



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA UNESP

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA-BIOQUÍMICA

“Análise químico-farmacêutica de cápsulas de glimepirida”

Carolina Peres

**ARARAQUARA-SP
2013**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA UNESP

“Análise químico-farmacêutica de cápsulas de glimepirida”

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de Araraquara,
da Universidade Estadual Paulista como
parte dos requisitos para a obtenção do
grau de Farmacêutico-Bioquímico.

Aluna: Carolina Peres

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Hérica Regina Nunes Salgado

Co-orientador: Prof. Dr. Rudy Bonfilio

AGRADECIMENTOS

À Deus, em primeiro lugar, por me dar força e perseverança para a conclusão deste trabalho.

À minha família, pelo amor, carinho e apoio nos mais diversos momentos, me estimulando sempre a seguir em frente.

À minha querida amiga e orientadora, Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado, pelo apoio para realização deste trabalho e todos ensinamentos que carregarei ao longo de minha vida.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Rudy Bonfilio pela amizade e por todo conhecimento transmitido ao longo deste trabalho.

A Fapesp e ao CNPq pelas bolsas concedidas.

Sumário

Lista de abreviaturas e siglas	7
Lista de Figuras	8
Lista de Tabelas	13
Resumo.....	15
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1. Material	21
3.1.2. Equipamentos.....	17
3.2. Métodos	18
3.2.2. Preparo da solução-amostra	18
3.2.3. Preparo da solução tampão fosfato pH 6,8.....	19
3.2.4. Preparo da solução tampão universal pH 3,5.....	19
3.2.5. Avaliação de aspecto e peso médio das cápsulas	19
3.2.5.1. Resultados e Discussão	26
3.2.6. Estudo dos adjuvantes utilizados nas amostras	21
3.2.6.1. Método.....	32
3.2.6.2. Resultados e Discussão	32
3.2.7. Validação de método analítico	32
3.2.7.1. Método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	33
3.2.7.1.1. Linearidade.....	33
3.2.7.1.2. Seletividade.....	30

3.2.7.1.3. Precisão	30
3.2.7.1.4. Exatidão do método avaliada pelo teste de recuperação	31
3.2.7.1.5. Robustez	31
3.2.7.1.6. Limite de detecção e limite de quantificação	31
3.2.7.1.7. Resultados e Discussão	36
3.2.7.1.7.1. Linearidade	36
3.2.7.1.7.2. Seletividade.....	36
3.2.7.1.7.3. Precisão	37
3.2.7.1.7.4. Exatidão do método avaliada pelo teste de recuperação	38
3.2.7.1.7.5. Robustez	39
3.2.7.1.7.6. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....	40
3.2.7.1.7.7. Conclusão	40
3.2.8. Método Espectrofotométrico na região do Ultravioleta.....	41
3.2.8.1. Obtenção da curva de Ringbom	43
3.2.8.2. Obtenção da curva analítica.....	44
3.2.8.3. Linearidade.....	40
3.2.8.4. Seletividade.....	45
3.2.8.5. Precisão	46
3.2.8.6. Exatidão pelo método da recuperação	49
3.2.8.7. Robustez	49
3.2.8.8. Limite de detecção e limite de quantificação	51
3.2.8.9. Conclusão	51
3.2.9. Método Espectrofotométrico na região do Visível	51
3.2.9.1. Reação com cloreto férrico (FeCl_3)	52

3.2.9.1. Material	52
3.2.9.2. Preparo da solução padrão de glimepirida	52
3.2.9.3. Preparo do reagente cloreto férrico 1,0%	52
3.2.9.4. Método.....	53
3.2.9.5. Resultados e Discussão	53
3.2.10. Reação com sulfato de cobre	54
3.2.10.1. Material	50
3.2.10.2. Preparo da solução padrão de glimepirida	54
3.2.10.3. Preparo do reagente sulfato de cobre 8%	54
3.2.10.4. Método.....	55
3.2.10.5. Resultados e Discussão	55
3.2.11. Reação com Vermelho de Congo	55
3.2.11.1. Material	56
3.2.11.2. Preparo da solução padrão de glimepirida	56
3.2.11.3. Preparo do reagente Vermelho de Congo	56
3.2.11.4. Método.....	56
3.2.11.5. Resultados e Discussão	57
4. CONCLUSÃO	58
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

Lista de abreviaturas e siglas

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CAS – *Chemical Abstracts Service*

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DM2 - Diabetes Mellitus Tipo 2

DPR – Desvio Padrão Relativo

FCR – Folin-Ciocalteu

FM – Fase móvel

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

SQR – Substância Química de referência

UV – Ultravioleta

Vis - Visível

v/v – volume em volume

WHO – World Health Organization

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura química das sulfonilureias	13
Figura 2. Estrutura química da glimepirida (CAS 93479-97-1).....	15
Figura 3. Espectro de absorção de solução de estearato de magnésio de concentração de 4µg/mL.....	24
Figura 4. Espectro de absorção de solução de aerosil, em concentração de 4µg/mL	25
Figura 5. Espectro de absorção de solução de celulose, em concentração de 4µg/mL	25
Figura 6. Espectro de absorção de solução de talco, em concentração de 4µg/mL	26
Figura 7. Espectro de absorção de solução de amido, em concentração de 4µg/mL	26
Figura 8. Espectro de absorção de lauril sulfato de sódio, em concentração de 4µg/mL.....	27
Figura 9. Espectro de absorção de todos os adjuvantes, em concentração de 4µg/mL.....	27
Figura 10. Espectro de absorção da solução padrão de glimepirida, em concentração de 4µg/mL.....	28
Figura 11. Curva Analítica da determinação de glimepirida por CLAE, fase móvel metanol:água purificada (80:20 v/v), vazão 1,0 mL/min, fase estacionária coluna Coluna Symmetry Waters C ₁₈ 5µm 4,6 x 250 mm	32
Figura 12. Cromatograma dos adjuvantes (A) presentes nas amostras A, B e C e do padrão de glimepirida (B) utilizando fase móvel metanol:água purificada (80:20	

v/v), vazão 1,0 mL/min, fase estacionária coluna Coluna Symmetry Waters C₁₈ 5µm 4,6 x 250 mm..... 33

Figura 13. Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região de ultravioleta para solução padrão de glimepirida, utilizando tampão fosfato monobásico de sódio pH 6,8 como solvente, no comprimento de onda de 228 nm..... 35

