 7,4 (50 mmol L <sup>-1</sup> ) + 1,5% de lauril sulfato de sódio	Turvação
Tampão fosfato pH 7,4 (50 mmol L <sup>-1</sup> ) + 2,0% de lauril sulfato de sódio	Solubilização
Etanol	Solubilização
Etanol-água 50:50 v/v	Precipitação
Etanol-água 25:75 v/v	Precipitação
Etanol-água 10:90 v/v	Precipitação
NaOH 0,1 mol L <sup>-1</sup>	Solubilização
NaOH 0,01 mol L <sup>-1</sup>	Solubilização
NaOH 5 mmol L <sup>-1</sup>	Solubilização

### CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

De acordo com as propriedades físico-químicas da glimepirida já descritas nesta tese, era de se esperar que este fármaco não se solubilizasse em água, mesmo com a adição de consideráveis quantidades de tensoativo, pois seu coeficiente de partição óleo-água ( $\log P$ ) é de 3,81 (SEEDHER, KANOJIA, 2009), sendo a glimepirida praticamente insolúvel em água (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008). Além disso, a glimepirida possui vários nitrogênios em sua estrutura e seu  $pK_a$  é de 6,3 (SEEDHER, KANOJIA, 2009). Um aumento no pH da solução utilizada para tentativa de solubilização da glimepirida, portanto, promove um aumento do número de moléculas de glimepirida protonadas nos grupos funcionais contendo nitrogênios, tornando, conseqüentemente, a glimepirida mais solúvel em pHs altos. Inversamente, uma diminuição no pH tende a diminuir a solubilidade da glimepirida. Por esta razão, observou-se a precipitação da glimepirida em solventes ácidos, uma parcial solubilização em tampão fosfato pH 6,8 ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ) contendo até 2,5% de lauril sulfato de sódio (turvação), uma parcial solubilização em tampão fosfato pH 7,4 ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ) contendo até 1,5% lauril sulfato de sódio, e uma solubilização em tampão fosfato pH 7,4 ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ) contendo 2,0% lauril sulfato de sódio e em NaOH em concentrações acima de  $5 \text{ mmol L}^{-1}$ . Além disso, o etanol também solubilizou a glimepirida por ser menos polar do que a água, interagindo, portanto, mais efetivamente com a estrutura relativamente lipofílica da glimepirida.

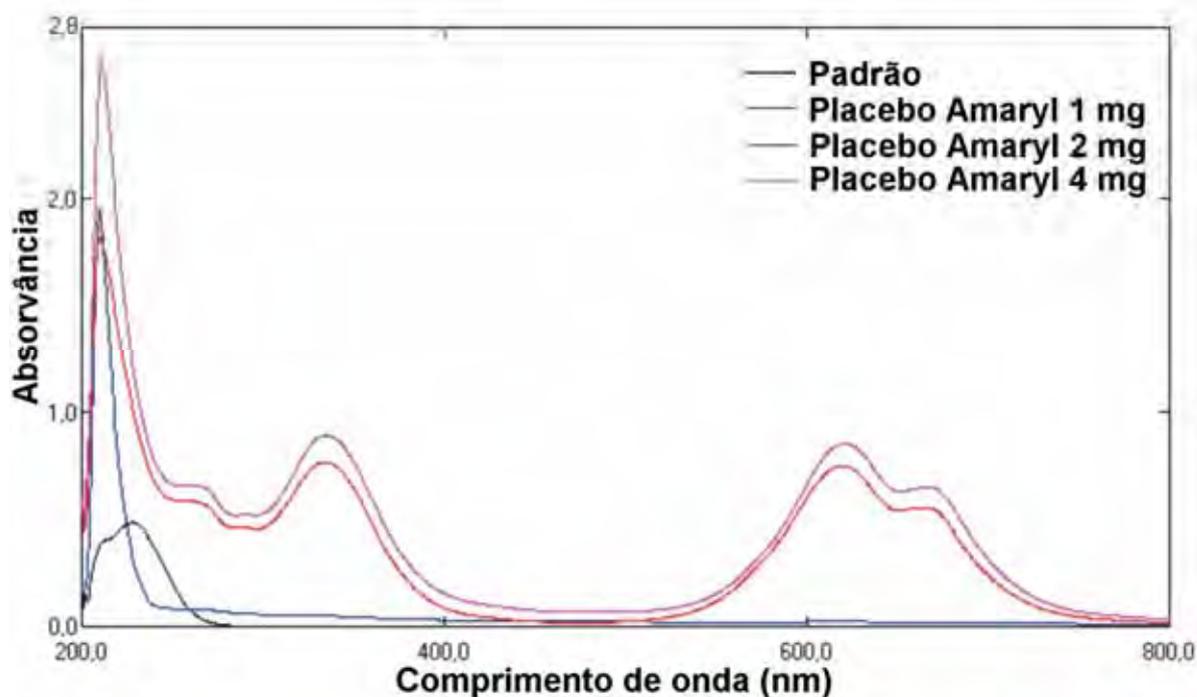
De acordo com a Tabela 4, pode-se observar que os solventes adequados para a determinação espectrofotométrica de glimepirida são: tampão fosfato pH 7,4 + 2,0% de lauril sulfato de sódio, etanol, NaOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , NaOH  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  e NaOH  $5 \text{ mmol L}^{-1}$ . Os placebos dos produtos Amaryl<sup>®</sup> 1, 2 e 4 mg, quando em contato com lauril sulfato de sódio, produziram turvação, impedindo o uso de tampão fosfato pH 7,4 + 2,0% de lauril

### CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

sulfato de sódio como solvente. O solvente de escolha para determinação espectrofotométrica foi, portanto, NaOH 5 mmol L<sup>-1</sup>, pois é de fácil preparo, de baixo custo e de fácil descarte.

A Figura 5 ilustra o espectro de absorção de glimepirida-SR em concentração de 10 µg mL<sup>-1</sup> e placebos dos produtos Amaryl<sup>®</sup> 1, 2 e 4 mg, utilizando NaOH 5 mmol L<sup>-1</sup> como solvente.

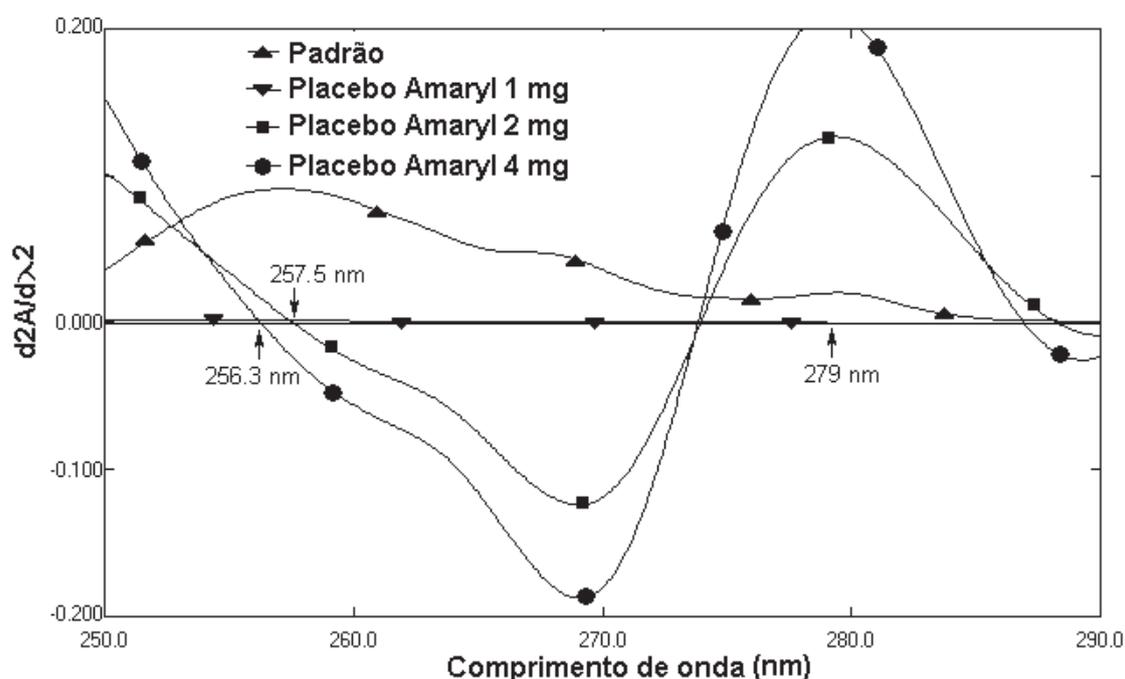


**Figura 5.** Espectro de absorção de glimepirida-SR, na concentração de 10 µg mL<sup>-1</sup> e placebos dos produtos Amaryl<sup>®</sup> 1, 2 e 4 mg, utilizando NaOH 5 mmol L<sup>-1</sup> como solvente.

A análise do espectro de absorção de ordem-zero de glimepirida demonstra que a solução a 10 µg mL<sup>-1</sup> em NaOH 5 mmol L<sup>-1</sup> apresenta máximo de absorção em 230 nm.

## CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Entretanto, os excipientes dos produtos Amaryl<sup>®</sup> 1, 2 e 4 mg apresentaram absorção significativa na região de absorção da glimepirida, o que impede o uso da espectrofotometria direta como técnica analítica. Por essa razão, o método de espectrofotometria derivada de segunda ordem (<sup>2</sup>D) foi considerado ideal para resolver a sobreposição de absorção de excipientes sobre o sinal de glimepirida.



**Figura 6.** Espectro de absorção de segunda derivada de glimepirida-SR, na concentração de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  e placebos dos produtos Amaryl<sup>®</sup> 1, 2 e 4 mg, utilizando NaOH  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  como solvente.

Como observado na Figura 6, o “zero-crossing” de soluções placebo de Amaryl<sup>®</sup> 1, 2 e 4 mg se localiza respectivamente em 279,0; 257,5 e 256,3 nm. Portanto, estes comprimentos de onda foram selecionados como ótimos para determinação de glimepirida na presença de excipientes farmacêuticos. As técnicas de derivada de primeira ordem (<sup>1</sup>D),

derivada de terceira ordem (<sup>3</sup>D) e derivada de quarta ordem (<sup>4</sup>D) foram descartadas, porque elas demonstraram resolução insuficiente e não apresentaram vantagens analíticas.

Para verificar o  $\Delta\lambda$  ótimo na obtenção do espectro de segunda derivada, vários valores foram testados, sendo  $\Delta\lambda = 8$  nm o mais apropriado a fim de produzir uma adequada relação razão sinal-ruído. Com o aumento do  $\Delta\lambda$ , foi observado uma melhoria na relação sinal-ruído, com diminuição na flutuação do espectro derivativo. Entretanto, se o valor de  $\Delta\lambda$  for muito alto, a intensidade do sinal do espectro de segunda derivada se deteriora.

#### 4.2.2.6.1. Avaliação da seletividade

A análise do espectro de segunda derivada de glimepirida-SR na concentração de 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e de soluções placebo dos produtos Amaryl<sup>®</sup> 1, 2 e 4 mg (Figura 6) demonstra que os excipientes das três formulações não interferem significativamente no método de determinação de glimepirida em comprimidos de Amaryl<sup>®</sup> por espectrofotometria derivada de segunda ordem. Os valores de resposta analítica obtidos com as soluções placebo foram 0,0000 para o placebo de Amaryl<sup>®</sup> 1 mg em 279 nm, 0,0004 para o placebo de Amaryl<sup>®</sup> 2 mg em 257,5 nm e -0,0005 para o placebo de Amaryl<sup>®</sup> 4 mg em 256,3 nm. Esses valores correspondem a 0,0; 0,43 e -0,55% dos sinais analíticos observados com a solução padrão a 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em 279,0; 257,5 e 256,3 nm, respectivamente.

CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS

4.2.2.6.2. Construção das curvas analíticas de glimepirida

As Tabelas 5, 6 e 7 mostram os valores experimentais obtidos na construção das curvas analíticas de glimepirida-SR em 279,0; 257,5 e 256,3 nm utilizando NaOH 5 mmol L<sup>-1</sup> como solvente.

**Tabela 5.** Valores experimentais obtidos na construção da curva analítica para glimepirida em 279,0 nm

Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Resposta ( $d2A/d\lambda 2$ )*	Médias das respostas ( $d2A/d\lambda 2$ )	Desvio padrão	D.P.R. %
2	0,0040	0,0042	0,000201	4,82
	0,0044			
	0,0041			
5	0,0097	0,0101	0,000377	3,72
	0,0103			
	0,0104			
10	0,0191	0,0201	0,000841	4,19
	0,0205			
	0,0207			
15	0,0295	0,0302	0,000620	2,06
	0,0304			
	0,0307			
20	0,0399	0,0403	0,000411	1,02
	0,0402			
	0,0407			
30	0,0608	0,0607	0,000494	0,82
	0,0601			
	0,0610			
40	0,0835	0,0818	0,001651	2,02
	0,0802			
	0,0817			

\*Média de três leituras

D.P.R. % - desvio padrão relativo.

CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS

**Tabela 6.** Valores experimentais obtidos na construção da curva analítica para glimepirida em 257,5 nm

Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Resposta ( $d2A/d\lambda^2$ )*	Médias das respostas ( $d2A/d\lambda^2$ )	Desvio padrão	D.P.R.%
2	0,0173	0,0176	0,00035	1,99
	0,0180			
	0,0174			
5	0,0438	0,0432	0,00050	1,16
	0,0431			
	0,0428			
10	0,0875	0,0875	0,00012	0,13
	0,0875			
	0,0873			
15	0,1305	0,1303	0,00160	1,23
	0,1286			
	0,1318			
20	0,1717	0,1708	0,00333	1,95
	0,1672			
	0,1737			
30	0,2670	0,2606	0,00624	2,39
	0,2545			
	0,2604			
40	0,3662	0,3507	0,01401	3,99
	0,3389			
	0,3469			

\*Média de três leituras

D.P.R.% - desvio padrão relativo.

CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS

**Tabela 7.** Valores experimentais obtidos na construção da curva analítica para glimepirida em 256,3 nm

Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Resposta ( $d2A/d\lambda^2$ ) *	Médias das respostas ( $d2A/d\lambda^2$ )	Desvio padrão	D.P.R.%
2	0,0172	0,0173	0,00023	1,36
	0,0176			
	0,0171			
5	0,0429	0,0427	0,00017	0,39
	0,0426			
	0,0427			
10	0,0853	0,0858	0,00048	0,56
	0,0861			
	0,0861			
15	0,1257	0,1264	0,00121	0,96
	0,1256			
	0,1278			
20	0,1675	0,1676	0,00328	1,95
	0,1644			
	0,1709			
30	0,2607	0,2567	0,00376	1,46
	0,2532			
	0,2562			
40	0,3555	0,3446	0,00973	2,82
	0,3368			
	0,3415			

\*Média de três leituras

D.P.R.% - desvio padrão relativo.

#### 4.2.2.6.3. Parâmetros obtidos a partir das curvas analíticas de glimepirida

A Tabela 8 relaciona os parâmetros obtidos a partir dos valores experimentais das curvas analíticas de glimepirida.

CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS

**Tabela 8.** Parâmetros obtidos a partir dos valores experimentais das curvas analíticas de glimepirida

Parâmetros	279,0 nm	257,5 nm	256,3 nm
$\Delta\lambda$ (nm)	8	8	8
Faixa linear ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	2,0 – 40,0	2,0 – 40,0	2,0 – 40,0
Equação: $y = bx + a$	$y = 0,0020x$ - 0,0002	$y = 0,0087x$ - 0,0008	$y = 0,0086x$ - 0,0011
Intercepto (a) $\pm$ DP	-0,0002 $\pm 0,00006$	-0,0008 $\pm 0,00291$	-0,0011 $\pm 0,00237$
Inclinação (b) $\pm$ DP	0,0020 $\pm 0,00089$	0,0087 $\pm 0,00035$	0,0086 $\pm 0,00026$
Limite de detecção ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	1,311	1,000	0,826
Limite de quantificação ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	4,371	3,332	2,755
$r \pm$ DP	0,99993 $\pm 0,00024$	0,99991 $\pm 0,00028$	0,99989 $\pm 0,00026$
n	7	7	7

DP = desvio padrão; r = coeficiente de correlação.

#### 4.2.2.6.4. Avaliação da precisão

A Tabela 9 relaciona os valores de precisão do método nos comprimentos de onda de 279,0; 257,5 e 256,3 nm.

CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS

**Tabela 9.** Valores obtidos no teste de precisão de método de espectrofotometria derivada de segunda ordem em 279,0; 257,5 e 256,3 nm

Comprimento de onda	Nível	Respostas analíticas (d2A/dλ <sup>2</sup> )						D.P.R.* (%)
		1	2	3	4	5	6	
279,0 nm	Repetitividade	0,0211	0,0214	0,0217	0,0213	0,0218	0,0211	1,39 (n=6)
	Precisão intermediária	0,0211	0,0214	0,0217	0,0213	0,0218	0,0211	1,74 (n=12)
257,5 nm	Repetitividade	0,0944	0,0933	0,0930	0,0923	0,0928	0,0913	1,11 (n=6)
	Precisão intermediária	0,0944	0,0933	0,0930	0,0923	0,0928	0,0913	1,02 (n=12)
256,3 nm	Repetitividade	0,0917	0,0906	0,0903	0,0897	0,0903	0,0890	1,00 (n=6)
	Precisão intermediária	0,0917	0,0906	0,0903	0,0897	0,0903	0,0890	1,14 (n=12)

\*D.P.R. = Desvio padrão relativo.

#### 4.2.2.6.5. Exatidão utilizando o teste de recuperação para glimepirida

As Tabelas 10, 11 e 12 demonstram os valores obtidos no teste de recuperação de glimepirida utilizando espectrofotometria derivada de segunda ordem em 279,0; 257,5 e 256,3 nm para os produtos Amaryl<sup>®</sup> 1, 2 e 4 mg, respectivamente.

CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS

**Tabela 10.** Valores obtidos no teste de recuperação de glimepirida-SR utilizando espectrofotometria derivada de segunda ordem em 279,0 nm para o produto Amaryl® 1 mg

	Concentração inicial ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Concentração adicionada ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Concentração teórica final ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Concentração recuperada ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) *	Recuperação (%) $\pm$ D.P.R.* (%)
R1 (80%)	5	3	8	2,939	97,98 $\pm$ 2,69
R2 (100%)	5	5	10	5,064	101,28 $\pm$ 3,04
R3 (120%)	5	7	12	6,933	99,04 $\pm$ 4,59

\* Média de três determinações

\* D.P.R. = Desvio padrão relativo.

**Tabela 11.** Valores obtidos no teste de recuperação de glimepirida-SR utilizando espectrofotometria derivada de segunda ordem em 257,5 nm para o produto Amaryl® 2 mg

	Concentração inicial ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Concentração adicionada ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Concentração teórica final ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Concentração recuperada ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) *	Recuperação (%) $\pm$ D.P.R.* (%)
R1 (80%)	5	3	8	3,033	101,10 $\pm$ 0,34
R2 (100%)	5	5	10	5,033	100,66 $\pm$ 0,60
R3 (120%)	5	7	12	6,828	97,54 $\pm$ 0,43

\* Média de três determinações

\*D.P.R. = Desvio padrão relativo.

**Tabela 12.** Valores obtidos no teste de recuperação de glimepirida-SR utilizando espectrofotometria derivada de segunda ordem em 256,3 nm para o produto Amaryl® 4 mg

	Concentração inicial ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Concentração adicionada ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Concentração teórica final ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Concentração recuperada ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) *	Recuperação (%) $\pm$ D.P.R.* (%)
R1 (80%)	5	3	8	2,931	97,70 $\pm$ 2,02
R2 (100%)	5	5	10	4,959	99,18 $\pm$ 0,32
R3 (120%)	5	7	12	6,816	97,38 $\pm$ 0,38

\* Média de três determinações

\*D.P.R. = Desvio padrão relativo.

CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS

---

4.2.2.6.6. Robustez

A Tabela 13 demonstra os valores de robustez obtidos a partir do teste proposto por Youden e Steiner (YOUDEN, STEINER, 1975).

**Tabela 13.** Valores obtidos no teste de robustez de método por espectrofotometria derivada de segunda ordem

Variável	Condição experimental								D.P. x $\sqrt{2}^*$
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Concentração de NaOH	A	A	A	A	a	a	a	a	
Fornecedor de NaOH	B	B	b	b	B	B	b	b	
Comprimento de onda	C	c	C	c	C	c	C	c	
Tempo de sonicação	D	D	d	d	d	d	D	D	
Cubeta	E	e	E	e	e	E	e	E	
Delta lambda	F	f	f	F	F	f	f	F	
Velocidade de varredura	G	g	g	G	g	G	G	g	
Resultados (279 nm)	0,0216	0,0168	0,0308	0,0175	0,0224	0,0124	0,0304	0,0180	0,0092
Resultados (257,5 nm)	0,0950	0,1190	0,0940	0,0888	0,0945	0,1137	0,1027	0,0908	0,0156
Resultados (256,3 nm)	0,0928	0,1086	0,0833	0,0926	0,0935	0,1090	0,0904	0,0956	0,0125

D.P. x  $\sqrt{2}^*$  = Desvio padrão multiplicado pela raiz quadrada de 2.

A partir dos valores encontrados, os efeitos de cada variável foram calculados e estão descritos a seguir, na Tabela 14.

CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS

**Tabela 14.** Valores de efeitos obtidos de acordo com o teste de Youden e Steiner (1975)

Variável	Efeitos		
	Amaryl <sup>®</sup> 1 mg (279,0 nm)	Amaryl <sup>®</sup> 2 mg (257,5 nm)	Amaryl <sup>®</sup> 4 mg (256,3 nm)
Concentração de NaOH	0,0009	-0,0012	-0,0028
Fornecedor de NaOH	-0,0059	0,0115	0,0105
Comprimento de onda	0,0101*	-0,0065	-0,0115
Tempo de sonicação	0,0009	0,0041	0,0023
Cubeta	-0,0011	-0,0029	-0,0011
Delta lambda	-0,0027	-0,0151	-0,0042
Velocidade de varredura	-0,0015	0,0005	0,0009
$s\sqrt{2}$	0,0092	0,0156	0,0125

\* = Efeito maior do que o critério  $s\sqrt{2}$  (desvio padrão multiplicado pela raiz quadrada de 2).

De acordo com Youden e Steiner (YOUDEN, STEINER, 1975), as variáveis que produzirem um efeito maior do que a raiz quadrada de dois multiplicada pelo desvio padrão entre os resultados ( $D.P. \times \sqrt{2}$ ) influenciam significativamente a resposta analítica. De acordo com a observação das Tabelas 13 e 14, pode-se concluir que a única variável que influencia significativamente na resposta é o comprimento de onda para o produto Amaryl<sup>®</sup> 1 mg, pois o efeito (0,0101) é maior em módulo do que a raiz quadrada de dois multiplicada pelo desvio padrão entre os resultados (0,0092), sendo, portanto, o método robusto somente para as outras variáveis consideradas: concentração de hidróxido de sódio, fornecedor de hidróxido de sódio, tempo de sonicação, cubeta, delta lambda ( $\Delta\lambda$ ) e velocidade de varredura.

CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS

---

4.2.2.6.7. Estabilidade de glimepirida em solução de NaOH 5 mmol L<sup>-1</sup>

A Tabela 15 mostra os resultados da determinação por espectrofotometria derivada de segunda ordem de solução de glimepirida na concentração de 50,0 µg mL<sup>-1</sup>, utilizando-se NaOH 5 mmol L<sup>-1</sup> como solvente nos tempos de 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas do preparo.

**Tabela 15.** Estudo de estabilidade de glimepirida em solução de NaOH 5 mmol L<sup>-1</sup>

		0h	1h	2h	3h	4h	5h	6h
Respostas em 279,0 nm	1 (d2A/dλ <sup>2</sup> )	0,1003	0,1011	0,1006	0,1000	0,1007	0,1005	0,1005
	2 (d2A/dλ <sup>2</sup> )	0,1007	0,1001	0,1004	0,1000	0,1006	0,0998	0,1002
	3 (d2A/dλ <sup>2</sup> )	0,1008	0,1015	0,1002	0,0959	0,0993	0,0993	0,1003
Respostas em 257,5 nm	1 (d2A/dλ <sup>2</sup> )	0,4390	0,4426	0,4391	0,4376	0,4378	0,4373	0,4369
	2 (d2A/dλ <sup>2</sup> )	0,4397	0,4374	0,4393	0,4376	0,4383	0,4326	0,4361
	3 (d2A/dλ <sup>2</sup> )	0,4395	0,4406	0,4394	0,4201	0,4321	0,4320	0,4369
Respostas em 256,3 nm	1 (d2A/dλ <sup>2</sup> )	0,4276	0,4304	0,4243	0,4244	0,4255	0,4249	0,4242
	2 (d2A/dλ <sup>2</sup> )	0,4275	0,4252	0,4259	0,4244	0,4252	0,4200	0,4235
	3 (d2A/dλ <sup>2</sup> )	0,4270	0,4280	0,4275	0,4086	0,4200	0,4194	0,4249

A Tabela 16 mostra a análise de variância comparando as respostas analíticas até o tempo de 6 h.

CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS

**Tabela 16.** Análise de variância de respostas analíticas no estudo de estabilidade de glimepirida em solução de NaOH 5 mmol L<sup>-1</sup>

	Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	F crítico
Respostas em 279,0 nm	Tratamentos	9,73 x 10 <sup>-6</sup>	6	1,62 x 10 <sup>-6</sup>	1,57	2,85
	Erro	1,45 x 10 <sup>-5</sup>	14	1,03 x 10 <sup>-6</sup>		
	Total	2,42 x 10 <sup>-5</sup>	20			
Respostas em 257,5 nm	Tratamentos	1,75 x 10 <sup>-4</sup>	6	2,91 x 10 <sup>-5</sup>	1,57	2,85
	Erro	2,59 x 10 <sup>-4</sup>	14	1,85 x 10 <sup>-5</sup>		
	Total	4,34 x 10 <sup>-4</sup>	20			
Respostas em 256,3 nm	Tratamentos	1,80 x 10 <sup>-4</sup>	6	3,00 x 10 <sup>-5</sup>	1,88	2,85
	Erro	2,24 x 10 <sup>-4</sup>	14	1,60 x 10 <sup>-5</sup>		
	Total	4,04 x 10 <sup>-4</sup>	20			

SQ = soma quadrática, gl = graus de liberdade, MQ = média quadrática, F = valor F calculado, F = valor F crítico.

A análise dos dados da Tabela 16 revelou a ausência de diferenças estatísticas ao nível de significância de 5% entre as leituras ( $d2A/d\lambda^2$ ) de solução de glimepirida na concentração de 50,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  nos tempos de 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas após o preparo, indicando a estabilidade do fármaco em NaOH 5 mmol L<sup>-1</sup> no intervalo de tempo considerado.

#### 4.2.2.7. Determinação de glimepirida nos comprimidos

A Tabela 17 relaciona os valores experimentais de glimepirida obtidos pelo método espectrofotométrico na região UV para comprimidos.

CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS

**Tabela 17.** Valores experimentais de comprimidos de glimepirida, obtidos por espectrofotometria derivada de primeira ordem na região UV

	Padrão	Amaryl <sup>®</sup> 1 mg (279,0 nm)	Amaryl <sup>®</sup> 2 mg (257,5 nm)	Amaryl <sup>®</sup> 4mg (256,3 nm)
Glimepirida (%)	100,12	100,21	100,34	103,93
Glimepirida (mg)	---	1,00	2,01	4,16
D.P.R. (%)	1,03 (n=5)	2,19 (n=5)	1,38 (n=5)	1,02 (n=5)

D.P.R. = Desvio padrão relativo.

#### 4.2.2.8. Discussão

Na espectrofotometria de derivadas a diferenciação do espectro de absorção por ordem zero não aumenta as informações do espectro de absorção original, mas ocorre supressão das bandas largas, realce das bandas estreitas apresentando maior resolução e obedecendo, ainda, a lei de Beer-Lambert (PASCHOAL et al., 2003). Esta técnica é frequentemente utilizada na tentativa de resolução de sobreposição de bandas. No caso deste trabalho, o recurso de derivadas foi satisfatoriamente empregado para minimizar a absorção dos excipientes presentes em comprimidos de Amaryl<sup>®</sup> 1 mg, 2 mg e 4 mg. Foi, portanto, desenvolvido e validado um método analítico por espectrofotometria derivada de segunda ordem na região UV para determinação de glimepirida em comprimidos. Para desenvolver o método, avaliou-se a solubilidade de glimepirida em diferentes solventes. O fármaco mostrou-se solúvel em tampão fosfato pH 7,4 + 2,0% de lauril sulfato de sódio, etanol, NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>, NaOH 0,01 mol L<sup>-1</sup> e NaOH 5 mmol L<sup>-1</sup>. Os placebos dos produtos Amaryl<sup>®</sup> 1, 2 e 4 mg, quando em contato com lauril sulfato de sódio, produziram turvação, impedindo o uso de tampão fosfato pH 7,4 + 2,0% de lauril sulfato de sódio como

### CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

solvente. O solvente de escolha para determinação espectrofotométrica foi NaOH mmol L<sup>-1</sup>, procurando um método simples, de baixo custo e a utilização de um solvente de baixa toxicidade. O método mostrou-se linear no intervalo de concentração de 2,0 - 40,0 µg mL<sup>-1</sup>, apresentando coeficientes de correlação maiores do que 0,999 entre as concentrações estabelecidas e as respostas analíticas nos comprimentos de onda de 279,0; 257,5 e 256,3 nm. A precisão do método, avaliada pelo desvio padrão relativo entre leituras de soluções de glimepirida-SR em NaOH 5 mmol L<sup>-1</sup> nos comprimentos de onda de 279,0; 257,5 e 256,3 nm, foi demonstrada pela obtenção de valores inferiores a 2% tanto ao nível de repetitividade quanto precisão intermediária. A exatidão do método foi verificada pelo teste de recuperação, em que se obteve médias de 99,43%, 99,77% e 98,09%, para os produtos Amaryl<sup>®</sup> 1 mg, 2 mg e 4 mg, respectivamente. Com este resultado, comprova-se a exatidão do método proposto. O teste de Youden e Steiner (YOU DEN, STEINER, 1975) mostrou que o método é robusto para os seguintes parâmetros: concentração de hidróxido de sódio, fornecedor de hidróxido de sódio, tempo de sonicação, cubeta, delta lambda ( $\Delta\lambda$ ) e velocidade de varredura. A glimepirida mostrou-se estável em solução de NaOH 5 mmol L<sup>-1</sup> por um tempo de até 6 horas, mostrando que o método é adequado para ser empregado em rotina de laboratórios de controle de qualidade. Portanto, o método apresentado mostrou-se adequado, demonstrando seletividade, linearidade, precisão, exatidão, robustez e adequados limites de detecção e quantificação, apresentando as vantagens de ser mais simples e de menor custo em relação à cromatografia líquida de alta eficiência. Além disso, o método espectrofotométrico gera menor quantidade de resíduos, devido ao gasto inferior de solventes, e possui instrumentação de menor custo.

### 4.2.3. Cromatografia líquida de alta eficiência

#### 4.2.3.1. Condições cromatográficas

A fase móvel foi otimizada de forma multivariada e variou de acordo com cada nível experimental, que será descrito a seguir. A fase móvel foi filtrada através de membrana com poro de 0,45  $\mu\text{m}$  e 47 mm de diâmetro, sob vácuo e desgaseificada no ultrassom durante 30 minutos. O equipamento utilizado foi o cromatógrafo a líquido Waters e coluna Symmetry Waters C-18 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ). A detecção foi realizada no UV a 228 nm e o volume de injeção foi de 20  $\mu\text{L}$ . As análises foram realizadas em temperatura ambiente (25° C).

#### 4.2.3.2. Solução utilizada na otimização de metodologia analítica

Para otimização de metodologia analítica, preparou-se amostra de glimepirida sob condições de degradação forçada, através de estresse de glimepirida-SR, realizado de acordo com a literatura (KOVARIKOVÁ et al., 2004; BANSAL et al., 2008).

**Degradação neutra, ácida, alcalina e oxidativa:** Foi preparada solução de glimepirida-SR em metanol na concentração de 500,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A partir desta solução foram transferidas, separadamente, quatro alíquotas de 20,0 mL para frascos de vidro e adicionou-se 20 mL de água ultra pura, 20 mL de HCl 0,2 mol  $\text{L}^{-1}$ , 20 mL de NaOH 0,2 mol  $\text{L}^{-1}$  e 20 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  4 % em cada um dos frascos, obtendo-se soluções com concentrações teóricas finais de aproximadamente 250,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Os frascos de vidro

### CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

foram fechados e mantidos em banho em temperatura de 85°C por 360 minutos. A fim de se obter uma solução contendo todos os possíveis produtos de degradação de glimepirida para otimização da metodologia, alíquotas de 1,0 mL de cada frasco, contendo o padrão estressado sob cada condição, foram misturadas e diluídas 10 vezes em fase móvel imediatamente antes das injeções cromatográficas. A fase móvel utilizada variou de acordo com cada nível experimental.

#### 4.2.3.3. Estratégia de otimização de metodologia

A metodologia analítica para determinação de glimepirida em comprimidos foi otimizada de forma multivariada, a fim de se obter um método de análise capaz de separar a glimepirida de seus produtos de degradação e, ao mesmo tempo, com baixo tempo de corrida. A abordagem experimental foi realizada de acordo com a literatura (MONTGOMERY, 2000), onde foi realizado inicialmente planejamento fatorial completo  $2^3$  para investigar quais os fatores experimentais mais importantes e quais os fatores que não afetam a resposta analítica. Nesse tipo de experimento, os fatores são examinados em dois níveis, o nível mais alto, codificado com o sinal positivo (+) e o nível mais baixo, codificado com o sinal negativo (-). Os fatores e seus níveis estudados neste experimento foram: pH do tampão acetato usado na fase móvel (4,5 e 5,5), proporção do tampão utilizado na fase móvel (35% e 40%) e vazão da fase móvel ( $0,8 \text{ mL min}^{-1}$  e  $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ ).

Estes três fatores foram inicialmente selecionados porque normalmente influenciam significativamente nas separações cromatográficas. Com relação ao pH do tampão utilizado na fase móvel, inicialmente foram selecionados valores intermediários (meia unidade

CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS

---

abaixo de pH 5,0 e meia unidade acima deste valor). Estes valores foram selecionados com base em alguns trabalhos descritos na literatura (Tabela 1) e em alguns experimentos preliminares, onde se observou separações razoáveis próximas destes valores. Com relação à proporção de tampão da fase móvel, observou-se em experimentos preliminares que separações razoáveis entre a glimepirida e seus produtos de degradação foram obtidas com proporções deste componente entre 30% e 40%. Os níveis de vazão da fase móvel (entre 0,8 mL min<sup>-1</sup> e 1,2 mL min<sup>-1</sup>) foram selecionados porque a maioria dos trabalhos de separações cromatográficas de fármacos em medicamentos utiliza estes valores.

A Tabela 18 mostra os fatores e os níveis codificados usados na realização do planejamento fatorial completo.

**Tabela 18.** Fatores e níveis empregados na construção de planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup>

Fatores	Níveis	
	(-) Baixo	(+) Alto
F1-pH do tampão acetato da fase móvel	4,5	5,5
F2- Proporção do tampão acetato da fase móvel	35%	40%
F3-Vazão da fase móvel	0,8 mL min <sup>-1</sup>	1,2 mL min <sup>-1</sup>

A resposta analítica buscada na otimização da metodologia foi a maior resolução entre as bandas cromatográficas e o menor tempo de corrida, empregando-se a função de utilidade, proposta por Derringer e Suich (DERRINGER, SUICH, 1980). Neste tipo de abordagem, as respostas obtidas em diferentes grandezas  $y_i$ , ( $i = 1, 2, \dots, m$ ), são

CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS

---

dimensionadas em uma mesma escala ( $d_i$ ), definidas como funções de utilidade parcial. A escala dessas funções de utilidade parcial ( $d_i$ ) varia entre 0, para respostas indesejáveis e 1 para as respostas buscadas. As equações 4 e 5 descrevem as fórmulas utilizadas para obtenção das funções de utilidade parcial:

$$d_i = \{0, \text{ se } y_i \leq a; [(y_i - a)/(b - a)], \text{ se } a < y_i < b; 1, \text{ se } y_i \geq b\} \quad (4)$$

em que:  $y_i$  = resposta observada;  $a$  = limite inferior e  $b$  = limite superior

$$d_i = \{1, \text{ se } y_i \leq a; [(y_i - b)/(a - b)], \text{ se } a < y_i < b; 0, \text{ se } y_i \geq b\} \quad (5)$$

em que:  $y_i$  = resposta observada;  $a$  = limite inferior e  $b$  = limite superior

A equação 4 é descrita como do tipo maior é melhor, ou seja, ela é utilizada quando se busca respostas com os maiores valores. Neste estudo, esta fórmula foi utilizada nas resoluções entre as bandas cromatográficas, buscando a maior resolução entre as bandas da glimepirida e seus produtos de degradação. A equação 5 é descrita como do tipo menor é melhor, ou seja, ela é utilizada quando se busca respostas com os menores valores. Neste trabalho, ela foi utilizada no tempo de corrida, buscando a obtenção de um baixo tempo de corrida, a fim de se economizar tempo e reagentes cromatográficos. Após as funções serem definidas para cada resposta de interesse, uma função de utilidade global ( $D$ ) foi definida, representando a função de utilidade média, que é calculada pela média geométrica das funções de utilidade individuais. Portanto,  $D$  é calculado como a raiz enésima do produto

CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS

das funções de utilidade individuais. Um valor de D próximo de 1 indica que a combinação dos diferentes critérios é ótima e as respostas estão próximas os valores desejados.

Após definição da resposta analítica, baseada na função de utilidade de Derringer e Suich (DERRINGER, SUICH, 1980), um planejamento fatorial completo  $2^3$  foi executado, em um total de 8 experimentos, realizados em duplicata, em ordem aleatória, de acordo com a matriz de planejamento apresentada na Tabela 19.

**Tabela 19.** Planejamento fatorial completo  $2^3$  utilizado na otimização de método analítico para determinação de glimepirida em comprimidos por cromatografia líquida de alta eficiência

Ensaio	F1	F2	F3	Resposta analítica (D)		Média das respostas	Variância
				Resposta 1	Resposta 2		
	- (4,5) + (5,5)	- (35%) + (40%)	- (0,8) + (1,2)				
1	-	-	-	0,645	0,670	0,657	$3,10 \times 10^{-4}$
2	+	-	-	0,449	0,413	0,431	$6,19 \times 10^{-4}$
3	-	+	-	0,623	0,726	0,674	$5,35 \times 10^{-3}$
4	+	+	-	0,758	0,638	0,698	$7,22 \times 10^{-3}$
5	-	-	+	0,727	0,648	0,687	$3,16 \times 10^{-3}$
6	+	-	+	0,529	0,540	0,535	$5,53 \times 10^{-5}$
7	-	+	+	0,684	0,703	0,693	$1,70 \times 10^{-4}$
8	+	+	+	0,600	0,523	0,562	$2,92 \times 10^{-3}$

Os valores das respostas foram utilizados para calcular os valores médios e a variância das respostas de cada experimento. A variância de cada experimento foi obtida usando a equação 6:

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad (6)$$

CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS

---

em que:  $n$  = número de vezes que o ensaio foi repetido,  $x_i$  representa a resposta analítica de cada ensaio (função de utilidade global ( $D$ )) e  $\bar{x}$  representa o valor médio das respostas de cada experimento.

As respostas analíticas foram utilizadas também para calcular os efeitos de cada fator. O efeito de cada fator é a média de todos os valores de um determinado fator no nível positivo subtraído da média de todos os valores do fator considerado em seu nível negativo. Por exemplo, o efeito para o pH do tampão acetato da fase móvel é obtido a partir do seguinte cálculo:  $[(1/4) (0,431 + 0,698 + 0,535 + 0,562)] - [(1/4) (0,657 + 0,674 + 0,687 + 0,693)] = -0,122$ . Os efeitos de interação foram calculados do mesmo modo, porém a coluna de interação entre dois fatores é igual ao produto das colunas dos fatores principais. A fim de verificar a significância estatística dos fatores e suas interações, a variância padrão ( $S_p^2$ ) foi calculada utilizando a equação 7:

$$S_p^2 = \frac{(n_A - 1)S_A^2 + (n_B - 1)S_B^2}{(n_A - 1) + (n_B - 1)} \quad (7)$$

em que:  $n$  é o número de vezes que o ensaio foi repetido e  $s^2$  é a variância obtida em cada ensaio. Posteriormente, a variância dos efeitos foi estimada partir da equação 8:

$$V(\text{estimada}) = \frac{S_p^2}{n} + \frac{S_p^2}{n} \quad (8)$$

em que:  $S_p^2$  é a variância padrão e  $n$  é o número de ensaios realizados nos níveis altos ( $n = 4$ ) e baixos ( $n = 4$ ).

CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS

---

O erro dos efeitos foi então obtido pela raiz quadrada da variância estimada. Multiplicando o erro por um valor  $t$  tabelado, com 8 graus de liberdade ao nível de significância de 5% (2,306) foi finalmente obtido o erro estimado. Quando valores absolutos de efeitos maiores do que o erro estimado são obtidos, significa que esses valores influenciam na resposta analítica. Além disso, efeitos positivos indicam que o aumento nos seus níveis produz o aumento na resposta analítica e efeitos negativos indicam que a resposta analítica tende a diminuir com o aumento nos seus níveis.

Após o estabelecimento dos fatores significantes, obtidos a partir do planejamento fatorial completo  $2^3$ , uma otimização final foi realizada utilizando matriz de Doehlert, que compreende 7 condições, com o ponto central realizado em triplicata (FERREIRA et al., 2004). Os fatores utilizados na otimização final e seus níveis foram: pH do tampão utilizado na fase móvel (5,5; 6,0 e 6,5) e proporção do tampão fosfato utilizado na fase móvel (30%, 32%, 34%, 36% e 38%). Os experimentos foram realizados de acordo com a matriz apresentada na Tabela 20.

**Tabela 20.** Matriz de Doehlert utilizada na otimização final de método analítico para determinação de glimepirida em comprimidos por cromatografia líquida de alta eficiência

Ensaio	pH do tampão fosfato da fase móvel	Proporção do tampão fosfato da fase móvel	Resposta analítica (D)		
1 (triplicata)	6,0	34	0,648	0,639	0,632
2	6,0	30		0,408	
3	6,5	32		0,623	
4	6,0	38		0,413	
5	5,5	36		0,339	
6	5,5	32		0,534	
7	6,5	36		0,595	

Utilizando a matriz de Doehlert, foi aplicada a metodologia de superfície de resposta, a fim de se otimizar os níveis dos dois fatores. Os dados foram processados utilizando o *software* STATISTICAL, versão 6.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

Esta metodologia de superfície de resposta se baseia na construção de um modelo matemático empírico, que geralmente emprega funções polinomiais lineares ou quadráticas para descrever o sistema estudado e, conseqüentemente dão condições de explorar (modelar e deslocar) o sistema até sua otimização (TEÓFILO, FERREIRA, 2006). Os principais planejamentos utilizados em otimização de métodos em química analítica são: Composto Central "CCD - *Central Composite Design*", Box Behnken e Doehlert. Entretanto, o planejamento de Doehlert é mais fácil de aplicar e necessita de menos experimentos para otimização do que os outros planejamentos citados (FERREIRA et al., 2007), o que justifica o seu emprego neste trabalho.

#### 4.2.3.4. Condições cromatográficas após otimização do método

Após otimização, o método foi validado utilizando como fase móvel: tampão fosfato de sódio (27,5 mmol L<sup>-1</sup>; pH 6,5) e metanol (34:66, v/v). A fase móvel foi filtrada através de membrana com poro de 0,45 µm e 47 mm de diâmetro, sob vácuo e desgaseificada no ultrassom durante 30 minutos. O equipamento utilizado foi o cromatógrafo a líquido Waters e coluna symmetry Waters C-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm). A detecção foi realizada no UV a 228 nm e o volume de injeção foi de 20 µL. As análises foram realizadas em temperatura ambiente (25° C).

## 4.2.3.5. Validação

A validação do método cromatográfico foi realizada de acordo com especificações do ICH (ICH, 2005) onde foram determinadas as seguintes características:

Seletividade: foi avaliada pela possível interferência dos excipientes na determinação quantitativa de glimepirida, comparando-se os cromatogramas obtidos do fármaco com os cromatogramas dos excipientes presentes nos produtos farmacêuticos. Foi preparada solução de glimepirida-SR na concentração de  $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  em fase móvel. Paralelamente, soluções contendo os excipientes dos produtos Amaryl<sup>®</sup> 1, 2 e 4 mg, presentes nos comprimidos, foram preparadas em fase móvel utilizando diluição equivalente à solução de glimepirida-SR, em conformidade com o peso médio dos comprimidos. As soluções preparadas para o teste foram colocadas em banho de ultrassom por 5 minutos. Os cromatogramas foram comparados, verificando a possível interferência dos excipientes na determinação do teor de glimepirida. Adicionalmente, a seletividade foi analisada através de análises por espectrometria de massas no tempo de análise da glimepirida da solução padrão, em comparação com análises por espectrometria de massas no tempo de análise da glimepirida obtidas com as soluções estressadas (degradação neutra, ácida, alcalina e oxidativa, seção 4.3.2.2). As seguintes condições do detector de massas foram utilizadas: Fonte de ionização: *electrospray* positivo (ESI (+)), divisor de vazão na interface HPLC/MS:  $130 \mu\text{L min}^{-1}$ , potencial do capilar: -4500 V, temperatura do gás secante: 300 °C, vazão do gás secante:  $8,0 \text{ L min}^{-1}$ , pressão de nebulização: 30 psi, quantidade de íons acumulados no *Ion-Trap*: 40000, tempo máximo de acúmulo de íons: 200 ms, skimmer: 40 volts, cap exit: 129, 5 volts, Oct 1: 12 volts, Oct 2: volts V, trap drive: 58, 5 volts, oct RF:

### CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

189 volts, lens 1: -5,0 volts, Lens 2: - 60,0 volts e intervalo de varredura no modo *full Scan*: 50-500 ou 50-700.