Figura 14. Representação gráfica da curva analítica de solução de padrão de glimepirida obtida pelo método espectrofotométrico na região de ultravioleta, no comprimento de onda de 228 nm..... 41

Lista de Tabelas

Tabela 1. Peso médio e desvio padrão das amostras A, B e C de cápsulas de glimepirida de 4 mg	21
Tabela 1. Adjuvantes das amostras A, B e C de cápsulas de glimepirida contendo 4 mg.	23
Tabela 3. Condições cromatográficas utilizadas por CLAE para desenvolvimento de método para quantificação de glimepirida em cápsulas	29
Tabela 4. Ensaio de repetibilidade e precisão intermediária de glimepirida na concentração de 5µg/mL	34
Tabela 5. Resultados do teste de exatidão do método avaliada pela recuperação.	35
Tabela 6. Condições avaliadas no ensaio de robustez.....	36
Tabela 7. Preparo da curva de Ringbom de solução padrão de glimepirida pelo método espectrofotométrico na região de ultravioleta a 228 nm	38
Tabela 8. Valores de absorvância determinados para a curva analítica de solução padrão de glimepirida pelo método espectrofotométrico na região de ultravioleta a 228 nm.....	40
Tabela 9. Valores obtidos para a repetibilidade intermediária do método espectrofotométrico na região de ultravioleta a 228 nm da amostras de glimepirida	42
Tabela 10. Valores obtidos para a precisão intermediária do método espectrofotométrico na região de ultravioleta a 228 nm das amostras de glimepirida	43
Tabela 11. Preparo das soluções de para o teste de recuperação do método espectrofotométrico.	43

Tabela 12. Teste de recuperação de amostras de cápsulas de glimepirida no método espectrofotométrico.	44
Tabela 13. Teores das cápsulas de glimepirida no ensaio de robustez de método espectrofotométrico	46

Resumo

O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é uma doença metabólica crônica progressiva resultante da deficiência absoluta ou relativa de secreção de insulina ou resistência nos tecidos sensíveis à insulina. As sulfonilureias pertencem a um grupo de hipoglicemiantes orais comumente prescritos e sua ação se deve à ligação a um receptor na membrana plasmática das células beta pancreáticas, resultando na secreção de insulina pré-formada. A glimepirida, pertencente a 2ª geração das sulfonilureias, é um medicamento comercializado no mercado brasileiro na forma de comprimidos e cápsulas. A frequência de sua utilização é justificada pelos seus benefícios terapêuticos em relação a outras sulfonilureias, pois a glimepirida alcança controle metabólico com as menores doses de todas as sulfonilureias (1 a 8 mg diariamente). Além disso, mantém uma melhor regulação fisiológica de secreção de insulina durante o exercício físico. Embora a literatura relate alguns estudos analíticos em periódicos de circulação internacional para determinação de glimepirida em comprimidos, não existe, até o momento, metodologia descrita para análise do fármaco em cápsulas em Farmacopeias, nem monografia para o produto acabado nessa forma farmacêutica. Portanto, os resultados obtidos nesses estudos serão essenciais para a elaboração de uma monografia farmacopeica para o produto acabado. Neste período foi realizado a validação de novo método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e método espectrofotométrico na região ultravioleta para análise de cápsulas de glimepirida. Previamente, realizou-se o estudo sobre a interferência de todos os excipientes que compunham as amostras adquiridas comercialmente.

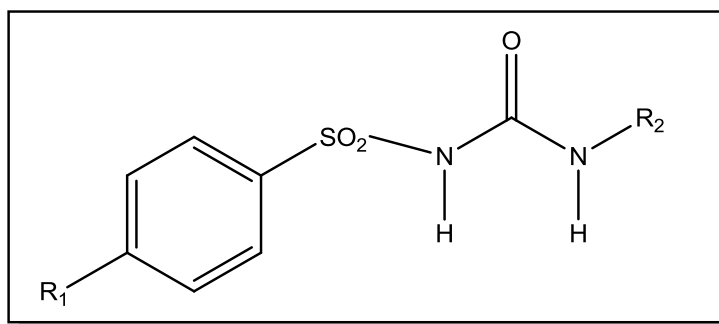
Palavras-chave: glimepirida, cápsulas, controle de qualidade, método espectrofotométrico na região ultravioleta, validação de método analítico, cromatografia líquida de alta eficiência.

1. INTRODUÇÃO

Há um número crescente de indivíduos diabéticos em todo o mundo, principalmente nos países em desenvolvimento (WILD et al., 2004). Estima-se que cerca de 90% desses indivíduos sejam portadores de diabetes mellitus (DM) do tipo 2. A estimativa é que até 2030 a incidência de DM2 nos países em desenvolvimento dobrará (WHO, 2013). O tratamento comumente utilizado para o DM2 consiste em dietas e exercícios físicos adequados. Entretanto, nos casos em que mesmo o tratamento usual não resulta em regularidade no metabolismo, faz-se necessário o uso de medicamentos hipoglicemiantes orais (SONG et al., 2004).

As sulfonilureias são fármacos hipoglicemiantes que aumentam a secreção de insulina, sendo, portanto, denominados secretagogos da insulina (COOK, 1995; KATZUNG, 2006) e são um dos grupos de antidiabéticos orais mais prescritos atualmente. As sulfonilureias apresentam um radical sulfona ligado a um grupo ureia. Todos os membros dessa classe são, portanto, arilsulfonilureias substituídas, diferindo por substituições na posição *para* do anel de benzeno (R₁) e um resíduo de nitrogênio do componente ureia (R₂) (DAVIS, 2006; SILVA, 2006). Sua estrutura química está representada na Figura 1.

Figura 1 – Estrutura química das sulfonilureias.



A principal ação das sulfonilureias consiste em aumentar a liberação de insulina pelo pâncreas, reduzindo, assim o nível plasmático de glicose (RANG et al., 2004). Essa ação se deve à ligação da sulfonilureia a um receptor de alta afinidade (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). Além destes efeitos, as sulfonilureias inibem a liberação de glicose pelo fígado e potencializam a atividade insulínica presente, diminuindo a insulinase e aumentando a concentração de sítios receptores de insulina nas superfícies de células mononucleares e de adipócitos (SILVA, 2006).

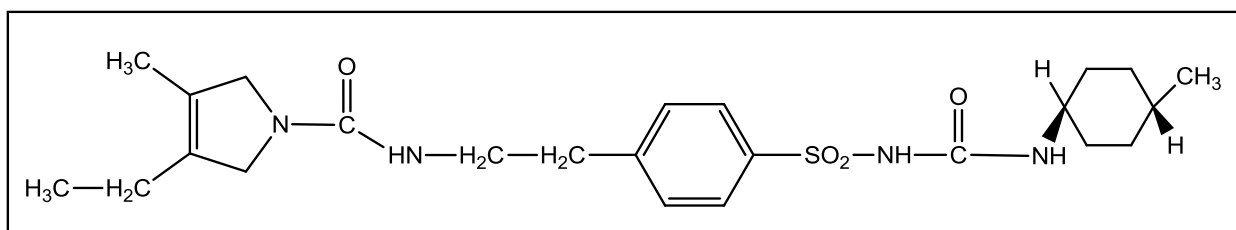
Há duas gerações de sulfonilureias. A primeira geração inclui a tolbutamida, acetoexamida, tolazamida e clorpropamida. A segunda geração, mais potente, inclui a gliburida (glibenclamida), glipizida, glicazida e glimepirida (DAVIS, 2006). As sulfonilureias de segunda geração são mais frequentemente prescritas, visto que apresentam menos efeitos adversos e menos interações medicamentosas (KATZUNG, 2006; KOROLKOVAS, FRANÇA, 2006).

A glimepirida alcança controle metabólico com as menores doses de todas as sulfonilureias (1 a 8 mg diariamente). Após a administração oral a glimepirida é completamente absorvida (100%) após 1 hora e picos máximos são atingidos em 2 a 3 horas (FDA, 2013). O fármaco apresenta longa duração de ação, com meia-vida de 5 horas, permitindo a sua administração uma vez ao dia, com consequente melhora da aderência do paciente ao tratamento. A glimepirida é

totalmente metabolizada pelo fígado a produtos inativos (KATZUNG, 2006). Aproximadamente 60% da glimepirida e seus metabólitos são excretados na urina e 40% são excretados nas fezes (FDA, 2013).

A glimepirida 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-metilciclohexil) ureia (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008). Sua estrutura química está representada na Figura 2.

Figura 2. Estrutura química da glimepirida (CAS 93479-97-1).



A fórmula molecular da glimepirida é $C_{24}H_{34}N_4O_5S$ e possui peso molecular de 490,62 (FDA, 2013). É praticamente insolúvel em água, solúvel em dimetilformamida, levemente solúvel em diclorometano e muito pouco solúvel em metanol (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008). A estrutura da glimepirida com um grupamento sulfonilureia, um grupo carboxamida, um anel lactâmico e uma carbonila α,β -insaturada favorece a degradação devido à instabilidade destes grupos funcionais frente a hidrólises e fotólises (BANSAL et al., 2008). A glimepirida caracteriza-se por estimular a secreção de insulina, ligando-se a um receptor específico na célula β , que determina o fechamento dos canais de potássio dependentes de ATP, resultando em despolarização da célula. O influxo de cálcio secundário à despolarização causa liberação de insulina, que potencializa a ação insulínica no tecido muscular, adiposo e no fígado,

diminuindo a produção hepática de glicose (YOUNG et al., 2001).

Tendo em vista a frequente prescrição de glimepirida em cápsulas, de acordo com um levantamento realizado no município de Araraquara, onde 66,7% das farmácias magistrais manipulam o medicamento, esse trabalho de conclusão de curso objetiva avaliar a qualidade de cápsulas de glimepirida comercializados no mercado nacional através dos seguintes ensaios de qualidade físico-química preconizados pelas farmacopeias, além da validação de novos métodos de análise para a glimepirida cápsulas. Assim sendo, os métodos serão validados baseado no desenvolvimento e validação de método já realizados pelo Doutorando Rudy Bonfilio para análise de comprimidos de glimepirida na apresentação de 1, 2 e 4 mg, desenvolvido no projeto de doutorado “Análise químico-farmacêutica de glimepirida comprimidos” e segundo diretrizes estabelecidas por órgãos nacionais e internacionais como ICH, ISO, ANVISA, INMETRO (ICH Q2B, 1996; INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION, 1999; BRASIL, 2003; INMETRO, 2003).

2. OBJETIVOS

- Validação de método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Estudo da interferência dos adjuvantes das amostras na identificação e quantificação do fármaco em Espectrofotômetro;
- Validação de método espectrofotométrico na região ultravioleta;
- Desenvolvimento de método espectrofotométrico na região do visível.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Soluções e Reagentes

A matéria prima utilizada foi a 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] sulfonil]-3-(trans-4-metilciclohexil) ureia. O padrão primário utilizado na padronização foi a glimepirida adquirida da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA) com teor de 100,12%.

As amostras desta pesquisa foram cápsulas contendo 4 mg de glimepirida (teor rotulado) adquiridos em três diferentes farmácias magistrais da cidade de Araraquara. Os produtos foram identificados como produto A, produto B e produto C.

O solvente utilizado na espectrofotometria foi hidróxido de sódio 5×10^{-3} mol/L.

3.1.2. Equipamentos

- “Aparelho de ultrassom SONICATOR – ULTRASONIC LIQUIDPROCESSOR”, HEAT SYSTEMS, modelo XL 2020;
- Balança analítica METTLER, modelo H10;
- Bomba de vácuo Nova técnica;
- Cromatógrafo líquido Waters HPLC, composto de bomba cromatográfica gradiente binária Waters 1525, injetor manual Rheodyne Breeze 7725i e detetor UV-Vis Waters 2487. Coluna Symmetry Waters C₁₈ 5 μm 4,6 x 250mm e pré-coluna Symmetry Waters C₁₈ 5 μm 3,9 x 20mm;
- Espectrofotômetro SHIMADZU – UV Mini – 1240;
- Peagômetro METTLER, modelo Delta 345;
- Sistema de purificação de água Millipore Direct-Q.

3.2. Métodos

3.2.1. Preparo da solução-padrão de glimepirida

Foram pesados, exatamente, 4 mg de glimepirida substância de referência (glimepirida-SQR), e transferidos para balão volumétrico de 100 mL. A substância foi dissolvida em solvente adequado. A solução permaneceu por 5 minutos no ultrassom e após isso o volume do balão foi completado, obtendo-se solução com concentração final de 40 μg/mL. Esta solução foi filtrada com papel de filtro quantitativo. Posteriormente, a solução foi diluída em solvente adequado, de acordo com o método utilizado.