Linearidade: foi avaliada pela análise de regressão de três curvas analíticas autênticas, construídas em três diferentes dias. Sete níveis de concentração foram obtidos (2 a 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Para a obtenção da curva analítica, foram pesados 12,5 mg de glimepirida-SR, transferidos para balão volumétrico de 250 mL, dissolvidos em metanol e mantidos em aparelho de ultrassom por 5 minutos, para melhor solubilização. Com a utilização de bureta foram obtidas soluções com concentrações de 2,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 30,0 e 40,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de glimepirida-SR, diluídas em fase móvel. As soluções foram então filtradas, injetadas no cromatógrafo e analisadas pelo método desenvolvido. A curva analítica foi construída utilizando o programa Microsoft Excel. A representação gráfica da equação da reta foi determinada pela análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ): foram determinados pelas equações 2 e 3, indicadas pelo ICH (ICH, 2005):

$$\text{LD} = 3(\text{DP}/a) \quad (2)$$

$$\text{LQ} = 10(\text{DP}/a) \quad (3)$$

em que DP = desvio padrão das intersecções e  $a$  é a inclinação média das três curvas analíticas obtidas no estudo de linearidade.

Precisão: foi analisada pelos níveis de repetitividade e precisão intermediária. A repetitividade foi avaliada pela análise de seis soluções de glimepirida-SR, com

### CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

concentração teórica de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ , preparadas no mesmo dia e sob as mesmas condições experimentais, utilizando como solvente fase móvel. Calculou-se o desvio padrão relativo entre as determinações. A precisão intermediária foi avaliada pela repetição do procedimento em dois diferentes dias, por dois diferentes analistas.

Exatidão: Foi avaliada pelas medidas de recuperação de glimepirida-SR adicionadas em amostras de Amaryl<sup>®</sup> 1, 2 e 4 mg em triplicata, em três níveis de concentração, 80, 100 e 120% da concentração teórica do método, adicionados no começo do procedimento, de acordo com recomendações do ICH (ICH, 2005). Foi preparada solução estoque de glimepirida-SR em metanol com concentração de  $50,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ . A partir do peso médio das amostras de Amaryl<sup>®</sup> 1, 2 e 4 mg, foram preparadas soluções da amostra em fase móvel com concentração de  $50,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ . As soluções adicionadas foram preparadas, transferindo-se as soluções estoques para balão volumétrico de 10 mL com auxílio de micropipeta, completando-se o volume com fase móvel. A Tabela 21 relaciona as concentrações das soluções obtidas para o teste de recuperação de glimepirida-SR usando método de cromatografia líquida de alta eficiência.

CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS

**Tabela 21.** Concentrações das soluções do teste de recuperação aplicado à amostra de glimepirida usando método de cromatografia líquida de alta eficiência

	Volume de solução amostra a 50 µg mL <sup>-1</sup> adicionado em balão volumétrico de 10 mL (mL)	Volume de solução padrão a 50 µg mL <sup>-1</sup> adicionado em balão volumétrico de 10 mL (mL)	Concentração obtida de adicionado (µg mL <sup>-1</sup> )
P	-	1	5
A	1,0	-	5
R <sub>1</sub> (80%)	1,0	0,6	8
R <sub>2</sub> (100%)	1,0	1,0	10
R <sub>3</sub> (120%)	1,0	1,4	12

Robustez: Foi avaliada pelo teste de robustez de Youden e Steiner (YOU DEN, STEINER, 1975), no qual sete variáveis que podem interferir no resultado analítico foram alteradas, com posterior análise dos dados. A resposta estudada neste teste foi a porcentagem de glimepirida presente nos produtos Amaryl<sup>®</sup> 1, 2 e 4 mg, a qual foi calculada pela comparação das áreas das bandas cromatográficas obtidas em cada produto com área das bandas cromatográficas obtidas com soluções padrão de glimepirida, na mesma concentração das amostras. As sete variáveis estudadas neste teste foram: fornecedor de coluna cromatográfica, pH do tampão fosfato da fase móvel, proporção do tampão fosfato na fase móvel, comprimento de onda do detector, vazão da fase móvel, fornecedor de metanol e utilização de ultrassom. As condições normais das variáveis foram codificadas por letras maiúsculas A, B, C, D, E, F e G e seus valores alternativos foram codificados pelas correspondentes letras minúsculas a, b, c, d, e, f e g. Um total de oito experimentos foram conduzidos, como indicado na Tabela 22. A partir desses resultados, o efeito de cada variável foi estimado, através da diferença entre a média dos resultados das quatro análises com letra maiúscula e a média dos resultados das quatro análises com letra

CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS

minúscula. Considerando o desvio padrão entre os oito resultados, os valores de efeito maior do que o produto do desvio padrão pela raiz quadrada de dois ( $s\sqrt{2}$ ) foram considerados significantes e, portanto, alteram a resposta a resposta analítica.

**Tabela 22.** Variáveis e seus níveis usados no estudo de robustez de método cromatográfico, de acordo com teste de robustez de Youden e Steiner (YOU DEN, STEINER, 1975)

Variável	Condições nominais	Condições alternativas	Condição experimental							
			1	2	3	4	5	6	7	8
Coluna cromatográfica	Waters (A)	Agilent (a)	A	A	A	A	a	a	a	a
pH do tampão	6,5 (B)	6,3 (b)	B	B	b	b	B	B	b	b
Proporção do tampão	34% (C)	36% (c)	C	c	C	c	C	c	C	c
Comprimento de onda	228 nm (D)	230 nm (d)	D	D	d	d	d	d	D	D
Vazão da fase móvel	1,0 mL min <sup>-1</sup> (E)	0,8 mL min <sup>-1</sup> (e)	E	e	E	e	e	E	e	E
Fornecedor de metanol	Sigma Aldrich (F)	Tedia (f)	F	f	f	F	F	f	f	F
Ultrassom	5 minutos (G)	Sem ultrassom (g)	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultados observados			s	t	u	v	w	x	y	z

Letras maiúsculas representam condições nominais

Letras minúsculas representam condições alternativas.

#### 4.2.3.6. Determinação de glimepirida nos comprimidos

A partir do peso médio das amostras de Amaryl<sup>®</sup> 1, 2 e 4 mg, pesou-se o equivalente a 2 mg, o qual foi transferido para balão volumétrico de 100 mL. Foram adicionados 80 mL de metanol e a solução foi mantida em aparelho de ultrassom por 5 minutos. O volume foi completado para a obtenção de solução com concentração de 20,0 µg mL<sup>-1</sup>. A solução foi então filtrada em papel de filtro quantitativo. Posteriormente, foram transferidas alíquotas de 5,0 mL para balões volumétricos de 10 mL e o volume completado com fase móvel (concentração teórica de 10,0 µg mL<sup>-1</sup>). Este procedimento foi realizado em quintuplicata.

CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS

---

Os teores, em relação ao valor rotulado, foram obtidos por comparação das áreas das bandas cromatográficas das amostras (n = 5), com os valores obtidos a partir de soluções padrão (n = 5), nos mesmos níveis de concentração.

#### 4.2.3.7. Resultados e discussão

##### 4.2.3.7.1. Otimização de metodologia analítica

Os resultados do planejamento fatorial completo  $2^3$  estão demonstrados na Tabela 23.

**Tabela 23.** Planejamento fatorial completo  $2^3$  utilizado na otimização de metodologia analítica por CLAE para determinação de glimepirida em comprimidos

Fatores e interações	Efeitos
Proporção do tampão acetato da fase móvel	-0,122*
pH do tampão acetato da fase móvel	0,079*
Vazão da fase móvel	0,004
Proporção do tampão acetato da fase móvel x pH do tampão acetato da fase móvel	0,068*
Proporção do tampão acetato da fase móvel x vazão da fase móvel	-0,020
pH do tampão acetato da fase móvel x vazão da fase móvel	-0,063*
Proporção do tampão acetato da fase móvel x pH do tampão acetato da fase móvel x vazão da fase móvel	-0,057
Erro estimado	<b>0,057</b>

\*Fatores e interações significativos ao nível de 5%.

Os efeitos assinalados com asterisco são estatisticamente significativos, pois seus valores absolutos excedem o erro estimado. Além disso, efeitos com valores positivos indicam que o aumento nos seus níveis resulta no aumento significativo da resposta

### CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

analítica e efeitos com valores negativos indicam que a resposta analítica aumenta com um decréscimo em seus níveis. A observação da Tabela 23 leva à conclusão de que os fatores proporção do tampão acetato da fase móvel e pH do tampão acetato da fase móvel são significativos, pois os efeitos são maiores do que o erro estimado. O valor negativo do efeito calculado para a proporção do tampão acetato da fase móvel (-0,122) indica que a resposta analítica (D) tende a aumentar com diminuição na porcentagem de tampão na fase móvel. O valor positivo do efeito calculado para o pH do tampão acetato da fase móvel (0,079) indica que o aumento no pH do tampão da fase móvel tende a produzir aumento na resposta analítica. A vazão da fase móvel não influencia significativamente na resposta e, portanto, foi decidido fixar esse fator em um valor intermediário ( $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ), considerando que uma vazão muito alta pode prejudicar o processo de difusão de glimepirida entre a fase móvel e fase estacionária e uma vazão muito baixa pode produzir alargamento das bandas cromatográficas.

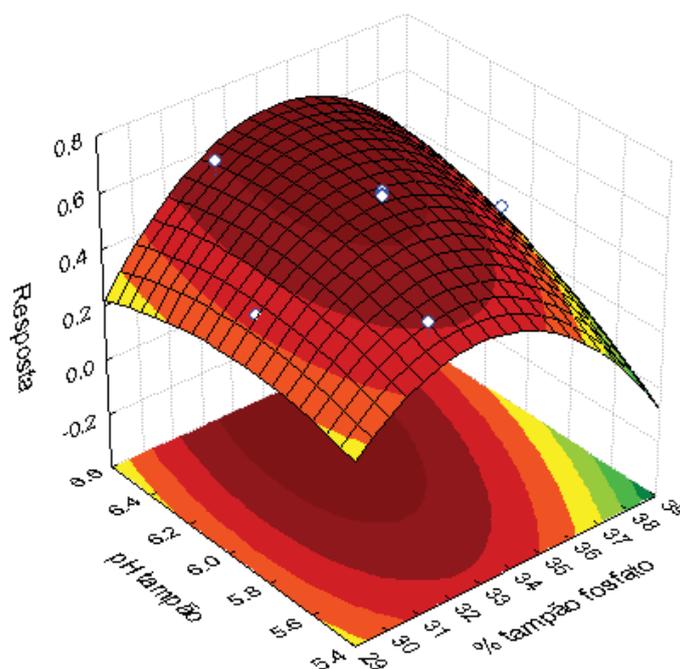
Uma interação significativa entre a proporção do tampão acetato da fase móvel e o pH do tampão acetato da fase móvel também foi observada e, portanto, objetivando estudar a influência desses dois fatores na resposta analítica, uma otimização final utilizando matriz de Doehlert foi realizada, de acordo com a Tabela 20. A fim de se produzir aumento na resposta analítica de acordo com o indicado pelo planejamento fatorial  $2^3$ , os valores de pH do tampão da fase móvel testado foram aumentados (para 5,5 a 6,5) e a proporção de tampão fosfato na fase móvel foi diminuída (para 38% a 30%). No caso do planejamento fatorial  $2^3$  foi preparado tampão acetato, pois a faixa de pH testada foi de 4,5 a 5,5, e o sal acetato possui boa capacidade tamponante nesta faixa. No caso da matriz de Doehlert foi utilizado tampão fosfato, pois este sal possui adequada capacidade tamponante na faixa de

---

### CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

pH de 5,5 a 6,5. Com os resultados obtidos a partir da matriz de Doehlert (demonstrados na Tabela 20), a superfície de resposta foi construída, representando a interação entre proporção do tampão fosfato da fase móvel e pH do tampão fosfato da fase móvel, utilizando o *software* STATISTICAL (Figura 7).



**Figura 7.** Superfície de resposta de otimização de método analítico para determinação de glimepirida em comprimidos por cromatografia líquida de alta eficiência. As condições selecionadas foram: 34% de tampão fosfato pH 6,5 (27,5 mmol L<sup>-1</sup>).

O planejamento matriz Doehlert (proporção do tampão fosfato da fase móvel em função do pH do tampão acetato da fase móvel) demonstrou que o máximo de resposta analítica (D) é obtido com 34% de tampão fosfato. Em relação ao pH do tampão da fase

### CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

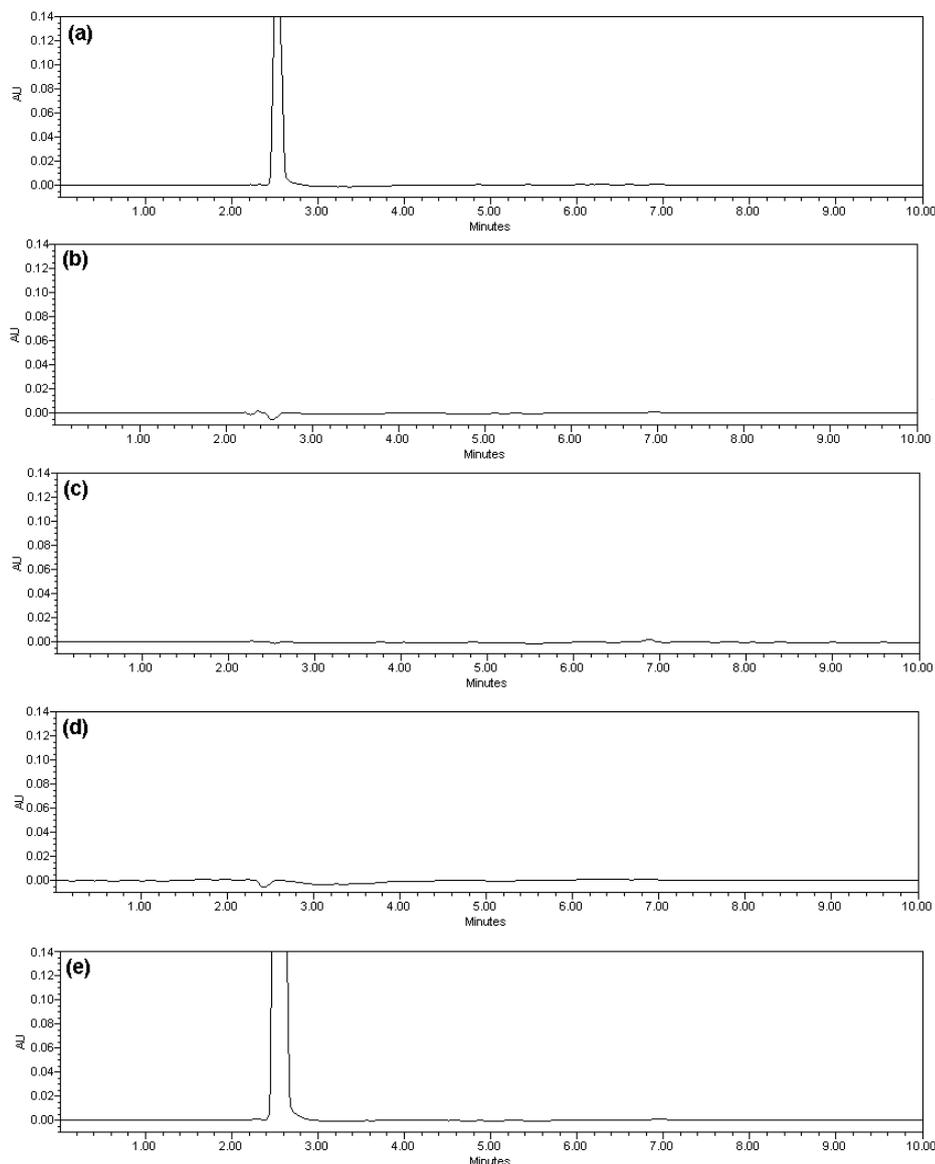
---

móvel, o aumento nos níveis produz aumento na resposta analítica. Embora altos valores de pH produzam os melhores resultados, foi decidido fixar esse fator em 6,5, pois altos valores de pH podem danificar a fase estacionária da coluna, diminuindo sua vida útil.

Portanto, o método desenvolvido para determinação de glimepirida em comprimidos utilizou como fase móvel tampão fosfato de sódio (27,5 mmol L<sup>-1</sup>; pH 6,5) e metanol (34:66, v/v). A fase estacionária utilizada foi coluna Waters Symmetry C-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm). A detecção foi realizada no UV a 228 nm e o volume de injeção foi de 20 µL. As análises foram realizadas em temperatura ambiente (25° C).

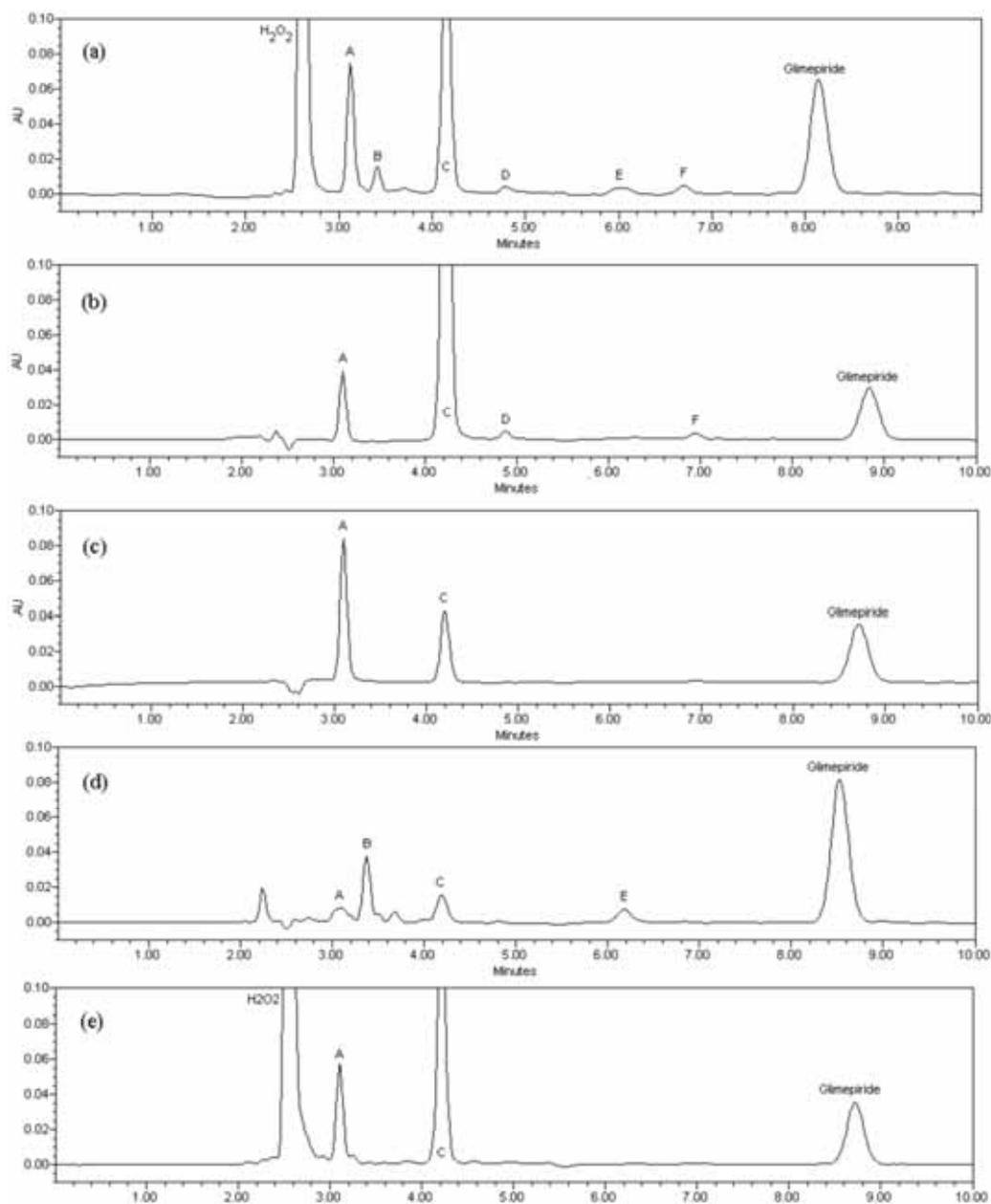
A fim de confirmar se os parâmetros cromatográficos produziram desempenho adequado, uma solução contendo todos os produtos de degradação da glimepirida (seção 3.2.4.2) e as soluções estressadas individualmente (degradação neutra, ácida, alcalina e oxidativa) foram analisadas utilizando o método proposto. Os cromatogramas dos brancos e das soluções estressadas estão demonstrados nas Figuras 8 e 9.

## CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS



**Figura 8.** Cromatogramas de brancos. (a) mistura de todos os brancos na proporção 1:1:1:1 (v/v/v/v), (b): HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, (c): H<sub>2</sub>O (d): NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> e (e): H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os brancos foram submetidos à temperatura constante de 90°C por 360 minutos e diluídos 10 vezes em fase móvel. Fase móvel composta de tampão fosfato de sódio (27,5 mmol L<sup>-1</sup>; pH 6,5) e metanol (34:66, v/v), coluna C-18 Waters Symmetry® como fase estacionária, detecção no UV a 228 nm, volume de injeção 20 µL, temperatura da coluna de 25° C e vazão a 1 mL min<sup>-1</sup>.

## CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS



**Figura 9.** Cromatogramas de glimepirida substância de referência contendo todos os possíveis produtos de degradação (a), glimepirida substância de referência submetida à degradação ácida (b), glimepirida substância de referência submetida à degradação neutra (c), glimepirida substância de referência submetida à degradação alcalina (d), glimepirida substância de referência submetida à degradação oxidativa (e). As amostras foram submetidas à temperatura constante de 90°C por 360

### CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

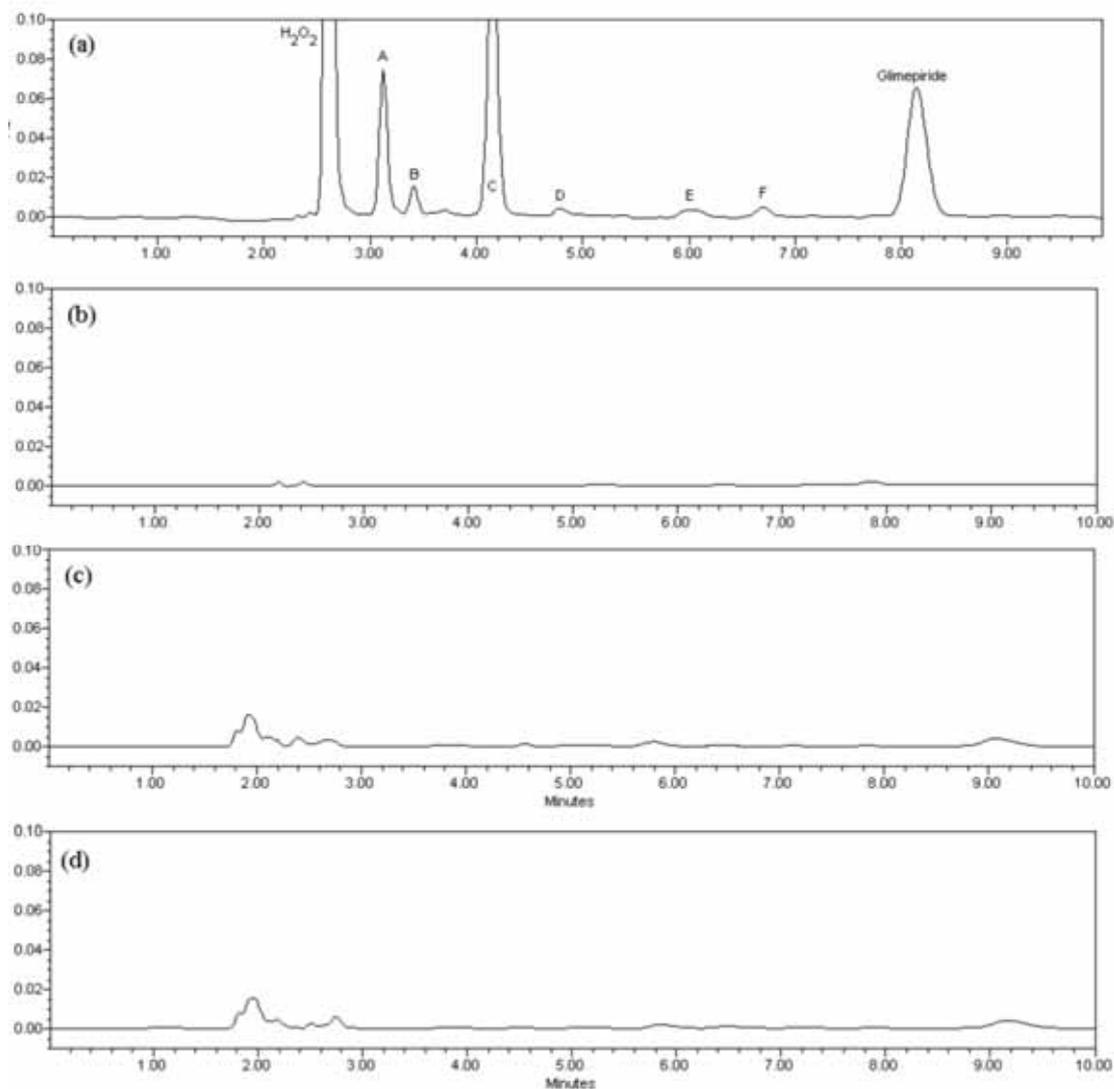
---

minutos e diluídas 10 vezes em fase móvel antes de serem analisadas pelo método cromatográfico. Os possíveis produtos de degradação foram codificados como A, B, C, D, E e F, baseados na ordem de eluição. Fase móvel composta de tampão fosfato de sódio (27,5 mmol L<sup>-1</sup>; pH 6,5) e metanol (34:66, v/v), coluna C-18 Waters Symmetry<sup>®</sup> como fase estacionária, detecção no UV a 228 nm, volume de injeção 20 µL, temperatura da coluna de 25° C e vazão a 1 mL min<sup>-1</sup>.

#### 4.2.3.7.2. Avaliação da seletividade

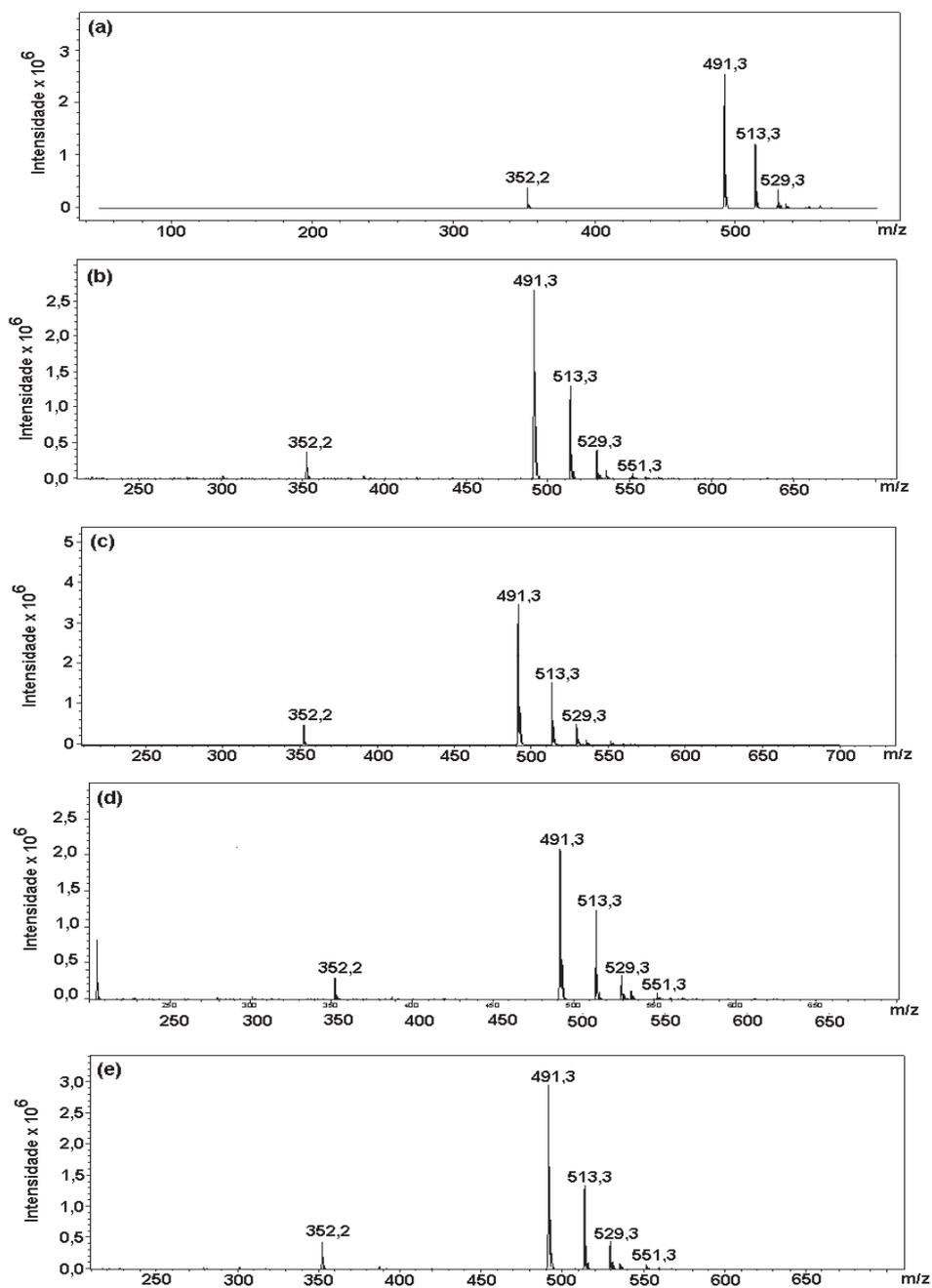
A análise do cromatograma de glimepirida-SR na concentração de 10 µg mL<sup>-1</sup> e de soluções placebo dos produtos Amaryl<sup>®</sup> 1, 2 e 4 mg demonstra que os excipientes das três formulações não interferem significativamente no método de determinação de glimepirida em comprimidos de Amaryl<sup>®</sup> por cromatografia líquida de alta eficiência (Figura 10). Além disto, as resoluções entre glimepirida e os potenciais produtos de degradação (A, B, C, D, E e F) foram maiores do que 2,0 em todos os casos, indicando adequada separação de glimepirida e seus produtos de degradação (Figura 8). A confirmação de que nenhum produto de degradação coeluiu com a glimepirida foi realizada através de análises por espectrometria de massas no tempo de análise da glimepirida da solução padrão e das soluções estressadas. Os espectros de massas obtidos das bandas cromatográficas da glimepirida das soluções estressadas (HCl, água, NaOH e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foram iguais ao espectro de massas obtido da solução padrão de glimepirida (Figura 10), o que garante a seletividade da separação cromatográfica obtida.

## CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS



**Figura 10.** Cromatogramas de glimepirida substância de referência contendo todos os possíveis produtos de degradação (a), soluções placebo dos produtos Amaryl<sup>®</sup> 1 mg (b), soluções placebo dos produtos Amaryl<sup>®</sup> 2 mg (c), soluções placebo dos produtos Amaryl<sup>®</sup> 4 mg (d). Fase móvel composta de tampão fosfato de sódio (27,5 mmol L<sup>-1</sup>; pH 6,5) e metanol (34:66, v/v), coluna C-18 Waters Symmetry<sup>®</sup> como fase estacionária, detecção no UV a 228 nm, volume de injeção 20 µL, temperatura da coluna de 25° C e vazão a 1 mL min<sup>-1</sup>.

## CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS



**Figura 11.** Espectros de massas obtidos no tempo de análise da glimepirida após separação cromatográfica, sob as condições otimizadas. (a) glimepirida substância de referência, (b) glimepirida substância de referência submetida à degradação ácida, (c) glimepirida substância de referência submetida à degradação neutra, (d) glimepirida substância de referência submetida à

### CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

degradação alcalina, (e) glimepirida substância de referência submetida à degradação oxidativa.  $m/z$  491 = glimepirida (M + H);  $m/z$  513 = glimepirida com aduto de sódio (M+H+Na);  $m/z$  529 = glimepirida com aduto de potássio (M+H+K) e  $m/z$  352 = íon fragmento de 491, formado na fonte. Fase móvel composta de tampão fosfato de sódio (27,5 mmol L<sup>-1</sup>; pH 6,5) e metanol (34:66, v/v), coluna C-18 Waters Symmetry<sup>®</sup> como fase estacionária, detecção no UV a 228 nm, volume de injeção 20 µL, temperatura da coluna de 25° C e vazão a 1 mL min<sup>-1</sup>. Condições do detector de massas: Fonte de ionização: *electrospray* positivo (ESI (+)), divisor de vazão na interface HPLC/MS: 130 µL min<sup>-1</sup>, potencial do capilar: -4500 V, temperatura do gás secante: 300 °C, vazão do gás secante: 8,0 L min<sup>-1</sup>, pressão de nebulização: 30 psi, quantidade de íons acumulados no *Ion-Trap*: 40000, tempo máximo de acúmulo de íons: 200 ms, skimmer: 40 volts, cap exit: 129, 5 volts, Oct 1: 12 volts, Oct 2: volts V, trap drive: 58, 5 volts, oct RF: 189 volts, lens 1: -5,0 volts, Lens 2: -60,0 volts e intervalo de varredura no modo *full Scan*: 50-500 ou 50-700.

#### 4.2.3.7.3. Construção da curva analítica de glimepirida

A Tabela 24 mostra os valores experimentais obtidos na construção da curva analítica de glimepirida-SR, utilizando fase móvel como solvente.

CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS

**Tabela 24.** Valores experimentais obtidos na construção da curva analítica de glimepirida

Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Resposta (área) *	Médias das áreas	Desvio padrão	D.P.R.%
2	153101	154474	2842	1,84
	152579			
	157741			
5	309930	304572	5128	1,68
	304075			
	299710			
10	571157	580605	11189	1,93
	592960			
	577697			
15	880566	897305	16747	1,87
	914060			
	897288			
20	1187776	1211973	20956	1,73
	1223971			
	1224172			
30	1861002	1844716	14364	0,78
	1839294			
	1833851			
40	2353935	2375884	22893	0,96
	2374099			
	2399617			

\*Média de três leituras

D.P.R.% - desvio padrão relativo.

#### 4.2.3.7.4. Parâmetros obtidos a partir da curva analítica de glimepirida

A Tabela 25 relaciona os parâmetros obtidos a partir dos valores experimentais da curva analítica de glimepirida.

CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS

**Tabela 25.** Parâmetros obtidos a partir dos valores experimentais da curva analítica de glimepirida

Parâmetros	Resultados
$\lambda$ (nm)	228
Faixa linear ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	2,0 – 40,0
Equação: $y = bx + a$	$y = 59655x + 13095$
Intercepto (a) $\pm$ desvio padrão	$13095,07 \pm 6265,60$
Inclinação (b) $\pm$ desvio padrão	$59654,67 \pm 358$
Limite de detecção ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0,315
Limite de quantificação ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	1,050
r (coeficiente de correlação) $\pm$ D.P.	$0,9994 \pm 0,000370$
n	7

Os valores são discriminados como média  $\pm$  desvio padrão de três curvas analíticas geradas em três dias consecutivos ( $n = 3$ ).

D.P. = Desvio padrão.

#### 4.2.3.7.5. Avaliação da precisão

A Tabela 26 relaciona os valores de precisão do método.

**Tabela 26.** Valores obtidos no teste de precisão de método de cromatografia líquida de alta eficiência

Nível	Áreas das bandas						D.P.	D.P.R.(%)
Repetitividade	560649	554584	553596	558307	553127	553855	3065,4 (n=6)	0,55 (n=6)
Precisão intermediária	560649	554584	553596	558307	553127	553855	9855,1 (n=6)	1,75 (n=12)

D.P. = Desvio padrão

D.P.R. = Desvio padrão relativo.

CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS

---

4.2.3.7.6. Exatidão utilizando o teste de recuperação para glimepirida

As Tabelas 27, 28 e 29 demonstram os valores obtidos no teste de recuperação de glimepirida utilizando o método de cromatografia líquida de alta eficiência para os produtos Amaryl<sup>®</sup> 1, 2 e 4 mg.

**Tabela 27.** Valores obtidos no teste de recuperação de glimepirida-SR utilizando cromatografia líquida de alta eficiência para o produto Amaryl<sup>®</sup> 1 mg

	Concentração inicial ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Concentração adicionada ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Concentração teórica final ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Concentração recuperada ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) *	Recuperação (%) $\pm$ D.P.R.
R1 (80%)	5	3	8	3,062	102,07 $\pm$ 0,84
R2 (100%)	5	5	10	4,907	98,14 $\pm$ 1,02
R3 (120%)	5	7	12	7,001	100,01 $\pm$ 1,05

\* Média de três determinações  
D.P.R. Desvio padrão relativo.

**Tabela 28.** Valores obtidos no teste de recuperação de glimepirida-SR utilizando cromatografia líquida de alta eficiência para o produto Amaryl<sup>®</sup> 2 mg

	Concentração inicial ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Concentração adicionada ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Concentração teórica final ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Concentração recuperada ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) *	Recuperação (%) $\pm$ D.P.R.
R1 (80%)	5	3	8	3,056	101,87 $\pm$ 1,73
R2 (100%)	5	5	10	4,895	97,90 $\pm$ 0,59
R3 (120%)	5	7	12	6,956	99,37 $\pm$ 0,90

\* Média de três determinações  
D.P.R. Desvio padrão relativo.

CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS

**Tabela 29.** Valores obtidos no teste de recuperação de glimepirida-SR utilizando cromatografia líquida de alta eficiência para o produto Amaryl<sup>®</sup> 4 mg

	Concentração inicial ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Concentração adicionada ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Concentração teórica final ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Concentração recuperada ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) *	Recuperação (%) $\pm$ D.P.R.
R1 (80%)	5	3	8	2,963	98,77 $\pm$ 0,22
R2 (100%)	5	5	10	5,001	100,02 $\pm$ 1,19
R3 (120%)	5	7	12	7,178	102,54 $\pm$ 1,55

\* Média de três determinações

D.P.R. Desvio padrão relativo.

#### 4.2.3.7.7. Robustez

A Tabela 30 demonstra os valores de robustez obtidos a partir do teste proposto por Youden e Steiner (YOU DEN, STEINER, 1975).

**Tabela 30.** Valores obtidos no teste de robustez de método por cromatografia líquida de alta eficiência

Variável	Condição experimental								D.P. x $\sqrt{2}$ *
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Coluna	A	A	A	A	a	a	a	a	
pH do tampão	B	B	b	b	B	B	b	b	
Proporção do tampão	C	c	C	c	C	c	C	c	
Comprimento de onda	D	D	d	d	d	d	D	D	
Vazão da fase móvel	E	e	E	e	e	E	e	E	
Fornecedor de metanol	F	f	f	F	F	f	f	F	
Ultrassom	G	g	g	G	g	G	G	g	
Resultados									
Amaryl <sup>®</sup> 1 mg	101,6	88,4	92,1	97,9	102,7	102,3	97,5	104,8	8,0
Amaryl <sup>®</sup> 2 mg	99,3	87,7	98,8	100,2	91,3	105,4	103,3	94,9	8,4
Amaryl <sup>®</sup> 4 mg	98,5	79,0	82,9	101,9	74,6	105,0	97,4	75,1	17,9

\* D.P. x  $\sqrt{2}$ \* = Desvio padrão multiplicado pela raiz quadrada de 2

CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS

A partir dos valores encontrados, os efeitos de cada variável foram calculados e estão descritos a seguir, na Tabela 31.

**Tabela 31.** Valores de efeitos obtidos de acordo com o teste de Youden e Steiner

Variável	Efeitos		
	Amaryl <sup>®</sup> 1 mg	Amaryl <sup>®</sup> 2 mg	Amaryl <sup>®</sup> 4 mg
Coluna cromatográfica	-6,8	-2,2	2,6
pH do tampão da fase móvel	0,7	-3,4	-0,1
Proporção do tampão na fase móvel	0,1	1,1	-1,9
Comprimento de onda	-0,7	-2,6	-3,6
Vazão da fase móvel	3,5	4,0	2,1
Fornecedor de metanol	6,6	-2,4	-3,5
Ultrassom	2,8	8,9*	22,8*

(YOU DEN, STEINER, 1975)

De acordo com Youden e Steiner (YOU DEN, STEINER, 1975), as variáveis que produzirem um efeito maior do que a raiz quadrada de dois multiplicada pelo desvio padrão entre os resultados ( $D.P. \times \sqrt{2}$ ) influenciam significativamente a resposta analítica. De acordo com a observação das Tabelas 30 e 31, pode-se concluir que a única variável que influencia significativamente na resposta analítica para os produtos Amaryl<sup>®</sup> 2 mg e Amaryl<sup>®</sup> 4 mg é o uso do ultrassom, pois os efeitos são maiores em módulo do que a raiz quadrada de dois multiplicada pelo desvio padrão entre os resultados. A partir destes resultados, pode-se deduzir que 5 minutos de ultrassom são necessários para que haja extração efetiva do princípio ativo glimepirida da matriz. Finalmente, o método foi considerado robusto para as outras variáveis consideradas: coluna cromatográfica, pH do tampão da fase móvel, proporção do tampão na fase móvel, comprimento de onda, vazão da fase móvel e fornecedor de metanol.

CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS

---

#### 4.2.3.8. Determinação de glimepirida nos comprimidos

A Tabela 32 mostra os resultados obtidos na determinação de glimepirida em comprimidos de Amaryl<sup>®</sup> 1 mg, Amaryl<sup>®</sup> 2 mg e Amaryl<sup>®</sup> 4 mg pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência.

**Tabela 32.** Valores experimentais de comprimidos de glimepirida, obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência

	Padrão	Amaryl <sup>®</sup> 1 mg	Amaryl <sup>®</sup> 2 mg	Amaryl <sup>®</sup> 4mg
Média das áreas	556052,6	560137	563683	559040
D.P.R. (%)	0,59 (n=5)	1,17 (n=5)	1,91 (n=5)	1,68 (n=5)
Glimepirida (%)	100,12	100,86	101,49	100,66
Glimepirida (mg)	---	1,01	2,03	4,03
D.P.R. Desvio padrão relativo.				

#### 4.2.3.9. Discussão

A literatura descreve diferentes métodos cromatográficos para a análise de glimepirida em matrizes biológicas e medicamentos (Tabela 1). Entretanto, existem somente três métodos descritos para a separação da glimepirida e seus produtos de degradação. Kovaříková e colaboradores (KOVÁŘÍKOVÁ et al., 2004) descreveram um método para a determinação de glimepirida e seus produtos de degradação com tempo de análise de 20 minutos. O método desenvolvido por Khan e colaboradores (KHAN et al., 2005) produziu a separação de glimepirida e suas substâncias relacionadas em um tempo total de 55 minutos. Bansal e colaboradores (Bansal et al., 2008) descreveram um método

### CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

para separação de glimepirida e suas substâncias relacionadas que dura cerca de 30 minutos de corrida cromatográfica. Além disso, as monografias propostas pela farmacopeia americana (USP, 2011) e pela farmacopeia europeia (EP, 2008) para análise de matéria-prima são baseadas em dois diferentes métodos: um método para a determinação da impureza glimepirida *cis*-isômero utilizando cromatografia de modo normal e um segundo método para a determinação de glimepirida e outras substâncias relacionadas por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa.

Devido ao fato da velocidade de análise ter se tornado de grande importância no campo de análise farmacêutica, este trabalho propôs o desenvolvimento de um método capaz de separar a glimepirida de seus produtos de degradação em menor tempo de corrida em relação aos métodos já descritos na literatura. A aplicação de uma abordagem multivariada permitiu a obtenção de um método que é capaz de analisar a glimepirida na presença de seus produtos de degradação em cerca de 9 minutos, demonstrando a vantagem do método proposto nesse trabalho. Esta abordagem, portanto, é extremamente útil para laboratórios que estejam buscando uma rápida otimização, sem o número total de experimentos que requer uma otimização univariada. Em relação ao método espectrofotométrico, também proposto neste trabalho, a técnica pro CLAE apresenta a vantagem de permitir a análise dos produtos de degradação. É sabido que há uma priorização de análise de produtos farmacêuticos por CLAE, devido à seletividade desta técnica. Uma das limitações da utilização de CLAE, porém, é o alto custo da análise de um medicamento por este método, que emprega solventes orgânicos de alta pureza para uso e padrões de referências. Com relação à validação analítica, o método de CLAE desenvolvido para determinação de glimepirida em comprimidos foi avaliado em relação aos seguintes

### CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

parâmetros: linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limite de quantificação, limite de detecção e robustez.