3.2.2. Preparo da solução-amostra

Para a determinação do teor de glimepirida, realizou-se primeiramente o peso médio das cápsulas conforme descrito no item 3.2.5. A quantidade de pó equivalente a 4 mg de glimepirida foi exatamente pesada e transferida para balão volumétrico de 100 mL. A substância foi dissolvida em solvente adequado e após permanecer 5 minutos no ultrassom, o volume do balão foi completado, obtendo-se solução com concentração final de 40 µg/mL. Esta solução foi filtrada com papel de filtro quantitativo, desprezando-se os primeiros 5mL da solução. Posteriormente, a solução foi diluída em solvente adequado, utilizando balão volumétrico, de acordo com o método utilizado.

3.2.3. Preparo da solução tampão fosfato pH 6,8

Primeiramente foi preparada solução de fosfato de sódio monobásico a 0,5 mol/L e solução de ácido cítrico a 0,1 mol/L. Para a preparação do tampão fosfato pH 6,8 foram utilizados 154,6 mL da solução de Na_2HPO_4 e 45,4 mL de solução de ácido cítrico. O pH foi corrigido para pH 6,8 com adição de ácido cítrico e após disso, completou-se volume para 2 litros.

3.2.4. Preparo da solução tampão universal pH 3,5

Para o preparo da solução tampão universal, foram utilizados 2,47 mL de ácido bórico, 2,3 mL de ácido acético glacial e 2,3 mL de ácido fosfórico. O pH foi corrigido com auxílio de hidróxido de sódio para o valor de pH 3,5 e após isso, completou-se o volume para 1 litro.

3.2.5. Avaliação de aspecto e peso médio das cápsulas

As cápsulas foram observadas quanto ao seu aspecto, e as características foram definidas em função da cor, odor, tamanho e incompatibilidade física do produto, pois alterações no aspecto podem evidenciar comprometimento na qualidade.

A determinação do peso médio das cápsulas foi realizada pela diferença dos valores individuais obtidos entre a cápsula cheia e vazia. Foi tolerado, no máximo, limites de variação de $\pm 10,0\%$ até 300,00 mg e desvio de $\pm 7,5\%$ acima de 300,00 mg. Se uma (ou mais cápsulas) estivessem fora dos limites indicados, seria adotado o segundo critério definido pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição (FARMACOPEIA, 2010).

3.2.5.1. Resultados e Discussão

As amostras apresentaram-se inodoras em tamanho nº 4 e sem nenhuma alteração no formato. A amostra A apresentou-se de coloração branca, a B incolor e a C azul escuro/azul claro.

O peso médio de cada amostra foi realizado com o pó de 20 cápsulas. O cálculo foi realizado com o peso da cápsula cheia subtraindo-se o peso da cápsula vazia.

Tabela 1. Peso médio e desvio padrão das amostras A, B e C de cápsulas de glimepirida de 4 mg.

Cápsulas	Amostras		
	A	B	C
1	0,1012	0,1023	0,1116
2	0,1003	0,1057	0,1041
3	0,1035	0,1014	0,1103
4	0,0957	0,1039	0,1100
5	0,1042	0,1032	0,1139
6	0,0980	0,1033	0,1079
7	0,0934	0,1016	0,1134
8	0,0955	0,1006	0,1113
9	0,1005	0,1037	0,1088
10	0,1023	0,0987	0,1113
11	0,0974	0,1044	0,1072
12	0,0944	0,1021	0,1106
13	0,1050	0,1010	0,1142
14	0,0928	0,1005	0,1100
15	0,0951	0,1003	0,1092
16	0,1081	0,0996	0,1132
17	0,1037	0,0965	0,1072
18	0,0987	0,1033	0,1062
19	0,1069	0,1011	0,1083
20	0,1003	0,0991	0,1109
Peso médio	0,0999	0,1016	0,1100
DP	0,0045	0,0022	0,0027

Como o limite de variação permitido é de $\pm 10,0\%$ para cápsulas com até 300 mg, todas as amostras obtiveram limites de variação dentro do permitido.

3.2.6. Estudo dos adjuvantes utilizados nas amostras

Como houve interferência dos adjuvantes na identificação e quantificação das amostras de glimepirida no método ultravioleta e no método visível, realizou-

se um estudo sobre esta interferência. Analisou-se separadamente cada excipiente e posteriormente associados. As absorvâncias obtidas foram comparadas com a absorvâncias da substância padrão de glimepirida na mesma concentração.

3.2.6.1. Método

Os adjuvantes foram pesados equivalentes a um peso médio, ou seja, uma cápsula de 4 mg de glimepirida, transferidos para balão volumétrico de 100 mL. As substâncias foram dissolvidas em hidróxido de sódio 5×10^{-3} mol/L e permaneceram por 30 minutos no ultrassom e após isso, completou-se o volume do balão para obtenção de solução com concentração final de 40 µg/mL. As soluções foram filtradas com papel de filtro quantitativo e diluídas em balão volumétrico de 10 mL, chegando a concentração de 4 µg/mL.

A solução padrão de glimepirida recebeu o mesmo tratamento das soluções de adjuvantes.

As análises de absorvâncias foram realizadas em dois espectrofotômetros diferentes para avaliar a confiabilidade do equipamento.

3.2.6.2. Resultados e Discussão

Os adjuvantes das amostras A, B e C estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Adjuvantes das amostras A, B e C de cápsulas de glimepirida contendo 4 mg.

Amostras	Adjuvantes	%
A	Talco	20,0
	Amido de milho	80,0
B	Estearato de magnésio	6,2
	Aerosil	12,5
	Lauril sulfato de sódio	12,5
	Talco	37,5
	Amido de milho	31,3
C	Estearato de magnésio	1,0
	Aerosil	1,0
	Celulose	10,0
	Talco	5,0
	Amido de milho	83,0

O talco é utilizado como excipiente de cápsulas e comprimidos como diluente (5-30%) e lubrificante (1-10%). A celulose tem a função de diluente (20 - 90%) e desintegrante (5-15%) que a tornam úteis em comprimidos. O estearato de magnésio é utilizado principalmente como um lubrificante em cápsulas e comprimidos em concentrações entre 0,25% e 5,0%. O aerosil (dióxido de sílica coloidal) por possuir partículas muito pequenas (15 nm) e grande área de superfície, dá uma característica deslizando e desintegrante às formulações, principalmente em processos de industrialização fabricação de comprimidos. O lauril sulfato de sódio (LSS) é um tensoativo e um agente de umedecimento, utilizado como lubrificante, principalmente em comprimidos (1-2%). O amido de milho pode ser utilizado em cápsulas e comprimidos como diluente (20-90%), desintegrante (3-15%) e aglutinante (5-25%) (HANDBOOK, 2006).

Analisando a amostra A, é possível concluir que a formulação está adequada, pois o talco e o amido, nas concentrações apresentadas, estão sendo

utilizados como diluente.

A amostra B possui porcentagens inadequadas de adjuvantes. Primeiramente, o LSS por ser um tensoativo e agente de umedecimento, além de ser desnecessário, está em uma concentração além da adequada permitida para a forma farmacêutica cápsula e/ou comprimido, sendo que a quantidade máxima aceitável é de 2%. O aerosil não é importante para cápsulas, já que tem caráter deslizante e desintegrante. O estearato de magnésio possui ação lubrificante, entretanto sua concentração está acima da recomendada. Por fim, o talco está nesta formulação como diluente, entretanto, está extrapolando a quantidade recomendada, que seria de 30% em cápsulas.

A amostra C, igualmente à A, está adequada, pois possui porcentagens aceitáveis de adjuvantes.

Nas figuras a seguir estão representados os espectros de absorvâncias obtidos dos adjuvantes separadamente, associados e da solução padrão de glimepirida, todos em concentrações de 4 µg/mL.

Figura 3. Espectro de absorção na região do ultravioleta de estearato de magnésio, em concentração de 4 µg/mL.

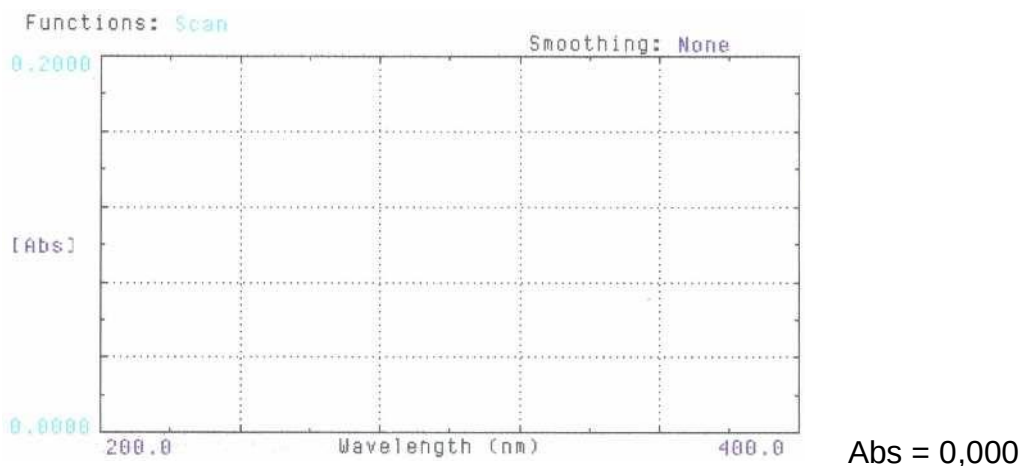


Figura 4. Espectro de absorção na região do ultravioleta de aerosil, em concentração de 4 µg/mL.

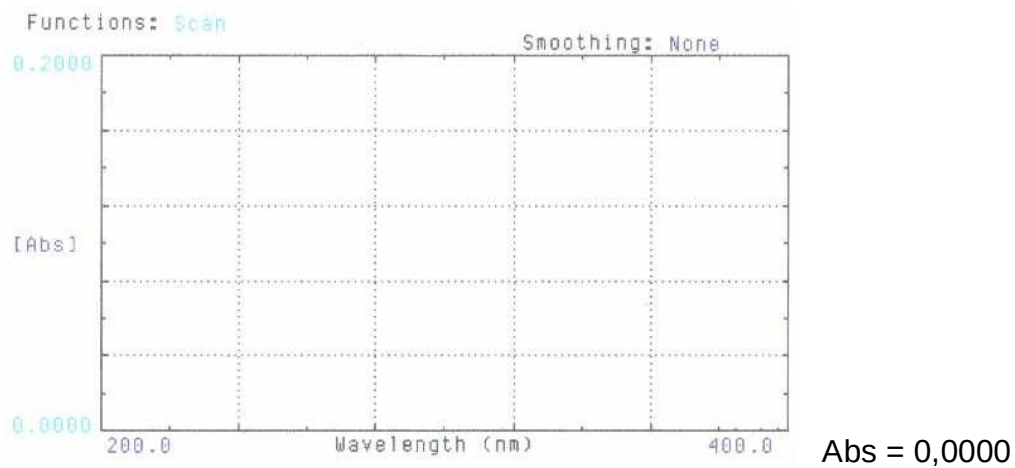


Figura 5. Espectro de absorção na região do ultravioleta de celulose, em concentração de 4 µg/mL.