A seletividade de um método analítico representa sua capacidade de sofrer a influência única e exclusiva da substância que se quer analisar. Ela pode ser determinada com a adição de impurezas e produtos de degradação, obtidos experimentalmente ou induzindo a sua formação (ERMER, 2001). A glimepirida foi submetida à degradação ácida, neutra, oxidativa e alcalina. Os cromatogramas das soluções degradadas estão ilustrados na Figura 9. Na degradação ácida (cromatograma b) observou-se a formação de quatro bandas adicionais, que foram codificados em A, C, D e F, de acordo com a ordem de eluição. Na degradação neutra (cromatograma c) observou-se a formação das bandas adicionais A e C. Na degradação alcalina (cromatograma d) foram observadas as bandas adicionais A e C já obtidas sob a condição ácida e condição neutra e mais duas bandas, que foram codificados como B e E. Na degradação oxidativa (cromatograma e) também foram observados as bandas adicionais A e C. Estes estudos de degradação forçada mostram a suscetibilidade do fármaco perante a degradação ácida, neutra, oxidativa e alcalina. Sugere-se que o método possui seletividade, podendo ser utilizado em estudos de estabilidade. Essa seletividade, foi confirmada através de estudos de HPLC-MS, que mostrou que os espectros de massas *full-scans* obtidos das bandas cromatográficas da glimepirida das soluções estressadas (HCl, água, NaOH e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foram iguais ao espectro de massas obtido da solução padrão de glimepirida (Figura 10).

Os resultados obtidos na validação do método demonstraram que as soluções de glimepirida apresentaram correlação linear entre as áreas das bandas e as concentrações, no intervalo utilizado. Gráficos de concentração em função da área absoluta foram plotados e

### CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

demonstraram linearidade na faixa de 2,0 a 40,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A equação da reta para a glimepirida foi  $y = 59655x + 13095$ , com coeficiente de correlação de 0,9994. A precisão do método analítico foi demonstrada pela repetibilidade (intradias) e precisão intermediária (interdias), relacionadas na Tabela 26. Os valores de D.P.R. inferiores a 2,0% confirmam a adequada precisão do método. Os valores de recuperação para os produtos Amaryl<sup>®</sup> 1 mg, Amaryl<sup>®</sup> 2 mg e Amaryl<sup>®</sup> 4 mg estão apresentados nas Tabelas 27, 28 e 29, respectivamente. Foram obtidas médias percentuais de recuperação de 100,07%; 99,71% e 100,44% para os produtos Amaryl<sup>®</sup> 1 mg, Amaryl<sup>®</sup> 2 mg e Amaryl<sup>®</sup> 4 mg, respectivamente, indicando exatidão adequada, pois os valores se encontram dentro do limite estabelecido de 98,0 a 102,0%. A sensibilidade do método em CLAE foi avaliada pela determinação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) de glimepirida no sistema cromatográfico empregado. De acordo com o ICH (ICH, 1996) e USP (USP, 2011) não há necessidade de avaliar estes parâmetros se o método for utilizado para fins de quantificação. Verificou-se que os LD e LQ foram 0,315  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 1,050  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, indicando que todas as análises foram realizadas acima desses limites. O teste de Youden e Steiner (YOU DEN, STEINER, 1975) mostrou que o método é robusto para os seguintes parâmetros: coluna cromatográfica, pH do tampão da fase móvel, proporção do tampão na fase móvel, comprimento de onda, vazão da fase móvel e fornecedor de metanol, sendo que o único fator que interferiu significativamente na recuperação de comprimidos de Amaryl<sup>®</sup> 2 mg e Amaryl<sup>®</sup> 4 mg foi a variável ultrassom. Nesses produtos, portanto, é necessário o tempo de ultrassom de 5 minutos para extração de substância ativa da matriz farmacêutica. O método cromatográfico mostrou-se adequado, apresentando simplicidade, especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez,

### CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

adequados limites de detecção e de quantificação e possui a vantagem de ser seletivo, permitindo a análise adequada de produtos de degradação.

Além disso, este capítulo demonstra a importância e aplicabilidade do emprego de abordagens multivariadas na otimização de métodos por HPLC, pois permitiu a obtenção de uma eficiência satisfatória com um reduzido número de experimentos. Outra vantagem é que o emprego de otimizações multivariadas permite um aumento da eficiência cromatográfica sem os elevados custos que requerem as colunas com menores diâmetros de partículas e os equipamentos com bombas mais eficientes.

## 5. TESTE DE DISSOLUÇÃO

### 5.1. Introdução

Um fator determinante para obtenção do efeito terapêutico esperado é a taxa de dissolução de um fármaco a partir da forma farmacêutica, pois a absorção deste fármaco está diretamente relacionada com sua dissolução. Portanto, os ensaios de dissolução são importantes ferramentas para avaliação da influência de diferentes fatores da formulação na absorção de fármacos, tais como propriedades físico-químicas da(s) substância(s) ativa(s), propriedades dos diferentes excipientes e diferentes passos nos processos de fabricação (GRAFFNER, 2006).

Os testes de dissolução para formas farmacêuticas sólidas foram inicialmente incluídos na Farmacopeia Americana na década de 1960 (SOUZA, FREITAS, STORPIRTIS, 2007). Atualmente, as principais aplicações dos ensaios de dissolução são no desenvolvimento de medicamentos, em estudos de estabilidade, no estabelecimento de correlações *in vitro-in vivo*, no controle de qualidade e em estudos de equivalência farmacêutica.

No desenvolvimento de medicamentos, os ensaios de dissolução são uma ferramenta extremamente útil, pois são utilizados para demonstrar a dependência da taxa de dissolução de fármacos a partir de formas farmacêuticas sólidas em função de certos excipientes e/ou variáveis de fabricação. Gray e colaboradores (2009) publicaram uma interessante revisão, citando trabalhos que estudaram dissoluções de medicamentos em função de variáveis tecnológicas. Dentre as variáveis que mostraram significativa

influência, pode-se citar: composição qualitativa e quantitativa de excipientes e do(s) fármaco(s), tamanho de partícula de excipientes e do(s) fármaco(s), higroscopicidade de excipientes e do(s) fármaco(s), método de incorporação de desintegrantes, processo de granulação, força de compressão, polimorfismo, tipo de embalagem e condições de estoque (temperatura e umidade). Outra revisão, que cita fatores que influenciam nos ensaios de dissolução foi realizada por Marcolongo (2003). Os principais fatores relacionados à formulação, citados pela autora são: pKa do fármaco; composição de excipientes; tamanho de partícula dos componentes da formulação; estado amorfo, cristalino e existência de polimorfos; forma farmacêutica, tecnologia de fabricação e processo de estocagem.

Em estudos de estabilidade, os ensaios de dissolução são fundamentais, pois podem indicar mudanças que ocorrem após a fabricação de um produto farmacêutico, tais como: cristalinidade, temperatura de transição vítrea, estrutura polimérica de excipientes, polimorfismo, interação de envólucros de cápsulas gelatinosas e conteúdo de misturas (GRAY et al., 2009).

No estabelecimento de correlações *in vitro-in vivo* (CIVIV), os testes de dissolução são aplicados como ferramenta para prever o desempenho de um medicamento *in vivo*. Os melhores candidatos para se estabelecer CIVIV são produtos em que a dissolução é a etapa determinante na absorção de fármacos (JANTRATID et al., 2009). Esses produtos são classificados como classe II no sistema de classificação biofarmacêutica, o qual foi proposto por Amidon e colaboradores (1995). Neste sistema, os fármacos são subdivididos em quatro categorias: classe I: fármacos de alta solubilidade e alta permeabilidade; classe II: fármacos de baixa solubilidade e alta permeabilidade; classe III: fármacos de alta solubilidade e baixa permeabilidade e classe IV: fármacos de baixa solubilidade e baixa

---

permeabilidade. A solubilidade do fármaco é determinada dissolvendo-se a maior dose desse fármaco em 250 mL de tampão ajustando-se o pH entre 1 e 8. A substância é considerada altamente solúvel quando a relação entre a dose e a solubilidade for menor ou igual a 250 mL. Fármacos de alta permeabilidade são aqueles com biodisponibilidade maior que 90%, na ausência de instabilidade documentada no trato gastrointestinal (FDA, 1997).

A importância de CIVIV se deve ao fato de que esta correlação pode ser utilizada para reduzir o número de estudos em humanos durante o desenvolvimento de determinada formulação (EMAMI, 2006). Além disso, sob certas condições, os ensaios de dissolução podem ser utilizados como substitutos de ensaios de bioequivalência (COSTA, LOBO, 2001).

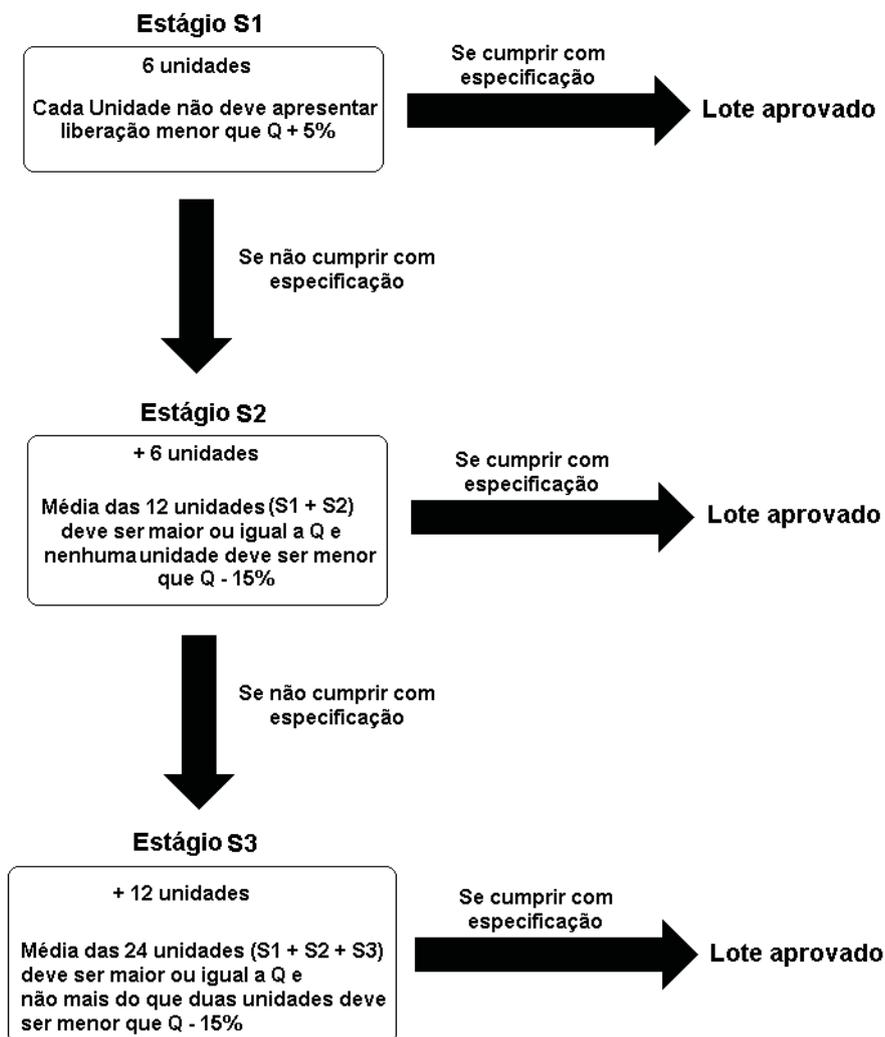
No estabelecimento de CIVIVs, cinco níveis de correlação foram definidos pelo FDA (1997), baseado na capacidade da correlação de refletir o perfil de concentração plasmática do fármaco em função do tempo: Nível A (correlação ponto a ponto entre a dissolução *in vitro* e a absorção *in vivo*); Nível B (média da dissolução *in vitro* é correlacionada com a média do tempo de dissolução *in vivo*); nível C (um ponto de dissolução *in vitro* é correlacionado com um parâmetro farmacocinético, como AUC,  $t_{max}$  ou  $C_{max}$ ); Nível C múltiplo (vários pontos de dissolução *in vitro* são correlacionados com um parâmetro farmacocinético, como AUC,  $t_{max}$  ou  $C_{max}$ ) e Nível D (qualitativo, não é considerado útil para propósitos regulatórios) (FDA, 1997; EMAMI, 2006).

No controle de qualidade de medicamentos, os ensaios de dissolução são utilizados para avaliar a qualidade de todos os lotes produzidos em indústrias, com a finalidade de distinguir entre lotes aceitáveis e não aceitáveis. Neste caso, o ensaio de dissolução deve ser

sensível as variáveis de fabricação críticas, que podem influenciar na dissolução da forma farmacêutica (GRAY et al., 2009).

Alguns testes de dissolução utilizados em controle de qualidade têm sido criticados porque não mimetizam as condições gastro intestinais. Entretanto, segundo Gray e colaboradores (2009), isto não é necessariamente uma limitação do teste, pois o objetivo de procedimentos de dissolução nestes casos é estabelecer equivalência de formulações testes com lotes clínicos aceitáveis.

Os testes de dissolução para análises de controle de qualidade de formas farmacêuticas sólidas de liberação imediata são descritos em monografias específicas, citadas em farmacopeias (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008; USP, 2011; BP 2009; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Estes testes são realizados através de um único ponto de amostragem. Os critérios de aceitação são definidos como uma quantidade  $Q$ , expressa como porcentagem do valor rotulado, que é estabelecida em cada monografia. Estes critérios são estabelecidos de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 12.



**Figura 12.** Critérios de aceitação para ensaios de dissolução aplicados no controle de qualidade de produtos farmacêuticos.

Entretanto, existem fármacos que não possuem monografia oficial e, para estes fármacos, existe a necessidade de desenvolver ensaios de dissolução (MALESUIK et al., 2006). Para desenvolver um teste de dissolução, vários fatores devem ser avaliados, como a solubilidade, a permeabilidade e as características farmacocinéticas do fármaco, bem como

as peculiaridades da formulação em estudo. O aparato (cesta ou pá, para formas farmacêuticas sólidas de liberação imediata como cápsulas e comprimidos), o meio de dissolução (pH de 1 a 6,8) e a velocidade de agitação (50, 75 e 100 rpm) devem ser cuidadosamente determinados. O volume utilizado também deve ser observado (FDA, 1997). Além destes fatores, deve se considerar outras variáveis que podem influenciar no ensaio: geometria e vibração do sistema; posição da haste; posição e método de amostragem; dispositivos para formas farmacêuticas que flutuam; presença de ar ou gases; temperatura; viscosidade; filtros utilizados, surfactantes e método analítico para quantificação. A seleção criteriosa das condições de ensaio deve ser orientada no sentido de obter o máximo poder discriminatório e resultar na capacidade de detecção de eventuais desvios dos padrões de qualidade propostos (MARCOLONGO, 2003).

Após a otimização de um ensaio de dissolução, que deve ser validado, é importante a avaliação dos parâmetros de seletividade, precisão, exatidão, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação e robustez, respeitando as características de cada caso (MARQUES, BROWN, 2002).

Em estudos de equivalência farmacêutica, os perfis de dissolução são utilizados para comparação entre o medicamento referência e medicamentos testes (similares ou genéricos). Este estudo é útil nos casos em que se deseja conhecer o comportamento de dois medicamentos antes de submetê-los a estudo de bioequivalência, para isenção de menores dosagens desses estudos e para alterações pós-registro. O método recomendado é o modelo independente simples, que será descrito a seguir (BRASIL, 2010).

Na avaliação de efeitos de mudanças em formulações, em estudos de estabilidade, em estudos de equivalência farmacêutica são construídos perfis de dissolução para posterior

---

comparação. Os métodos utilizados em comparação de perfis são classificados em várias categorias, tais como:

- Métodos estatísticos: podem ser distinguidos em métodos que acessam a diferença entre as médias de dados de dissolução de dois fármacos em um único ponto de dissolução: análise de variância com uma fonte de variação (ANOVA) ou teste *t* de *student*, ou métodos que acessam a diferença entre as médias de dados de dissolução de dois fármacos em múltiplos pontos de dissolução: análise de variância multivariada (MANOVA) (COSTA, LOBO, 2001).
- Métodos modelo independente: comparam diretamente a diferença entre a porcentagem de fármaco dissolvida em uma unidade de tempo para os produtos teste e referência. Podem ser calculados a partir de uma simples taxa de percentual do fármaco dissolvido ( $t_x\%$ ), a partir de uma área sob a curva (ASC) ou a partir de uma taxa de dissolução média (TDM). Porém, os mais utilizados são os testes combinados, ou métodos modelo independente simples, que empregam um fator de diferença (F1) e um fator de semelhança (F2) (COSTA, LOBO, 2001). Estes modelos são definidos a partir das equações 9 e 10:

$$F1 = \{[\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|]\} / \{[\sum_{t=1}^n R_t]\} \times 100 \quad (9)$$

$$F2 = 50 \times \log \{[(1 + 1/n) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2]^{-0,5} \times 100\} \quad (10)$$

em que:  $Rt$  é a porcentagem do fármaco referência dissolvido em cada ponto,  $Tt$  é a porcentagem de produto teste dissolvido em cada ponto e  $n$  é o número de pontos de amostragem (COSTA, LOBO, 2001).

- Métodos modelo dependente: são baseados em funções matemáticas distintas que, após seleção de uma função adequada, permitem a avaliação dos perfis em relação aos parâmetros derivados dos modelos aplicados. Os exemplos mais comuns encontrados na literatura são: ordem zero, primeira ordem, Hixon-Crowell, Higushi, quadrático, Weibull, entre outros (SERRA, STORPIRTS, 2007).

Existem outros parâmetros que se fundamentam em estudos de dissolução e que possibilitam conclusões a respeito do processo de dissolução de uma determinada formulação: constante de velocidade de dissolução ( $k$ ); meia-vida de dissolução ( $t_{50\%}$ ); e quantidade dissolvida em determinado tempo ( $Q_t$ ). Estes parâmetros são obtidos em função dos perfis de dissolução de formulações e permitem conhecer: a velocidade do processo; a quantidade máxima dissolvida e pontos nos quais podem ocorrer mudanças significativas da dissolução. Além destes, a eficiência de dissolução ( $ED\%$ ) pode ser incluída como um importante parâmetro de cinética de dissolução. Este termo pode ser definido como a área sob a curva de dissolução em um determinado intervalo de tempo. A  $ED\%$  permite a comparação mais fidedigna entre dois produtos (SERRA, STORPIRTIS, 2007).

## 5.2. Parte experimental

### 5.2.1. Material

#### 5.2.1.1. Amostras

Foram utilizados comprimidos glimepirida (Amaryl<sup>®</sup> 4mg, validade: 03/2011), descritos no capítulo 3, empregados para o desenvolvimento e validação dos métodos quantitativos.

#### 5.2.1.2. Equipamentos

- Aparelho de ultrassom Unique<sup>®</sup> modelo USC2800A (Indaiatuba, Brasil);
- Balança analítica Kern<sup>®</sup> modelo 410 (Kern, Alemanha);
- Coluna Waters Symmetry<sup>®</sup> C-18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) e pré-coluna Waters Symmetry<sup>®</sup> C-18 (20 mm x 3,9 mm, 5 µm) (Milford, EUA);
- Cromatógrafo a líquido Shimadzu<sup>®</sup> (Kyoto, Japão), série LC-10A, injetor manual 7725i com alça de amostragem de 20 µL (Rheodyne<sup>®</sup>, Califórnia, EUA), detector SPD-10AVP, válvula FCV-10ALVP, forno de coluna CTO-10AVP e controlador SCL-10Avp;
- Dissolutor Electrolab<sup>®</sup> TDT-08 L, equipado com oito cubas de dissolução, de acordo com as normas estabelecidas pela USP 34 (USP, 2011);

- Filtros de politetrafluoretileno (PTFE) hidrofílicos com 0,45 µm de poro (Millipore<sup>®</sup>, Bedford, EUA).
- Membranas de politetrafluoretileno (PTFE) hidrofílicas com 0,45 µm de poro e 47,0 mm de diâmetro (Millipore<sup>®</sup>, Bedford, EUA);
- Papel de filtro quantitativo isento de cinzas Vetec<sup>®</sup> (Rio de Janeiro, Brasil);
- Peagômetro Marconi<sup>®</sup> modelo PA 200 (Piracicaba, Brasil);
- Sistema de filtração à vácuo Nova Técnica<sup>®</sup> (São Paulo, Brasil);
- Sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore<sup>®</sup>, Bedford, EUA);

#### **5.2.1.3. Solventes e reagentes**

- Acetato de sódio triidratado Synth<sup>®</sup> (Diadema, Brasil);
- Ácido acético glacial Vetec<sup>®</sup> (Rio de Janeiro, Brasil);
- Ácido cítrico Vetec<sup>®</sup> (Rio de Janeiro, Brasil);
- Ácido clorídrico Vetec<sup>®</sup> (Rio de Janeiro, Brasil);
- Água ultrapura – água Milli-Q;
- Fosfato de sódio bibásico anidro Vetec<sup>®</sup> (Rio de Janeiro, Brasil);
- Fosfato de sódio monobásico monoidratado Reagen<sup>®</sup> (Colombo, Brasil);
- Hidróxido de sódio PA DINÂMICA<sup>®</sup> (São Paulo, Brasil);
- Lauril sulfato de sódio Henrifarma<sup>®</sup> (São Paulo, Brasil);
- Metanol grau HPLC TEDIA company<sup>®</sup> (Fairfield, EUA);

### 5.3. Teste de dissolução

#### 5.3.1. Determinação das condições *sink*

As condições *sink* para glimepirida foram testadas em água, HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, HCl 0,01 mol L<sup>-1</sup>, tampão acetato pH 4,5 (50 mmol L<sup>-1</sup>), tampão fosfato pH 6,8 (50 mmol L<sup>-1</sup>) e tampão fosfato pH 6,8 (50 mmol L<sup>-1</sup>) contendo várias concentrações de lauril sulfato de sódio. Foram utilizados 4 mg do fármaco em 333 mL do meio de dissolução sob agitação e na temperatura de 37 °C ± 0,5 °C.

#### 5.3.2. Determinação dos perfis de dissolução

Para determinação de condições ótimas para realização de ensaios e perfis de dissolução de comprimidos contendo 4 mg de glimepirida, foram obtidos perfis de dissolução utilizando os seguintes meios: tampão fosfato pH 6,8 (50 mmol L<sup>-1</sup>) contendo 0,5% de lauril sulfato de sódio, tampão fosfato pH 6,8 (50 mmol L<sup>-1</sup>) e tampão fosfato pH 6,8 (50 mmol L<sup>-1</sup>) contendo 0,1% de lauril sulfato de sódio. Os meios foram desaerados em banho de ultrassom por 30 minutos sob a temperatura 41° C. Foram testados os aparatos cesta e pá sob as velocidades de agitação de 50, 75 e 100 rpm. Os tempos de coleta selecionados foram 5, 10, 15, 20, 30 e 60 minutos. Alíquotas de 10,0 mL foram retiradas de cada cuba e imediatamente filtradas em papel de filtro VETEC. O mesmo volume de meio de dissolução retirado das cubas foi repostado, para manter o volume total constante. As

alíquotas retiradas foram filtradas em filtro de 0,45 µm e injetadas diretamente no cromatógrafo e analisadas utilizando o método desenvolvido e validado (seção 4.2.4).

#### **5.4. Validação do método analítico aplicado ao teste de dissolução**

A validação do método analítico aplicado ao teste de dissolução foi realizada pela avaliação dos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, repetibilidade, precisão intermediária, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

##### **5.4.1. Seletividade**

Foi avaliada usando placebo dos comprimidos de glimepirida. A amostra placebo foi preparada utilizando-se quantidades de excipientes equivalentes a um comprimido de Amaryl<sup>®</sup> 4 mg, os quais foram transferidos para cubas de dissolução contendo 1000 mL de tampão fosfato pH 6,8 (50 mmol L<sup>-1</sup>) contendo 0,1% de lauril sulfato de sódio. A solução placebo foi submetida ao ensaio de dissolução sob as seguintes condições: aparato pá por 1 h a 150 rpm. A interferência dos excipientes presentes foi analisada por CLAE.

##### **5.4.2. Linearidade**

Foi avaliada pela análise de regressão de três curvas analíticas autênticas, construídas em três diferentes dias. Seis níveis de concentração foram obtidos (1 a 6 µg mL<sup>-1</sup>). Para a obtenção da curva analítica, foram pesados 25 mg de glimepirida-SR, transferidos

para balão volumétrico de 50 mL, dissolvidos em metanol e mantidos em aparelho de ultrassom por 5 minutos, para melhor solubilização. Uma alíquota de 5 mL desta solução foi transferida com auxílio de pipeta volumétrica para balão volumétrico de 100 mL e dissolvida em metanol. Com a utilização de bureta foram obtidas soluções com concentrações de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de glimepirida-SR em tampão fosfato pH 6,8 (50  $\text{mmol L}^{-1}$ ) contendo 0,1% de lauril sulfato de sódio. As soluções foram analisadas por CLAE. A curva analítica foi construída utilizando o programa Microsoft Excel. A representação gráfica da equação da reta foi determinada pela análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

#### **5.4.3. Precisão**

A precisão foi avaliada em triplicata, aos níveis de 50%, 100% e 150% da concentração teórica do teste. Para obtenção de solução estoque de glimepirida foram pesados 40 mg de glimepirida-SR, transferidos para balão volumétrico de 100 mL, dissolvidos em metanol e mantidos em aparelho de ultrassom por 5 minutos, para melhor solubilização. Para obtenção de soluções ao nível de 50% da concentração teórica do ensaio, 5 mL de solução padrão de glimepirida em metanol foram transferidos para cubas de dissolução contendo 1000 mL de tampão fosfato de sódio pH 6,8 (50  $\text{mmol L}^{-1}$ ) contendo 0,1% de lauril sulfato de sódio. Em seguida, adicionou-se quantidades de excipientes equivalente a 50% da quantidade contida em um comprimido de Amaryl<sup>®</sup> 4 mg. O procedimento foi realizado em triplicata. Para obtenção de soluções ao nível de 100% da concentração teórica do ensaio, 10 mL de solução padrão de glimepirida em

metanol foram transferidos para cubas de dissolução contendo 1000 mL de tampão fosfato de sódio pH 6,8 (50 mmol L<sup>-1</sup>) contendo 0,1% de lauril sulfato de sódio. Em seguida, adicionou-se quantidades de excipientes equivalente a 100% da quantidade contida em um comprimido de Amaryl<sup>®</sup> 4 mg. O procedimento foi realizado em triplicata. Para obtenção de soluções ao nível de 150% da concentração teórica do ensaio, 15 mL de solução padrão de glimepirida em metanol foram transferidos para cubas de dissolução contendo 1000 mL de tampão fosfato de sódio pH 6,8 (50 mmol L<sup>-1</sup>) contendo 0,1% de lauril sulfato de sódio. Em seguida, adicionaram-se quantidades de excipientes equivalente a 150% da quantidade contida em um comprimido de Amaryl<sup>®</sup> 4 mg. O procedimento foi realizado em triplicata. As soluções foram submetidas ao ensaio de dissolução sob as seguintes condições: aparato pá por 1 h a 50 rpm. As soluções foram filtradas em papel de filtro VETEC e analisadas por CLAE. Calculou-se o desvio padrão relativo entre as determinações. A precisão intermediária foi avaliada pela repetição do procedimento em dois diferentes dias, por dois diferentes analistas.

#### **5.4.4. Exatidão**

A exatidão foi avaliada em triplicata, aos níveis de 50%, 100% e 150% da concentração teórica do teste. Para obtenção de solução estoque de glimepirida foram pesados 40 mg de glimepirida-SR, transferidos para balão volumétrico de 100 mL, dissolvidos em metanol e mantidos em aparelho de ultrassom por 5 minutos, para melhor solubilização. Para obtenção de soluções ao nível de 50% da concentração teórica do ensaio, 5 mL de solução padrão de glimepirida em metanol foram transferidos para cubas

de dissolução contendo 1000 mL de tampão fosfato de sódio pH 6,8 ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ) contendo 0,1% de lauril sulfato de sódio. Em seguida, adicionaram-se quantidades de excipientes equivalentes a 50% da quantidade contida em um comprimido de Amaryl<sup>®</sup> 4 mg. O procedimento foi realizado em triplicata. Para obtenção de soluções ao nível de 100% da concentração teórica do ensaio, 10 mL de solução padrão de glimepirida em metanol foram transferidos para cubas de dissolução contendo 1000 mL de tampão fosfato de sódio pH 6,8 ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ) contendo 0,1% de lauril sulfato de sódio. Em seguida, adicionaram-se quantidades de excipientes equivalentes a 100% da quantidade contida em um comprimido de Amaryl<sup>®</sup> 4 mg. O procedimento foi realizado em triplicata. Para obtenção de soluções ao nível de 150% da concentração teórica do ensaio, 15 mL de solução padrão de glimepirida em metanol foram transferidos para cubas de dissolução contendo 1000 mL de tampão fosfato de sódio pH 6,8 ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ) contendo 0,1% de lauril sulfato de sódio. Em seguida, adicionaram-se quantidades de excipientes equivalentes a 150% da quantidade contida em um comprimido de Amaryl<sup>®</sup> 4 mg. O procedimento foi realizado em triplicata. As soluções foram submetidas ao ensaio de dissolução sob as seguintes condições: aparato pá por 1 h a 50 rpm. As soluções foram filtradas em papel de filtro VETEC e analisadas por CLAE. Calculou-se a porcentagem de recuperação de glimepirida em cada cuba dividindo-se o valor encontrado pelo valor teórico correspondente a cada concentração.

#### **5.4.5. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)**

Foram determinados pelas equações 2 e 3, indicadas pelo ICH (ICH, 2005):

$$LD = 3(DP/a) \quad (2)$$

$$LQ = 10(DP/a) \quad (3)$$

em que DP = desvio padrão das intersecções e  $a$  é a inclinação média das três curvas analíticas obtidas no estudo de linearidade.

#### **5.4.6. Robustez**

Foi avaliada através do teste de robustez de Youden e Steiner (YOU DEN, STEINER, 1975), no qual sete variáveis que podem interferir no resultado analítico foram alteradas, com posterior análise dos dados. A resposta analítica avaliada foi a porcentagem de recuperação de comprimidos de Amaryl<sup>®</sup> 4 mg após realização de ensaio de dissolução sob as condições descritas na Tabela 33. As sete variáveis selecionadas foram: tempo de dissolução, pH do meio de dissolução, velocidade de agitação do aparato, temperatura do meio de dissolução, desaeração, filtro de papel e exposição à luz. As condições normais das variáveis foram denotadas por letras maiúsculas A, B, C, D, E, F e G e seus valores alternativos foram denotados pelas correspondentes letras minúsculas a, b, c, d, e, f e g. Um total de oito experimentos foram conduzidos, como indicado na Tabela 33. A partir destes resultados, o efeito de cada variável foi estimado, pela diferença entre a média dos resultados das quatro análises com letra maiúscula e a média dos resultados das quatro análises com letra minúscula. Considerando o desvio padrão entre os oito resultados, os

valores de efeito maior do que o produto do desvio padrão pela raiz quadrada de dois ( $s\sqrt{2}$ ) foram considerados significantes e, portanto, alteram a resposta analítica.

**Tabela 33.** Variáveis e seus níveis usadas em estudo de robustez do teste de dissolução, de acordo com teste de robustez de Youden e Steiner (YOU DEN, STEINER, 1975)

Variável	Condições nominais	Condições alternativas	Condição experimental							
			1	2	3	4	5	6	7	8
Tempo de dissolução	60 minutos (A)	55 minutos (a)	A	A	A	A	a	a	a	a
pH do meio de dissolução	6,8 (B)	6,6 (b)	B	B	b	b	B	B	b	b
Velocidade de agitação	50 rpm (C)	45 rpm (c)	C	c	C	c	C	c	C	c
Temperatura do meio	37 °C (D)	35 °C (d)	D	D	d	d	d	d	D	D
Desaeração	sim (E)	não (e)	E	e	E	e	e	e	E	E
Filtro de papel	sim (F)	não (f)	F	f	f	F	F	f	f	F
Exposição à luz	sim (G)	não (g)	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultados observados			s	t	u	v	w	x	y	z

Letras maiúsculas representam condições nominais

Letras minúsculas representam condições alternativas.

## 5.5. Resultados e discussão

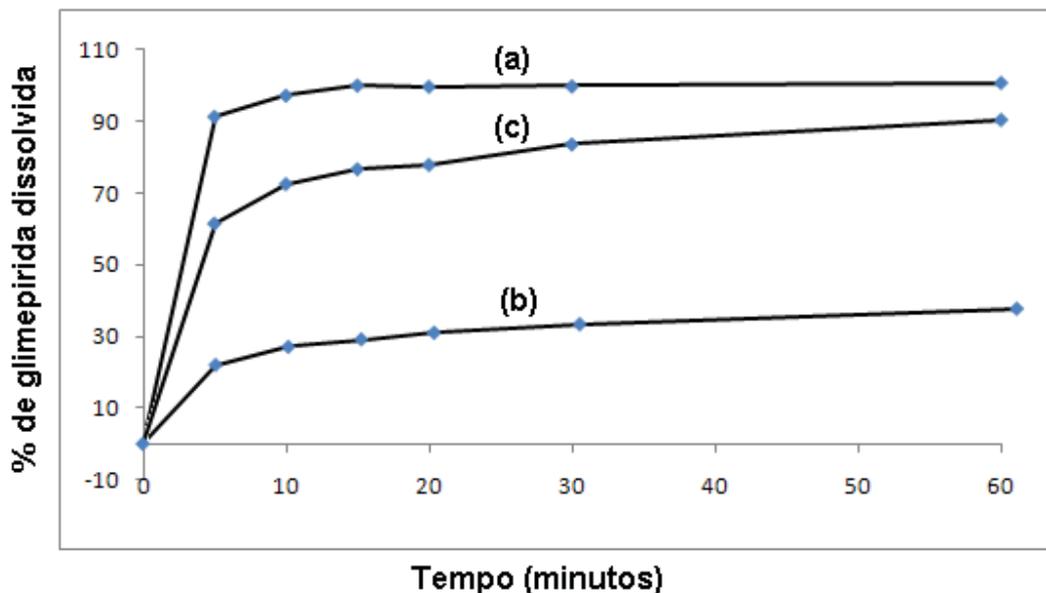
A Tabela 34 mostra os resultados dos ensaios de solubilidade de glimepirida na determinação das condições *sink* para estabelecimento de meio de dissolução para glimepirida comprimidos. Neste ensaio, 4 mg do fármaco foram adicionados em 333 mL dos solventes descritos na tabela a 37 °C ± 0,5°C. Observou-se visualmente de houve solubilização do fármaco.

**Tabela 34.** Solventes testados na determinação das condições *sink* para estabelecimento de meio de dissolução para glimepirida comprimidos

Solvente	Resultado
Água	Não dissolveu
HCl 0,1 mol L <sup>-1</sup>	Não dissolveu
HCl 0,01 mol L <sup>-1</sup>	Não dissolveu
Tampão acetato pH = 4,5 (50 mmol L <sup>-1</sup> )	Não dissolveu
Tampão fosfato pH = 6,8 (50 mmol L <sup>-1</sup> )	Não dissolveu
Tampão fosfato pH 6,8 (50 mmol L <sup>-1</sup> ) + 0,1% de LSS	Dissolução parcial
Tampão fosfato pH 6,8 (50 mmol L <sup>-1</sup> ) + 0,2% de LSS	Dissolução parcial
Tampão fosfato pH 6,8 (50 mmol L <sup>-1</sup> ) + 0,3% de LSS	Dissolução parcial
Tampão fosfato pH 6,8 (50 mmol L <sup>-1</sup> ) + 0,4% de LSS	Dissolução parcial
Tampão fosfato pH 6,8 (50 mmol L <sup>-1</sup> ) + 0,5% de LSS	Dissolução
Tampão fosfato pH 6,8 (50 mmol L <sup>-1</sup> ) + 1,0% de LSS	Dissolução
Tampão fosfato pH 6,8 (50 mmol L <sup>-1</sup> ) + 1,5% de LSS	Dissolução
Tampão fosfato pH 6,8 (50 mmol L <sup>-1</sup> ) + 2,0% de LSS	Dissolução
Tampão fosfato pH 6,8 (50 mmol L <sup>-1</sup> ) + 2,5% de LSS	Dissolução

LSS = lauril sulfato de sódio.

A partir dos resultados que estão apresentados na Tabela 34, pode-se concluir que os meios que asseguram as condições *sink* para a glimepirida foram tampão fosfato pH 6,8 (50 mmol L<sup>-1</sup>) contendo 0,5 a 2,5 % de lauril sulfato de sódio. A partir destes resultados construiu-se um perfil de dissolução utilizando comprimidos de Amaryl<sup>®</sup> 4 mg e o aparato pá a 50 rpm e tampão fosfato pH 6,8 (50 mmol L<sup>-1</sup>) contendo 0,5% de lauril sulfato de sódio como meio de dissolução. A Figura 13 (a) mostra os resultados obtidos na realização do ensaio.



**Figura 13.** Perfil de dissolução de comprimidos contendo 4 mg de glimepirida utilizando pá a 50 rpm. (a): tampão fosfato pH 6,8 ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ) contendo 0,5% de lauril sulfato de sódio como meio de dissolução, (b): tampão fosfato pH 6,8 ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ) como meio de dissolução e (c): tampão fosfato pH 6,8 ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ) contendo 0,1% de lauril sulfato de sódio como meio de dissolução. Amostras foram analisadas por CLAE. Fase móvel composta de tampão fosfato de sódio ( $27,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 6,5) e metanol (34:66 v/v), coluna Waters® Symmetry C-18 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) como fase estacionária, detecção no UV a 228 nm e volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ .

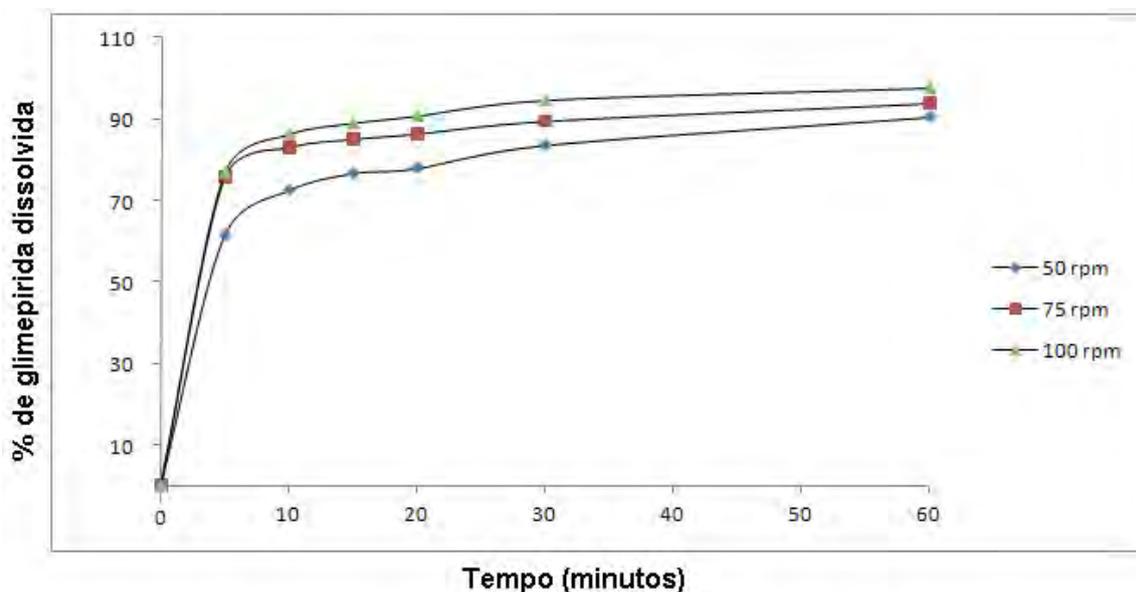
A partir dos resultados demonstrados na Figura 13 (a), pode-se concluir que o meio e tampão fosfato pH 6,8 ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ) contendo 0,5% de lauril sulfato de sódio não é ideal para realização de ensaios e perfis de dissolução para comprimidos contendo 4 mg de glimepirida, pois a liberação da substância ativa ocorreu de forma rápida, sendo que foram observados 100% de liberação em 15 minutos. De acordo com a resolução RE nº 310, de 1º de setembro de 2004 (BRASIL, 2004), na comparação de perfis de dissolução pelo método

modelo independente simples, deve-se incluir apenas um ponto acima de 85% de dissolução para os produtos. Assim sendo, de forma a permitir um perfil de dissolução discriminatório, que possa ser empregado em estudos de equivalência farmacêutica, testaram-se outros meios de dissolução. De acordo com a FDA (FDA, 1997), as condições *sink* são desejáveis, mas não mandatórias. O meio tampão fosfato pH 6,8 (50 mmol L<sup>-1</sup>), apesar de não assegurar as condições *sink*, foi testado, a fim de se obter um perfil de dissolução com liberação mais lenta e que atendesse aos requisitos para comparação de perfis de dissolução pelo método modelo independente simples. A Figura 13 (b) mostra os resultados obtidos na realização de perfil de dissolução de comprimidos contendo 4 mg de glimepirida utilizando pá a 50 rpm e tampão fosfato pH 6,8 (50 mmol L<sup>-1</sup>) como meio de dissolução.

A partir dos resultados demonstrados na Figura 13 (b), pode-se concluir que o meio tampão fosfato pH 6,8 (50 mmol L<sup>-1</sup>) a 50 rpm não é ideal para realização de ensaios e perfis de dissolução para comprimidos contendo 4 mg de glimepirida, pois a liberação da substância ativa ocorreu de forma lenta (apenas 37,75% de substância ativa em 60 minutos de ensaio). Assim sendo, a velocidade de agitação foi aumentada para 100 rpm, na tentativa de obter maior liberação de glimepirida. Entretanto, a liberação da substância ativa ocorreu de forma lenta (apenas 36,78% da substância ativa em 60 minutos de ensaio), (resultados não demonstrados). Assim sendo, testou-se o meio de dissolução tampão fosfato pH 6,8 (50 mmol L<sup>-1</sup>) contendo 0,1% de lauril sulfato de sódio. A Figura 13 (c) mostra os resultados obtidos de perfil de dissolução de comprimidos contendo 4 mg de glimepirida utilizando pá a 50 rpm e tampão fosfato pH 6,8 (50 mmol L<sup>-1</sup>) e 0,1% de lauril sulfato de sódio como meio de dissolução.

A partir dos resultados demonstrados na Figura 13 (c), pode-se concluir que o meio tampão fosfato pH 6,8 (50 mmol L<sup>-1</sup>) contendo 0,1% de lauril sulfato de sódio é ideal para realização de ensaios e perfis de dissolução para comprimidos contendo 4 mg de glimepirida, pois esse meio, sob as condições descritas, permitiu a liberação de 90,4% de substância ativa em 60 minutos de ensaio. Além disso, verificou-se apenas um ponto acima de 85% de dissolução, o que permite comparação de perfis de dissolução pelo método modelo independente simples.

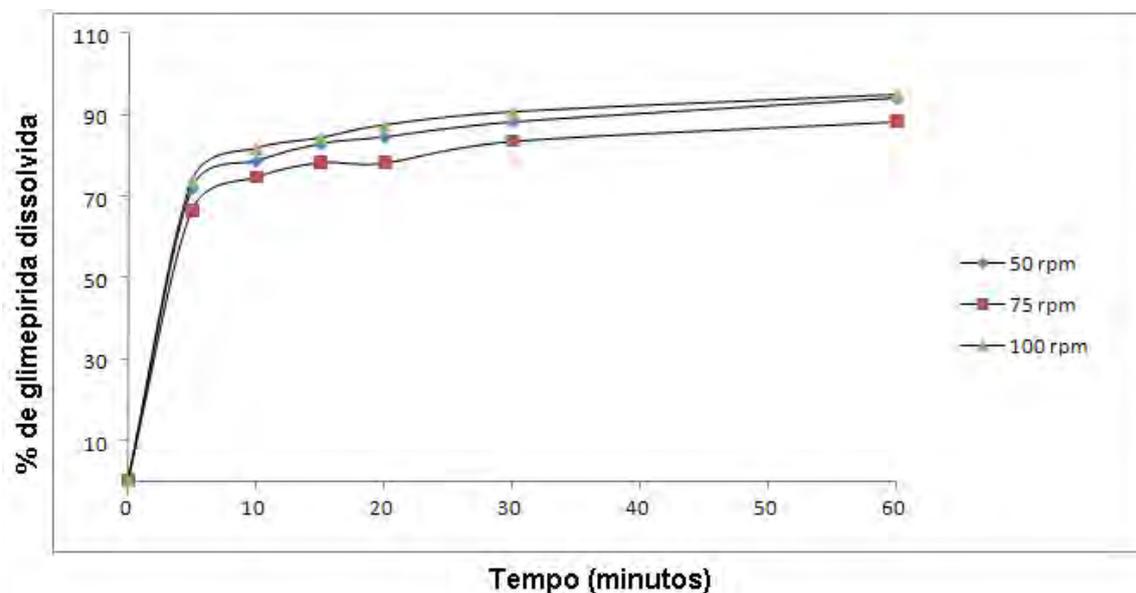
A influência da velocidade de agitação e do tipo de aparato foram posteriormente testadas para determinação de condições ótimas para realização de ensaios e perfis de dissolução para comprimidos contendo 4 mg de glimepirida. A Figura 14 mostra os resultados obtidos na realização de perfis de dissolução de comprimidos contendo 4 mg de glimepirida utilizando pá a 50, 75 e 100 rpm e tampão fosfato pH = 6,8 (50 mmol L<sup>-1</sup>) contendo 0,1% de lauril sulfato de sódio como meio de dissolução.



**Figura 14.** Perfis de dissolução de comprimidos contendo 4 mg de glimepirida utilizando pá a 50, 75 e 100 rpm e tampão fosfato pH 6,8 ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ) contendo 0,1% de lauril sulfato de sódio como meio de dissolução. Amostras foram analisadas por CLAE. Fase móvel composta de tampão fosfato de sódio ( $27,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 6,5) e metanol (34:66 v/v), coluna Waters® Symmetry C-18 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) como fase estacionária, detecção no UV a 228 nm e volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ .

A partir dos resultados demonstrados na Figura 14, pode-se concluir que a velocidade de agitação das pás exerce uma influência na liberação de comprimidos de glimepirida, sendo que a única condição que permitiu apenas um ponto acima de 85% de dissolução foi a velocidade de 50 rpm. O aparato pá, sob 75 e 100 rpm, e o meio de dissolução tampão fosfato pH 6,8 ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ), contendo 0,1% de lauril sulfato de sódio não permitem, portanto, a comparação de perfis de dissolução através do método modelo independente simples.

Posteriormente, testou-se o aparato cesta e a influência na velocidade de agitação deste tipo de aparato na liberação de comprimidos contendo 4 mg de glimepirida utilizando o meio de dissolução tampão fosfato pH 6,8 ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ) contendo 0,1% de lauril sulfato de sódio. Os resultados estão demonstrados na Figura 15.



**Figura 15.** Perfis de dissolução de comprimidos contendo 4 mg de glimepirida utilizando cesta a 50, 75 e 100 rpm e tampão fosfato pH 6,8 ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ) contendo 0,1% de lauril sulfato de sódio como meio de dissolução. Amostras foram analisadas por CLAE. Fase móvel composta de tampão fosfato de sódio ( $27,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 6,5) e metanol (34:66 v/v), coluna Waters® Symmetry C-18 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) como fase estacionária, detecção no UV a 228 nm e volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ .

A partir dos resultados demonstrados na Figura 15, pode-se concluir que a velocidade de agitação das cestas exerce uma influência na liberação de comprimidos de

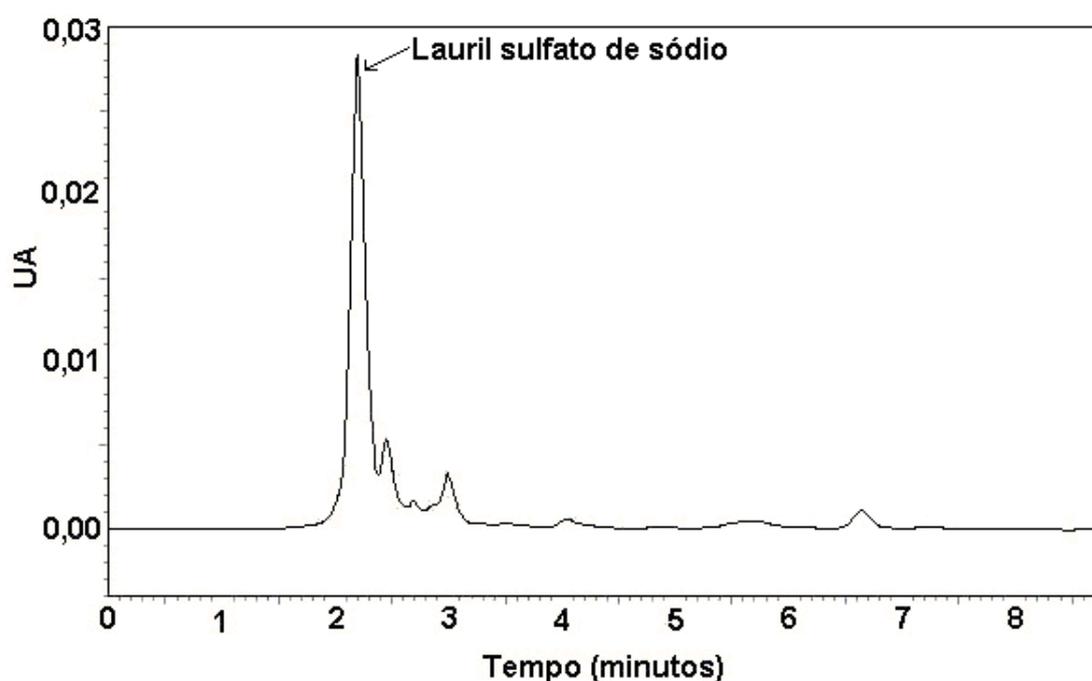
glimepirida, sendo que a única condição que permitiu apenas um ponto acima de 85% de dissolução foi a velocidade de 75 rpm. O aparato cesta, sob 50 e 100 rpm, e o meio de dissolução tampão fosfato pH 6,8 (50 mmol L<sup>-1</sup>) contendo 0,1% de lauril sulfato de sódio não permitem, portanto, a comparação de perfis de dissolução pelo método modelo independente simples.

As condições que podem ser utilizadas para comparação de perfis de dissolução de glimepirida pelo método modelo independente simples são: aparato pá a 50 rpm e tampão fosfato pH 6,8 (50 mmol L<sup>-1</sup>) contendo 0,1% de lauril sulfato de sódio como meio de dissolução e aparato cesta a 75 rpm e tampão fosfato pH 6,8 (50 mmol L<sup>-1</sup>) contendo 0,1% de lauril sulfato de sódio como meio de dissolução. Considerando que o aparato pá é normalmente recomendado pela farmacopeia americana para realização de testes de dissolução em comprimidos (USP, 2011), estabeleceu-se pá a 50 rpm e tampão fosfato pH 6,8 (50 mmol L<sup>-1</sup>) contendo 0,1% de lauril sulfato de sódio como condições ideais para realização de perfis e ensaios de dissolução de comprimidos contendo 4 mg de glimepirida, pois estas condições permitem a obtenção de um perfil de dissolução discriminatório, que pode ser empregado em estudos de equivalência farmacêutica e em testes de rotina de laboratórios de controle de qualidade. O tempo para realização de ensaios de dissolução de glimepirida foi estabelecido em 60 minutos com um Q de 80%, pois todas as unidades individuais do produto referência Amaryl<sup>®</sup> 4 mg demonstraram uma liberação superior a 85% em 60 minutos de ensaio. O ensaio de dissolução estabelecido sob as condições descritas foi posteriormente validado.

### 5.5.1. Validação do método analítico aplicado ao teste de dissolução

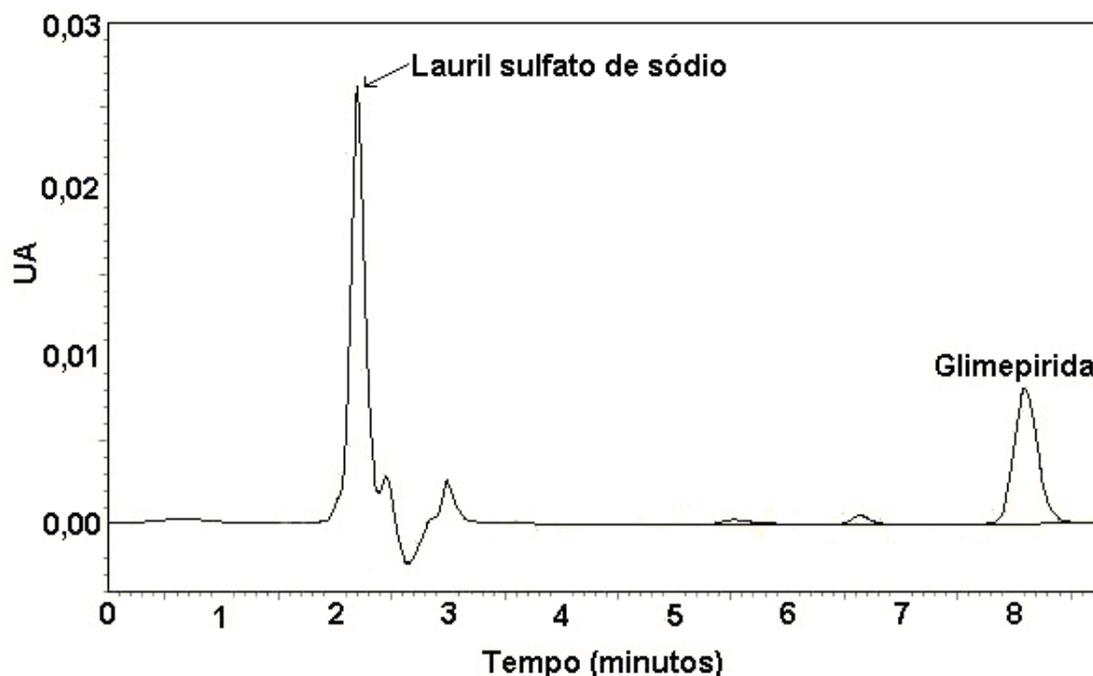
#### 5.5.1.1. Avaliação da seletividade

A Figura 16 mostra o cromatograma referente à avaliação da seletividade dos excipientes contidos no comprimido de Amaryl<sup>®</sup> 4 mg.



**Figura 16.** Cromatograma de placebo em tampão fosfato pH 6,8 ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ) contendo 0,1% de lauril sulfato de sódio. A solução placebo foi submetida ao ensaio de dissolução usando pá por 1 h a 150 rpm. Fase móvel composta de tampão fosfato de sódio ( $27,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 6,5) e metanol (34:66 v/v), coluna Waters<sup>®</sup> Symmetry C-18 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) como fase estacionária, detecção no UV a 228 nm, volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$  e vazão de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ .

A análise do cromatograma de glimepirida de solução placebo do produto Amaryl<sup>®</sup> 4 mg demonstra que os excipientes não interferem significativamente no método de determinação de glimepirida em comprimidos de Amaryl<sup>®</sup> por cromatografia líquida de alta eficiência, pois não houve interferência no tempo de retenção da glimepirida (Figura 17).



**Figura 17.** Cromatograma de glimepirida substância química de referência em tampão fosfato pH 6,8 ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ) contendo 0,1% de lauril sulfato de sódio. Fase móvel composta de tampão fosfato de sódio ( $27,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 6,5) e metanol (34:66 v/v), coluna Waters<sup>®</sup> Symmetry C-18 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) como fase estacionária, detecção no UV a 228 nm, volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$  e vazão de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ .

## 5.5.1.2. Construção da curva analítica de glimepirida

A Tabela 35 mostra os valores experimentais obtidos na construção da curva analítica de glimepirida-SR, em tampão fosfato pH 6,8 (50 mmol L<sup>-1</sup>) contendo 0,1% de lauril sulfato de sódio.

**Tabela 35.** Valores experimentais obtidos na construção da curva analítica para glimepirida para validação de ensaio de dissolução

Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Resposta (área) *	Médias das áreas	Desvio padrão	D.P.R. %
1	31716,67	31440,56	239,86	0,76
	31283,67			
	31321,33			
2	64075,00	63119,00	1092,19	1,73
	61928,67			
	63353,33			
3	97365,67	96929,00	1534,98	1,58
	95223,00			
	98198,33			
4	126209,33	125752,22	1578,77	1,26
	127052,00			
	123955,33			
5	162767,00	158398,67	3784,24	2,39
	156121,00			
	156308,00			
6	192069,33	189939,33	2570,36	1,35
	187084,33			
	190664,33			

\*Média de três leituras

D.P.R. % - desvio padrão relativo.

## 5.5.1.3. Parâmetros obtidos a partir da curva analítica de glimepirida

A Tabela 36 relaciona os parâmetros obtidos a partir dos valores experimentais da curva analítica de glimepirida.

**Tabela 36.** Parâmetros obtidos a partir dos valores experimentais da curva analítica de glimepirida

Parâmetros	Resultados
$\lambda$ (nm)	228
Faixa linear ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	1,0 – 6,0
Equação: $y = bx + a$	$y = 31595x + 214,19$
Intercepto (a) $\pm$ desvio padrão	$214,19 \pm 447,33$
Inclinação (b) $\pm$ desvio padrão	$31595 \pm 496,51$
Limite de detecção ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0,042
Limite de quantificação ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0,142
r (coeficiente de correlação)	$0,99987 \pm 0,000222$
n	6

Os valores são discriminados como média  $\pm$  desvio padrão de três curvas analíticas geradas em três dias consecutivos ( $n = 3$ ).

As Tabelas 35 e 36 demonstram que o método analítico aplicado ao ensaio de dissolução apresenta linearidade satisfatória no intervalo considerado, pois o coeficiente de correlação (r) foi maior do que 0,999, como recomendado pelo ICH, 2005.

## 5.5.1.4. Avaliação da precisão

A Tabela 37 relaciona os valores de precisão do método.

**Tabela 37.** Valores obtidos no teste de precisão de ensaio de dissolução de comprimidos contendo 4 mg de glimepirida

Nível	Áreas das bandas						Média	D.P.	D.P.R. (%)
	1	2	3	4	5	6			
<b>Repetitividade</b>									
50%	60270	60123	60622	---	---	---	60338	256,4	0,42 (n=3)
100%	121021	122335	122138	---	---	---	121831	708,7	0,58 (n=3)
150%	178770	177440	178938	---	---	---	178383	820,7	0,46 (n=3)
<b>Precisão intermediária</b>									
50%	60270	60123	60622	58915	59328	62463	60287	1239,1	2,06 (n=6)
100%	121021	122335	122138	114557	116650	116270	118829	3393,9	2,86 (n=6)
150%	178770	177440	178938	171894	173895	174208	175858	2924,3	1,66 (n=6)

D.P. = Desvio padrão

D.P.R. = Desvio padrão relativo.

Os valores da Tabela 37 demonstram que o método analítico aplicado ao ensaio de dissolução é suficientemente preciso, pois foram obtidas estimativas de desvio padrão relativo inferiores à 5,0%, como recomendado na literatura para ensaios de dissolução (USP, 2011).

## 5.5.1.5. Exatidão utilizando o teste de recuperação para glimepirida

A Tabela 38 demonstra os valores obtidos no teste de recuperação de glimepirida após realização de ensaio de dissolução.

**Tabela 38.** Valores obtidos no teste de recuperação de glimepirida após realização de ensaio de dissolução

	Concentração de glimepirida adicionada ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Concentração recuperada ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) *	Recuperação (%) $\pm$ D.P.R.
R1 (50%)	2	1,9857	99,29 $\pm$ 0,42
R2 (100%)	4	4,0095	100,24 $\pm$ 0,58
R3 (150%)	6	5,8706	97,84 $\pm$ 0,46

\* Média de três determinações.

D.P.R.% - desvio padrão relativo.

Os valores da Tabela 38 demonstram que o método analítico aplicado ao ensaio de dissolução apresenta exatidão adequada, pois foram obtidos valores de recuperação entre 95,0 e 105,0%, como recomendado na literatura para ensaios de dissolução (USP, 2011).

#### 5.5.1.6. Robustez

A Tabela 39 demonstra os valores de robustez obtidos a partir do teste proposto por Youden e Steiner (YOU DEN, STEINER, 1975).

**Tabela 39.** Valores obtidos no teste de robustez de ensaio de dissolução para comprimidos contendo 4 mg de glimepirida

Variável	Condição experimental								D.P. x $\sqrt{2}$
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Tempo de dissolução	A	A	A	A	a	a	a	a	
pH do meio de dissolução	B	B	b	b	B	B	b	b	
Velocidade de agitação	C	c	C	c	C	c	C	c	
Temperatura do meio	D	D	d	d	d	d	D	D	
Desaeração	E	e	E	e	e	E	e	E	
Filtro de papel	F	f	f	F	F	f	f	F	
Exposição à luz	G	g	g	G	g	G	G	g	
Resultados (% dissolvida)	92,2	93,3	89,5	77,7	87,8	95,2	93,8	84,8	8,23

D.P. x  $\sqrt{2}$  = Desvio padrão multiplicado pela raiz quadrada de 2.

A partir dos valores encontrados, os efeitos de cada variável foram calculados e estão descritos na Tabela 40.

**Tabela 40.** Valores de efeitos obtidos de acordo com o teste de Youden e Steiner (YOU DEN, STEINER, 1975)

Variável	Efeito
Tempo de dissolução	-2,22
pH do meio de dissolução	5,70
Velocidade de agitação	3,11
Temperatura do meio	3,47
Desaeração	2,29
Filtro de papel	-7,32
Exposição à luz	0,87

De acordo com Youden e Steiner (YOU DEN, STEINER, 1975), as variáveis que produzirem um efeito maior do que a raiz quadrada de dois multiplicada pelo desvio padrão entre os resultados (D.P. x  $\sqrt{2}$ ) influenciam significativamente a resposta analítica. De

acordo com a observação das Tabelas 39 e 40, pode-se concluir nenhum fator testado influencia significativamente na resposta analítica para o produto Amaryl<sup>®</sup> 4 mg. A partir destes resultados, pode-se deduzir que o método de análise é considerado robusto para todas as variáveis consideradas.

### 5.5.2. Discussão

Os ensaios de dissolução *in vitro* de formas farmacêuticas de liberação imediata são de extrema importância, pois são essenciais na avaliação da qualidade lote a lote de um produto farmacêutico, para orientar o desenvolvimento de novas formulações e para assegurar a qualidade contínua de um produto após certas mudanças, como alterações na formulação, no processo ou local de produção ou até mesmo na escala do processo de fabricação.

Neste trabalho, foram propostas as condições ideais para realizar perfis de dissolução de comprimidos contendo 4 mg de glimepirida e para realização dos ensaios de dissolução orientados os controle de qualidade deste produto farmacêutico. Após teste com vários meios de dissolução e os dois aparatos (cesta e pá) nas velocidades de agitação de 50, 75 e 100 rpm, chegou-se à conclusão de que as condições ideais são tampão fosfato de sódio pH 6,8 (50 mmol L<sup>-1</sup>) contendo 0,1% de lauril sulfato de sódio como meio de dissolução e aparato pá sob a velocidade de agitação de 50 rpm com quantificação por CLAE. A espectrofotometria desenvolvida neste trabalho não pôde ser utilizada como método de quantificação pois, além de ser um método não seletivo quanto aos produtos de degradação, não permitiu a quantificação da glimepirida em meio contendo lauril sulfato de

sódio, uma vez que este tensoativo, quando em contato com os excipientes presentes no produto Amaryl<sup>®</sup> 4 mg produziu uma turvação, o que impede o emprego da espectrofotometria.

Sob as condições descritas, o perfil de dissolução de comprimidos de Amaryl<sup>®</sup> 4 mg, com coleta das amostras nos tempos 5, 10, 15, 20, 30 e 60 minutos, mostrou-se adequado para realização de estudos de equivalência farmacêutica, pois verificou-se apenas um ponto com dissolução superior a 85%, como estabelecido pela resolução RE nº 310, de 01 de setembro de 2004 (BRASIL, 2004), que determina essa condição para comparação de perfis de dissolução através do método modelo independente simples.

O tempo para realização de ensaios de dissolução de glimepirida foi estabelecido em 60 minutos com Q de 80%, pois todas as unidades individuais do produto referência Amaryl<sup>®</sup> 4 mg demonstraram liberação superior a 85% em 60 minutos de ensaio. O método analítico aplicado ao teste de dissolução sob as condições descritas foi posteriormente validado. A seletividade foi demonstrada pela ausência de interferência dos excipientes no método cromatográfico.

Os resultados obtidos na determinação da linearidade do método demonstraram que as soluções de glimepirida apresentaram correlação linear entre as áreas das bandas e as concentrações, no intervalo utilizado. Gráficos de concentração em função da área absoluta foram plotados e demonstraram linearidade na faixa de 1,0 a 6,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em meio de dissolução. A equação da reta para a glimepirida foi  $y = 31595x + 214,19$  com coeficiente de correlação de 0,99987.

A precisão do método analítico foi demonstrada pela repetibilidade (intradias) e precisão intermediária (interdias). Os valores de D.P.R. inferiores a 5,0% confirmam a

adequada precisão de métodos aplicados à ensaios de dissolução, de acordo com estabelecido na literatura (USP, 2011). A média de recuperação foi de 99,12%, indicando exatidão adequada, pois o valor se encontra dentro do limite estabelecido de 95,0 a 105,0% (USP, 2011). Verificou-se que LD e LQ foram  $0,042 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $0,142 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, indicando que todas as análises foram realizadas acima destes limites.

O teste de Youden e Steiner (YOU DEN, STEINER, 1975) demonstrou a robustez para todos os parâmetros considerados: tempo de dissolução, pH do meio de dissolução, velocidade de agitação do aparato, temperatura do meio de dissolução, desaeração, filtro de papel e exposição à luz.

As condições descritas nesta seção permitem a comparação de perfis de dissolução pelo método modelo independente simples, podendo, portanto, ser empregadas na avaliação de equivalência farmacêutica entre o produto referência (Amaryl<sup>®</sup> 4 mg) e genéricos ou similares. Além disso, estabeleceu-se um ensaio de dissolução orientado ao controle de qualidade de Amaryl<sup>®</sup> 4 mg. Portanto, as condições estabelecidas foram adequadas e o perfil obtido considerado satisfatório.

Este ensaio proposto é de extrema importância, pois somente a aplicação de testes que possam discriminar adequadamente a qualidade de formulações comercializadas irá garantir a qualidade, segurança e eficácia dos medicamentos similares e genéricos. Posteriormente, este ensaio de dissolução será aplicado em formulações similares, para avaliar sua capacidade discriminatória e para verificar estes produtos cumprem com os requisitos mínimos para comercialização.

## 6. ESTUDOS DE ESTABILIDADE

### 6.1. Introdução

Entende-se por estabilidade a capacidade de uma formulação de manter as especificações físicas, químicas, microbiológicas e biofarmacêuticas dentro dos limites especificados durante todo seu prazo de validade (O'DONNELL, BOKSER, 2005).

A relevância de estudos de estabilidade é verificada ao se considerar que a perda da estabilidade de um medicamento pode estar diretamente relacionada com a perda do efeito terapêutico ou com a formação de produtos de degradação (SILVA et al., 2009). A formação de produtos de degradação pode resultar em atividade reduzida ou tóxica (CARVALHO et al., 2005).

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 adjuvantes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (BRASIL, 2005).

A partir destes estudos, pode-se determinar o prazo de validade, o material de embalagem e as condições de armazenamento e transporte de fármacos e medicamentos (ICH, 2003). Entende-se por prazo de validade o período de tempo compreendido entre a fabricação do produto farmacêutico até aquele que sua potência não seja inferior a 90%, desde que os produtos de degradação estejam todos seguramente identificados e

previamente reconhecidos seus efeitos e que a qualidade do produto esteja dentro do especificado (SILVA et al., 2009).

Muitos fatores afetam a estabilidade de um produto farmacêutico, entre eles, a estabilidade das substâncias ativas, a interação excipiente-fármaco, os processos de produção, a forma farmacêutica, a embalagem e o sistema de lacre, as condições durante o transporte, armazenamento e o período entre a fabricação e a utilização do produto. Fatores ambientais que podem alterar um produto com o tempo incluem temperatura, radiações, umidade, oxigênio e outros gases atmosféricos, pressão, solventes, pH, interações, contaminação microbiana, entre outros (KOMMANABOYINA e RHODES, 1999).

As reações de degradação em produtos farmacêuticos ocorrem com velocidade definida e são de natureza química. Portanto, ao considerar a estabilidade química de um produto farmacêutico é preciso conhecer a ordem e a velocidade da reação. A expressão da velocidade da reação é uma descrição da concentração do fármaco com relação ao tempo. Em geral, as reações de degradação de produtos farmacêuticos são de ordem zero e de primeira ordem e, mais raramente, de segunda ordem (ANSEL et al., 2000). O modelo cinético pode ser representado pelas seguintes equações:

$$C = C_0 - kt \quad t_{90\%} = (0,1 \times C_0)/k \quad (\text{reação de ordem zero})$$

$$\ln C = \ln C_0 - kt \quad t_{90\%} = 0,106/k \quad (\text{reação de primeira ordem})$$

$$1/C = 1/C_0 + kt \quad t_{90\%} = 1/(9k \times C_0) \quad (\text{reação de segunda ordem})$$

Quando a ordem de reação é desconhecida, é possível deduzi-la pela análise dos gráficos plotados para cada ordem. A representação gráfica que resultar em uma linha reta indica qual a ordem de reação (NETZ e ORTEGA, 2002).

Vários métodos para determinação de estabilidade química de produtos farmacêuticos são descritos na literatura, dentre eles:

- Método de *Arrhenius*: Consiste em expor o medicamento a, no mínimo 3 diferentes condições de temperaturas superiores à normal e acompanhar o decréscimo da concentração da substância ativa. Posteriormente, determina-se a ordem de reação e através da inclinação da curva de ordem determinada, obtém-se a velocidade de degradação (K) do fármaco em cada temperatura. Posteriormente, elabora-se o gráfico log K em função de 1/T (T deve estar em Kelvin). O K para a temperatura de armazenamento no qual o produto será exposto pode então ser calculado. Sabendo-se a ordem de reação e o K na temperatura desejada, pode-se calcular o prazo de validade nesta temperatura, que é o tempo teórico em que ocorrerá diminuição de substância ativa em 10% ( $t_{90\%}$ ). Entretanto, este método apresenta algumas limitações, pois é desejável que as reações atinjam uma porcentagem de pelo menos 50% da degradação para de avaliar a ordem de reação (LEITE, 2006).
- Método empírico: Estabelece que a cada aumento de 10°C duplica-se o valor de velocidade de reação. Porém, esta regra é tão simplista que só pode ser utilizada em um número limitado de casos (LEITE, 2006).
- Método da tabela de estabilidade: Relaciona a estabilidade à temperatura ambiente ( $T_0$ ) com dados de degradação a duas temperaturas mais elevadas ( $T_1$  e  $T_2$ ), através da Equação 9:

$$\alpha = T_2/T_0 \cdot (T_1 - T_0)/(T_2 - T_1) \quad (9)$$

A utilização deste método é restrita ao desenvolvimento de produtos farmacêuticos. Para produtos a serem comercializados no Brasil, é desejável utilizar 30°C como temperatura ambiente (LEITE, 2006).

- Método do coeficiente de temperatura: o coeficiente de temperatura ( $Q_{10}$ ) é definido segundo a equação 10 (ANSEL, 2000):

$$Q_{10} = K(T+10)/KT \quad (10)$$

em que:  $K(T+10)$ : é a velocidade de uma reação em determinada temperatura e  $KT$  é a velocidade de uma reação a uma temperatura 10°C inferior.

- Termogravimetria: Permite a verificação de estabilidade térmica e determinação de parâmetros cinéticos (energia de ativação, fator pré-exponencial e ordem de ativação), através do estudo da decomposição térmica de medicamentos. Os parâmetros cinéticos podem ser calculados a partir do perfil termogravimétrico, utilizando tratamentos matemáticos de regressão linear e não linear, com base em equações desenvolvidas para este fim (LEITE, 2006).

Embora os métodos clássicos descritos anteriormente sejam úteis para prever a diminuição de teor de uma substância ativa, existem diretrizes bem estabelecidas para condução de estudos de estabilidade.

No Brasil, a resolução RE n. 1, de 29 de julho de 2005 (BRASIL, 2005) serve como guia para a realização de estudos de estabilidade. Esta resolução tem como referência os guias de qualidade editados pelo ICH relativos a requerimentos técnicos para registro de

medicamentos para uso humano. Este guia define três tipos de estudos de estabilidade: a) estabilidade acelerada: estudo em que se acelera a degradação química ou mudanças físicas de um produto em condições forçadas de armazenamento; b) estabilidade de longa duração: estudo projetado para verificar as características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto durante o prazo de validade esperado e, opcionalmente, após seu vencimento; c) estabilidade de acompanhamento: estudo realizado após o início da comercialização do produto, para verificar a manutenção das características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas, previstas nos estudos de estabilidade de longa duração (CARVALHO et al., 2005).

Com relação à frequência dos testes nos estudos de estabilidade acelerada e estabilidade de longa duração, é estabelecido que para os estudos de estabilidade de longa duração os testes devem ser realizados a cada três meses no primeiro ano e a cada seis meses no segundo ano. Além disso, para submissão às autoridades sanitárias, os estudos de estabilidade de longa duração devem ser conduzidos por pelo menos 12 meses. Os testes no estudo de estabilidade acelerada devem ser realizados nos tempos zero, três e seis meses (BRASIL, 2005).

No caso de sólidos, nos estudos de estabilidade acelerada a ANVISA estabelece o armazenamento das amostras na embalagem primária a  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $75\% \pm 5\%$  de umidade relativa. No estudo de estabilidade de longa duração, as amostras devem ser armazenadas a  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $75\% \pm 5\%$  de umidade relativa (BRASIL, 2005).

A RE n. 1, de 29 de julho de 2005 estabelece ainda que para as formas farmacêuticas sólidas devem ser apresentadas informações sobre a dissolução e dureza (BRASIL, 2005).

Os estudos de estabilidade acelerada são conduzidos com o propósito de monitorar as reações de degradação e prever o prazo de validade nas condições normais de armazenamento. O teste de estabilidade de longa duração, é recomendado para validar a estabilidade pretendida (LEITE, 2006).

## **6.2. Parte experimental**

### **6.2.1. Material**

#### **6.2.1.1. Amostras**

Os produtos farmacêuticos utilizados foram comprimidos de Amaryl<sup>®</sup> 4 mg (validade: 03/2011) e três diferentes produtos similares contendo 4 mg de glimepirida, os quais foram codificados como produto A (validade: 03/2011), produto B (validade: 05/2011) e produto C (validade: 12/2011). Todas as amostras de cada produto farmacêutico pertencem ao mesmo lote.

#### **6.2.1.2. Equipamentos**

- Aparelho de ultrassom Unique<sup>®</sup> modelo USC2800A (Indaiatuba, Brasil);
- Balança analítica Kern<sup>®</sup> modelo 410 (Kern, Alemanha);
- Câmara climática Nova Ética<sup>®</sup> modelo CLD 420 (São Paulo, Brasil);

- Coluna Waters Symmetry<sup>®</sup> C-18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) e pré-coluna Waters Symmetry<sup>®</sup> C-18 (20 mm x 3,9 mm, 5 µm) (Milford, EUA);
- Cromatógrafo a líquido Shimadzu<sup>®</sup> (Kyoto, Japão), série LC-10A, injetor manual 7725i com alça de amostragem de 20 µL (Rheodyne<sup>®</sup>, California, EUA), detector SPD-10AVP, válvula FCV-10ALVP, forno de coluna CTO-10AVP e controlador SCL-10Avp;
- Dissolutor Electrolab<sup>®</sup> TDT-08 L, equipado com oito cubas de dissolução (São Paulo, Brasil);
- Durômetro Nova Ética<sup>®</sup> modelo 298 DGP (Nova Ética<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil);
- Filtros de politetrafluoretileno (PTFE) hidrofílicos com 0,45 µm de poro (Millipore<sup>®</sup>, Bedford, EUA).
- Membranas de politetrafluoretileno (PTFE) hidrofílicas com 0,45 µm de poro e 47,0 mm de diâmetro (Millipore<sup>®</sup>, Bedford, EUA);
- Papel de filtro quantitativo isento de cinzas Vetec<sup>®</sup> (Rio de Janeiro, Brasil);
- Peagômetro Mettler<sup>®</sup> modelo Delta 345 (Barueri, Brasil);
- Sistema de filtração à vácuo Nova Técnica<sup>®</sup> (São Paulo, Brasil);
- Sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore<sup>®</sup>, Bedford, EUA).

### 6.2.1.3. Solventes e reagentes

- Acetato de sódio triidratado Synth<sup>®</sup> (Diadema, Brasil);
- Ácido acético glacial Vetec<sup>®</sup> (Rio de Janeiro, Brasil);
- Ácido cítrico Vetec<sup>®</sup> (Rio de Janeiro, Brasil);

- Ácido clorídrico Vetec<sup>®</sup> (Rio de Janeiro, Brasil);
- Água ultrapura – água Milli-Q;
- Fosfato de sódio bibásico anidro Vetec<sup>®</sup> (Rio de Janeiro, Brasil);
- Fosfato de sódio monobásico monohidratado Reagen<sup>®</sup> (Colombo, Brasil);
- Hidróxido de sódio PA DINÂMICA<sup>®</sup> (São Paulo, Brasil);
- Lauril sulfato de sódio Henrifarma<sup>®</sup> (São Paulo, Brasil);
- Metanol grau HPLC TEDIA Company<sup>®</sup> (Fairfield, EUA);

### 6.2.2. Condições de estudo

#### 6.2.2.1. Estudo de estabilidade acelerada de comprimidos de glimepirida

As amostras foram mantidas na câmara climática em embalagem primária a  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $75\% \pm 5\%$  de umidade relativa. As amostras foram analisadas no tempo 0, 3 e 6 meses através de ensaios de teor de glimepirida, produtos de degradação, dureza e dissolução. O método analítico empregado nos ensaios de teor e produtos de degradação foi o método apresentado na seção 5.2.4: fase móvel composta de tampão fosfato de sódio ( $27,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ; pH 6,5) e metanol (34:66 v/v). A detecção foi realizada no UV a 228 nm e o volume de injeção foi de 20  $\mu\text{L}$ . As análises foram realizadas à temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C}$ ). O ensaio de dissolução utilizado foi o ensaio apresentado na seção 5: aparato pá a 50 rpm; 1000 mL de tampão fosfato pH 6,8 ( $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ) contendo 0,1% de lauril sulfato de sódio como meio de dissolução; coleta das amostras após 60 minutos e análise por CLAE.

Os ensaios de dureza foram realizados de acordo com o preconizado pela quinta edição da Farmacopeia Brasileira (2010). O teste consistiu em submeter o comprimido à ação de um aparelho (durômetro) que mediu a força, aplicada diametralmente, necessária para esmagá-lo. A força foi medida em Kgf.

#### 6.2.2.2. Estudo de estabilidade de longa duração de comprimidos de glimepirida

As amostras foram condicionadas na câmara climática em embalagem primária a  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $75\% \pm 5\%$  de umidade relativa. As amostras foram analisadas nos tempos 0, 3, 6, 9 e 12 meses através de ensaios de teor de glimepirida, produtos de degradação, dureza e dissolução. As análises de teor e produtos de degradação foram realizadas utilizando coluna Symmetry Waters C-18 5  $\mu\text{m}$  250 x 4,6 mm e pré-coluna Symmetry Waters C-18 5  $\mu\text{m}$ , 20 x 3,9 mm, acopladas em cromatógrafo a líquido Shimadzu<sup>®</sup> (Kyoto, Japão), série LC-10A, injetor manual 7725i com alça de amostragem de 20  $\mu\text{L}$  (Rheodyne<sup>®</sup>, Califórnia, EUA), detector SPD-10AVP, válvula FCV-10ALVP, forno de coluna CTO-10AVP e controlador SCL-10Avp. O método analítico e o ensaio de dissolução foram os mesmos descritos na seção 5.3. Os ensaios de dureza foram realizados de acordo com o preconizado pela quinta edição da Farmacopeia Brasileira (2010). O teste consistiu em submeter o comprimido à ação de um aparelho (durômetro) que mediu a força, aplicada diametralmente, necessária para esmagá-lo. A força foi medida em Kgf.

---

### **6.3. Resultados e discussão**

#### **6.3.1. Estudo de estabilidade acelerada de comprimidos de glimepirida**

##### **6.3.1.1. Dureza**

A Tabela 41 apresenta os resultados de ensaios dureza de comprimidos contendo 4 mg de glimepirida no tempo 0 e após comprimidos serem submetidos sob condições de degradação acelerada por 3 e 6 meses, respectivamente. Os ensaios foram realizados de acordo com o preconizado pela quinta edição da Farmacopeia Brasileira (2010).

## CAPÍTULO V – ESTUDOS DE ESTABILIDADE

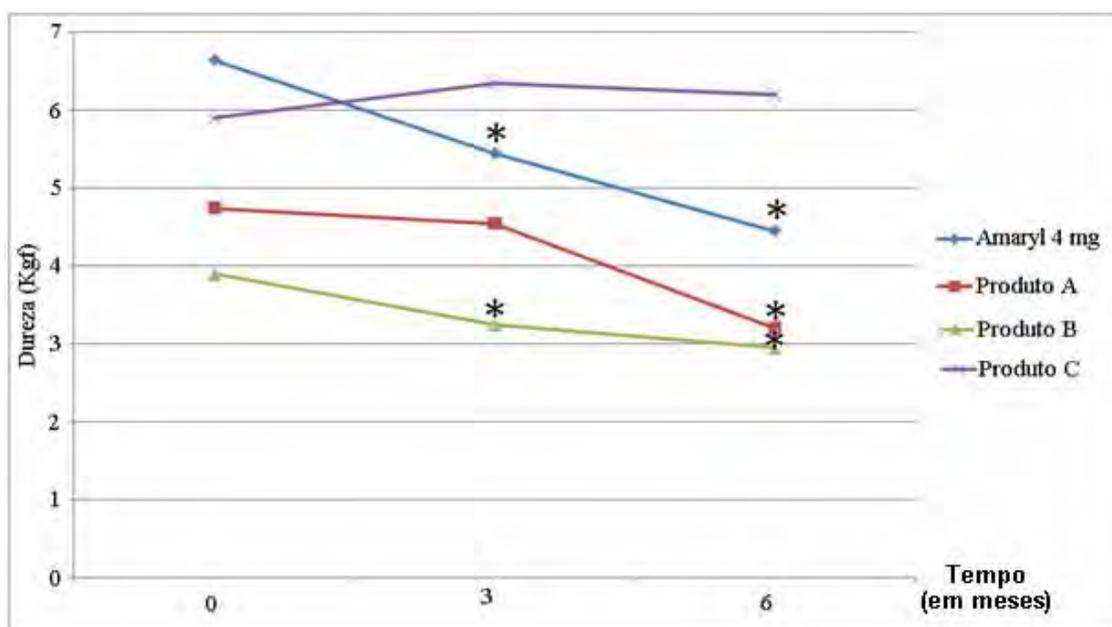
**Tabela 41.** Valores encontrados nos ensaios de dureza de comprimidos contendo 4 mg de glimepirida no tempo 0 e após 3 e 6 meses sob condições de degradação acelerada

Tempo	Dureza (kgf)			
	Amaryl <sup>®</sup> 4 mg	Produto A	Produto B	Produto C
0	5,5	4,5	5,0	6,5
	6,0	4,5	4,0	6,5
	6,0	4,0	4,5	6,0
	7,0	4,5	3,5	5,5
	7,5	4,5	3,5	5,5
	6,5	5,5	3,5	5,5
	7,0	5,5	3,5	6,0
	7,0	5,5	3,5	6,0
	6,5	4,5	4,0	6,0
	6,0	4,5	4,0	5,5
3 meses	6,0	4,0	3,0	7,5
	5,0	4,5	3,0	5,5
	5,5	4,5	3,0	5,5
	5,0	5,0	3,5	5,5
	6,0	3,5	3,0	6,0
	5,0	4,0	3,5	7,0
	6,5	4,5	4,0	6,0
	5,5	5,0	3,5	7,5
	5,5	6,0	3,0	6,5
	4,5	4,5	3,0	6,5
6 meses	4,5	3,0	3,0	6,0
	4,5	3,0	2,5	6,0
	4,5	3,0	3,0	6,5
	4,0	3,5	3,0	6,5
	4,0	3,5	3,5	5,5
	4,5	3,0	2,5	5,5
	5,0	3,0	3,0	7,0
	4,5	3,5	3,0	6,5
	4,5	3,0	3,0	6,5
	4,5	3,5	3,0	6,0

A partir dos dados demonstrados na Tabela 41 pode-se concluir que todas as unidades testadas encontram-se dentro do limite farmacopeico de dureza estabelecido para comprimidos no tempo 0 e após 3 meses sob condições de degradação acelerada (mínimo de 3 kgf) (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Entretanto, após 6 meses sob tais

condições, o produto B apresentou duas unidades abaixo dos limites de dureza estabelecidos.

Os resultados de dureza obtidos no estudo de estabilidade acelerada foram plotados em gráfico, correlacionando-se a média das durezas de cada produto obtidas nos tempos 0, 3 e 6 meses (Figura 18).



**Figura 18.** Média das durezas de Amaryl<sup>®</sup> 4 mg, produto A, produto B e produto C, obtidas nos tempos 0, 3 e 6 meses do estudo de estabilidade acelerada. Valores médios que diferem estatisticamente dos valores obtidos no tempo zero, ao nível de significância de 5% (utilizando-se ANOVA), foram marcados com asteriscos.

A partir dos resultados demonstrados na Figura 18 pode-se inferir que, com exceção do produto C, todos os produtos sofreram diminuição na média da dureza dos comprimidos, quando submetidos por 6 meses sob condições de estudo de estabilidade acelerada.

## 6.3.1.2. Dissolução

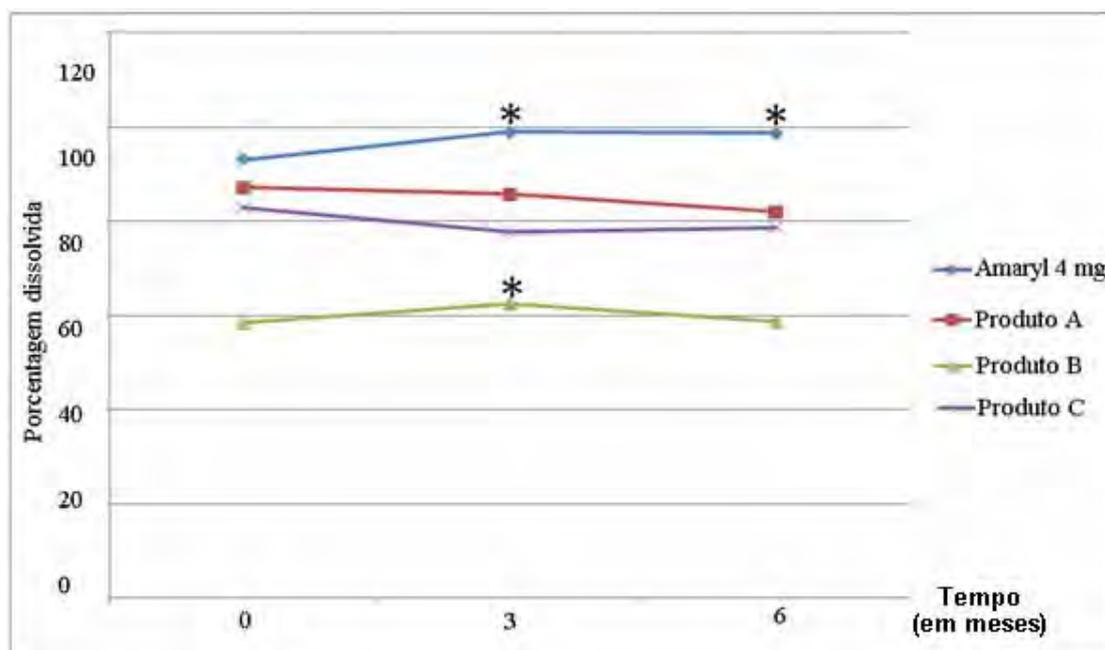
A Tabela 42 apresenta os resultados de ensaios de dissolução de comprimidos contendo 4 mg de glimepirida no tempo 0 e após serem submetidos sob condições de degradação acelerada por 3 e 6 meses, respectivamente. Os ensaios de dissolução foram realizados de acordo com as condições estabelecidas no capítulo IV. As condições foram as seguintes: aparato pá sob a velocidade de 50 rpm, 1000 mL de tampão fosfato de sódio pH 6,8 (50 mmol L<sup>-1</sup>) contendo 0,1% de lauril sulfato de sódio como meio de dissolução e tempo de coleta após 60 minutos de ensaio.