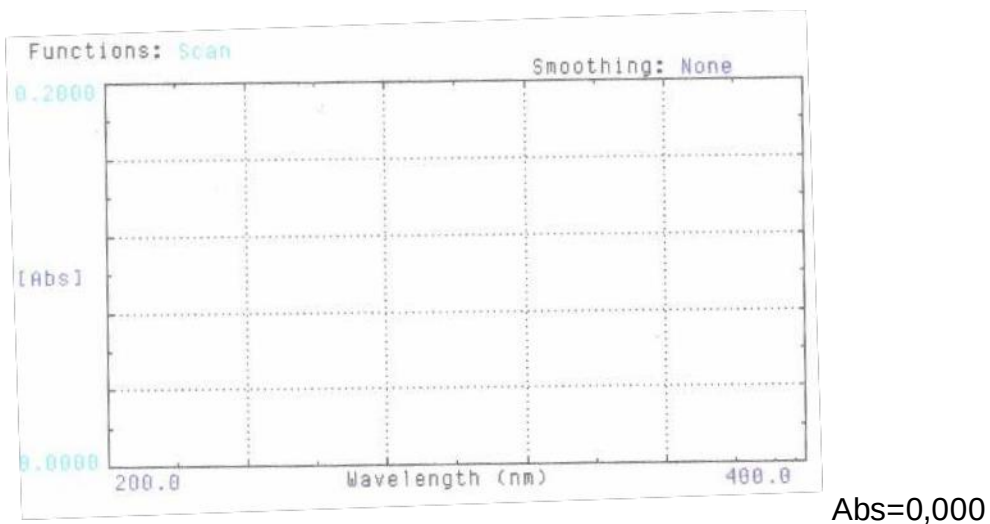
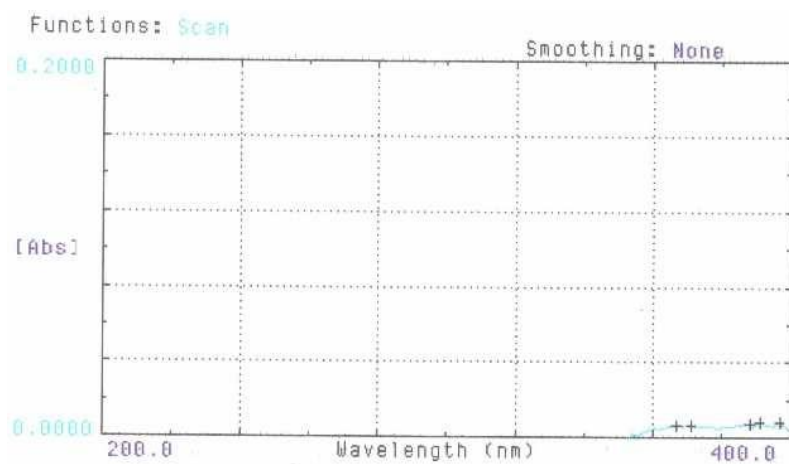
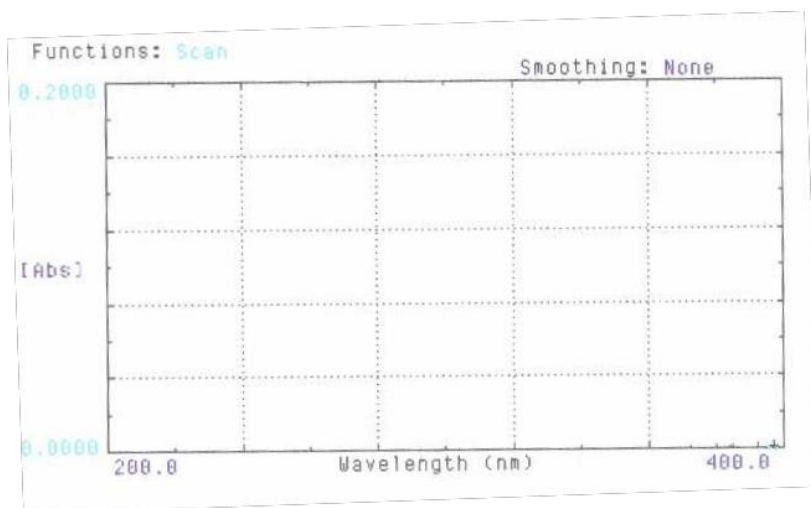


Figura 6. Espectro de absorção na região do ultravioleta de talco, em concentração de 4 $\mu\text{g/mL}$.



Abs=0,009

Figura 7. Espectro de absorção na região do ultravioleta de amido, em concentração de 4 $\mu\text{g/mL}$.



Abs= 0,000

Figura 8. Espectro de absorção na região do ultravioleta de lauril sulfato de sódio, em concentração de 4 µg/mL.

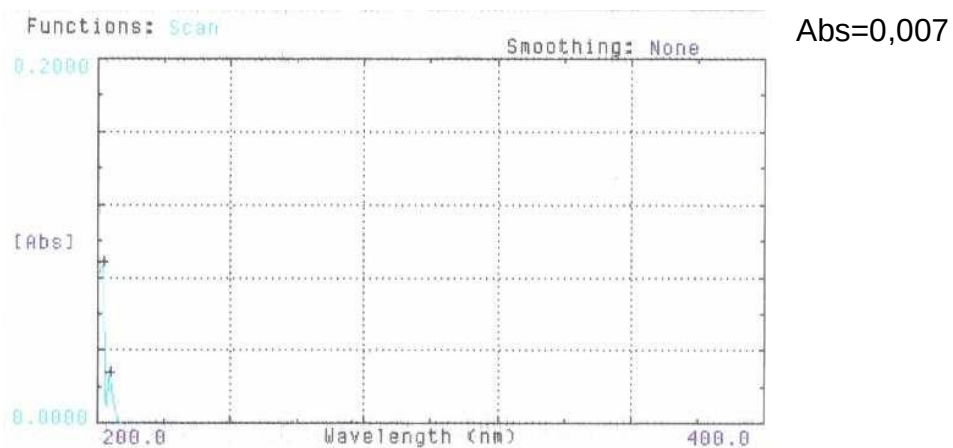


Figura 9. Espectro de absorção na região do ultravioleta de todos os adjuvantes, em concentração de 4 µg/mL.

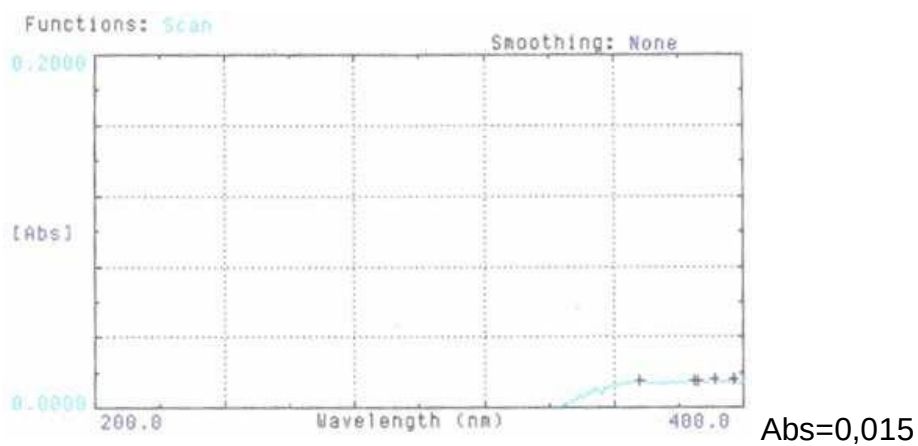
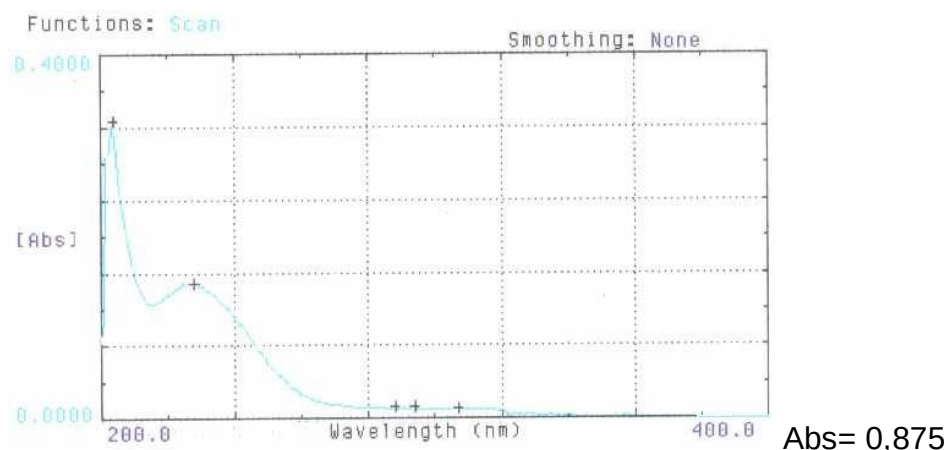


Figura 10. Espectro de absorção na região do ultravioleta da solução padrão de glimepirida, em concentração de 4 µg/mL.



Após análise dos espectros das figuras 3 a 10, pode-se concluir que o estearato de magnésio, o aerosil, a celulose e o amido não absorvem em nenhum comprimento de onda na região do ultravioleta. O talco tem uma pequena absorvância na faixa de 367,0 nm a 397,0 nm. Quando os adjuvantes foram analisados todos juntos, houve uma absorção pouco significativa (ABS 0,015) entre 368,0 a 397,0 nm, decorrente da absorção do talco. Comparando-se os espectros de todos os adjuvantes com o espectro da glimepirida, pode-se concluir que os adjuvantes não interferem na identificação e quantificação da glimepirida, pois o comprimento de onda do fármaco, além de não ser o mesmo dos adjuvantes, está muito distante destes.

3.2.7. Validação de método analítico

As metodologias analíticas para determinação de teor de princípio ativo foram validadas de acordo com a resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003) e o ICH (ICH Q2(R1), 1996). Foram determinados os parâmetros de linearidade, seletividade, precisão, exatidão, robustez, limites de

detecção e de quantificação.

Foi realizada a validação de método analítico por espectrofotometria na região do ultravioleta e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3.2.7.1. Método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A fase móvel utilizada foi metanol:água (80:20, v/v). A fase móvel foi filtrada através de membrana com poro de 0,45 µm e 47 mm de diâmetro, sob vácuo, degaseificada no ultrassom, durante 30 minutos. Após a estabilização do sistema, foram injetados 20,0 µL, previamente filtrados em membrana com poro de 0,45 µm e 13 mm de diâmetro.

Tabela 3. Condições cromatográficas utilizadas por CLAE para desenvolvimento de método para quantificação de glimepirida em cápsulas.

Fase móvel	Metanol:água (80:20, v/v)
Coluna	Symmetry Waters C18 5µ m 4,6 x 250mm
Comprimento de onda	228 nm
Vazão	1,0 mL/min
Volume de injeção	20 µL
Temperatura	20°C ±1°C

O método foi utilizado para realização dos testes de linearidade, seletividade, precisão, exatidão, robustez, limites de detecção e de quantificação.

3.2.7.1.1. Linearidade

O ensaio de linearidade foi realizado de acordo com o estabelecido na Farmacopeia Brasileira (2010). A solução padrão foi diluída em seis concentrações

5, 10, 15, 20, 30 e 40 µg/L, para isso foram utilizadas alíquotas de 1, 2, 3, 4, 6 e 8mL, respectivamente, da solução padrão que foram transferidas para balão volumétrico de 10 mL completando o volume com fase móvel.

3.2.7.1.2. Seletividade

Para verificar a seletividade do método foi utilizado um placebo, para determinar a ausência de resposta aos adjuvantes na formulação. O analito não deveria apresentar interferência de componentes externos. Os placebos das cápsulas foram submetidos às mesmas condições analíticas empregadas na amostra.

Os adjuvantes de cada amostra foram pesados e homogeneizados. Desta mistura pesou-se o correspondente a 2,5 vezes o peso médio da amostra, e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL completando o volume com metanol. O cálculo utilizado para determinar a massa de excipiente a ser pesada foi 2,5 vezes o peso médio da amostra multiplicando a porcentagem do excipiente na amostra.

3.2.7.1.3. Precisão

A precisão foi avaliada aos níveis de repetibilidade (intradias) e precisão intermediária (interdias). Ao nível de repetibilidade foram construídas 6 soluções na concentração média da curva analítica de cada método desenvolvido. Para a precisão intermediária, o procedimento foi repetido em um segundo dia por um segundo analista. A precisão dos métodos foi avaliada pelo desvio padrão relativo entre as determinações.

3.2.7.1.4. Exatidão do método avaliada pelo teste de recuperação

A exatidão foi estabelecida pelo teste de recuperação, que consiste em adicionar concentrações conhecidas da substância referência à amostra (USP, 2011). Foram preparadas soluções com concentrações de 5, 20 e 40 µg/mL, de forma que as concentrações lidas sempre estivessem dentro da faixa da curva analítica. Para isso foi preparada uma solução com amostra adicionada de substância referência, na qual 10 mg da substância referência e 2,5 vezes o peso médio da amostra foram diluídos em balão volumétrico de 50 mL, para obtenção de solução com concentração final de 50 µg/mL. Desta solução foram retiradas alíquotas de 1, 4 e 8 mL para o preparo das soluções de concentrações, respectivamente, 5, 20 e 40 µg/mL.

3.2.7.1.5. Robustez

A robustez do método foi determinada através de pequenas variações que eventualmente podem ocorrer e influenciar nos métodos analíticos (BRASIL, 2003). As variações foram deliberadas de acordo com as condições do método desenvolvido. Para esta análise foram variadas as condições de vazão, proporção da fase móvel e comprimento de onda. A vazão normal realizada nos testes (1 mL/min), foi modificada para 0,8 mL/min e 1,2 mL/min. A proporção da fase móvel (metanol e água) normal 80:20 (v/v), foi alterada para proporções de 78:22 (v/v) e 82:18 (v/v). O comprimento de onda normal 228nm foi alterado para 223 nm e 233 nm para a robustez.

3.2.7.1.6. Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) dos métodos foram

determinados de acordo com as seguintes fórmulas: $LD = 3,3 \times Dpa/IC$; $LQ = 10 \times Dpa/IC$. Em que DPa é o desvio padrão de 20 determinações do branco e IC é a inclinação da curva analítica.