**Tabela 42.** Ensaios de dissolução de comprimidos contendo 4 mg de glimepirida, realizados no tempo 0 e após 3 e 6 meses sob condições de degradação acelerada

Tempo	Dissolução (%)			
	Amaryl <sup>®</sup> 4 mg	Produto A	Produto B	Produto C
0	92,69	85,51	59,94	85,59
	91,96	85,90	55,50	86,08
	92,58	89,74	60,96	80,17
	92,62	90,47	57,58	80,37
	92,52	86,60	59,58	76,58
	96,33	84,84	57,53	88,22
3 meses	101,32	88,73	61,10	78,24
	105,27	89,96	63,36	84,38
	96,36	90,42	63,00	74,96
	92,13	84,81	63,33	74,07
	100,90	79,48	61,35	74,53
	97,81	80,84	63,49	80,36
6 meses	96,95	83,54	63,54	75,28
	96,12	78,03	55,43	83,44
	97,40	82,59	54,94	85,29
	97,71	78,41	56,37	73,79
	99,61	78,10	64,16	75,34
	104,26	91,50	58,62	79,55

A partir dos dados demonstrados na Tabela 42 pode-se concluir que apenas o produto referência (Amaryl<sup>®</sup> 4 mg) apresentou todas as amostras de comprimidos com teor de dissolução acima do valor estabelecido ( $Q = 80\%$ ). Segundo a Farmacopeia Brasileira (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010), para que o lote seja considerado aprovado no primeiro critério de aceitação para o ensaio de dissolução, todas as unidades individuais testadas devem apresentar um valor de dissolução acima de  $Q + 5\%$ .

Os resultados de dissolução obtidos no estudo acelerado de estabilidade foram plotados em gráfico, correlacionando-se a média das dissoluções de cada produto obtidas nos tempos 0, 3 e 6 meses (Figura 19).



**Figura 19.** Média dos percentuais de dissoluções de Amaryl<sup>®</sup> 4 mg, produto A, produto B e produto C, obtidas nos tempos 0, 3 e 6 meses do estudo de estabilidade acelerada. Valores médios que

diferem estatisticamente dos valores obtidos no tempo zero, ao nível de significância de 5% (utilizando-se ANOVA), foram marcados com asteriscos.

A partir dos resultados demonstrados na Figura 19 pode-se inferir que os produtos Amaryl<sup>®</sup> 4 mg e produto B sofreram aumento na média da dissolução dos comprimidos, quando submetidos a condições de estudo de estabilidade acelerada.

#### 6.3.1.3. Teor

A Tabela 43 apresenta os resultados de ensaios de teor de comprimidos contendo 4 mg de glimepirida no tempo 0 e após comprimidos serem submetidos sob condições de degradação acelerada por 3 e 6 meses, respectivamente. O método analítico empregado foi o método apresentado na seção 5.2.4: fase móvel composta de tampão fosfato de sódio (27,5 mmol L<sup>-1</sup>; pH 6,5) e metanol (34:66 v/v). A detecção foi realizada no UV a 228 nm e o volume de injeção foi de 20 µL. As análises foram realizadas à temperatura ambiente (25° C).

## CAPÍTULO V – ESTUDOS DE ESTABILIDADE

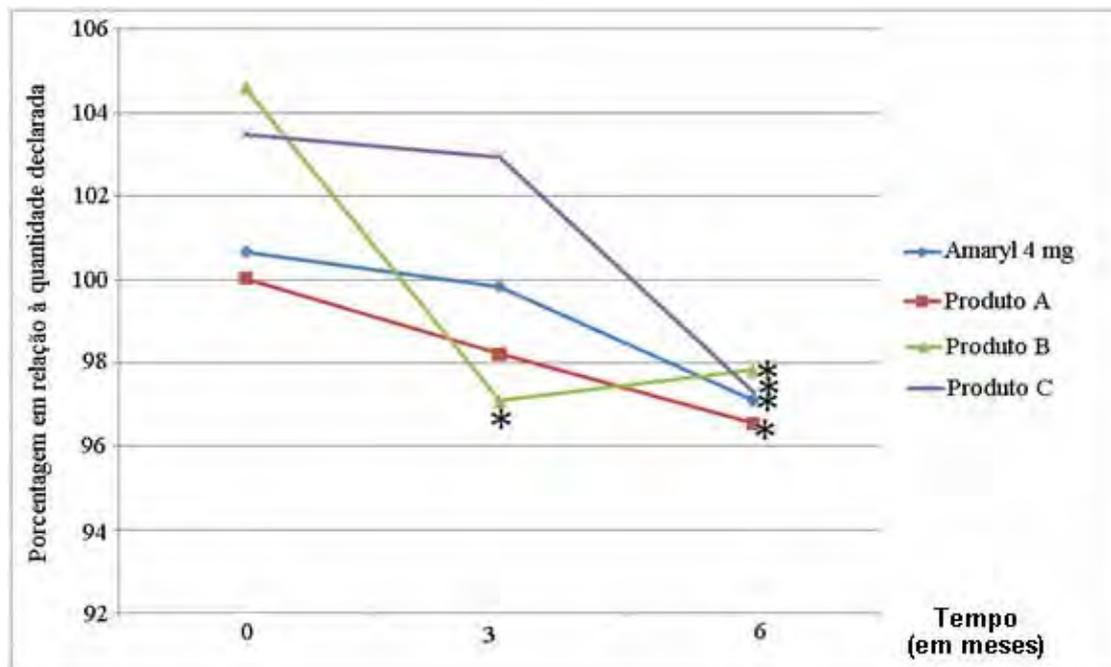
**Tabela 43.** Ensaios de teor de comprimidos contendo 4 mg de glimepirida, realizados no tempo 0 e após 3 e 6 meses sob condições de degradação acelerada

Tempo		Amaryl <sup>®</sup> 4 mg	Produto A	Produto B	Produto C
0	Glimepirida (mg)	4,03	4,00	4,18	4,14
	Glimepirida (%)	100,66	100,03	104,60	103,49
	D.P.R. (%)	1,68 (n = 5)	1,59 (n = 5)	1,92 (n = 5)	1,58 (n = 5)
3 meses	Glimepirida (mg)	3,99	3,93	3,88	4,12
	Glimepirida (%)	99,83	98,21	97,10	102,93
	D.P.R. (%)	1,23 (n = 5)	2,21 (n = 5)	1,16 (n = 5)	0,83 (n = 5)
6 meses	Glimepirida (mg)	3,88	3,86	3,91	3,89
	Glimepirida (%)	97,09	96,55	97,83	97,28
	D.P.R. (%)	2,50 (n = 5)	2,42 (n = 5)	2,19 (n = 5)	0,73 (n = 5)

D.P.R. (%) = desvio padrão relativo.

A partir dos dados demonstrados na Tabela 43 pode-se concluir que todos os produtos testados apresentaram valores percentuais de teor dentro dos limites de 90,0% a 110,0%, estabelecido pela Farmacopeia Americana (USP, 2011).

Os resultados de teor obtidos no estudo de estabilidade acelerada foram plotados em gráfico, correlacionando-se a média dos teores de cada produto obtidas nos tempos 0, 3 e 6 meses (Figura 20).



**Figura 20.** Média dos teores de Amaryl<sup>®</sup> 4 mg, produto A, produto B e produto C, obtidas nos tempos 0, 3 e 6 meses do estudo de estabilidade acelerada. Valores médios que diferem estatisticamente dos valores obtidos no tempo zero, ao nível de significância de 5% (utilizando-se ANOVA), foram marcados com asteriscos.

A partir dos resultados demonstrados na Figura 20 pode-se inferir que todos os produtos sofreram diminuição na média de teor de glimepirida presente nos comprimidos, quando submetidos a condições de estudo de estabilidade acelerada, porém, mantiveram-se dentro da faixa de aceitação de 90,0 a 110,0% (USP, 2011).

## 6.3.1.4. Produtos de degradação

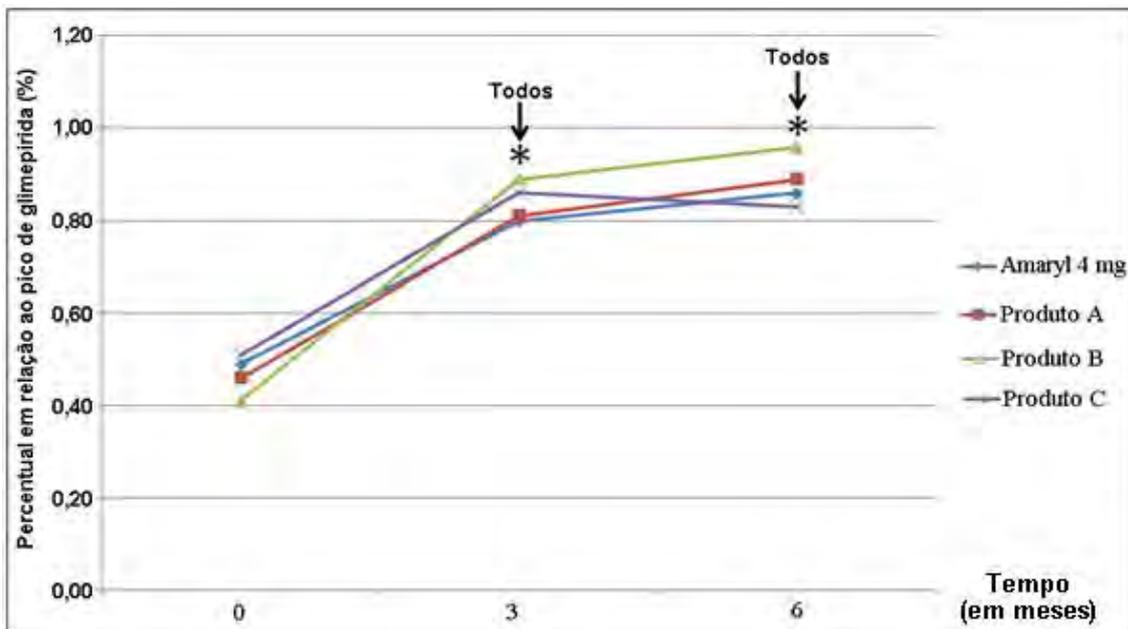
A análise dos produtos de degradação das amostras Amaryl<sup>®</sup> 4 mg, produto A, produto B e produto C sob condições de degradação acelerada demonstrou que todos os produtos apresentaram uma banda cromatográfica em torno de 4 minutos, que foi atribuída a um produto de degradação da glimepirida. A área referente ao produto de degradação da glimepirida foi medida utilizando o *software* do cromatógrafo. Os resultados de produtos de degradação estão demonstrados na Tabela 44.

**Tabela 44.** Área média de produto de degradação de comprimidos contendo 4 mg de glimepirida no tempo 0 e após 3 e 6 meses sob condições de degradação acelerada

Tempo		Amaryl <sup>®</sup> 4 mg	Produto A	Produto B	Produto C
0	Área média de produto de degradação	1480,47	1489,80	1384,00	1708,25
	D.P.R. (%) (n = 5)	8,57	10,95	1,66	8,04
3 meses	Área média de produto de degradação	2621,75	2598,00	2838,20	2895,40
	D.P.R. (%) (n = 5)	7,70	6,98	4,76	4,86
6 meses	Área média de produto de degradação	2732,40	2819,00	3067,75	2655,50
	D.P.R. (%) (n = 5)	10,74	6,07	5,58	2,07

D.P.R. (%) = desvio padrão relativo.

Os resultados de produtos de degradação obtidos no estudo acelerado de estabilidade foram plotados em gráfico, correlacionando-se a média das áreas obtidas nos tempos 0, 3 e 6 meses (Figura 21).



**Figura 21.** Média das áreas de produto de degradação de Amaryl<sup>®</sup> 4 mg, produto A, produto B e produto C, obtidas nos tempos 0, 3 e 6 meses do estudo de estabilidade acelerada. Valores médios que diferem estatisticamente dos valores obtidos no tempo zero, ao nível de significância de 5% (utilizando-se ANOVA), foram marcados com asteriscos.

A partir dos resultados demonstrados na Figura 21 pode-se concluir que todos os produtos apresentaram aumentos estatisticamente significativos nas áreas de produtos de degradação após estudo de estabilidade acelerada.

### **6.3.2. Estudo de estabilidade sob condições de longa duração de comprimidos de glimepirida**

#### 6.3.2.1. Dureza

A Tabela 45 apresenta os resultados de ensaios dureza de comprimidos contendo 4 mg de glimepirida, realizados após comprimidos serem submetidos sob condições de degradação de longa duração por 3, 6, 9 e 12 meses, respectivamente. Os ensaios foram realizados de acordo com o preconizado na quinta edição da Farmacopeia Brasileira (2010).

## CAPÍTULO V – ESTUDOS DE ESTABILIDADE

**Tabela 45.** Valores de dureza de comprimidos contendo 4 mg de glimepirida, submetidos a condições de degradação de longa duração por 3, 6, 9 e 12 meses

Tempo	Dureza (kgf)			
	Amaryl <sup>®</sup> 4 mg	Produto A	Produto B	Produto C
0	5,5	4,5	5,0	6,5
	6,0	4,5	4,0	6,5
	6,0	4,0	4,5	6,0
	7,0	4,5	3,5	5,5
	7,5	4,5	3,5	5,5
	6,5	5,5	3,5	5,5
	7,0	5,5	3,5	6,0
	7,0	5,5	3,5	6,0
	6,5	4,5	4,0	6,0
	6,0	4,5	4,0	5,5
3 meses	4,5	4,0	3,0	6,0
	6,0	4,0	3,0	6,0
	6,0	4,5	3,0	7,5
	4,5	6,0	3,0	6,0
	5,5	4,0	3,0	7,5
	4,5	4,0	3,0	8,0
	6,0	4,0	2,5	6,0
	5,5	4,0	2,5	8,0
	5,5	4,5	3,5	7,5
	5,0	3,5	3,0	8,0
6 meses	4,5	3,5	3,5	6,5
	5,0	3,0	2,5	8,5
	4,5	3,0	2,5	7,0
	4,5	3,0	2,5	8,5
	4,0	3,5	2,5	6,0
	4,5	3,5	2,5	7,0
	5,0	4,0	3,0	6,0
	4,5	3,5	3,0	6,0
	4,0	4,0	2,5	7,0
	5,0	3,5	3,5	6,0
9 meses	4,5	3,5	3,0	7,5
	4,0	3,5	2,5	8,0
	4,0	3,5	3,5	7,0
	4,5	3,5	3,0	7,0
	4,5	4,0	3,0	8,0
	4,0	4,0	2,5	7,0
4,0	3,5	3,0	6,5	

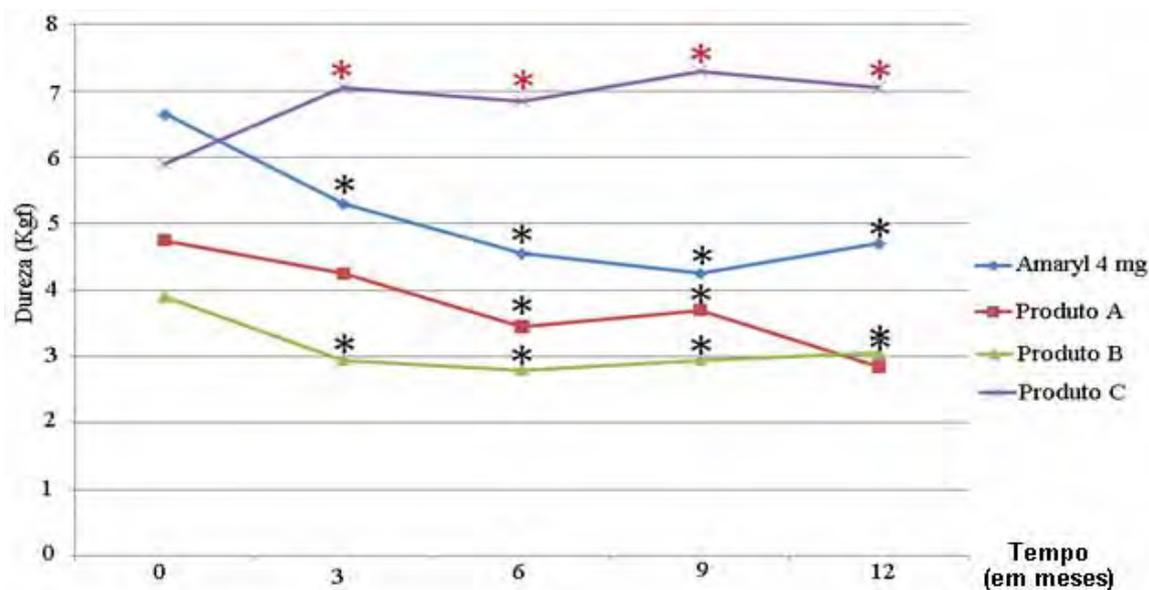
Continua na próxima página

**Tabela 45 (continuação).** Valores de dureza de comprimidos contendo 4 mg de glimepirida, submetidos a condições de degradação de longa duração por 3, 6, 9 e 12 meses

9 meses	4,5	3,5	3,0	7,5
	4,0	4,5	3,0	8,0
	4,5	3,5	3,0	6,5
12 meses	5,0	2,5	3,0	6,5
	4,5	3,5	3,5	6,5
	5,0	3,0	3,0	7,0
	5,0	2,5	3,0	7,0
	4,5	3,0	3,0	7,0
	4,5	3,0	3,0	7,0
	4,5	2,5	2,5	7,0
	5,0	2,5	3,5	7,5
	4,5	2,5	3,5	7,5
	4,5	3,5	2,5	7,5

A partir dos dados demonstrados na Tabela 45 pode-se concluir que após 3, 6, 9 e 12 meses de estudos de estabilidade de longa duração os produtos A e B apresentaram unidades abaixo do limite de dureza estabelecido (mínimo de 3 kgf) (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Os resultados de dureza obtidos no estudo de estabilidade de longa duração foram plotados em gráfico, correlacionando-se a média das durezas de cada produto obtidas nos tempos 0, 3, 6, 9 e 12 meses (Figura 22).



**Figura 22.** Média dos valores obtidos nos ensaios de dureza de Amaryl<sup>®</sup> 4 mg, produto A, produto B e produto C, obtidas nos tempos 0, 3, 6, 9 e 12 meses do estudo de estabilidade de longa duração. Valores que apresentam média estatisticamente maior do que valores obtidos no tempo zero, ao nível de significância de 5% (utilizando-se ANOVA), foram marcados com asteriscos vermelhos. Valores que apresentam média estatisticamente menor do que valores obtidos no tempo zero, ao nível de significância de 5% (utilizando-se ANOVA), foram marcados com asteriscos pretos.

A partir dos resultados demonstrados na Figura 22 pode-se inferir que, com exceção do produto C, todos os produtos sofreram diminuição na média da dureza dos comprimidos, quando submetidos por 12 meses sob condições de estudo de estabilidade de longa duração.

#### 6.3.2.2. Dissolução

A Tabela 46 apresenta os resultados de ensaios de dissolução de comprimidos contendo 4 mg de glibenclâmida, realizados após comprimidos serem submetidos sob condições de degradação de longa duração por 3, 6, 9 e 12 meses, respectivamente.

## CAPÍTULO V – ESTUDOS DE ESTABILIDADE

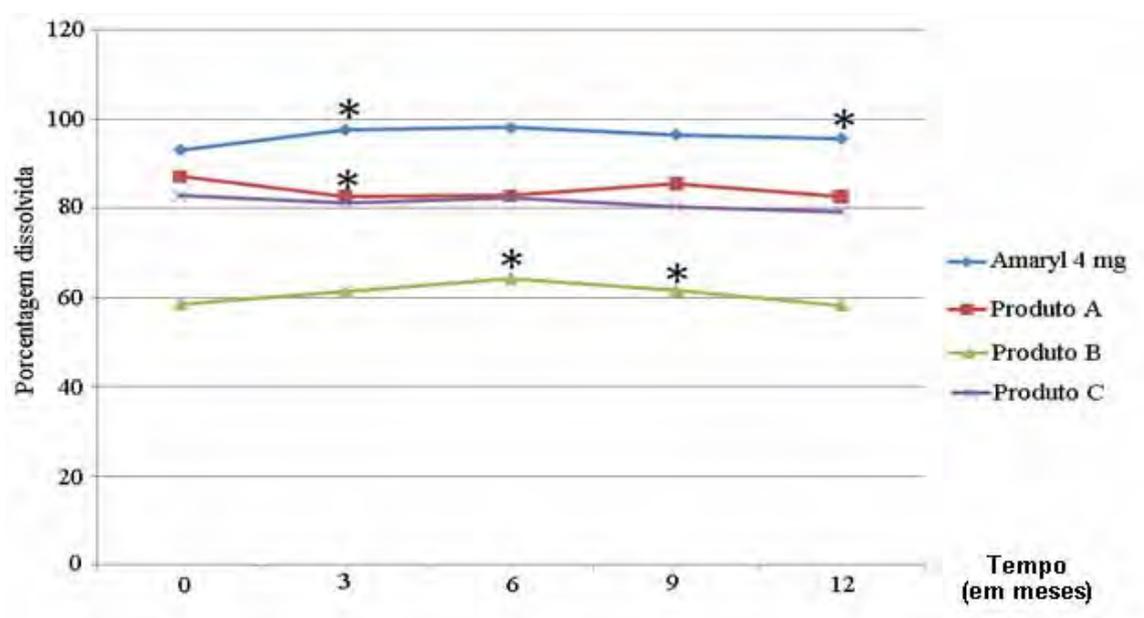
**Tabela 46.** Percentual de dissolução de comprimidos contendo 4 mg de glimepirida, submetidos a condições de degradação de longa duração por 3, 6, 9 e 12 meses

Tempo	Dissolução (%)			
	Amaryl <sup>®</sup> 4 mg	Produto A	Produto B	Produto C
0	92,69	85,51	59,94	85,59
	91,96	85,90	55,50	86,08
	92,58	89,74	60,96	80,17
	92,62	90,47	57,58	80,37
	92,52	86,60	59,58	76,58
	96,33	84,84	57,53	88,22
3 meses	97,48	85,77	58,37	77,79
	104,41	84,19	61,32	80,95
	98,39	81,91	65,07	82,00
	97,00	82,62	61,26	81,60
	95,12	85,92	62,84	85,25
	93,84	76,04	58,63	80,43
6 meses	96,83	85,48	64,59	84,26
	87,62	89,17	62,48	85,13
	98,97	89,86	63,51	79,19
	103,33	71,20	63,70	85,56
	100,89	82,66	65,27	81,66
	101,23	78,88	66,42	79,32
9 meses	105,53	85,1	60,49	78,15
	91,54	84,2	61,05	85,39
	88,48	84,01	61,06	77,40
	93,71	87,51	61,47	77,54
	97,86	88,18	63,24	82,16
	102,51	84,46	61,89	82,15
12 meses	98,72	75,55	64,50	77,97
	96,78	87,33	58,85	79,11
	95,66	94,53	57,56	81,27
	94,58	81,18	57,86	73,47
	92,90	80,26	54,03	79,63
	95,80	77,03	56,74	84,67

A partir dos dados demonstrados na Tabela 46 pode-se concluir que apenas o produto referência (Amaryl<sup>®</sup> 4 mg) apresentou todas as amostras de comprimidos com teor de dissolução acima do valor estabelecido (Q = 80%). Segundo a Farmacopeia Brasileira (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010), para que um lote seja considerado aprovado no

primeiro critério de aceitação para o ensaio de dissolução, todas as unidades individuais testadas devem apresentar um valor de dissolução acima de  $Q + 5\%$ .

Os resultados de dissolução obtidos no estudo de estabilidade acelerada foram plotados em gráfico, correlacionando-se a média das dissoluções de cada produto obtidas nos tempos 0, 3, 6, 9 e 12 meses (Figura 23).



**Figura 23.** Média dos percentuais de dissolução de Amaryl<sup>®</sup> 4 mg, produto A, produto B e produto C, obtidas nos tempos 0, 3, 6, 9 e 12 meses do estudo de estabilidade de longa duração. Valores médios que diferem estatisticamente dos valores obtidos no tempo zero, ao nível de significância de 5% (utilizando-se ANOVA), foram marcados com asteriscos.

A partir dos resultados demonstrados na Figura 23 pode-se inferir que os produtos Amaryl<sup>®</sup> 4 mg e produto B sofreram aumento na média da dissolução dos comprimidos, quando submetidos a condições de estudo de estabilidade de longa duração. Enquanto o

produto A sofreu diminuição na dissolução após 3 meses, o produto C não apresentou diferenças estatisticamente significativas no ensaio de dissolução.

### 6.3.2.3. Teor

A Tabela 47 apresenta os resultados de ensaios de teor de comprimidos contendo 4 mg de glimepirida, realizados após comprimidos serem submetidos sob condições de degradação de longa duração por 3, 6, 9 e 12 meses, respectivamente.

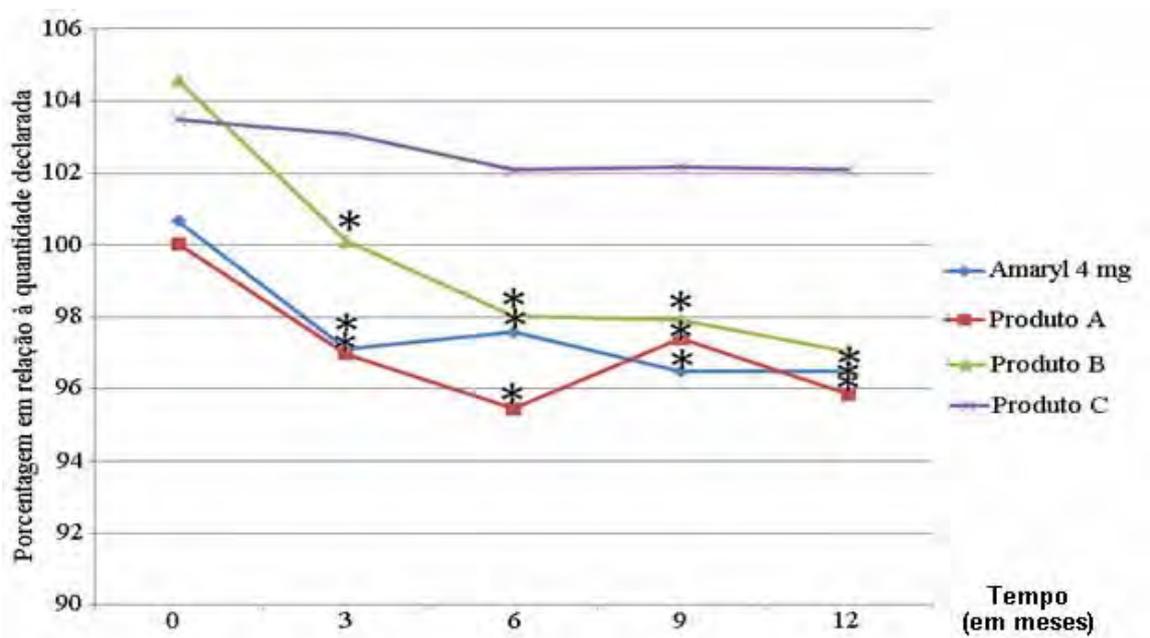
**Tabela 47.** Teor de comprimidos contendo 4 mg de glimepirida, submetidos a condições de degradação de longa duração por 3, 6, 9 e 12 meses

Tempo		Amaryl <sup>®</sup> 4 mg	Produto A	Produto B	Produto C
0	Glimepirida (mg)	4,03	4,00	4,18	4,14
	Glimepirida (%)	100,66	100,03	104,60	103,49
	D.P.R. (%)	1,68 (n = 5)	1,59 (n = 5)	1,92 (n = 5)	1,58 (n = 5)
3 meses	Glimepirida (mg)	3,88	3,88	4,00	4,12
	Glimepirida (%)	97,10	96,98	100,10	103,07
	D.P.R. (%)	1,04 (n = 5)	0,99 (n = 5)	1,16 (n = 5)	1,76 (n = 5)
6 meses	Glimepirida (mg)	3,90	3,82	3,92	4,08
	Glimepirida (%)	99,79	95,45	98,02	102,08
	D.P.R. (%)	1,79 (n = 5)	0,80 (n = 5)	2,69 (n = 5)	1,27 (n = 5)
9 meses	Glimepirida (mg)	3,86	3,90	3,92	4,09
	Glimepirida (%)	96,49	97,40	97,90	102,16
	D.P.R. (%)	2,14 (n = 5)	0,94 (n = 5)	2,67 (n = 5)	1,55 (n = 5)
12 meses	Glimepirida (mg)	3,86	3,83	3,88	4,08
	Glimepirida (%)	96,48	95,85	97,05	102,08
	D.P.R. (%)	1,91 (n = 5)	2,00 (n = 5)	2,11 (n = 5)	1,09 (n = 5)

D.P.R. (%) = desvio padrão relativo.

A partir dos dados demonstrados na Tabela 47, pode-se concluir que todos os produtos testados apresentaram valores percentuais de teor dentro dos limites de 90,0% a 110,0%, estabelecido pela Farmacopeia Americana (USP, 2011).

Os resultados de teor obtidos no estudo de estabilidade de longa duração foram plotados em gráfico, correlacionando-se a média dos teores de cada produto obtidas nos tempos 0, 3, 6, 9 e 12 meses (Figura 24).



**Figura 24.** Média dos teores de Amaryl<sup>®</sup> 4 mg, produto A, produto B e produto C, obtidas nos tempos 0, 3, 6, 9 e 12 meses do estudo de estabilidade de longa duração. Valores médios que diferem estatisticamente dos valores obtidos no tempo zero, ao nível de significância de 5% (utilizando-se ANOVA), foram marcados com asteriscos.

A partir dos resultados demonstrados na Figura 24 pode-se inferir que todos os produtos (com exceção do produto C) sofreram diminuição na média de teor de glimepirida presente nos comprimidos, quando submetidos a condições de estudo de estabilidade de longa duração.

#### 6.3.2.4. Produtos de degradação

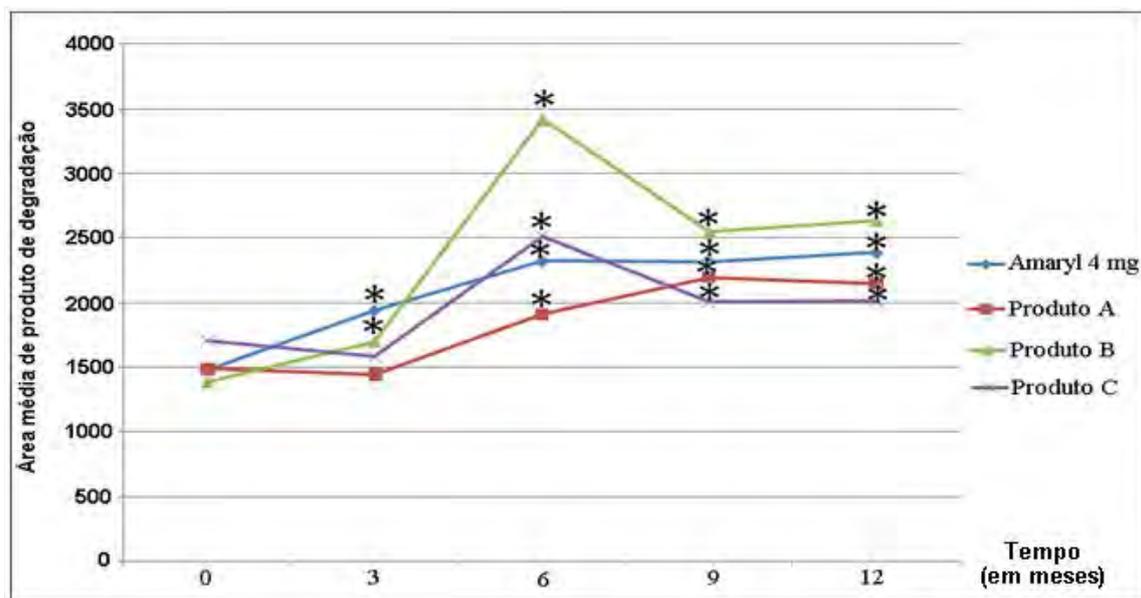
A análise dos produtos de degradação das amostras Amaryl<sup>®</sup> 4 mg, produto A, produto B e produto C sob condições de degradação de longa duração demonstrou que todos os produtos apresentaram uma banda cromatográfica em torno de 4 minutos, que foi atribuída a um produto de degradação da glimepirida. A área referente ao produto de degradação da glimepirida foi medida utilizando o *software* do cromatógrafo. Os resultados de produtos de degradação estão demonstrados na Tabela 48.

**Tabela 48.** Área média de produto de degradação de comprimidos contendo 4 mg de glimepirida sob condições de degradação de longa duração após 3, 6, 9 e 12 meses

Tempo		Amaryl <sup>®</sup> 4 mg	Produto A	Produto B	Produto C
0	Área média de produto de degradação	1480,47	1489,80	1384,00	1708,25
	D.P.R. (%) (n = 5)	8,57	10,95	1,66	8,04
3 meses	Área média de produto de degradação	1939,50	1446,20	1700,00	1581,80
	D.P.R. (%) (n = 5)	7,43	6,96	7,99	6,07
6 meses	Área média de produto de degradação	2323,50	1910,67	3420,00	2515,20
	D.P.R. (%) (n = 5)	12,98	7,46	8,30	5,46
9 meses	Área média de produto de degradação	2318,33	2198,00	2546,60	2004,20
	D.P.R. (%) (n = 5)	8,89	2,96	1,97	8,68
12 meses	Área média de produto de degradação	2387,20	2147,75	2631,75	2016,40
	D.P.R. (%) (n = 5)	9,48	8,78	19,80	6,52

D.P.R. (%) = desvio padrão relativo.

Os resultados de produtos de degradação obtidos no estudo de estabilidade de longa duração foram plotados em um gráfico, correlacionando-se a média das áreas de cada produto obtidas nos tempos 0, 3, 6, 9 e 12 meses (Figura 25).



**Figura 25.** Média das áreas de produto de degradação de Amaryl<sup>®</sup> 4 mg, produto A, produto B e produto C, obtidas nos tempos 0, 3, 6, 9 e 12 meses do estudo de estabilidade de longa duração. Valores médios que diferem estatisticamente dos valores obtidos no tempo zero, ao nível de significância de 5% (utilizando-se ANOVA), foram marcados com asteriscos.

A partir dos resultados demonstrados na Figura 25 pode-se concluir que todos as amostras apresentaram aumentos estatisticamente significativos nos percentuais de produto de degradação após estudo de estabilidade de longa duração.

### 6.3.2. Discussão

Os estudos de estabilidade de medicamentos são de extrema relevância do ponto de vista legal, econômico e quando se considera o possível impacto de uma instabilidade físico-química na saúde dos pacientes.

Do ponto de vista legal, a RE nº 01, de 29 de julho de 2005 exige a demonstração de informações sobre dureza e dissolução. Além disso, a resolução determina que as formas farmacêuticas sólidas cumpram com os testes de teor de substância ativa e quantificação de produtos de degradação (BRASIL, 2005).

Neste trabalho, os estudos de estabilidade realizados demonstraram diminuição estatística na dureza dos comprimidos (com exceção do produto C). Este fenômeno foi atribuído à alta umidade relativa exigida nas câmaras climáticas ( $75\% \pm 5\%$ ). Várias pesquisas têm mostrado resultados semelhantes, em que a umidade tem reduzido a resistência dos comprimidos ao esmagamento (AMIDON, MIDDLETON, 1988; de LIMA et al., 2005; da NÓBREGA et al., 2006; CORVELEYN, REMON, 1999; BOWEN et al., 2007). A elevada umidade pode ter permeado o blíster e, conseqüentemente, diminuído a agregação das partículas presentes nos comprimidos. Além disso, pode-se observar que o produto B apresentou unidades abaixo dos limites de dureza estabelecidos de 3 kgf (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010), quando submetido sob condições de degradação acelerada ou de longa duração, o que nos leva a considerar a importância da avaliação da dureza em estudos físico-químicos de estabilidade.

Com relação à dissolução, foi observada uma tendência no aumento da dissolução para alguns produtos (Amaryl<sup>®</sup> 4 mg e produto B). Estes aumentos de dissolução foram atribuídos à diminuição da dureza dos comprimidos, pois sabe-se que a dureza está inversamente relacionada com a desintegração e conseqüentemente com a dissolução de sólidos. Uma observação interessante é que apenas o produto referência (Amaryl<sup>®</sup> 4 mg) apresentou todas as amostras de comprimidos com teor de dissolução acima do valor estabelecido ( $Q = 80\%$ ). Ou seja, desde o tempo 0, os produtos similares não cumpriram

com as especificações estabelecidas neste trabalho, as quais foram definidas a partir estudos realizados com o produto referência (CAPÍTULO V) e embasadas na legislação vigente (BRASIL, 2010).

Os produtos analisados apresentaram uma tendência de diminuição de teor de glimepirida estatisticamente significativa (com exceção do produto C, no estudo de estabilidade de longa duração). Este efeito é esperado, pois como discutido na parte introdutória desta tese e, posteriormente demonstrado nos estudos de degradação forçada, a glimepirida é instável devido à presença de grupamentos funcionais lábeis. Entretanto, tanto o produto referência quanto os três similares testados mantiveram-se dentro dos limites de variação estabelecidos ( $\pm 10\%$ ).

Finalmente, a análise de produtos de degradação mostrou um aumento estatisticamente significativo na área de uma banda cromatográfica em torno de 4 minutos, que foi atribuída a um produto de degradação da glimepirida ainda não identificado. Este efeito também é esperado, devido à diminuição nos teores de glimepirida em consequência de sua instabilidade química.

A partir desses estudos de estabilidade foi concluído que a qualidade físico-química dos produtos analisados é suscetível à influência de temperatura e umidade. Entretanto, o produto Amaryl<sup>®</sup> 4 mg foi o único produto testado que, mesmo sofrendo tais influências, foi aprovado em todos os ensaios realizados. Além disso, o produto C, apesar de apresentar baixos teores de dissolução desde o tempo 0, foi o que pareceu sofrer menos influência das condições aplicadas neste estudo. Tal fenômeno pode ser atribuído ao tipo de blíster utilizado na embalagem primária ou a propriedades farmacotécnicas deste produto, que podem ter influenciado a estabilidade dos produtos.

Não foi possível identificar o material de que são constituídos os blisters do produto referência e dos três similares analisados neste estudo, pois não há informações disponíveis nos produtos. Mas sabe-se que historicamente os fabricantes farmacêuticos utilizam um filme rígido de PVC 10 mil com uma estrutura laminada para formar blisters. Entretanto, nos casos de produtos em que a umidade é um aspecto importante, estas embalagens não podem oferecer a proteção necessária (RODRIGUES, FERRAZ, 2007). Portanto, sugere-se que comprimidos de glimepirida devam ser acondicionados em materiais com função barreira eficientes como laminados combinados cloreto de polivinila (PVC)/cloreto de polivinilideno (PVDC), PVC/copolímeros de olefinas cíclicas (COC)/PVC ou laminados alumínio/alumínio. Entretanto, esta hipótese deverá ser confirmada experimentalmente e a avaliação de influência do tipo de blister na estabilidade de comprimidos de glimepirida trata-se de um bom objeto de estudo.

Com relação a propriedades farmacotécnicas, todos os produtos analisados possuem lactose monoidratada e celulose microcristalina, que são insumos higroscópicos (TOLLER, SCHMIDT, 2005). As diferenças de quantidades destes excipientes em cada produto analisado pode ter influenciado a estabilidade destes produtos. Entretanto, não foi possível tentar correlacionar a quantidade de lactose monoidratada e celulose microcristalina com a estabilidade dos produtos, pois as concentrações destes insumos não são fornecidas pelos fabricantes. Porém, a avaliação de influência das proporções dos excipientes na estabilidade de comprimidos de glimepirida trata-se também de um bom objeto de estudo.

Os estudos de estabilidade realizados nesta tese objetivaram verificar a conformidade da qualidade de produtos comercializados no mercado nacional em relação às diretrizes estabelecidas (BRASIL, 2005). Para calcular o modelo cinético e o prazo de validade

teórico, uma porcentagem de pelo menos 50% de degradação é desejável, sob diferentes condições de temperaturas. Neste trabalho, as amostras não foram expostas a tais condições porque foram obedecidas as condições preconizadas pela ANVISA, não sendo possível, portanto, calcular a ordem de reação e prazo de validade teórico, segundo os métodos descritos na seção introdutória deste capítulo.

## 7. EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA

### 7.1. Introdução

Com a entrada de medicamentos genéricos e similares no mercado brasileiro, levantou-se um questionamento sobre a qualidade desses produtos e, após uma longa tramitação, a RDC nº 9.787 foi aprovada pelo Congresso Nacional em 1999 (BRASIL, 1999a). Esta resolução definiu o medicamento genérico como medicamento similar a um produto de referência no qual foram comprovadas a segurança, eficácia e qualidade por meio de diversos ensaios químicos e farmacológicos e, especialmente, a bioequivalência ao medicamento de referência (LINSBINSKI, 2008). Seis meses depois, foi formalizada a regulamentação técnica para registro dos medicamentos genéricos (BRASIL, 1999b). Em pouco tempo, os genéricos conquistaram espaço considerável no mercado farmacêutico brasileiro. A contínua adequação da legislação, o respaldo da mídia e o envolvimento do governo em sua divulgação possibilitaram o sucesso obtido (DIAS, ROMANO-LIEBER, 2006).

Em contraste aos genéricos, os similares eram considerados inicialmente como aqueles que continham as mesmas substâncias ativas e que possuíam indicação e posologias semelhantes a medicamentos anteriormente registrados para uso no país. Em nenhum momento, era exigida a comprovação de testes referentes à dissolução, biodisponibilidade ou bioequivalência (BERMUDEZ, 1994). Entretanto, a partir de 2003, os similares passaram a se assemelhar aos genéricos, mediante exigência de apresentação dos mesmos testes, no momento de renovação do registro. A renovação deve ser feita a cada cinco anos,

no aniversário do registro do produto (BRASIL, 2003b; RUMEL, NISHIOKA, SANTOS, 2006). Entretanto, estima-se que até 2014 todos os medicamentos similares comercializados no Brasil possuam estudos de equivalência farmacêutica e biodisponibilidade relativa, pois os mesmos terão até a segunda renovação do registro (dez anos) para apresentar os estudos (CAPUCHO, MASTROIANNI, CUFFINI, 2008).

Tendo em vista o atual cenário, a comprovação de intercambialidade entre medicamentos genéricos e similares em relação ao medicamento referência é fundamental para que o sistema de saúde conte com medicamentos que assegurem eficácia, segurança e qualidade. Dentro dessa perspectiva, é conveniente ressaltar que a intercambialidade com o medicamento de referência é assegurada por testes de equivalência farmacêutica e bioequivalência realizados por laboratórios credenciados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e sua qualidade pelo monitoramento das unidades produtivas quanto ao atendimento das Boas Práticas de Fabricação (QUENTAL et al., 2008).

Os ensaios de equivalência farmacêutica são, portanto, imprescindíveis. A equivalência farmacêutica entre dois medicamentos relaciona-se à comprovação de que ambos contêm o mesmo fármaco na mesma dosagem e forma farmacêutica, o que pode ser avaliado por meio de testes *in vitro* (SHARGEL, YU, 1999; WHO, 1999). Portanto, pode ser considerada como um indicativo da bioequivalência entre os medicamentos em estudo, sem, contudo, garanti-la (STORPIRTIS, 2004).

A resolução que atualmente dispõe sobre os requisitos para a realização dos Estudos de Equivalência Farmacêutica e de Perfil de Dissolução Comparativo é a RDC nº 31, de 11 de agosto de 2010 (BRASIL, 2010). Segundo a resolução, o estudo de equivalência

---

farmacêutica deve ser realizado por centro de equivalência farmacêutica devidamente habilitado pela Anvisa para esta finalidade, comparando, simultaneamente, medicamento teste e medicamento de referência e com lotes dentro do prazo de validade. A resolução estabelece ainda que os medicamentos-teste e de referência devem cumprir, em sua totalidade, com os requisitos da monografia individual da Farmacopeia Brasileira, preferencialmente, ou com os de outros compêndios oficiais, complementados com os ensaios descritos em métodos gerais desses compêndios. Na ausência de monografia descrita em compêndio oficial, normas ou regulamentos específicos aprovados/referendados pela Anvisa, deve-se utilizar método analítico validado pelo patrocinador do estudo ou centro de equivalência farmacêutica.

A RDC nº 31 especifica também que na ausência de método de dissolução descrito em compêndio oficial, normas ou regulamentos específicos aprovados/referendados pela Anvisa, é de responsabilidade do patrocinador do estudo o relatório de desenvolvimento e validação do método de dissolução que deve ser realizado conforme preconizado em guias nacionais e internacionais e conter dados que demonstrem que o método é discriminativo (BRASIL, 2010).

## **7.2. Parte experimental**

### **7.2.1. Material**

#### **7.2.1.1. Amostras**

Os produtos farmacêuticos utilizados foram comprimidos de Amaryl<sup>®</sup> 4 mg (validade: 03/2011) e três diferentes produtos similares contendo 4 mg de glimepirida, os quais foram codificados como produto A (validade: 03/2011), produto B (validade: 05/2011) e produto C (validade: 12/2011). Todas as amostras de cada produto farmacêutico pertencem ao mesmo lote.

#### 7.2.1.2. Equipamentos

- Aparelho de ultrassom Unique<sup>®</sup> modelo USC2800A (Indaiatuba, Brasil);
- Balança analítica Kern<sup>®</sup> modelo 410 (Kern, Alemanha);
- Coluna Waters Symmetry<sup>®</sup> C-18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) e pré-coluna Waters Symmetry<sup>®</sup> C-18 (20 mm x 3,9 mm, 5 µm) (Milford, EUA);
- Cromatógrafo a líquido Shimadzu<sup>®</sup> (Kyoto, Japão), série LC-10A, injetor manual 7725i com alça de amostragem de 20 µL (Rheodyne<sup>®</sup>, Califórnia, EUA), detector SPD-10AVP, válvula FCV-10ALVP, forno de coluna CTO-10AVP e controlador SCL-10Avp;
- Desintegrador Nova Ética<sup>®</sup> modelo 301-AC (São Paulo, Brasil);
- Dissolutor Electrolab<sup>®</sup> TDT-08 L, equipado com oito cubas de dissolução (São Paulo, Brasil);
- Durômetro Nova Ética<sup>®</sup> modelo 298 DGP (São Paulo, Brasil);
- Filtros de politetrafluoretileno (PTFE) hidrofílicos com 0,45 µm de poro (Millipore<sup>®</sup>, Bedford, EUA).
- Friabilômetro Nova Ética<sup>®</sup> modelo 300-1 (São Paulo, Brasil);

- Membranas de politetrafluoretileno (PTFE) hidrofílicas com 0,45 µm de poro e 47,0 mm de diâmetro (Millipore<sup>®</sup>, Bedford, EUA);
- Papel de filtro quantitativo isento de cinzas Vetec<sup>®</sup> (Rio de Janeiro, Brasil);
- Peagômetro Mettler<sup>®</sup> modelo Delta 345 (Barueri, Brasil);
- Sistema de filtração a vácuo Nova Técnica<sup>®</sup> (São Paulo, Brasil);
- Sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore<sup>®</sup>, Bedford, EUA).

### 7.2.1.3. Solventes e reagentes

- Acetato de sódio triidratado Synth<sup>®</sup> (Diadema, Brasil);
- Ácido acético glacial Vetec<sup>®</sup> (Rio de Janeiro, Brasil);
- Ácido cítrico Vetec<sup>®</sup> (Rio de Janeiro, Brasil);
- Ácido clorídrico Vetec<sup>®</sup> (Rio de Janeiro, Brasil);
- Água ultrapura – água Milli-Q;
- Fosfato de sódio dibásico anidro Vetec<sup>®</sup> (Rio de Janeiro, Brasil);
- Fosfato de sódio monobásico monoidratado Reagen<sup>®</sup> (Colombo, Brasil);
- Hidróxido de sódio PA DINÂMICA<sup>®</sup> (São Paulo, Brasil);
- Lauril sulfato de sódio Henrifarma<sup>®</sup> (São Paulo, Brasil);
- Metanol grau HPLC TEDIA Company<sup>®</sup> (Fairfield, EUA);

### 7.2.2. Condições de estudo

Os seguintes ensaios físico-químicos foram realizados:

Determinação de peso médio: Foram pesados individualmente 20 comprimidos de cada produto farmacêutico em balança analítica, sendo calculados os pesos médios, desvio padrão e coeficiente de variação, tolerando-se não mais que duas unidades fora dos limites especificados; porém, nenhuma amostra deve conter peso unitário acima ou abaixo do dobro das porcentagens indicadas. Para comprimidos contendo peso médio de 80 até 250 mg, a variação de peso permitida é  $\pm 7,5 \%$  em relação ao peso médio. (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Friabilidade: Vinte comprimidos de cada produto farmacêutico foram pesados e introduzidos em um friabilômetro. Após 100 rotações efetuadas durante 5 min (20 rpm), os comprimidos foram retirados do equipamento e todo resíduo ou poeira foram removidos e novamente pesados. A friabilidade foi calculada pela diferença entre o peso inicial e o peso final dos comprimidos. Consideraram-se aceitáveis os comprimidos com perda menor que 1,5% do seu peso. Os comprimidos lascados ou que se separaram em duas camadas não foram considerados para cálculo da porcentagem de friabilidade (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Tempo de desintegração: Seis comprimidos de cada marca foram colocados em tubos transparentes do equipamento contidos em uma cesta. Em seguida foram adicionados os discos de acrílico sobre os comprimidos. A cesta contendo os tubos com as respectivas amostras foi transferida para o suporte do aparelho. Em seguida, a cesta foi submetida a movimentos verticais em meio líquido (água) a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  até a completa desintegração

dos comprimidos. O limite de tempo estabelecido como critério geral de aceitação é de 30 minutos, a menos que outra especificação se encontre na monografia do medicamento (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

**Dureza:** Foram submetidas dez unidades ao teste, utilizando o durômetro, objetivando verificar a resistência dos mesmos a uma força aplicada diametralmente. Segundo a Farmacopeias Brasileira, o mínimo aceitável é 30 N (aproximadamente 3 kgf) (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

**Doseamento:** foi realizado utilizando o método cromatográfico desenvolvido no capítulo III. As condições estão apresentadas na seção 3.2.3.4. O limite de aceitação foi estabelecido com base no critério estabelecido na trigésima segunda edição da Farmacopeia Americana, 2011 ( $\pm 10\%$  em relação ao valor declarado).

**Uniformidade de conteúdo:** Dez comprimidos de cada produto farmacêutico foram esmagados e transferidos quantitativamente e individualmente para balões volumétricos de 50 mL. Adicionaram-se 40 mL de metanol e os balões foram levados ao ultrassom por 60 minutos. O volume de cada balão foi completado com metanol. Alíquotas de cada amostra, previamente filtradas em papel de filtro quantitativo, foram diluídas em fase móvel para a concentração final  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  e analisadas pela o método cromatográfico desenvolvido na seção 4.2.3.4, comparando-se os valores das respostas das amostras com as de glimepirida padrão de trabalho preparadas nas mesmas concentrações. O primeiro critério de aceitação estabelecido foi o seguinte: cada conteúdo individual deve estar entre 85,0% e 115,0% da quantidade declarada e o desvio padrão relativo entre as determinações deve ser inferior a 6,0% (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Testes de dissolução: Foi realizado nas seguintes condições: tampão fosfato de sódio pH 6,8 (50 mmol L<sup>-1</sup>) contendo 0,1% de lauril sulfato de sódio como meio de dissolução, pá como sistema de agitação, velocidade de 50 rpm, tempo de coleta de 60 minutos, tolerância (Q) de 80% e quantificação pelo método cromatográfico descrito na seção 3.2.3.4. O primeiro critério de aceitação, estabelecido com seis unidades, foi o seguinte: cada unidade deve apresentar resultados maiores ou iguais a Q + 5%. O segundo critério de aceitação, estabelecido com 12 unidades, foi o seguinte: a média das 12 unidades deve ser maior ou igual à Q e nenhuma unidade deve apresentar resultados inferiores a Q – 15%.

Perfis de dissolução: Foi realizado utilizando as condições descritas na seção 5.5, com exceção do número de comprimidos testados, que foram 12, para cada produto farmacêutico. Utilizando os resultados dos perfis de dissolução, a curva obtida com o produto referência foi comparada com as curvas obtidas com os produtos similares (produto A, produto B e produto C), através do método modelo independente simples, que utiliza o cálculo do fator de diferença (f1) e do fator de semelhança (f2), que foram obtidos a partir das equações 9 e 10, descritas a seguir:

$$F1 = \{[\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|]\} / \{[\sum_{t=1}^n R_t]\} \times 100 \quad (9)$$

$$F2 = 50 \times \log \{[(1 + 1/n) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2]^{-0.5} \times 100\} \quad (10)$$

em que:  $Rt$  é a porcentagem do fármaco referência dissolvido em cada ponto,  $Tt$  é a porcentagem de produto similar dissolvido em cada ponto e  $n$  é o número de pontos de amostragem.

Para duas curvas serem consideradas similares, o valor de  $f_1$  deve ser próximo de 0 e o valor de  $f_2$  deve ser próximo de 100. Geralmente, valores de  $f_1$  de 0 a 15 e valores de  $f_2$  de 50 a 100 asseguram equivalência entre duas curvas (BRASIL, 2010).

Adicionalmente, as curvas construídas com o produto referência e com os produtos similares foram utilizadas para cálculos de cinética de dissolução e de eficiência de dissolução (ED%). Para o estudo da cinética de dissolução, foram aplicados os modelos de ordem zero, plotando-se os valores da quantidade de fármaco não dissolvido em função do tempo, e de primeira ordem, através de gráficos do logaritmo neperiano (ln) da quantidade de fármaco não dissolvido em função do tempo. Na construção dos modelos, foram considerados apenas os pontos ascendentes do perfil de dissolução. Os parâmetros cinéticos da dissolução, como a constante de velocidade de dissolução ( $K$ ) e a meia-vida de dissolução ( $t_{50\%}$ ), foram determinados a partir das equações definidas pelo modelo matemático que apresentou o melhor e mais significativo índice de correlação.

A eficiência de dissolução (ED%) foi calculada a partir da razão entre a área sob a curva de dissolução (ASC) da glimepirida no intervalo de tempo compreendido entre zero e sessenta minutos e a área total do retângulo (ATR) definido pela ordenada (100% de dissolução) e pela abscissa (tempo igual a sessenta minutos).

### 7.3. Resultados e discussão

#### 7.3.1. Determinação de peso médio

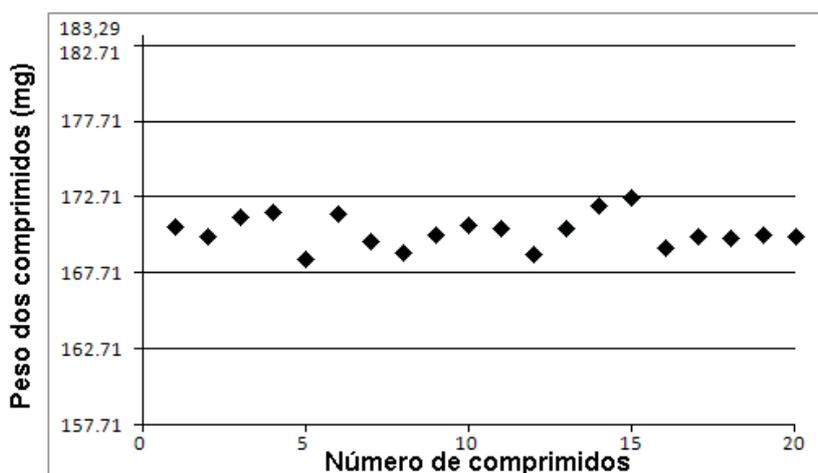
A Tabela 49 relaciona os pesos individuais de vinte comprimidos de cada produto analisado, com seus respectivos pesos médios, desvio padrão e coeficiente de variação.

**Tabela 49.** Peso individual dos comprimidos contendo 4 mg de glimepirida, peso médio e respectivos coeficientes de variação

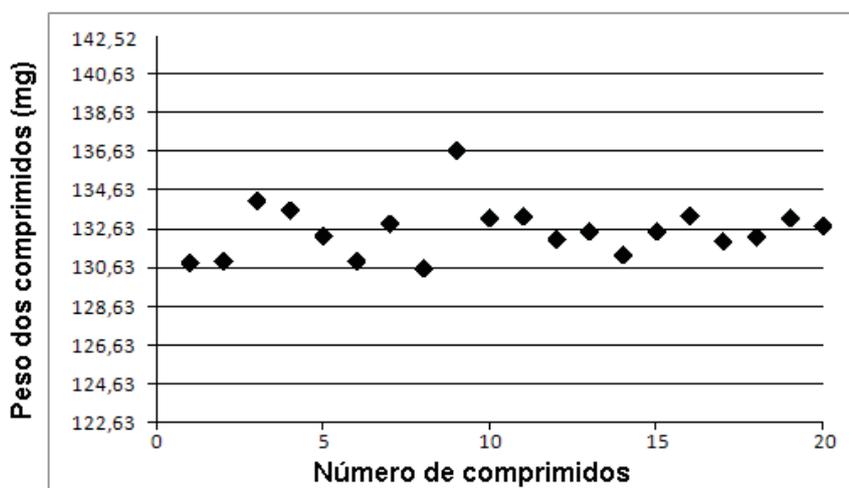
Comprimido	Peso individual Amaryl <sup>®</sup> 4 mg (mg)	Peso individual Produto A (mg)	Peso individual Produto B (mg)	Peso individual Produto C (mg)
1	170,8	130,9	79,4	152,5
2	170,2	131,0	80,3	148,9
3	171,4	134,1	79,5	153,8
4	171,8	133,6	79,2	151,9
5	168,7	132,3	80,0	151,6
6	171,6	131,0	79,5	147,2
7	169,8	132,9	81,0	148,5
8	169,1	130,6	80,3	147,4
9	170,3	136,7	80,1	153,6
10	170,9	133,2	79,6	153,1
11	170,7	133,3	81,1	150,1
12	169,0	132,1	80,8	151,0
13	170,7	132,5	81,0	152,0
14	172,2	131,3	81,0	152,1
15	172,7	132,5	81,1	152,6
16	169,4	133,3	81,2	149,3
17	170,2	132,0	80,8	155,0
18	170,0	132,2	81,8	154,7
19	170,3	133,2	81,7	152,8
20	170,2	132,8	79,4	150,9
Peso médio (mg)	170,5	132,58	80,51	151,45
Desvio padrão	1,06	1,39	0,78	2,27
CV (%)*	0,62	1,04	0,97	1,50

\*CV – Coeficiente de Variação.

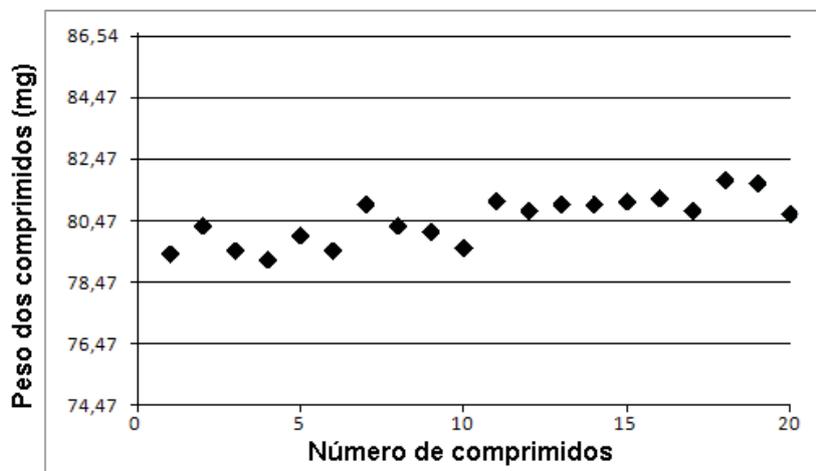
As Figuras 26, 27, 28 e 29 ilustram a variação de peso dos vinte comprimidos de Amaryl<sup>®</sup> 4 mg, produto A, produto B e produto C, respectivamente.



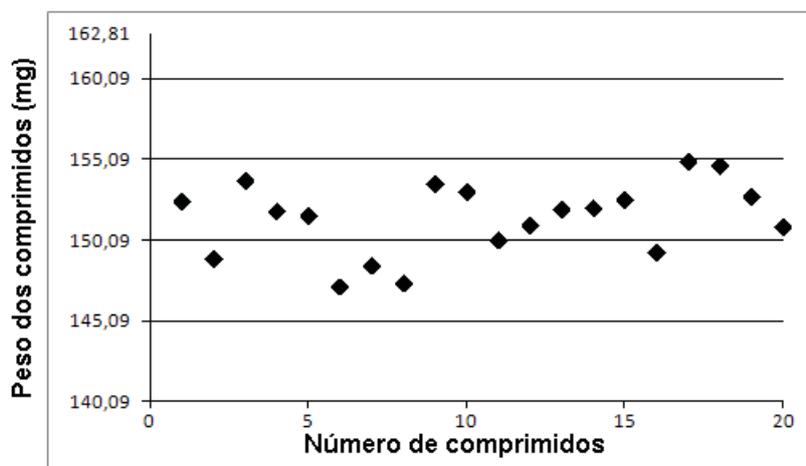
**Figura 26.** Variação de peso de vinte comprimidos de Amaryl<sup>®</sup> 4 mg, com eixo y representando limite de  $\pm 7,5\%$  em relação ao peso médio.



**Figura 27.** Variação de peso de vinte comprimidos de produto A, com eixo y representando limite de  $\pm 7,5\%$  em relação ao peso médio.



**Figura 28.** Variação de peso de vinte comprimidos de produto B, com eixo y representando limite de  $\pm 7,5\%$  em relação ao peso médio.



**Figura 29.** Variação de peso de vinte comprimidos de produto C, com eixo y representando limite de  $\pm 7,5\%$  em relação ao peso médio.

As variações de peso dos comprimidos dos produtos analisados encontram-se dentro dos limites pré-estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira (FARMACOPEIA

BRASILEIRA, 2010), pois as Figuras 28, 29, 30 e 31 demonstram que todas as unidades testadas de todos os produtos encontram-se dentro do limite de  $\pm 7,5\%$  em relação ao peso médio. Além disso, o coeficiente de variação entre o peso dos comprimidos foi inferior a 2%, demonstrando a homogeneidade do peso dos comprimidos.

### 7.3.2. Friabilidade

Os resultados de friabilidade dos produtos analisados estão demonstrados na Tabela 50.

**Tabela 50.** Friabilidade de Amaryl<sup>®</sup> 4 mg, produto A, produto B e produto C

Produto	Peso antes do teste (g)	Peso após o teste (g)	Perda de peso (%)
Amaryl <sup>®</sup> 4 mg	3,4298	3,4295	0,009
Produto A	2,6404	2,6387	0,064
Produto B	1,6155	1,6150	0,031
Produto C	3,0307	3,0286	0,069

De acordo com a observação dos resultados demonstrados na Tabela 50, pode-se concluir que todas as amostras testadas no ensaio de friabilidade foram aprovadas, pois a perda de peso, em todos os casos, foi inferior ao limite de 1,5% estabelecido pela Farmacopeia Brasileira, 2010.

### 7.3.3. Tempo de desintegração

Os resultados de tempo de desintegração dos produtos analisados estão demonstrados na Tabela 51.

**Tabela 51.** Tempos de desintegração de Amaryl<sup>®</sup> 4 mg, produto A, produto B e produto C

Produto	Tempo de desintegração
Amaryl <sup>®</sup> 4 mg	75 segundos
Produto A	68 segundos
Produto B	42 segundos
Produto C	35 segundos

De acordo com a observação dos resultados demonstrados na Tabela 51, pode-se concluir que todas as amostras testadas no ensaio de desintegração foram aprovadas, pois o tempo necessário para desintegração completa dos comprimidos, em todos os casos, foi inferior ao limite de 30 minutos, estabelecido pela Farmacopeia Brasileira, 2010.

### 7.3.4. Dureza

Os resultados de dureza dos produtos analisados estão demonstrados na Tabela 52.

## CAPÍTULO VI – EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA

**Tabela 52.** Dureza de Amaryl<sup>®</sup> 4 mg, produto A, produto B e produto C

Dureza (kgf)			
Amaryl <sup>®</sup> 4 mg	Produto A	Produto B	Produto C
5,5	4,5	5,0	6,5
6,0	4,5	4,0	6,5
6,0	4,0	4,5	6,0
7,0	4,5	3,5	5,5
7,5	4,5	3,5	5,5
6,5	5,5	3,5	5,5
7,0	5,5	3,5	6,0
7,0	5,5	3,5	6,0
6,5	4,5	4,0	6,0
6,0	4,5	4,0	5,5

A partir dos dados demonstrados na Tabela 52, pode-se concluir que todas as unidades testadas encontram-se dentro do limite farmacopeico de dureza estabelecido para comprimidos (mínimo de 3 kgf) (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

**7.3.5. Doseamento**

Os resultados de doseamento dos produtos analisados estão demonstrados na Tabela 53.

**Tabela 53.** Teor de Amaryl<sup>®</sup> 4 mg, produto A, produto B e produto C

	Amaryl <sup>®</sup> 4mg	Produto A	Produto B	Produto C
Glimepirida (mg)	4,03	4,00	4,18	4,14
Glimepirida (%)	100,66	100,03	104,60	103,49
D.P.R. (%)	1,68 (n = 5)	1,59 (n = 5)	1,92 (n = 5)	1,58 (n = 5)

D.P.R. (%) = desvio padrão relativo.

A partir dos dados demonstrados na Tabela 53, pode-se concluir que todos os produtos testados apresentaram valores percentuais de teor dentro dos limites estabelecidos (90,0% a 110,0%).

### 7.3.6. Uniformidade de conteúdo

Os resultados de uniformidade de conteúdo dos produtos analisados estão demonstrados na Tabela 54.

**Tabela 54.** Uniformidade de conteúdo de Amaryl<sup>®</sup> 4 mg, produto A, produto B e produto C

Amostra	Teor (%)			
	Amaryl <sup>®</sup> 4 mg	Produto A	Produto B	Produto C
1	95,18	94,11	104,51	105,60
2	110,71	98,92	105,04	102,45
3	95,35	102,99	103,48	108,88
4	99,21	101,45	100,93	105,07
5	95,95	105,04	103,93	104,88
6	97,62	106,37	104,12	104,01
7	95,26	100,22	104,56	106,95
8	106,25	100,66	102,52	108,93
9	103,47	98,03	109,66	109,28
10	99,27	101,42	105,96	111,86
Média	99,83	100,92	104,47	106,79
D.P.R. (%)	5,34	3,48	2,19	2,71

D.P.R. (%) = Desvio Padrão Relativo.

A partir dos dados demonstrados na Tabela 54, pode-se concluir que todos os produtos testados apresentaram valores individuais de teor dentro dos limites estabelecidos de 85,0% a 115,0%. Além disso, as estimativas de desvios padrões relativos entre as unidades testadas foram inferiores a 6,0%, para todos os produtos testados.

### 7.3.7. Testes de dissolução

Os resultados dos ensaios de dissolução dos produtos analisados estão demonstrados na Tabela 55.

**Tabela 55.** Dissolução de Amaryl<sup>®</sup> 4 mg, produto A, produto B e produto C

Amostra	Dissolução (%)			
	Amaryl <sup>®</sup> 4 mg	Produto A	Produto B	Produto C
1	92,69	85,51	59,94	85,59
2	91,96	85,90	55,50	86,08
3	92,58	89,74	60,96	80,17
4	92,62	90,47	57,58	80,37
5	92,52	86,60	59,58	76,58
6	96,33	84,84	57,53	88,22
7	-	88,77	-	78,93
8	-	90,35	-	83,76
9	-	88,22	-	84,29
10	-	89,08	-	80,01
11	-	91,18	-	83,57
12	-	92,83	-	84,12
Média	93,12 (n=6)	88,62 (n=12)	58,52 (n=6)	82,64 (n=12)
D.P.R. (%)	1,72 (n=6)	2,80 (n=12)	3,42 (n=6)	4,12 (n=12)

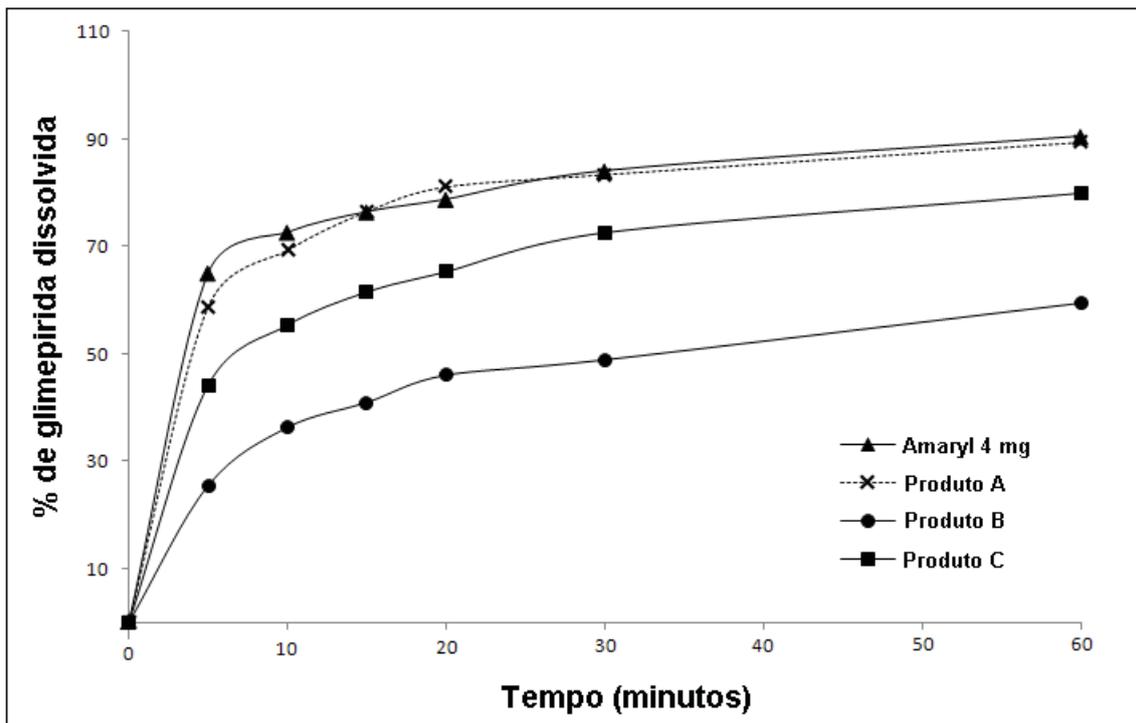
D.P.R. (%) = Desvio Padrão Relativo.

A observação da Tabela 55 nos permite concluir que o produto Amaryl<sup>®</sup> 4 mg foi aprovado no primeiro critério de aceitação estabelecido para o ensaio de dissolução, pois todas as unidades apresentaram resultados maiores ou iguais a  $Q + 5\%$  (85%), não sendo, portanto, necessário a realização de mais ensaios. O produto A, entretanto, não foi aprovado no primeiro critério de aceitação, pois apresentou uma unidade abaixo de 85%. Realizou-se um segundo ensaio com mais seis amostras e o produto foi aprovado no segundo critério de aceitação, pois a média das 12 unidades foi maior ou igual à  $Q$  e

nenhuma unidade apresentou resultados inferiores a  $Q - 15\%$ . O produto B foi reprovado no primeiro ensaio, pois apresentou todas as unidades com dissolução inferior a  $Q - 15\%$ , não sendo necessário, portanto, a realização de mais ensaios. O produto C apresentou três unidades abaixo de  $85\%$  no primeiro ensaio. Realizou-se um segundo ensaio com mais seis amostras e o produto foi aprovado no segundo critério de aceitação, pois a média das 12 unidades foi maior ou igual à  $Q$  e nenhuma unidade apresentou resultados inferiores a  $Q - 15\%$ .

#### **7.3.8. Perfis de dissolução**

Os perfis de dissolução obtidos com o produto referência (Amaryl<sup>®</sup> 4 mg) e com os produtos similares (produto A, produto B e produto C) estão demonstrados na Figura 30.



**Figura 30.** Perfis de dissolução de Amaryl<sup>®</sup> 4 mg, produto A, produto B e produto C, sob condições otimizadas.

Os resultados obtidos com os produtos analisados foram utilizados para comparação de perfis de dissolução entre o produto referência e os produtos similares, empregando o método modelo independente simples. Os valores de  $f_1$  e  $f_2$  estão demonstrados na Tabela 56.

**Tabela 56.** Fatores de diferença ( $f_1$ ) e fatores de semelhança ( $f_2$ ) obtidos na comparação entre perfis de dissolução de Amaryl<sup>®</sup> 4 mg e produtos similares (produto A, produto B e produto C)

Produtos	Fator de diferença ( $f_1$ )	Fator de semelhança ( $f_2$ )
Referência x produto A*	1,86	54,57
Referência x produto B	45,04	1,55
Referência x produto C	18,98	19,79

\* Quando dois perfis são considerados similares.

A análise da Tabela 56 permite concluir que somente o produto A apresentou semelhança de perfil com o produto referência através do cálculo que emprega o método modelo independente simples.

Posteriormente, foi realizado o estudo da cinética do processo de dissolução, empregando-se os modelos de ordem zero e primeira ordem. Através da linearização das curvas de dissolução, foram obtidos os respectivos coeficientes de correlação ( $r$ ). Os resultados estão apresentados na Tabela 57. Nestes cálculos, foram utilizados os valores de dissolução até o tempo de 15 minutos.

**Tabela 57.** Parâmetros estatísticos dos estudos de regressão aplicando modelo de ordem zero e primeira ordem, derivados dos perfis de dissolução dos produtos Amaryl<sup>®</sup> 4 mg, produto A, produto B e produto C após o ensaio de dissolução sob condições otimizadas

Produto	Ordem Zero (r)	Primeira Ordem (r)
Amaryl <sup>®</sup> 4 mg	0,8497	0,9064
Produto A	0,8887	0,9518
Produto B	0,8172	0,8925
Produto C	0,9094	0,9502

A observação da Tabela 57 nos permite concluir que o modelo considerado mais adequado, ou seja, o que apresentou melhor correlação foi o de primeira ordem para todos os produtos.

Com a finalidade de se observar possíveis diferenças nos parâmetros de dissolução entre o produto referência e os produtos similares, foram determinados os parâmetros constante de velocidade de dissolução (k) e meia-vida de dissolução ( $t_{50\%}$ ). Nestes cálculos, foram utilizados os valores de dissolução até o tempo de 15 minutos. Calculou-se também a eficiência de dissolução (ED%), a partir do modelo de primeira ordem. Os resultados estão demonstrados na Tabela 58.

**Tabela 58.** Valores da constante de velocidade de dissolução ( $k$ ), meia-vida de dissolução ( $t_{50\%}$ ) e eficiência de dissolução (ED%) para Amaryl<sup>®</sup> 4 mg, produto A, produto B e produto C

Produto	$t_{50\%}$ (min)	$k$ ( $\text{min}^{-1}$ )	(ED%)
Amaryl <sup>®</sup> 4 mg	4,74	0,092	78,3
Produto A	5,51	0,093	77,4
Produto B	35,89	0,013	45,4
Produto C	9,28	0,062	65,7

Os resultados demonstrados na Tabela 58 indicaram que o produto A apresentou os parâmetros de dissolução mais próximos do produto referência. Estes resultados estão de acordo com a comparação que utilizou o método modelo independente simples, confirmando assim a equivalência entre esses dois produtos. Os similares B e C apresentaram parâmetros de dissolução diferenciados em relação ao produto referência, o que também já tinha sido observado quando se comparou as curvas utilizando os fatores  $f_1$  e  $f_2$ .

#### 7.4. Discussão

A evolução dos aspectos relacionados à regulamentação brasileira na área de medicamentos é evidente. A implantação de genéricos nas duas últimas décadas tem contribuído para o aprimoramento da fabricação e garantia de qualidade dos medicamentos. Os conceitos equivalência farmacêutica, biodisponibilidade e bioequivalência são recentes e sua introdução no Brasil devem-se, sobretudo, à introdução dos genéricos (STORPIRTIS, 2004).

O aumento com o rigor em relação aos genéricos também beneficiou a qualidade dos medicamentos similares, que a partir de 2003 passaram a se assemelhar aos genéricos, mediante exigência de apresentação dos mesmos testes, no momento de renovação do registro (BRASIL, 2003b; RUMEL, NISHIOKA, dos SANTOS, 2006). Até então, os medicamentos similares eram cópias do medicamento de referência e se fazia necessária a comprovação da qualidade apenas por meio da apresentação dos certificados das boas práticas de fabricação e da inspeção para autorização de funcionamento da empresa. Entretanto, um fator interessante a se considerar, é que até 2014 os medicamentos similares poderão ser comercializados sem estudos de equivalência farmacêutica e biodisponibilidade relativa, pois os mesmos terão até a segunda renovação do registro (dez anos) para apresentar os estudos (MASTROIANNI, LUCCHETTA, 2011).

A pesquisa relacionada à qualidade de similares comercializados no mercado nacional é, portanto, imprescindível, pois um desvio de qualidade desses produtos pode causar sérios comprometimentos à saúde do paciente. Dentro deste contexto, os ensaios de equivalência farmacêutica são fundamentais para assegurar a qualidade e eficácia desses medicamentos.

Neste trabalho, foram realizados estudos de equivalência farmacêutica de 3 produtos classificados como similares, frente ao medicamento referência Amaryl<sup>®</sup> 4 mg. Foram analisados parâmetros físicos e físico-químicos, preconizados pela quinta edição da Farmacopeia Brasileira, 2010. O método usado na quantificação, bem como o método aplicado ao ensaio de dissolução foram adequadamente otimizados e validados, conforme descrito em capítulos anteriores.

Com relação aos ensaios de peso médio, friabilidade, tempo de desintegração, dureza, doseamento e uniformidade de conteúdo, todas as amostras testadas foram aprovadas. Entretanto, no teste de dissolução, o produto B apresentou baixo teor de dissolução sendo reprovado, não apresentando, portanto, equivalência farmacêutica

Os resultados obtidos no teste de perfil de dissolução também mostram problemas com os medicamentos similares, pois os produtos B e C não apresentaram semelhança de perfis através da comparação das curvas empregando o modelo independente simples. Os ensaios de perfis de dissolução servem de parâmetro importante para o desenvolvimento da forma farmacêutica, pois demonstram claramente que a diferença de quantidade de fármaco liberado em meio aquoso poderá comprometer o resultado do teste de bioequivalência em um primeiro momento, bem como o tratamento do paciente.

Conclui-se a partir deste capítulo de tese que a glimepirida na forma de comprimidos e dosagem de 4 mg possui produtos similares comercializados no mercado nacional que não apresentam equivalência farmacêutica com o referência correspondente, nas condições aqui descritas. Portanto, estes similares não são adequados ao uso clínico. Esses resultados também foram observados em outros trabalhos semelhantes (FERNANDES, CAMPOS, PIANETTI, 2003; LINDBINSKI, MUSIS, MACHADO, 2008). Isto evidencia uma necessidade de maior atenção e participação ativa dos profissionais de saúde e espera-se que as autoridades responsáveis, que são cada vez mais atuantes, possam em um futuro próximo diminuir ou erradicar tais problemas

## 8. POLIMORFISMO

### 8.1. Introdução

Antes de abordar o polimorfismo de sólidos farmacêuticos, é necessário considerar o termo célula unitária, definida como o menor agrupamento onde ocorre um arranjo regular e periódico de átomos ou íons. Seis parâmetros de rede determinam uma célula unitária: os comprimentos das arestas da célula unitária ( $a$ ,  $b$  e  $c$ ) e os ângulos entre as arestas ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) (REZENDE, 2004). Existem sete tipos fundamentais de células unitárias, as quais definem as sete classes de sistemas cristalinos: cúbico ( $a = b = c$ ,  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ ), tetragonal ( $a = b \neq c$ ,  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ ), ortorrômbico ( $a \neq b \neq c$ ,  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ ), monoclinico ( $a \neq b \neq c$ ,  $\alpha = \gamma = 90^\circ$ ,  $\beta \neq 90^\circ$ ), triclínico ( $a \neq b \neq c$ ,  $\alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$ ), hexagonal ( $a = b \neq c$ ,  $\alpha = \beta = 90^\circ$ ,  $\gamma = 120^\circ$ ) e trigonal ( $a = b = c$ ,  $\alpha = \beta = 90^\circ$ ,  $\gamma \neq 90^\circ$ ) (BRITAIN, 2009).

O termo polimorfismo é utilizado para denotar sistemas cristalinos nos quais uma substância pode existir em estruturas caracterizadas por diferentes células unitárias. Porém, cada estrutura deve possuir exatamente a mesma composição elementar. Se uma mesma substância possui uma variação da estrutura cristalina (definida por uma diferente célula unitária) e esta célula unitária difere em sua composição elementar, devido à inclusão de uma ou mais moléculas de solvente, o termo para designar tal fenômeno é solvatomorfismo (anteriormente denominado pseudopolimorfismo). O termo amorfo designa um sólido que não tem estrutura cristalina definida (BRITAIN, 2009). Dois ou mais componentes

sólidos em temperatura ambiente podem também formar estruturas cristalinas. Neste caso, são designados co-cristais (LU, LI, JIANG, 2010).

Entretanto, no campo da farmácia física, o termo polimorfismo é hoje em dia frequentemente utilizado para designar uma variedade de formas sólidas de princípios ativos e adjuvantes, incluindo formas cristalinas, amorfas, solvatos e hidratos (AALTONEN et al., 2009).

Os dois principais tipos de polimorfismo são: empacotamento e conformacional. No polimorfismo de empacotamento, as moléculas são normalmente rígidas e são arranjadas de forma diferente dentro da célula unitária de cada polimorfo, porém mantendo a mesma conformação. No polimorfismo conformacional, as moléculas são mais flexíveis e existem como diferentes confôrmeros (SARMA et al., 2011).

A principal técnica analítica utilizada para a demonstração da evidência de polimorfismo e para a identificação da estrutura cristalina é a difração de raios X. Porém, outras técnicas são utilizadas, incluindo a microscopia, análise térmica (calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria) e técnicas espectroscópicas (espectroscopia na região do infravermelho, Raman e ressonância magnética nuclear no estado sólido) (PAYGHAN et al., 2010).

A importância do polimorfismo na área de ciências farmacêuticas se deve ao fato de que a maioria dos produtos farmacêuticos são formulados a partir de insumos sólidos (ingredientes ativos e excipientes) no estado cristalino (LEE, ERDEMIR, MYERSON, 2011). As variações no estado cristalino de uma mesma molécula podem resultar em diferentes propriedades físicas e químicas, o que pode produzir impacto direto nas

propriedades farmacotécnicas dos insumos e/ou na qualidade biofarmacêutica dos medicamentos (PAYGHAN et al., 2010).

Com relação às propriedades farmacotécnicas, diferenças em formas polimórficas podem resultar em diferenças de higroscopicidade, forma de partícula, densidade, granulometria, ângulo de repouso e compactabilidade. Estas diferenças provavelmente influenciam no processamento dos insumos farmacêuticos. Entretanto, o efeito do polimorfismo no processamento farmacêutico é dependente da formulação e do processo tecnológico. Para um produto fabricado por compressão direta, as propriedades dos insumos sólidos são críticas para o processamento. Já no processo via granulação úmida, as propriedades originais dos sólidos farmacêuticos são modificadas, o que provavelmente resultará em menor influência na qualidade do produto farmacêutico (PAYGHAN et al., 2010).

Com relação à qualidade, o polimorfismo pode influenciar na estabilidade física e química de medicamentos, devido a diferenças entre estabilidades termodinâmicas dos polimorfos. Por esta razão, durante o desenvolvimento de uma formulação, a forma mais estável de um fármaco é frequentemente escolhida, baseado na maior estabilidade química e no menor potencial de conversão para outra forma (SAIFEE et al., 2009). Entretanto, um polimorfo metaestável (menor estabilidade) pode ser escolhido para melhoria de biodisponibilidade (PAYGHAN et al., 2010). Neste caso, a formulação farmacêutica deve ser otimizada, a fim de se maximizar a estabilidade do polimorfo (SAIFEE et al., 2009).

Polimorfos de um determinado fármaco podem ter diferentes solubilidades e taxas de dissolução (YU et al., 2003). Uma regra universalmente aceita é que formas metaestáveis possuem maior solubilidade do que formas estáveis (PUROHIT,

VENUGOPALAN, 2009), e que solvatos são sempre menos solúveis do que o sólido original (HUANG, TONG, 2004). Quando as diferenças de solubilidade são significantes, a biodisponibilidade de um produto farmacêutico pode ser alterada, principalmente para fármacos de baixa solubilidade, onde a taxa de dissolução é o fator limitante para a absorção. Consequentemente, isto pode dificultar a obtenção de bioequivalência. Esta consideração é extremamente relevante, pois, devido a mudanças nas taxas de dissolução dos polimorfos, um polimorfo de um fármaco pode ser ativo terapeuticamente e outro ser menos ativo, inativo ou até mesmo tóxico (CAPUCHO, MASTROIANNI, CUFFINI, 2008).

As diferenças entre polimorfos que resultam em diferenças de solubilidade e de taxas de dissolução são frequentemente detectadas por ensaios de dissolução. Estes ensaios fornecem uma forma adequada de controlar a qualidade de um produto quanto à biodisponibilidade e estabilidade (YU et al., 2003).

A obtenção de uma forma cristalina pode ser realizada através de diversos processos: cristalização através de evaporação do solvente, cristalização por adição de anti-solvente, cristalização por evaporação do solvente, cristalização por resfriamento, cristalização por alteração de pH (para ácidos ou bases fracas), cristalização por adição de cristais “sementes”, cristalização por introdução de aditivos, etc (HUANG, TONG, 2004).

Na indústria farmacêutica, durante a síntese de fármacos, os processos tecnológicos de cristalização, purificação e secagem podem impactar na estrutura cristalina dos fármacos (LEE, ERDEMIR, MYERSON, 2011). Por este motivo, muitos compostos de relevância farmacêutica podem ocorrer em uma ou mais formas cristalinas (COSTA, 2005). Além disso, os polimorfos podem sofrer alteração na forma cristalina quando misturados com

outras substâncias ou em determinados processos tecnológicos (p.ex.: moagem dos pós e compressão) (JANNUZZI, VASCONCELLOS, SOUZA, 2008).

O estudo do polimorfismo de sólidos farmacêuticos é, portanto, fundamental para assegurar a qualidade de qualquer medicamento. Isto é corroborado pela observação de que o estudo da forma polimórfica é um requerimento regulatório para o registro de um novo produto farmacêutico (ICH, 1999). A FDA recomenda que, durante o desenvolvimento de novos produtos, sejam realizadas buscas de possíveis formas polimórficas e solvatos, empregando processos de recristalização. Aconselha-se ainda um rigoroso acompanhamento da pureza física do fármaco durante o seu processamento industrial e período de armazenamento (FDA, 2004). No Brasil, a RDC nº 136, de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003) exige que o relatório de registro de um novo medicamento especifique, dentre outras informações, a discriminação das características do polimorfo utilizado no medicamento e de outros polimorfos relacionados à substância ativa.

## **8.2. Parte experimental**

### **8.2.1. Material**

#### **8.2.1.1. Amostras**

Para recristalização de polimorfos, utilizou-se glimepirida padrão de referência (padrão secundário), adquirida da empresa Zhejiang Xianju Huakang Pharmaceutical & Chemical Co., Ltd. (Xianju, China).

Para fabricação de comprimidos contendo formas polimórficas de glimepirida, preparou-se o placebo, contendo a seguinte composição:

Lactose monoidratada.....	80%
Lauril sulfato de sódio.....	5%
Amido glicolato de sódio.....	4%
Polivinilpirrolidona.....	0,4%
Celulose microcristalina.....	10%
Estearato de magnésio.....	0,4%
Indigotina laca de alumínio.....	0,2%

### 8.2.1.2. Equipamentos

- Dissolutor Electrolab<sup>®</sup> TDT-08 L, equipado com oito cubas de dissolução (São Paulo, Brasil);
- Cromatógrafo a líquido Shimadzu<sup>®</sup> (Kyoto, Japão), série LC-10A, injetor manual 7725i com alça de amostragem de 20 µL (Rheodyne<sup>®</sup>, Califórnia, EUA), detector SPD-10AVP, válvula FCV-10ALVP, forno de coluna CTO-10AVP e controlador SCL-10Avp;
- Coluna Waters Symmetry<sup>®</sup> C-18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm);
- Difratorômetro de raios X Rigaku<sup>®</sup>, modelo ultima IV (Tokyo, Japão).
- Espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier Shimadzu<sup>®</sup>, modelo Prestige-21 (Tokyo, Japão).

- Calorímetro de varredura diferencial Mettler Toledo<sup>®</sup>, modelo DSC 1 Stare System (Barueri, Brasil).
- Microscópio eletrônico de varredura Jeol<sup>®</sup>, modelo JSM 7500F (São Paulo, São Paulo, Brasil).
- Compressora rotativa Lemaq<sup>®</sup>, modelo LM08B (Diadema, Brasil);
- Evaporador rotativo Marconi<sup>®</sup>, modelo MA 120 (Piracicaba, Brasil)
- Aparelho de ultrassom Unique<sup>®</sup> modelo USC2800A (Indaiatuba, Brasil);
- Balança analítica Kern<sup>®</sup> modelo 410 (Kern, Alemanha);
- Filtros de politetrafluoretileno (PTFE) hidrofílicos com 0,45 µm de poro (Millipore<sup>®</sup>, Bedford, EUA).
- Membranas de politetrafluoretileno (PTFE) hidrofílicas com 0,45 µm de poro e 47,0 mm de diâmetro (Millipore<sup>®</sup>, Bedford, EUA);
- Papel de filtro quantitativo isento de cinzas Vetec<sup>®</sup> (Rio de Janeiro, Brasil);
- Peagômetro Mettler<sup>®</sup> modelo Delta 345 (Barueri, Brasil);
- Sistema de filtração a vácuo Nova Técnica<sup>®</sup> (São Paulo, Brasil);
- Sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore<sup>®</sup>, Bedford, EUA).

### **8.2.1.3. Solventes e reagentes**

- Fosfato de sódio dibásico anidro Vetec<sup>®</sup> (Rio de Janeiro, Brasil);
- Fosfato de sódio monobásico monoidratado Reagen<sup>®</sup> (Colombo, Brasil);
- Hidróxido de sódio PA DINÂMICA<sup>®</sup> (São Paulo, Brasil);

- Etanol P.A. Vetec<sup>®</sup> (Rio de Janeiro, Brasil);
- Brometo de potássio grau espectroscópico Vetec<sup>®</sup> (Rio de Janeiro, Brasil);
- Clorofórmio P.A. Vetec<sup>®</sup> (Rio de Janeiro, Brasil);
- Acetato de amônio P.A. Vetec<sup>®</sup> (Rio de Janeiro, Brasil);
- Ácido cítrico P.A. Vetec<sup>®</sup> (Rio de Janeiro, Brasil);
- Ácido clorídrico P.A. Vetec<sup>®</sup> (Rio de Janeiro, Brasil);
- Ácido acético glacial Vetec<sup>®</sup> (Rio de Janeiro, Brasil);
- Lauril sulfato de sódio Henrifarma<sup>®</sup> (São Paulo, Brasil);
- Metanol grau HPLC TEDIA Company<sup>®</sup> (Fairfield, EUA);
- Água ultrapura – água Milli-Q.

## 8.2.2. Condições de estudo

### 8.2.2.1. Preparação de formas cristalinas

A forma polimórfica I da glimepirida foi preparada de acordo com a literatura (ENDO et al., 2003). Os cristais foram obtidos vertendo-se 500 mL de etanol em 500 mL de uma solução de glimepirida em clorofórmio (1,2 g L<sup>-1</sup>) à temperatura ambiente. Os solventes foram evaporados em rotavapor sob vácuo a 40°C.

A forma polimórfica II da glimepirida foi recristalizada dissolvendo-se 0,6 g de glimepirida em 1000 mL de solução etanol-água (1:1, v/v) a 85°C em banho-maria por 60 minutos. Em seguida, a solução foi mantida em temperatura ambiente por 12 horas e

posteriormente foi mantida sob refrigeração a 5°C por uma semana. Os cristais foram então coletados por filtração e secos em estufa a 60°C sob vácuo (em dessecador).

#### **8.2.2.2. Identificação das formas polimórficas**

As formas polimórficas da glimepirida foram identificadas através das técnicas de difração de raios X por pó, espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier, calorimetria exploratória diferencial e microscopia eletrônica de varredura.

As medidas de raios X foram realizadas em temperatura ambiente, sob as seguintes condições: Radiação Cu-K $\alpha$  ( $\lambda = 1.542 \text{ \AA}$ ) utilizando monocromador de grafite, voltagem de 40 kV, corrente de 30 mA e faixa de varredura  $2\theta$  entre 3,0 a 40,0°, na razão de aquecimento de 1°/min.

Os dados espectroscópicos na região do infravermelho foram obtidos sob temperatura ambiente na faixa de 3500-400-cm $^{-1}$ . As amostras foram preparadas utilizando pastilhas de KBr.

As análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram realizadas a 2 °C min $^{-1}$ . Os dados foram coletados de 25 a 250 °C.

As análises de microscopia eletrônica foram utilizadas para observação das características morfológicas dos cristais.

### **8.2.2.3. Preparação de comprimidos de glimepirida**

A fim de avaliar a influência do polimorfismo em comprimidos contendo 4 mg de glimepirida, dois lotes foram preparados: lote 1 (contendo a forma polimórfica I) e lote 2 (contendo a forma polimórfica II). Os lotes foram preparados da seguinte forma: Duas porções de 1,665 g do placebo (descrito na seção 8.2.1.1) foram adicionadas individualmente em dois sacos plásticos. Posteriormente, adicionou-se individualmente 40 mg de cada forma polimórfica em cada saco plástico, que foram agitados por cerca de 10 minutos. Em seguida, pesou-se 170 mg de pó (mistura de placebo e polimorfos) de cada lote e transferiu-se para as matrizes da compressora rotativa. Finalmente, foram obtidos 6 comprimidos de cada lote através de compressão direta. A força de compressão foi ajustada para produzir comprimidos com dureza de aproximadamente 5 kgf. As condições utilizadas para produzir os dois lotes foram as mesmas, variando-se somente a forma polimórfica de cada lote.

### **8.2.2.4. Comparação de perfis de dissolução de comprimidos contendo polimorfos**

Os dois lotes de comprimidos de glimepirida, preparados de acordo com a seção prévia (8.2.2.3), foram submetidos ao ensaio de dissolução desenvolvido e validado neste trabalho (seção 5). As condições foram: tampão fosfato de sódio pH 6,8 (50 mmol L<sup>-1</sup>) contendo 0,1% de lauril sulfato de sódio como meio de dissolução, aparato pá sob a velocidade de agitação de 50 rpm e coleta das amostras nos tempos 5, 10, 15, 20, 30 e 60 minutos, com imediata reposição. O método por CLAE desenvolvido e validado nesta tese

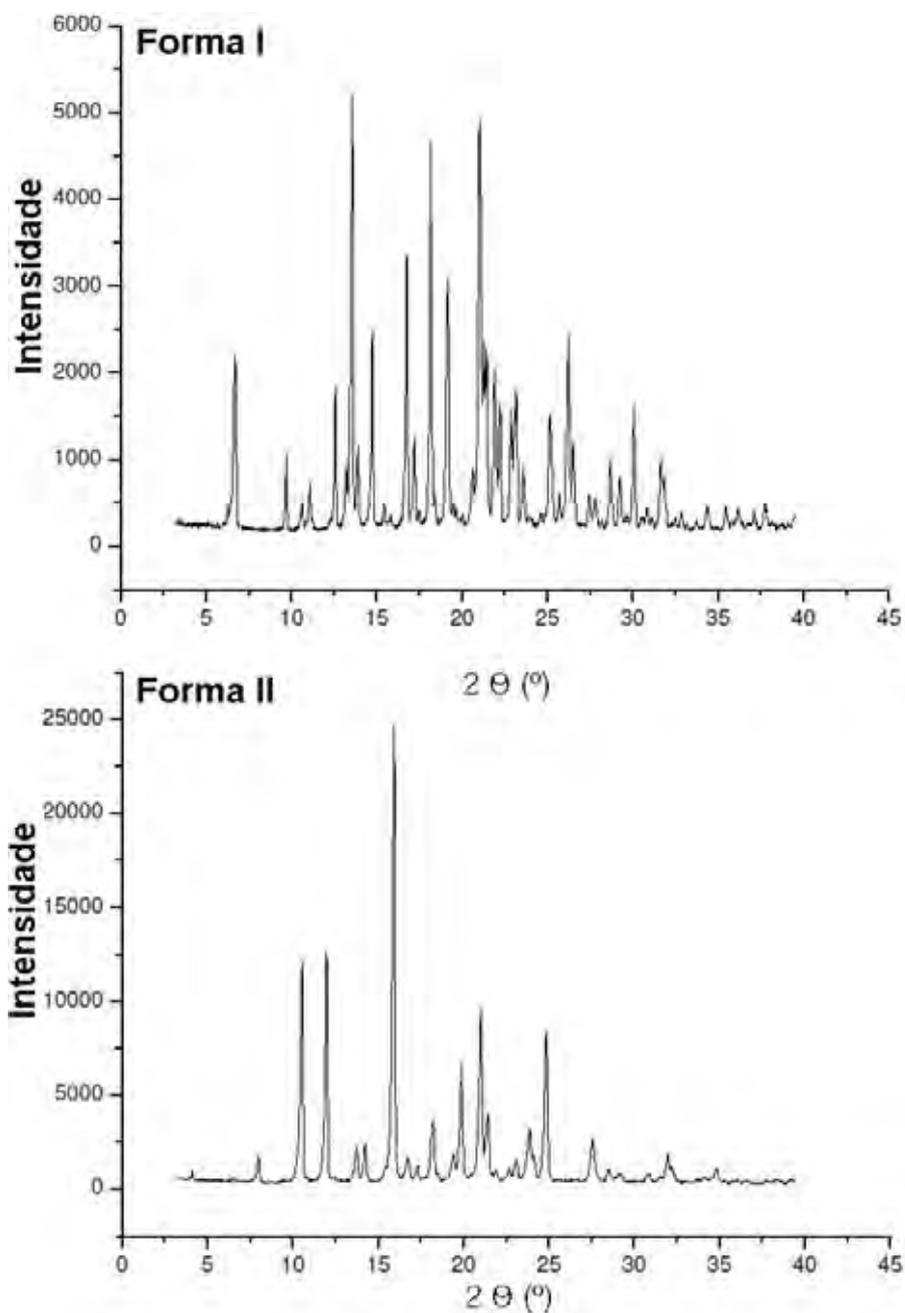
foi empregado para a quantificação das amostras, que foram injetadas diretamente no cromatógrafo. As condições cromatográficas foram: tampão fosfato de sódio (27,5 mmol L<sup>-1</sup>; pH 6,5) e metanol (34:66, v/v) como fase móvel, coluna Waters<sup>®</sup> Symmetry C-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) como fase estacionária, detecção no UV a 228 nm e volume de injeção de 20 µL. As análises foram realizadas à temperatura ambiente (25° C).

Foram ensaiados 6 comprimidos de cada lote e os resultados foram utilizados para construção de perfis de dissolução. Os perfis foram então comparados através do método modelo independente simples, que utiliza o cálculo do fator de diferença (f1) e do fator de semelhança (f2), que foram obtidos a partir das equações 9 e 10, descritas na seção 7.7.2.

Para duas curvas serem consideradas similares, o valor de f1 deve ser próximo de 0 e o valor de f2 deve ser próximo de 100. Geralmente, valores de f1 de 0 a 15 e valores de f2 de 50 a 100 asseguram equivalência entre duas curvas (BRASIL, 2010).

### **8.3. Resultados e discussão**

Os resultados de difração de raios X por pó das formas polimórficas de glimepirida, recristalizadas a partir do padrão de trabalho, estão demonstradas na Figura 31.

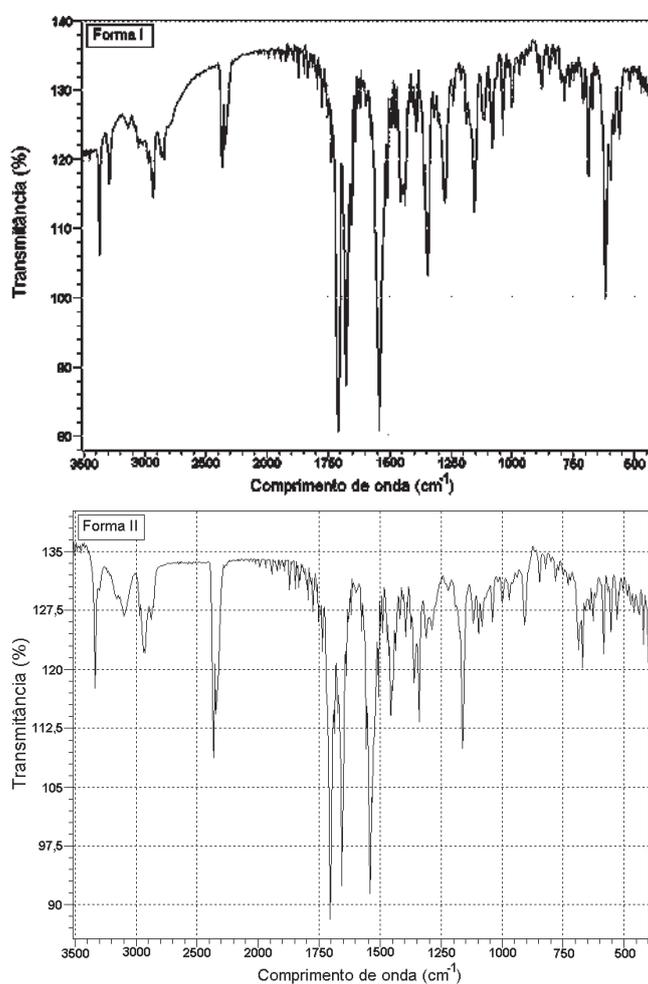


**Figura 31.** Difratoformas de formas polimórficas de glimepirida.

A observação dos difratogramas demonstrados na Figura 31 nos permite concluir que as técnicas de recristalização nos solventes clorofórmio/etanol e etanol/água, descritas

na seção 8.2.2.1, permitem a obtenção das formas polimórficas I e II da glimepirida, respectivamente, pois os padrões de difração obtidos neste trabalho coincidem com os padrões demonstrados na literatura (ENDO et al., 2003).

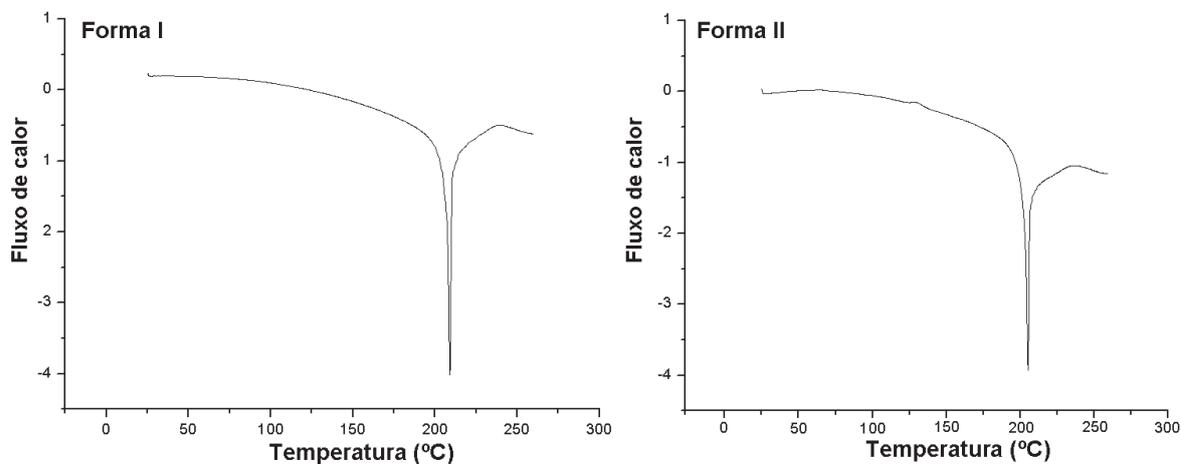
Os resultados de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier das formas polimórficas de glimepirida, recristalizadas a partir do padrão de trabalho, estão demonstrados na Figura 32.



**Figura 32.** Espectros de infravermelho de formas polimórficas de glimepirida.

A observação dos espectros de infravermelho demonstrados na Figura 32 nos permite confirmar que as técnicas de recristalização nos solventes clorofórmio/etanol e etanol/água, descritas na seção 8.2.2.1, permitiram a obtenção das formas polimórficas I e II da glimepirida, respectivamente. Os espectros obtidos neste trabalho coincidem com os espectros demonstrados na literatura (ENDO et al., 2003), onde uma banda larga próxima a  $3100\text{ cm}^{-1}$  foi observada somente no espectro da forma II. Esta banda foi atribuída a uma interação intermolecular de hidrogênio do grupamento N-H da sulfonamida. Além desta, as seguintes bandas principais também foram verificadas na forma I:  $3369\text{ cm}^{-1}$  (estiramento N-H de amina secundária),  $3288\text{ cm}^{-1}$  (estiramento N-H da sulfonamida),  $3050\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-H  $sp^2$ ),  $2930\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-H  $sp^3$ ),  $2360\text{ cm}^{-1}$  (pico de  $\text{CO}_2$  do espectro de fundo), bandas harmônicas entre  $2000\text{ cm}^{-1}$  e  $1700\text{ cm}^{-1}$  (aromático),  $1706\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C=O),  $1674\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C=O conjugado a uma ligação dupla  $\alpha, \beta$ ),  $1541\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C=C aromático),  $1360\text{ cm}^{-1}$  (dobramento de  $\text{CH}_3$ ). Na forma II, foram verificadas as seguintes bandas principais:  $3333\text{ cm}^{-1}$  (estiramento N-H da amina secundária),  $3298\text{ cm}^{-1}$  (estiramento N-H da sulfonamida)  $2932\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-H  $sp^3$ ),  $2360\text{ cm}^{-1}$  (pico de  $\text{CO}_2$  do espectro de fundo), bandas harmônicas entre  $2000\text{ cm}^{-1}$  e  $1700\text{ cm}^{-1}$  (aromático),  $1701\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C=O),  $1653\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C=O conjugado a uma ligação dupla  $\alpha, \beta$ ),  $1541\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C=C aromático),  $1341\text{ cm}^{-1}$  (dobramento de  $\text{CH}_3$ ).

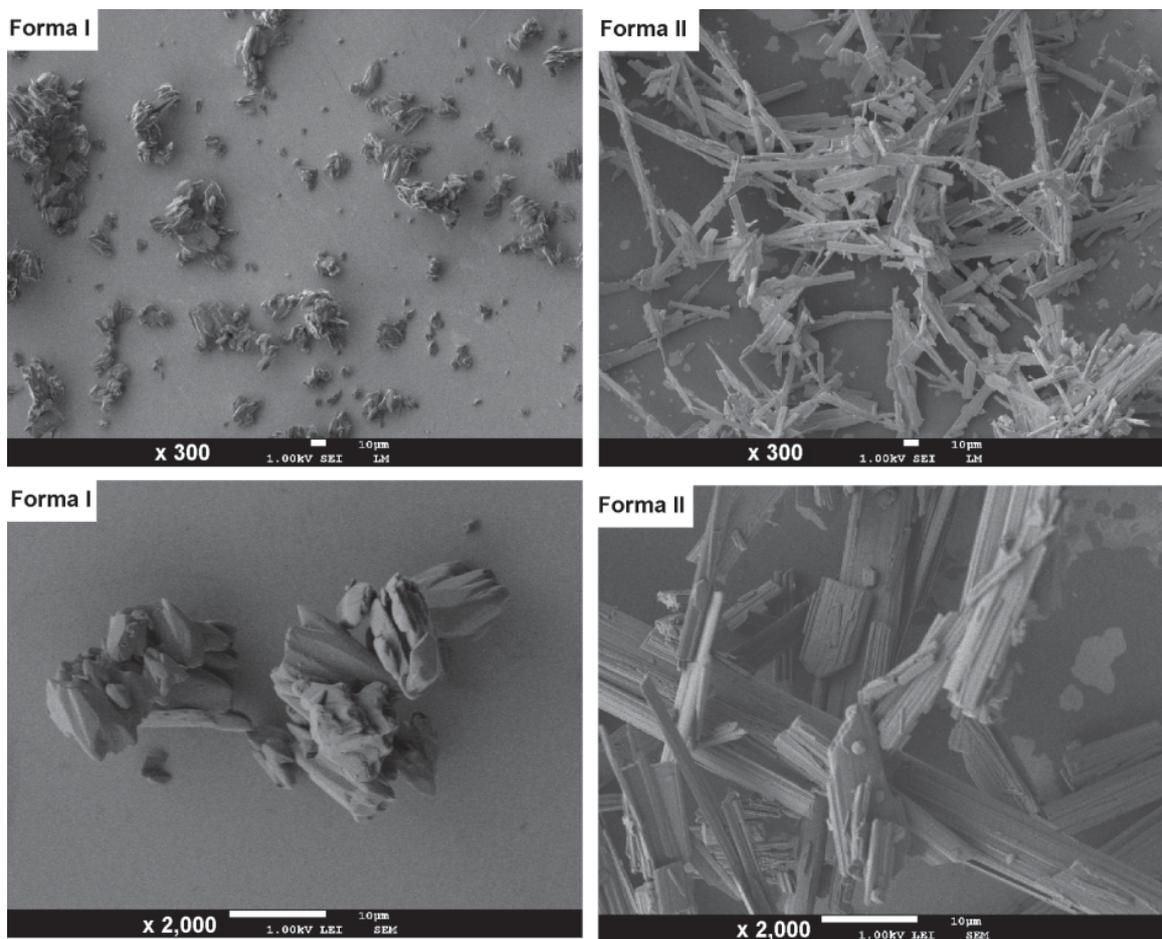
Os resultados de DSC das formas polimórficas de glimepirida, recristalizadas a partir do padrão de trabalho, estão demonstrados na Figura 33.



**Figura 33.** Curvas de DSC de formas polimórficas de glimepirida.

A observação das curvas de DSC demonstradas na Figura 33 nos permite confirmar que as técnicas de recristalização nos solventes clorofórmio/etanol e etanol/água, descritas na seção 8.2.2.1, permitiram a obtenção das formas polimórficas I e II da glimepirida, respectivamente, pois as curvas obtidas neste trabalho coincidem com as curvas apresentadas na literatura (ENDO et al., 2003). Ambas as formas demonstraram picos endotérmicos acima de 200°C, que correspondem aos seus pontos de fusão. Entretanto, somente a forma II demonstrou um pico exotérmico em torno de 140°C, que foi atribuído a transição polimórfica da forma II em forma I.

Os resultados de microscopia eletrônica das formas polimórficas de glimepirida, recristalizadas a partir do padrão de trabalho, estão demonstrados na Figura 34.



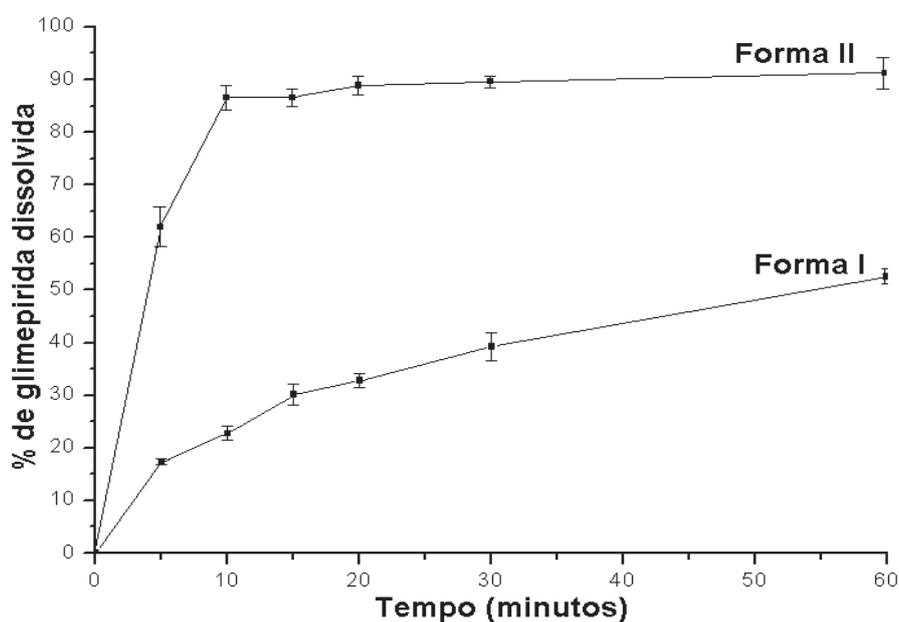
**Figura 34.** Microscopia eletrônica de varredura de formas polimórficas de glimepirida.

A observação das fotos de microscopia eletrônica dos polimorfos de glimepirida demonstradas na Figura 34 nos permite confirmar que as técnicas de recristalização nos solventes clorofórmio/etanol e etanol/água, descritas na seção 8.2.2.1, permitiram a obtenção das formas polimórficas I e II da glimepirida, respectivamente. Pode-se observar claramente que somente o polimorfo II possui uma estrutura em forma de agulha. Além disso, as fotos demonstradas na Figura 34 nos permitem visualizar que não há diferenças evidentes nos tamanhos de partículas de polimorfos. Portanto, qualquer diferença entre os

perfis de dissolução de comprimidos contendo os polimorfos de glimepirida provavelmente ocorrerá devido ao fenômeno do plomimorfismo e não devido à diferenças entre o tamanho dos polimorfos.

Os resultados de difração de raios X por pó, espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier, calorimetria exploratória diferencial e microscopia eletrônica de varredura, portanto, confirmam que as formas polimórficas I e II da glimepirida foram recristalizadas neste trabalho.

Posteriormente, comprimidos contendo as formas polimórficas de glimepirida foram preparados de acordo com a seção 8.2.2.3 e submetidos ao ensaio de dissolução sob as condições descritas na seção 8.2.2.4. Os resultados estão demonstrados na Figura 35.

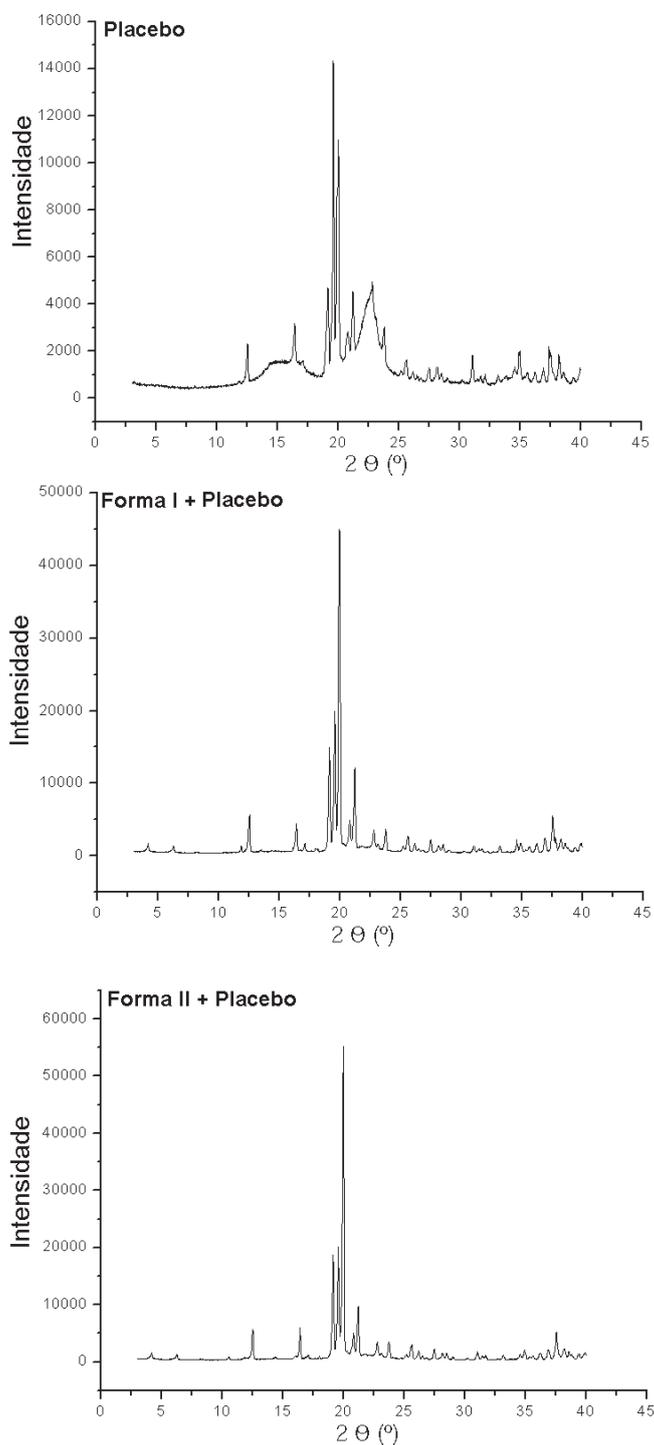


**Figura 35.** Perfis de dissolução de comprimidos contendo 4 mg de formas polimórficas de glimepirida. Barras de erros representam intervalos de confiança a 95%.

A observação dos resultados demonstrados na Figura 35 nos permite concluir que os perfis de dissolução de comprimidos contendo 4 mg de glimepirida são influenciados pela forma polimórfica presente nos comprimidos. Para confirmar essa conclusão, foram calculados os fatores de diferença (f1) e de similaridade (f2), e foram encontrados valores de 61,40 e 7,06, respectivamente. Os resultados demonstrados na Figura 35 e os cálculos de f1 e f2, portanto, demonstram a influência do polimorfismo nos perfis de dissolução de comprimidos contendo glimepirida, sendo que a forma II, por ser 3,5 vezes mais solúvel do que a forma I (ENDO et al., 2003), promove uma dissolução mais rápida e mais efetiva até 60 minutos.

Uma tentativa de identificar a forma polimórfica da glimepirida presente em comprimidos foi realizada através das técnicas de difração de raios X por pó, espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier e calorimetria exploratória diferencial. Estas técnicas, sob as condições descritas na seção 8.2.2.2, foram aplicadas no placebo descrito na seção 8.2.1.1, na mistura de placebo + forma polimórfica I e na mistura de placebo + forma polimórfica II.

Os resultados de difração de raios X por pó do placebo, da mistura de placebo + forma polimórfica I e da mistura de placebo + forma polimórfica II estão demonstrados na Figura 36.

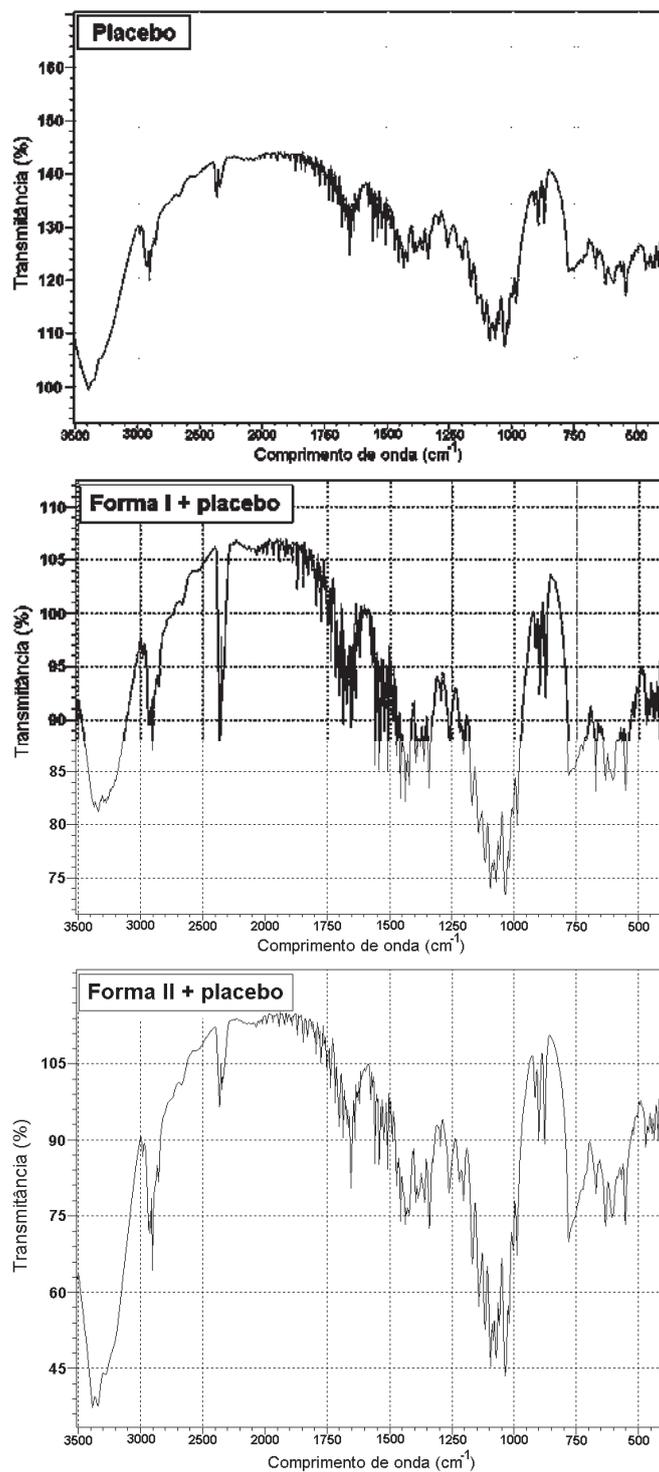


**Figura 36.** Difratoigramas de placebo, de mistura de placebo + forma polimórfica I da glimepirida e de mistura de placebo + forma polimórfica II da glimepirida.

A observação dos resultados demonstrados na Figura 36 nos permite concluir que não é possível identificar a forma polimórfica presente em comprimidos de glimepirida através da técnica de difração de raios X, pois os excipientes apresentam difração significativa entre 3 e 40°. Esta interferência ocorreu devido ao estado cristalino dos excipientes presentes no placebo. Além disso, a quantidade de glimepirida em relação ao peso total dos comprimidos é pequena (cerca 2,35% p/v), o que prejudica a identificação da forma polimórfica da glimepirida em comprimidos.

Os resultados de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier do placebo, da mistura de placebo + forma polimórfica I e da mistura de placebo + forma polimórfica II estão demonstrados na Figura 37.

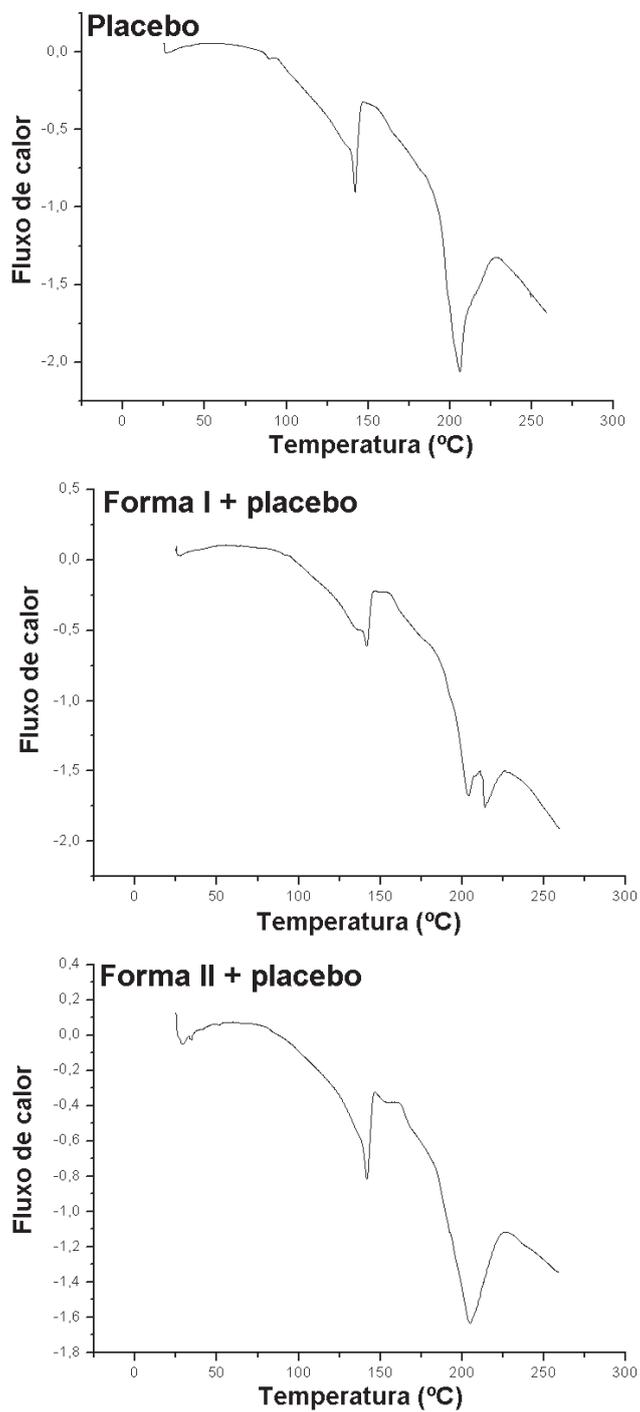
## POLIMORFISMO



**Figura 37.** Espectros de infravermelho de placebo, de mistura de placebo + forma polimórfica I da glimepirida e de mistura de placebo + forma polimórfica II da glimepirida.

A observação dos resultados demonstrados na Figura 37 nos permite concluir que não é possível identificar a forma polimórfica presente em comprimidos de glimepirida através da técnica espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, pois os excipientes apresentam absorção significativa na região de  $3100\text{ cm}^{-1}$ , não permitindo, portanto, a visualização da principal banda responsável pela identificação da forma polimórfica II.

Os resultados das análises de calorimetria exploratória diferencial do placebo, da mistura de placebo + forma polimórfica I e da mistura de placebo + forma polimórfica II estão demonstrados na Figura 38.



**Figura 38.** Curvas de DSC de placebo, de mistura de placebo + forma polimórfica I da glimepirida e de mistura de placebo + forma polimórfica II da glimepirida.

A observação dos resultados demonstrados na Figura 38 nos permite concluir que não é possível identificar a forma polimórfica presente em comprimidos de glimepirida através da técnica de calorimetria exploratória diferencial, pois o pico endotérmico em 140° verificado na curva de DSC do placebo se sobrepõe ao pico de transição da forma polimórfica II da glimepirida em forma I.

#### **8.4. Discussão**

O estudo do polimorfismo em sólidos farmacêuticos é fundamental para assegurar a qualidade de qualquer medicamento, pois variações no estado cristalino podem produzir alterações nas propriedades farmacotécnicas dos insumos farmacêuticos, na estabilidade física e química dos insumos e medicamentos, na solubilidade, taxas de dissolução e biodisponibilidade de princípios ativos contidos em uma determinada formulação, e na equivalência farmacêutica de produtos genéricos e/ou similares.

Vários trabalhos descritos na literatura demonstram a influência do polimorfismo nas propriedades de dissolução e na biodisponibilidade oral de medicamentos (CHEMBURKAR et al., 2000; KOBAYASHI et al., 2000; SWANEPOEL, LIEBENBERG, de VILLIERS, 2003; SOHN, KIM, 2008; MA, MOULTON, 2009; HISAZUMI et al., 2011). Essa influência pode ser crítica na qualidade de medicamentos contendo fármacos poucos solúveis (Classe II e Classe IV, de acordo com o sistema de classificação biofarmacêutica), pois a dissolução para estes fármacos é o fator limitante para a absorção.

A glimepirida pertence à Classe II, pois é praticamente insolúvel em água (EP, 2008), com coeficiente de partição óleo-água de 3,81 (SEEDHER, KANOJIA, 2009), sendo

completamente absorvida após 1 hora de administração oral (HARRIGAN, NATHAN, BEATTIE, 2001). Além disso, a glimepirida possui duas formas polimórficas cristalinas, designadas como forma I e forma II. Cada polimorfo apresenta diferente solubilidade, sendo que a forma II é cerca de 3,5 vezes mais solúvel que a forma I em solventes aquosos (ENDO et al., 2003).

Tendo em vista a importância do polimorfismo na qualidade de produtos farmacêuticos contendo fármacos pouco solúveis, este capítulo objetivou avaliar o impacto das formas polimórficas descritas para a glimepirida em comprimidos contendo 4 mg deste fármaco e adjuvantes utilizados na fabricação do produto referência, um estudo ainda não descrito na literatura.

Primeiramente, as duas formas polimórficas da glimepirida foram recristalizadas. A forma I foi obtida com sucesso na primeira tentativa, utilizando o procedimento descrito por Endo e colaboradores (2003). Entretanto, a forma II não foi obtida com a realização do procedimento descrito pelos mesmos autores. Outras tentativas foram realizadas, variando-se as temperaturas das soluções e a proporção de solventes utilizados no sistema etanol/água. Estas tentativas também levaram a forma mais estável (forma I). Uma busca na literatura de procedimentos de recristalização de fármacos da classe das sulfonilureias em sistemas etanol/água foi realizada. Foi encontrada uma descrição de recristalização de uma forma polimórfica de acetoexamida em etanol/água (SAKAGUCHI et al., 1978). O procedimento descrito foi realizado para a glimepirida (seção 8.2.2.1) e as análises de difração de raios X mostraram um padrão de difração coincidente com o padrão demonstrado para a forma II da glimepirida (ENDO et al., 2003). A confirmação de que a forma II foi recristalizada com sucesso foi realizada pelas técnicas de espectroscopia na

---

região do infravermelho, calorimetria exploratória diferencial e microscopia eletrônica de varredura.

As formas polimórficas foram utilizadas na fabricação de comprimidos de 4 mg. Uma formulação foi desenvolvida e foi utilizada para fabricação de dois lotes de comprimidos de glimepirida: lote 1 (contendo a forma polimórfica I) e lote 2 (contendo a forma polimórfica II). Com o objetivo de variar apenas a forma polimórfica entre um lote e outro, os dois lotes foram fabricados utilizando a mesma composição qualitativa e quantitativa de excipientes, mesma compressora e mesma força de compressão, sendo produzidos no mesmo dia (um lote imediatamente após o outro).

Os dois lotes foram submetidos ao ensaio de dissolução sob as condições descritas nesta tese e os resultados demonstram uma significativa influência do polimorfismo nos perfis de dissolução de comprimidos contendo glimepirida, sendo que a forma II, como esperado, promoveu uma dissolução mais rápida e mais efetiva até 60 minutos de ensaio.

Entretanto, o lote contendo a forma mais estável (Forma I) não apresentou uma dissolução efetiva, como demonstrado na Figura 35. Uma tentativa de variação na composição quantitativa de excipientes e de aumento do tensoativo (lauril sulfato de sódio) foi realizada, mas a dissolução da forma I no lote desenvolvido neste trabalho permaneceu baixa. Foi levantada a hipótese de que a formulação referência pode conter uma certa quantidade de polimorfo II. Uma tentativa de análise de polimorfismo em comprimidos foi realizada, submetendo os excipientes e as misturas de ambos polimorfos com os excipientes às técnicas analíticas descritas neste capítulo (difração de raios X, espectrofotometria na região do infravermelho por transformada de Fourier e calorimetria exploratória diferencial). Infelizmente, chegou-se a conclusão que não é possível identificar a forma

---

polimórfica em comprimidos contendo 4 mg de glimepirida, pois a quantidade de excipientes nas formulações farmacêuticas comercializadas é significativamente alta, o que promove uma alta interferência dos excipientes, impedindo conseqüentemente que as técnicas sejam conclusivas.

Entretanto, com base nos resultados obtidos neste capítulo, sugere-se que a qualidade da matéria-prima utilizada no desenvolvimento de comprimidos contendo glimepirida seja controlada, através das técnicas utilizadas. Também é sugerido o controle de qualidade da matéria-prima utilizada na fabricação de cada lote, para que não haja utilização de um polimorfo diferente do utilizado no desenvolvimento farmacotécnico. A importância desta observação é reforçada ao se considerar que a glimepirida é um antidiabético oral, sendo que a taxa de dissolução deste fármaco é o fator limitante para a sua absorção. Portanto, o aumento significativo no perfil de dissolução de produtos contendo glimepirida, devido à utilização de matéria-prima contendo o polimorfo mais solúvel, pode aumentar a taxa de absorção, o que pode ocasionar queda nos níveis glicêmicos. Inversamente, a diminuição no perfil de dissolução, devido à utilização do polimorfo menos solúvel, pode prejudicar o tratamento.

Este capítulo de tese é extremamente relevante e chama a atenção para a necessidade de maiores exigências por parte dos órgãos regulatórios competentes quanto à análises de polimorfos das matérias-primas utilizadas na fabricação de medicamentos comercializados no Brasil e no mundo, pois estas análises não são exigidas na grande maioria das monografias presentes nos compêndios oficiais. Uma parceria entre indústrias, centros de pesquisas e universidades seria uma forma viável de consolidar pesquisas nesta área e contribuir para a melhoria da qualidade de medicamentos sólidos.

## 9. CONCLUSÕES

O método de espectrofotometria por derivadas na região do ultravioleta foi considerado adequado para quantificação de comprimidos contendo 1, 2 e 4 mg de glimepirida. Este método é fácil de executar, possui baixo custo, é rápido e não gera resíduos tóxicos ou poluentes. Entretanto, os produtos de degradação não podem ser quantificados através desta técnica. Além disso, a presença de lauril sulfato de sódio causa turvação nas soluções dos comprimidos, o que impede a aplicação desta técnica na quantificação de amostras obtidas nos ensaios de dissolução.

O método por cromatografia líquida de alta eficiência também foi considerado adequado para quantificação de comprimidos contendo 1, 2 e 4 mg de glimepirida. Este método, que foi desenvolvido de forma multivariada, apresenta a vantagem de permitir a separação e quantificação de produtos de degradação. Porém, demanda um maior tempo, maior treinamento e, além disso, gera maior quantidade de solventes em relação ao método espectrofotométrico. Porém, em relação aos métodos cromatográficos descritos na literatura, o tempo de corrida é significativamente menor.

O ensaio de dissolução desenvolvido mostrou-se adequado para avaliar a qualidade de comprimidos contendo 4 mg de glimepirida e mostrou-se adequado para aplicação em análises de rotina em laboratórios de controle de qualidade. Além disso, permitiu a comparação de perfis de dissolução para ensaios de equivalência farmacêutica.

Os estudos de estabilidade mostraram que todos os produtos farmacêuticos testados (referência e similares) sofreram influência das condições estabelecidas para estudos de estabilidade acelerada e de longa duração.

## CONCLUSÕES

---

Os estudos de equivalência farmacêutica mostraram que dois produtos similares contendo 4 mg de glimepirida comercializados no mercado nacional não demonstram equivalência farmacêutica, não sendo adequados, portanto, ao uso clínico.

Os estudos de polimorfismo demonstram uma significativa influência do polimorfismo nos perfis de dissolução de comprimidos contendo glimepirida, sendo que a forma II promoveu uma dissolução mais rápida e mais efetiva até 60 minutos de ensaio. A partir desta observação, sugere-se que a qualidade da matéria-prima utilizada em comprimidos contendo glimepirida seja controlada, pois o aumento significativo no perfil de dissolução de produtos contendo este fármaco pode aumentar a sua bioequivalência, o que pode ocasionar queda nos níveis glicêmicos. Inversamente, a diminuição no perfil de dissolução pode prejudicar a terapia medicamentosa do diabetes tipo II.

Finalmente, este trabalho mostra a importância de métodos adequados de controle de qualidade na avaliação de produtos comercializados no mercado brasileiro, pois mesmo com o crescente rigor dos órgãos competentes, os pacientes ainda estão sujeitos a usarem medicamentos com qualidade comprometida.

## 10. ARTIGOS CIENTÍFICOS

Esta tese de doutorado gerou cinco artigos científicos, os quais estão publicados ou foram aceitos por periódicos de circulação internacional. Os trabalhos são os seguintes:

- **Artigos publicados**

Bonfilio, R.; Araújo, M. B. de; Salgado, H. R. N. A Review of Analytical Techniques for Determination of Glimepiride: Present and Perspectives. *Therapeutic Drug Monitoring*, v. 32, p. 550-559, 2010.

Bonfilio, R.; Araújo, M. B. de ; Salgado, H. R. N. Development and validation of an UV-derivative spectrophotometric method for determination of glimepiride in tablets. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 22, p. 292-299, 2011.

- **Artigos aceitos para publicação**

Bonfilio, R.; Araújo, M. B. de; Salgado, H. R. N. Multivariate development and validation of a stability-indicating HPLC method for the determination of glimepiride in tablets. *Journal of AOAC International*, 2011.

Bonfilio, R.; Pires, S. A.; Ferreira, L. M. B.; Almeida, A. E. de; Doriguetto, A. C.; Araújo, M. B. de; Salgado, H. R. N. A discriminating dissolution method for glimepiride polymorphs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2011.

Bonfilio, R.; Cazedey, E. C. L.; Araújo, M. B. de; Salgado, H. R. N. Analytical validation of quantitative High Performance Liquid Chromatographic methods in pharmaceutical analysis: a practical approach. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2011.

**11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AALTONEN, J. et al. Solid form screening – A review. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 71, n. 1, p. 23–37, 2009.

ALTINOZ, S.; TEKELI, D. Analysis of glimepiride by using derivative UV spectrophotometric method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 24, n. 3, p. 507-515, 2001.

AMIDON, G. E.; MIDDLETON, K. R. Accelerated physical stability testing and long-term predictions of changes in the crushing strength of tablets stored in blister packages. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 45, n. 1-2, p. 79-89, 1988.

AMIDON, G. L. et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharmaceutical Research*, v. 12, n. 3, p. 413-420, 1995.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JUNIOR, L.V. *Formas farmacêuticas e sistema de liberação de fármacos*. 6. ed. São Paulo: Editorial Premier, 2000.

AOAC INTERNATIONAL. *Appendix D: Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis*. 2000. Disponível em: [http://www.aoac.org/Official\\_Methods/Collaborative\\_Study\\_Validation\\_Guidelines.pdf](http://www.aoac.org/Official_Methods/Collaborative_Study_Validation_Guidelines.pdf)  
Acesso em: 12 mai. 2011.

ARAÚJO, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of Chromatography B*, v. 877, n. 23, p. 2224–2234, 2009.

BALESTRE, K. C. B. E. et al. Relato de um seguimento farmacoterapêutico de pacientes portadores de diabetes do programa saúde da família de Atalaia, Paraná. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 28, n.2, p.203-208, 2007.

BANSAL, G. et al. LC–UV–PDA and LC–MS studies to characterize degradation products of glimepiride. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 48, n. 3, p. 788-795, 2008.

BAZOTTE, R. B.; SILVA, G. E. C.; KOYASHIKI, N. Perfil de pacientes diabéticos usuários de sulfonilureias. *Infarma*, v. 17, n. 3/4, p. 76-79, 2005.

As referências bibliográficas deste trabalho estão de acordo com o manual de normas da UNESP: CECCANTINI, J. L. C. T. et al. <i>Normas para publicação da UNESP</i> . São Paulo: Editora UNESP, 2010. 1v.
---

BOGUSZ, M. J. et al. Application of LC–ESI–MS–MS for detection of synthetic adulterants in herbal remedies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 41, n. 2, p. 554-564, 2006.

BOMFIM, J. H. G. G. *Caracterização da utilização de medicamentos por indivíduos residentes na área compreendida pelo Núcleo de Saúde da Família III – Ribeirão Preto, SP*. 2007. 134f. Tese (Doutorado em Medicamentos e Cosméticos)- Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

BONFILIO, R.; de ARAÚJO, M. B.; SALGADO, H. R. N. A review of analytical techniques for determination of glimepiride: present and perspectives. *Therapeutic Drug Monitoring*, v. 32, n. 5, p. 550-559, 2010.

BOWEN, L. et al. Stability of furosemide tablets repackaged in dose administration aids. *Journal of Pharmacy Practice and Research*, v. 37, n. 3, p. 178-181, 2007.

BP. BRITISH PHARMACOPOEIA. London: The British Pharmacopoeia Convention, 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 9.787, de 10 de fevereiro de 1999. Dispõe sobre a vigilância sanitária, estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 11 fev. 1999a. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 16 jun. 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 391, de 9 de agosto de 1999. Aprova o Regulamento Técnico para Medicamentos Genéricos. Diário Oficial da União, Brasília, 10 ago. 1999b. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 16 jun. 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n. 899, 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Brasília, 02 jun. 2003a. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 16 jun. 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 133, de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre o registro de Medicamento Similar e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 02 jun. 2003b. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 16 jun. 2011.

BRASIL. Resolução RE n. 310, de 01 de setembro de 2004. Determina a publicação do Guia para realização do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica e

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

perfil de dissolução. Diário Oficial da União, Brasília, de 30 de ago. de 2004. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 16 jun. 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n. 1, de 29 de julho de 2005. Guia para Realização de Estudos de Estabilidade. Diário Oficial da União, Brasília, 01 ago. 2005. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 16 jun. 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 31, de 11 de agosto de 2010. Dispõe sobre a realização dos Estudos de Equivalência Farmacêutica e de Perfil de Dissolução Comparativo. Diário Oficial da União, Brasília, 12 ago. 2010. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 16 jun. 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para a qualidade em química analítica. Uma assistência para a habilitação. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/series/laboratorios.pdf>. Acesso em: 16 jun. 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta de produtos medicamentos. Disponível em: [http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/consulta\\_produto/Medicamentos/frmConsultaMedicamentos.asp](http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/consulta_produto/Medicamentos/frmConsultaMedicamentos.asp). Acesso em: 08 nov. 2011.

BRITAIN, H. G. *Polymorphism in pharmaceutical solids*. 2.ed. New York: Informa Healthcare, 2009.

BRUCE, P.; MINKKINEN, P.; RIEKKOLA, M. L. Practical Method Validation: Validation sufficient for an Analysis Method. *Microchimica Acta*, v. 128, n. 1-2, p. 93-106, 1998.

BUCHHEIT, K. R.; DAAS, A.; JÖNSSON, K. H. Collaborative study for establishment of an HPLC-method for batch consistency control of recombinant interferon-alfa-2. *Pharmeuropa Special Issue Biologicals*, v. 2002, n. 1, p. 7-27, 2002.

CAMPBELL, R. K. Glimepiride: Role of a new sulfonylurea in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Annals of Pharmacotherapy*, v. 32, n. 10, p. 1044-1052, 1998.

CAPUCHO, H. C.; MASTROIANNI, P. C.; CUFFINI, S. Farmacovigilância no Brasil: a relação entre polimorfismo de fármacos, efetividade e segurança dos medicamentos. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 29, n. 3, p. 277-283, 2008.

CARVALHO, J. P. et al. Estabilidade de medicamentos no âmbito da farmacovigilância. *Revista Fármacos e Medicamentos*, v. 34, n. 6, p. 22-27, 2005.

CÉSAR, I. C.; PIANETTI, G. A. Robustness evaluation of the chromatographic method for the quantification of lumefantrine using Youden's test. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 45, n. 2, p.235-240, 2009.

CHAKRADHAR, L. et al. A rapid and highly sensitive method for the determination of glimepiride in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry: Application to a pre-clinical pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography*, v. 22, n. 1, p. 58-63, 2008.

CHANDRAN, S.; SINGH, R. S. P. Comparison of various international guidelines for analytical method validation. *Pharmazie*, v. 62, n. 1, p. 4-14, 2007.

CHEMBURKAR, S. R. et al. Dealing with the impact of ritonavir polymorphs on the late stages of bulk drug process development. *Organic Process Research and Development*, v. 4, n.5, p. 413-417, 2000.

CHENG, A. Y. Y.; LEITER, L. A. Diabetes and cardiovascular disease: the role of glycemic control. *Current Diabetes Reports*, v. 9, n. 1, p. 65-72, 2009.

CLARK, C. M.; GOLDBERG, R. B. Glimepiride dosing and efficacy: Results of placebo controlled, dose-regimen, and active-controlled trials. In: WHITEHOUSE, F.; GAVIN, J. *Postgraduate Medicine Special Report: Therapeutic Strategies for Managing NIDDM*. Minneapolis: McGraw-Hill Healthcare Information Group, 1997. p. 45- 56.

COLE, W. C.; MCPHERSON, C. D.; SONTAG, D. ATP-regulated K<sup>+</sup> channels protect the myocardium against ischemia/reperfusion damage. *Circulation Research*, v. 69, n. 3, p. 571-581, 1991.

CORVELEYN, S.; REMON, J. P. Stability of freeze-dried tablets at different relative humidities. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 25, n. 9, p. 1005-1013, 1999.

COSTA, L. L. *Avaliação do polimorfismo de fármacos utilizados para a produção de medicamentos genéricos no Brasil*. 2005. 88f. Dissertação (Mestrado Profissionalizante em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 13, n.2, p. 123-133, 2001.

DAVIS, N. S. Insulina, agentes hipoglicemiantes orais e a farmacologia do pâncreas endócrino. In: GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. G.; GILMAN, A. *As bases*

*farmacológicas da terapêutica*. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006. p. 1478-1481.

DEEB, S. E.; PREU, L.; WÄTZIG, H. Evaluation of monolithic HPLC columns for various pharmaceutical separations: Method transfer from conventional phases and batch to batch repeatability. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 44, n. 1, p. 85-95, 2007.

DEJAEGHER, B.; VANDER HEYDEN, Y. Ruggedness and robustness testing. *Journal of Chromatography A*, v. 1158, n.1-2, p. 138-157, 2007.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of Quality Technology*, v. 12, n. 4, p. 214-219, 1980.

DIAS, C. R. C.; ROMANO-LIEBER, N. S. Processo da implantação da política de medicamentos genéricos no Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 22, n. 8, p. 1661-1669, 2006.

DILLS, D. G. et al. Clinical evaluation of glimepiride versus glyburide in NIDDM in a double-blind comparative study. *Hormone and Metabolic Research*, v. 28, n. 9, p. 426-429, 1996.

DOTSIKAS, Y. et al. Development of a rapid method for the determination of glimepiride in human plasma using liquid-liquid extraction based on 96-well format micro-tubes and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 19, n. 14, p. 2055-2061, 2005.

DRAEGER, K. E. et al. Long-term treatment of type 2 diabetic patients with the new oral antidiabetic agent glimepiride (Amaryl<sup>®</sup>): a double-blind comparison with glibenclamide. *Hormone and Metabolic Research*, v. 28, n. 9, p. 419-425, 1996.

EL-REYANI, N. E. et al. Comparison of the efficacy of glibenclamide and glimepiride in reperfusion-induced arrhythmias in rats. *The European Journal of Pharmacology*, v. 365, n. 2-3, p. 187-192, 1999.

EMAMI, J. In vitro - In vivo Correlation: From Theory to Applications. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 9, n. 2, p. 169-189, 2006.

ENDO, T. et al. Polymorphism of glimepiride: crystallographic study, thermal transitions behavior and dissolution study. *STP Pharma Sciences*, v. 13, n. 4, p. 281-286, 2003.

EP. EUROPEAN PHARMACOPOEIA. 6. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2008.

ÉPSHTEIN, N. A. Validation of HPLC techniques for pharmaceutical analysis. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, v. 38, n. 4, p. 40-56, 2004.

ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I. An integrated approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 24, n.5-6, p.755-767, 2001.

EURACHEM GUIDE. *Quantifying uncertainty in analytical measurement*. 2000. Disponível em: <http://www.eurachem.org/>. Acesso em: 25 mai. 2011.

EURACHEM GUIDE. *The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics*. 1998. Disponível em: <http://www.eurachem.org/>. Acesso em: 25 mai. 2011.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância, 2010.

FDA. *Analytical procedures and methods validation*. 2000. Disponível em: <http://www.fda.gov>. Acesso em: 25 mai. 2011.

FDA. *Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms*. 1997. Disponível em: <http://www.fda.gov>. Acesso em: 25 mai. 2011.

FDA. *Electronic Orange Book Query*. Disponível em: [http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Search.Label\\_ApprovalHistory](http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Search.Label_ApprovalHistory). Acesso em: 16 jun. 2011.

FDA. *Pharmaceutical Solid Polymorphism*. 2004. Disponível em: <http://www.fda.gov>. Acesso em: 25 mai. 2011.

FERNANDES, C.; CAMPOS, L. M. M. de; PIANETTI, G. A. Validação de metodologia para doseamento e estudo de equivalência farmacêutica de comprimidos de lamivudina 150 mg. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 39, n. 4, p. 381-389, 2003.

FERREIRA, S. L. C. Application of multivariate techniques in optimization of spectroanalytical methods. *Applied Spectroscopy Reviews*, v. 42, n. 5, p. 475-491, 2007.

FERREIRA, S. L.C. et al. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry-review. *Talanta*, v. 63, n. 4, p. 1061-1067, 2004.

FORTI, A. F.; SCORTICHINI, G. Determination of then sulphonamides in egg by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 637, n. 1-2, p. 214-219, 2009.

FOWLER, M. J. Diabetes treatment, part 2: oral agents for glyceimic management. *Clinical Diabetes*, v. 25, n. 4, p. 131-134, 2007.

GAMBA, V. et al. Development and validation of a confirmatory method for determination of sulphonamides in milk by liquid chromatography with diode array detection. *Analytica Chimica Acta*, v. 637, n.1-2, p. 18-23, 2009.

GEISEN, K. et al. Cardiovascular effects of conventional sulfonylureas and glimepiride. *Hormone and Metabolic Research*, v. 28, n. 9, p. 496-507, 1996.

GOLDBERG, R. B.; HOLVEY, S. M.; SCHNEIDER, J. A dose-response study of glimepiride in patients with NIDDM who have previously received sulfonylurea agents. *Diabetes Care*, v. 19, n. 8, p. 849-856, 1996.

GOYAL, A.; SINGHVI, I. Simultaneous spectrophotometric estimation of rosiglitazone maleate and glimepiride in tablet dosage forms. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 69, n. 6, p. 780-783, 2007.

GRAFFNER, C. Regulatory aspects of drug dissolution from a European perspective. *European journal of pharmaceutical sciences*, v. 29, n. 3-4 (Special issue), p. 288-293, 2006.

GRAY, V. et al. The science of USP 1 and 2 dissolution: present challenges and future relevance. *Pharmaceutical Research*, v. 26, n. 6, p. 1289-1302, 2009.

GRBIC, S. et al. A Contribution to the Glimepiride Dissociation Constant Determination. *The Journal of Chemical and Engineering Data*, v. 55, n. 3, p. 1368-1371, 2010.

HAMAGUCHI, T. et al. Efficacy of glimepiride in type 2 diabetic patients treated with glibenclamide. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 66 (Suppl.), p. S129-132, 2004.

HARRIGAN, R. A.; NATHAN, M. S.; BEATTIE, P. Oral agents for the treatment of type 2 diabetes mellitus: pharmacology, toxicity and treatment. *Annals of Emergency Medicine*, v. 38, n. 1, p. 68-78, 2001.

HERRMANN, M.; KNIRSCH, W.; KRAUTH, R. Glimpiride (Amaryl): Results of a noninterventional study in Germany. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 50 (Suppl), p. S346-S-347, 2000.

HISAZUMI, J. et al. Quantification of pharmaceutical polymorphs and prediction of dissolution rate using theophylline tablet by terahertz Spectroscopy. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 59, n. 4, 442-446, 2011.

HOIZEY, G. et al. Identification and quantification of 8 sulfonylureas with clinical toxicology interest by liquid chromatography–ion-trap tandem mass spectrometry and library searching. *Clinical Chemistry*, v. 51, n. 9, p. 1666-1672, 2005.

HOLSTEIN, A.; PLASCHKE, A.; EGBERTS, E. -H. Lower incidence of severe hypoglycaemia in patients with type 2 diabetes treated with glimepiride versus glibenclamide. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, v. 17, n. 6, p. 467-473, 2001.

HORWITZ, W. Nomenclature of interlaboratory analytical studies (IUPAC Recommendations 1994). *Pure and Applied Chemistry*, v. 66, n. 9, p. 1903-1911, 1994.

HSU, M. C.; HUANG, W. F. Collaborative study of the determination of cloxacillin by column liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, v. 600, n. 2, p. 333-336, 1992.

HUANG, L. -F.; TONG, W. -Q. Impact of solid state properties on developability assessment of drug candidates. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, n. 3, p. 321– 334, 2004.

HYDRIE, M. Z. I. et al. Glimpiride study on type-2 diabetic subjects. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, v. 22, n. 2, p.132-135, 2006.

ICH. *Q1A(R2)*: ICH stability testing of new drug substances and products. 2003. Disponível em: [http://private.ich.org/cache/compo/363-272-1.html#Q1A\(R2\)](http://private.ich.org/cache/compo/363-272-1.html#Q1A(R2)). Acesso em: 16 jun. 2011.

ICH. *Q2(R1)*: Validation of analytical procedures: Text and Methodology. 2005. Disponível em: [http://www.bioforum.org.il/Uploads/Editor/karen/q2\\_r1\\_step4.pdf](http://www.bioforum.org.il/Uploads/Editor/karen/q2_r1_step4.pdf). Acesso em: 16 jun. 2011.

ICH. *Q6A*: Test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances. 1999. Disponível em: <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm134966.htm>. Acesso em: 16 jun. 2011.

INMETRO. *DOQ-CGCRE-008, revisão 03*: Orientação de validação de métodos de ensaios químicos. 2010. Disponível em:

[http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8\\_03.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf).

Acesso em 16 jun. 2011.

ISO. *DGuide 99999*: International vocabulary of basic and general terms in metrology. 2004. Disponível em:

[http://www.iat.es/SIMCE/html/subidas/descarga/international%20vocabulary%20of%20basic%20and%20general%20terms%20in%20metrology%20\(vim\)%20\(draft%20-%202004\).pdf](http://www.iat.es/SIMCE/html/subidas/descarga/international%20vocabulary%20of%20basic%20and%20general%20terms%20in%20metrology%20(vim)%20(draft%20-%202004).pdf). Acesso em 16 jun. 2011.

ISO. *ISO/IEC 17025*: General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. 2008. Disponível em: [http://a2la.org/requirements/A2LA General Requirements for Proficiency Testing.pdf](http://a2la.org/requirements/A2LA%20General%20Requirements%20for%20Proficiency%20Testing.pdf). Acesso em 16 jun. 2011.

JAIN, D. et al. Simultaneous estimation of metformin hydrochloride, pioglitazone hydrochloride, and glimepiride by RP-HPLC in tablet formulation. *Journal of Chromatographic Science*, v. 46, n. 6, p. 501-504, 2008.

JANNUZZI, A. H. L.; VASCONCELLOS, A. G.; SOUZA, C. G de. Especificidades do patenteamento no setor farmacêutico: modalidades e aspectos da proteção intelectual. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 24, n. 6, p. 1205-1218, 2008.

JANTRATID, E. et al. Application of biorelevant dissolution tests to the prediction of *in vivo* performance of diclofenac sodium from an oral modified-release pellet dosage form. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 37, n. 3-4, p. 434-441, 2009.

JIMIDAR, M. I.; HEYLEN, P.; SMET M. de. Method validation. *Separation Science and Technology*, v. 8, n. 1, p. 441-458, 2007.

JOHNSON, E. L. et al. Treatment of diabetes in long-term care facilities: a primary care approach. *Clinical Diabetes*, v. 26, n. 4, p. 152-156, 2008.

KARTHRIK, A. et al. Simultaneous determination of pioglitazone and glimepiride in bulk drug and pharmaceutical dosage form by RP-HPLC method. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 21, n. 4, p. 421-425, 2008.

KATZUNG, B. G. *Farmacologia básica e clínica*. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

- KHAN, I. U. et al. Determination of glimepiride in pharmaceutical formulations using HPLC and first-derivative spectrophotometric methods. *Journal of Analytical Chemistry*, v. 64, n. 2, p. 171–175, 2009.
- KHAN, M. A. et al. LC determination of glimepiride and its related impurities. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 39, n. 5, p. 928-943, 2005.
- KIM, H. et al. Determination of glimepiride in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, v. 25, n. 1, p. 109-114, 2004a.
- KIM, H. et al. Determination of glimepiride in human plasma by LC-MS-MS and comparison of sample preparation methods for glimepiride. *Chromatographia*, v. 60, n. 1-2, p. 93-98, 2004b.
- KOBAYASHI, Y. et al. Physicochemical properties and bioavailability of carbamazepine polymorphs and dehydrate. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 193, n. 2, p. 137–146, 2000.
- KOLTE, B. L. et al. Simultaneous determination of metformin and glimepiride in pharmaceutical dosage form by reverse phase liquid chromatography. *Journal of Separation Science*, v. 28, n. 16, p. 2076-2079, 2005.
- KOMMANABOYINA, B.; RHODES, C. T. Trends in stability testing, with emphasis on stability during distribution and storage. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 25, n. 7, p. 857- 868, 1999.
- KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F. A. C. *Dicionário Terapêutico Guanabara*. ed. 2006/2007. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- KOVAŘÍKOVÁ, P. et al. HPLC study of glimepiride under hydrolytic stress conditions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 36, n.1, p. 205-209, 2004.
- KRAMER, W.; MULLER, G.; GEISEN, K. Characterization of the molecular mode of action of the sulfonylurea, glimepiride, at beta-cells. *Hormone and Metabolic Research*, v. 28, n. 9, p. 464-468, 1996.
- LAKSHMI, K. S. et al. Development and validation of liquid chromatographic and UV derivative spectrophotometric methods for the determination of metformin, pioglitazone and glimepiride in pharmaceutical formulations. *Der Pharma Chemica*, v. 1, n. 1, p. 238-246, 2009.

LECHLEITNER, M.; WEITGASSER, R. Improvement in glycaemic control and weight gain in patients with type 2 diabetes mellitus during long-term treatment with glimepiride. *Acta Medica Austriaca*, v.26, (Suppl), p. S16-S22, 1999.

LEE, A. Y.; ERDEMIR, D.; MYERSON, A. S. Crystal polymorphism in chemical process development. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, v. 2, p. 12.1–12.22, 2011.

LEHR, K. H.; DAMM, P. Simultaneous determination of the sulphonylurea glimepiride and its metabolites in human serum and urine by high-performance liquid chromatography after pre-column derivatization. *Journal of Chromatography*, v. 526, n. 2, p. 497-505, 1990.

LEITE, E. G. *Estabilidade: importante parâmetro para avaliar a qualidade, segurança e eficácia de fármacos e medicamentos*. 2006. 178f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

LIMA, A. C. et al. Força de compressão e umidade no perfil de dissolução da hidroclorotiazida. *Acta Farmacêutica Bonaerense*, v. 25, n. 1, p. 104-107, 2006.

LINSBINSKI, L. M.; DE MUSIS, C. R.; MACHADO, S. R. P. Avaliação da equivalência farmacêutica de comprimidos de captopril. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 89, n. 3, p. 214-219, 2008.

LU, J.; LI, Z.; JIANG, X. Polymorphism of pharmaceutical molecules: perspectives on nucleation. *Frontiers of Chemical Engineering in China*, v. 4, n. 1, p. 37–44, 2010.

LUTEROTTI, S.; KORDIĆ, T. V.; DODIG, S. Simultaneous determination of iron and copper in children's sera by FAAS. *Acta Pharmaceutica*, v. 61, n. 1, p. 93–102, 2011.

MA, H.-L. et al. Polarographic behavior and determination of glimepiride. *Yaoxue Xuebao*, v. 40, n. 8, p. 750-753, 2005.

MA, Z.; MOULTON, B. A novel polymorph of 5-chloro-8-hydroxyquinoline with improved water solubility and faster dissolution rate. *Journal of Chemical Crystallography*, v. 39, n. 12, p. 913-918, 2009.

MAIER, V. et al. Determination of antihyperglycemic drugs in nanomolar concentration levels by micellar electrokinetic chromatography with non-ionic surfactant. *Journal Chromatography A*, v. 1216, n. 20, p. 4492–4498, 2009.

MALESUIK, M. D. et al. Determination of amlodipine in pharmaceutical dosage forms by liquid chromatography and UV spectrophotometry. *Journal of AOAC International*, v. 89, n. 2, p. 359-364, 2006.

MARCOLONGO, R. *Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica*. 2003. 127f. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos)- Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MARQUES, M.; BROWN, W. Desenvolvimento e validação de métodos de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais. *Revista Analytica*, v. 1, n. 1, p. 48-51, 2002.

MASSI-BENEDETTI, M. Glimpiride in type 2 diabetes mellitus: a review of the worldwide therapeutic experience. *Clinical Therapeutics*, v. 25, n. 3, p. 799-816, 2003.

MASTROIANNI, P. C.; LUCCHETTA, R. C. Regulamentação sanitária de medicamentos. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 32, n. 1, p. 127-132, 2011.

MATTHEWS, D. R.; WALLACE, T. M. Sulphonylureas and the rise and fall of beta-cell function. *British Journal of Diabetes and Vascular Disease*, v. 5, n. 4, p. 192-196, 2005.

MAURER, H. H. et al. Screening, library-assisted identification and validated quantification of oral antidiabetics of the sulfonylurea-type in plasma by atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography– mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, v. 773, n. 1, p. 63–73, 2002.

MEINERT, C. L. et al. A study of the effects of hypoglycemic agents on vascular complications in patients with adult-onset diabetes. II. Mortality results. *Diabetes*, v. 19 (Suppl), p. 789-830, 1970.

MONTGOMERY, D. C. *Design and Analysis of Experiments*. New York: Wiley, 2000.

MULLER, G. The molecular mechanism of the insulin-mimetic/sensitizing activity of the antidiabetic sulfonylurea drug amaryl. *Molecular Medicine*, v. 6, n. 11, p. 907-933, 2000.

MULLER, G.; SATOH, Y.; GEISEN, K. Extrapancratic effects of sulfonylureas – a comparison between glimepiride and conventional sulfonylureas. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 28 (Suppl), p. S115-S137, 1995.

NAKASHIMA, K.; IKEDA, R.; WADA, M. Analytical studies on the development of high-performance liquid chromatographic methods with fluorescence or

chemiluminescence detections and their practical applications. *Analytical Sciences*, v. 25, n. 1, p.21-31, 2009.

NETZ, P. A.; ORTEGA, G. G. *Fundamentos de Físico-química: uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas*. Porto Alegre: Artmed, 2002.

NEVADO, J. J. B. Enantiomeric determination, validation and robustness studies of racemic citalopram in pharmaceutical formulations by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, v. 1072, n. 2, p. 249-257, 2005.

NÓBREGA, Í. M. F. et al. Estudo de estabilidade de comprimidos de captopril 25mg acondicionados em blister frente a diferentes tipos de filmes moldáveis. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 87, n. 4, p. 128-131, 2006.

NÚÑEZ, M. et al. Detection of hypoglycemic drugs in human urine using micellar electrokinetic chromatography. *Analytical Chemistry*, v. 67, n. 20, p. 3668-3675, 1995.

O'DONNELL, P. B.; BOKSER, A. D. Stability of Pharmaceutical Products. In: GENNARO, A. (ed). *Remington: the science and practice of pharmacy*. 21. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. p.1025-1036.

PAGE, C. et al. *Farmacologia integrada*. 2. ed. Barueri: Manole, 2004.

PASCHOAL, L. R. et al. Aplicação do método da espectrofotometria de derivadas na identificação e doseamento simultâneo de sistemas multicomponentes. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 39, n. 1, p. 105-113, 2003.

PATEL, J. R.; SUHAGIA, B. N.; PATEL, M. M. Simultaneous estimation of glimepiride and pioglitazone in bulk and in pharmaceutical formulation by HPTLC method. *Asian Journal of Chemistry*, v. 18, n. 4, p. 2873-2878, 2006.

PATHARE, D. B.; JADHAV, A. S.; SHINGARE, M. S. RP-LC Determination of the *cis*-isomer of glimepiride in a bulk drug substance. *Chromatographia*, v. 66, n. 7-8, p. 639-641, 2007.

PAWAR, S. P.; MESHARAM, G. A.; PHADKE.; M. U. Simultaneous LC estimation of glimepiride and metformin in glimepiride immediate release and metformin sustained release tablets. *Chromatographia*, v. 68, n. 11-12, p. 1063-1066, 2008.

PAYGHAN, S. A. et al. Pharmaceutical solid polymorphism: approach in regulatory consideration. *Journal of Global Pharma Technology*, v. 2, n. 1, p. 8-16, 2010.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; PINTO, A. F. *Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos correlatos e cosméticos*. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

PISTOS, C.; KOUTSOPOULOU, M.; PANDERI, I. Improved liquid chromatographic tandem mass spectrometric determination and pharmacokinetic study of glimepiride in human plasma. *Biomedical Chromatography*, v. 19, n. 5, p. 394-401, 2005.

POGATSA, G. What kind of cardiovascular alterations could be influenced positively by oral antidiabetic agents? *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 31 (Suppl), p. S27-S31, 1996.

PUROHIT, R.; VENUGOPALAN, P. Polymorphism: an overview. *Resonance*, v. 14, n. 9, p. 882-893, 2009.7

QUEIROZ, P. C. Prevalência das complicações micro e macrovasculares e de seus fatores de risco em pacientes com diabetes mellitus e síndrome metabólica. *Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica*, v. 9, n. 4, p. 254-258, 2011.

QUENTAL, C. et al. Medicamentos genéricos no Brasil: impactos das políticas públicas sobre a indústria nacional. *Ciência e Saúde Coletiva*, v. 13 (suppl. 1) p. 619-628, 2008.

RANG, H. P. et al. *Farmacologia*. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

RAVICHANDRAN, V. et al. Validation of analytical methods – Strategies & importance. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 2, n. 3, p. 18-22, 2010.

REDDY, V. S. et al. Newer oral antidiabetic agents. *Indian Academy of Clinical Medicine*, v. 1, n. 3, p. 245-251, 2000.

REZENDE, S. M. *Materiais e dispositivos eletrônicos*. 2. ed. São Paulo: Editora Livraria da Física, 2004.

RIBANI, M. validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROBKAMP, R.; WERNICKE-PANTEN, K.; DRAEGER E. Clinical profile of the novel sulphonylurea glimepiride. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 31 (suppl.), p. S33-S42, 1996.

RODRIGUES, L. N. C.; FERRAZ, H. G. Embalagem farmacêutica tipo blíster: escolha de um filme adequado para fármacos sensíveis à umidade. *Revista Analytica*, n. 28, p. 80-86, 2007.

RUMEL, D.; NISHIOKA, S. A.; SANTOS, A. A. M. dos. Intercambialidade de medicamentos: abordagem clínica e o ponto de vista do consumidor. *Revista de Saúde Pública*, v. 40, n. 5, p. 921-9277, 2006.

SACCONI, C. D. et al. Statistical properties of the dissolution test of USP. *Dissolution Technologies*, v. 11, n. 3, p.25-28, 2004.

SAIFEE, M. et al. Drug Polymorphism: A Review. *International Journal of Health Research*, v. 2, n. 4, p. 291-306, 2009.

SAKAGUCHI, H. et al. Crystal Structure of facial-[Bis-(adeninato) (diethylenetriamine)-copper (II)] Monohydrate. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 26, n. 8, p. 2565-2568, 1978.

SALEM, I. I.; IDREES, J.; AL TAMIMI, J. I. Determination of glimepiride in human plasma by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, v. 799, n. 1, p. 103–109, 2004.

SANE, R. T. et al. Simultaneous determination of pioglitazone and glimepiride by high-performance liquid chromatography. *Chromatographia*, v. 59, n. 7-8, p. 451–453, 2004.

SARMA, B. Solid forms of pharmaceuticals: Polymorphs, salts and cocrystals. *Korean Journal of Chemical Engineering*, v. 28, n. 2, p. 315-322, 2011.

SCHNEIDER, J. An overview of the safety and tolerance of glimepiride. *Hormone and Metabolic Research*, v. 28, n. 9, p. 413-418, 1996.

SCHOLZ, G. H. et al. Efficacy and tolerability of glimepiride in daily practice. A non-interventional observational cohort study. *Clinical Drug Investigation*, v. 21, n. 9, p. 597-604, 2001.

SEEDHER, N.; KANOJIA, M. Mechanism of interaction of hypoglycemic agents glimepiride and glipizide with human serum albumin. *Central European Journal of Chemistry*, v. 7, n. 1, p. 96-104, 2009.

SENGUPTA, P. et al. LC–MS–MS Development and validation for simultaneous quantitation of metformin, glimepiride and pioglitazone in human plasma and its

application to a bioequivalence study. *Chromatographia*, v. 69, n. 11-12, p. 1243–1250, 2009.

SERRA, C. H. R.; STORPIRTIS, S. Comparação de perfis de dissolução da cefalexina através de estudos de cinética e eficiência de dissolução (ED%). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 43, n. 1, p. 79-88, 2007.

SHAODONG, J. et al. Comparison of ultraviolet detection, evaporative light scattering detection and charged aerosol detection methods for liquid-chromatographic determination of anti-diabetic drugs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 51, n. 4, p. 973–978, 2010.

SHARGEL, L.; YU, A. B. C. *Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics*. 4. ed. Stamford: Appleton & Lange, 1999.

SHORR, R. I. et al. Incidence and risk factors for serious hypoglycemia in older persons using insulin or sulfonylureas. *Archives of Internal Medicine*, v. 157, n. 15, p. 1681-1686, 1997.

SHRIVASTAVA, A.; GUPTA, V. B. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists*, v. 2, n. 1, p. 21-25, 2011.

SILVA, K. E. R. et al. Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 30, n. 2, p. 1-8, 2009.

SILVA, P. *Farmacologia*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SOHN, Y. T.; KIM, S. H. Polymorphism and pseudopolymorphism of acyclovir. *Archives of Pharmaceutical Research*, v. 31, n. 2, p. 231-234, 2008.

SONG, Y.-K. et al. Determination of glimepiride in human plasma using semi-microbore high performance liquid chromatography with column-switching. *Journal of Chromatography B*, v. 810, n. 1, p. 143-149, 2004.

SONNENBERG, G. E. et al. Short-term comparison of once- versus twice-daily administration of glimepiride in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Annals of Pharmacotherapy*, v. 31, n. 6, p. 671-676, 1997.

SOUZA, J.; FREITAS, Z. M. F.; STORPIRTIS, S. Modelos *in vitro* para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* v. 43, n. 4, p. 515-527, 2007.

STORPIRTIS, S. et al. Equivalência farmacêutica no contexto da intercambialidade entre medicamentos genéricos e de referência: bases técnicas e científicas. *Infarma*, v. 16, n. 9-10, p. 51-56, 2004.

SWANEPOEL, E.; LIEBENBERG, W.; DE VILLIERS, M. M. Quality evaluation of generic drugs by dissolution test: changing the USP dissolution medium to distinguish between active and non-active mebendazole polymorphs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 55, n. 3, p. 345-349, 2003.

SWARTZ, M.; KRULL, I. Analytical Method Validation: Back to Basics, Part I. *LC-GC North America*, v. 27, n. 11, p. 989-995, 2009.

TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; VAN BOCKSTAELE, E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 23, n. 8, p. 535-552, 2004.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. *Quimica Nova*, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. *Pure and Applied Chemistry*, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

TIWARI, G.; TIWARI, R. Bioanalytical method validation: An updated review. *Pharmaceutical methods*, v. 1, n. 1. p. 25-38, 2010.

TOLLER, A. B.; SCHMIDT, C. A. Excipientes à base de celulose e lactose para compressão direta. *Disciplinarum Scientia, série: Ciências da Saúde*. v. 6, n. 1. p. 61-79, 2005.

TSIKAS, D. A proposal for comparing methods of quantitative analysis of endogenous compounds in biological systems by using the relative lower limit of quantification (rLLOQ). *Journal of Chromatography B*, v. 877, n. 23, p. 2244-2251, 2009.

TSUMURA, K. Clinical evaluation of glimepiride (HOE490) in NIDDM, including a double blind comparative study versus gliclazide. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 28 (Suppl), p. S147-S149, 1995.

UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY (UKPDS 13). Relative efficacy of randomly allocated diet, sulphonylurea, insulin, or metformin in patients with newly diagnosed non-insulin dependent diabetes followed for three years. *British Medical Journal*, v. 310, n. 6972, p. 83-88, 1995.

UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY (UKPDS 33). Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes. *Lancet*, v. 352, n. 9131, p. 837-853, 1998.

USP. UNITED STATES PHARMACOPEIA. 32. ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2009.

USP. UNITED STATES PHARMACOPEIA. 34. ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2011.

VEGH, A.; PAPP, J. G. Haemodynamic and other effects of sulphonylurea drugs on the heart. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 31 (Suppl. 1), p. S43-S53, 1996.

VOGT, F. G.; KORD, A. S. K. Development of Quality-By-Design Analytical Methods. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 100, n. 3, p. 797-812, 2011.

WATZIG, H. Validation of analytical methods using capillary electrophoresis. *Separation Science and Technology*, v. 9, n. 1, p. 225-244, 2008.

WHITMIRE, M. L. et al. Nonclinical dose formulation analysis method validation and sample analysis. *The AAPS Journal*, v. 12, n. 4, p. 628-634, 2010.

WHO. *Fortieth Report: WHO expert committee on specifications for pharmaceutical preparations*. 2006. Disponível em: <http://www.who.int/en/>. Acesso em: 16 jun. 2011.

WHO. *Marketing authorization of pharmaceutical products with special reference to multisource (generic) products: a manual for a drug regulatory authority*. 1999. Disponível em: <http://www.who.int/en/>. Acesso em: 16 jun. 2011.

YAO, J.; SHI, Y. -Q.; LI, Z.- R.; JIN, S. -H. Development of a RP-HPLC method for screening potentially counterfeit anti-diabetic drugs. *Journal of Chromatography B*, v. 853, n. 1-2, p. 254-259, 2007.

YOU DEN, W. J.; STEINER, E. H. *Statistical manual of AOAC*. Washington: Association of Official Analytical Chemistry, 1975.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

YU, L. X. et al. Scientific considerations of pharmaceutical solid polymorphism in abbreviated new drug applications. *Pharmaceutical Research*, v. 20, n. 4, p. 531-536, 2003.

YÜZÜAK, N. et al. Determination of glimepiride in human plasma by LC-MS-MS. *Chromatographia*, v. 66, (Suppl. 1), p. S165-S168, 2007.

### GLIMEPIRIDA COMPRIMIDOS

Contém, no mínimo, 95,0% e, no máximo, 105% da quantidade declarada de  $C_{24}H_{34}N_4O_5S$ .

#### IDENTIFICAÇÃO

O tempo de retenção da banda principal do cromatograma da *Solução amostra*, obtida no método **B.** de *Doseamento*, corresponde àquele da banda principal da *Solução padrão*.

#### CARACTERÍSTICAS

**Determinação de peso (5.1.1).** Cumpre o teste.

**Teste de dureza (5.1.3.1).** Cumpre o teste.

**Teste de friabilidade (5.1.3.2).** Cumpre o teste.

**Teste de desintegração (5.1.4.1).** Cumpre o teste.

**Uniformidade de doses unitárias (5.1.6).** Cumpre o teste.

*Procedimento para uniformidade de conteúdo.* Transferir individualmente 10 comprimidos para balões volumétricos de 50 mL, adicionar 40 mL de metanol e deixar em ultrassom até a desintegração do comprimido. Completar o volume com o metanol e filtrar. Diluir o filtrado para a concentração final de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  utilizando fase móvel como solvente. Prosseguir conforme descrito no método **B.** de *Doseamento* a partir de *Solução padrão*.

**TESTE DE DISSOLUÇÃO (5.1.5)**

*Meio de dissolução:* Tampão fosfato de sódio pH 6,8 (50 mmol L<sup>-1</sup>) contendo 0,1% de lauril sulfato de sódio, 1000 mL.

*Aparelhagem:* pás, 50 rpm

*Tempo:* 60 minutos

*Procedimento:* após o teste, retirar alíquota do meio de dissolução, e proceder conforme descrito no método **B.** de *Doseamento*. Calcular a quantidade de C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>S dissolvida no meio, comparando as áreas das bandas cromatográficas obtidas com a solução de glimepirida SQR na concentração de 4 µg mL<sup>-1</sup>, preparada da seguinte forma:

*Solução padrão para ensaio de dissolução:* pesar exatamente 10,0 mg de glimepirida SQR e transferir para balão volumétrico de 50 mL. Adicionar cerca de 40 mL de metanol e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com o mesmo solvente e filtrar. Diluir o filtrado para a concentração final de 4 µg/mL utilizando *Meio de dissolução* como solvente.

*Tolerância:* não menos que 80% (Q) da quantidade declarada de C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>S se dissolvem em 60 minutos.

**ENSAIOS DE PUREZA****Substâncias relacionadas.**

*Solução amostra:* Proceder conforme descrito no método **B.** de *Doseamento*.

*Procedimento:* injetar 20 µL da *Solução amostra*, registrar os cromatogramas, medir a área da banda de glimepirida e medir as áreas individuais de todas as outras bandas obtidos a partir da *Solução amostra*. Calcular a quantidade de qualquer impureza desconhecida a partir da fórmula:

$$100 X (A_i/A_s)$$

em que:  $A_i$  é a área individual obtida de cada banda e  $A_s$  é somas das áreas de todas as bandas.

O limite é de 0,5% para cada impureza e de 3,5% para o total de impurezas.

#### DOSEAMENTO

**A.** Por *Espectrofotometria de absorção no ultravioleta (5.2.14)*. Pesar e pulverizar 20 comprimidos. A partir do peso médio, pesar a quantidade de pó equivalente a 4 mg de glimepirida e transferir para balão volumétrico de 50 mL. Adicionar cerca de 40 mL de hidróxido de sódio a 5 mmol L<sup>-1</sup> e levar ao ultrassom por 30 minutos. Completar o volume com o mesmo solvente e filtrar. Diluir o filtrado para a concentração final de 10 µg mL<sup>-1</sup> utilizando hidróxido de sódio a 5 mmol L<sup>-1</sup> como solvente. Preparar solução padrão, na mesma concentração, utilizando o mesmo solvente. Efetuar a varredura espectral na faixa de 200 a 300 nm. Obter o espectro de segunda derivada das curvas, utilizando delta lambda ( $\Delta\lambda$ ) de 8 nm. Medir os valores de amplitude a partir do espectro de segunda derivada em unidades de distância dos picos em relação à linha de base nos comprimentos de onda de 279,0; 257,5 e 256,3 nm para quantificação de comprimidos contendo 1 mg, 2 mg e 4 mg

de glimepirida, respectivamente. Calcular a quantidade de  $C_{24}H_{34}N_4O_5S$  nos comprimidos, a partir das respostas obtidas.

**B. Por cromatografia líquida de alta eficiência (5.2.17.4).** Utilizar cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 228 nm, coluna de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (5  $\mu$ m), mantida à temperatura ambiente; vazão de fase móvel de 1,0 mL/minuto.

*Fase móvel:* dissolver 0,94 g de fosfato de sódio monobásico monoidratado ( $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ ) em 340 mL de água. Ajustar o pH em 6,5 com solução de hidróxido de sódio 1 mol  $L^{-1}$ . Adicionar 660 mL de metanol e homogeneizar.

*Solução amostra:* pesar e pulverizar 20 comprimidos. A partir do peso médio, pesar a quantidade de pó equivalente a 4 mg de glimepirida e transferir para balão volumétrico de 50 mL. Adicionar cerca de 40 mL de metanol e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com o mesmo solvente e filtrar. Diluir o filtrado para a concentração final de 10  $\mu$ g/mL utilizando fase móvel como solvente.

*Solução padrão:* pesar exatamente 12,5 mg de glimepirida SQR e transferir para balão volumétrico de 250 mL. Adicionar cerca de 200 mL de metanol e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com o mesmo solvente e filtrar. Diluir o filtrado para a concentração final de 10  $\mu$ g/mL utilizando fase móvel como solvente.

Injetar replicatas de 20  $\mu$ L da *Solução padrão*. O desvio padrão relativo das áreas de replicatas das bandas cromatográficas registradas não deve ser maior que 2%.

*Procedimento:* injetar, separadamente, 20 µL das *Soluções padrão e amostra*, registrar os cromatogramas e medir as áreas sob as bandas cromatográficas. Calcular o teor de  $C_{24}H_{34}N_4O_5S$  na amostra a partir das respostas obtidas para a *Solução padrão e Solução amostra*.

#### EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes bem fechados.

#### ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.