3.2.7.1.7. Resultados e Discussão

3.2.7.1.7.1. Linearidade

A linearidade do ensaio foi testada com uma solução padrão diluída na fase móvel metanol : água purificada (80:20 v/v) em concentrações entre 5 e 40 $\mu\text{g/mL}$.

A curva analítica para glimepirida padrão, como mostra a Figura 11, apresentou linearidade significativa na faixa de 5 a 40 $\mu\text{g/mL}$, com $R^2 = 0,9993$ (coeficiente de determinação). A equação da reta obtida foi $y = 0,016x + 0,2849$.

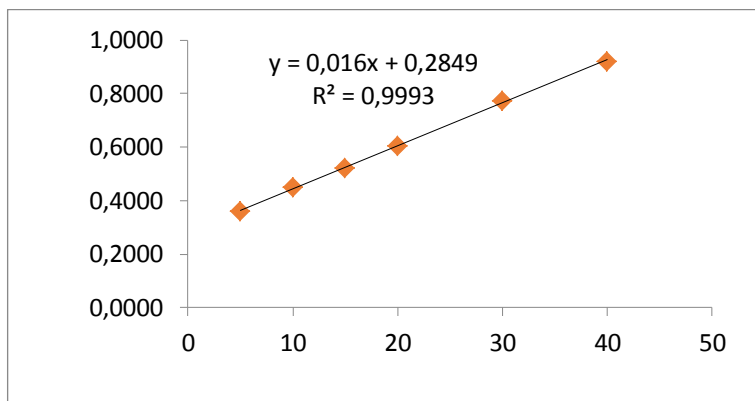


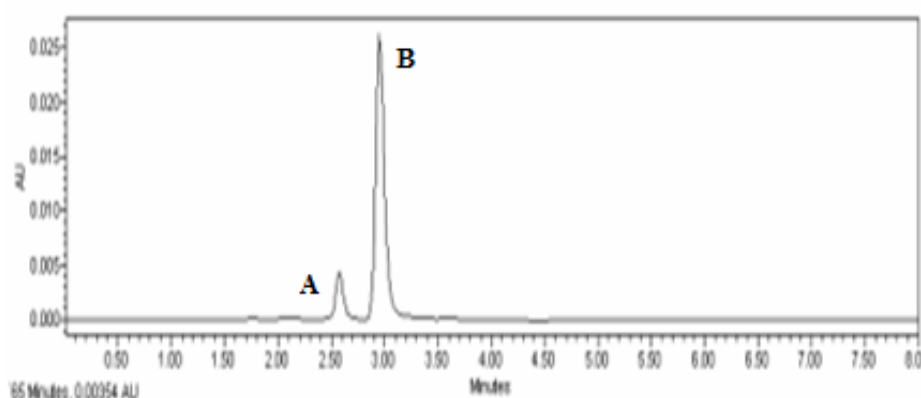
Figura 11. Curva Analítica da determinação de glimepirida por CLAE, fase móvel metanol:água purificada (80:20 v/v), vazão 1,0 mL/min, fase estacionária coluna Coluna Symmetry Waters C_{18} 5 μm 4,6 x 250 mm.

3.2.7.1.7.2. Seletividade

Através da análise de amostras de placebos, os adjuvantes presentes na

amostra não demonstraram interferência no tempo de retenção da glimepirida.

Figura 12. Cromatograma dos adjuvantes (A) presentes nas amostras A, B e C e do padrão de glimepirida (B) utilizando fase móvel metanol:água purificada (80:20 v/v), vazão 1,0 mL/min, fase estacionária coluna Coluna Symmetry Waters C₁₈ 5µm 4,6 x 250 mm.



Como demonstrado na Figura 12, o tempo de retenção dos adjuvantes presentes na amostra é menor que o tempo de retenção da glimepirida, portanto não há interferência dos adjuvantes na análise de cápsulas de glimepirida.

3.2.7.1.7.3. Precisão

Foram encontrados DPR inferiores a 5% para todas as amostras analisadas, o que demonstra a precisão do método.

Os resultados obtidos para precisão do método, incluindo repetibilidade (intradias) e precisão intermediária (interdias), estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Ensaio de repetibilidade e precisão intermediária de glimepirida na concentração de 5 µg/mL.

Amostras	Repetibilidade (DPR)			Precisão intermediária (DPR)
	Dia 1 (n=6)	Dia 2 (n=6)	Dia 3 (n=6)	(n = 18)
A	1,84	1,03	1,00	3,23
B	1,35	1,64	1,18	2,52
C	1,48	1,77	1,05	1,39

DPR=desvio padrão relativo; n=número de repetições do ensaio

3.2.7.1.7.4. Exatidão do método avaliada pelo teste de recuperação

O método apresentou-se exato, com recuperação média das quantidades de substância adicionadas às amostras entre 95 e 105%. A amostra A apresentou média de recuperação de 102,01%, a amostra B 101,01% e a amostra C 101,96%, de acordo com a Tabela 5.

Tabela 5. Resultados do teste de exatidão do método avaliada pela recuperação.

Amostra	Concentração	Solução ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)
	Adicionada	Encontrada	
A	5,00	5,11	102,26
	20,00	20,23	101,16
	40,00	41,04	102,60
	Média		102,01
B	5,00	5,11	102,13
	20,00	20,06	100,29
	40,00	40,31	100,78
	Média		101,07
C	5,00	5,10	101,91
	20,00	20,30	101,52
	40,00	40,98	102,46
	Média		101,96

3.2.7.1.7.5. Robustez

O método mostrou-se robusto quando foram variadas as condições de comprimento de onda e proporção de fase móvel, na qual os DPR calculados foram 1,09 e 1,95%, respectivamente. Entretanto, com a variação da vazão, o método não apresentou-se robusto, apresentando o DPR de 5,35%. Porém, como as bombas dos equipamentos atuais reproduzem muito bem a vazão, é possível controlar esta variável, para que não haja interferência no resultado analítico.

Tabela 6. Condições avaliadas no ensaio de robustez

	λ (nm)			Vazão (mL/min)			Proporção de fase móvel (v/v)		
	223	228	233	0,8	1	1,2	(78:22)	(80:20)	(82:18)
Médias das áreas	342638	362285	345520	484128	362285	334220	352610	362285	357422
Teor	68,19	66,73	67,33	69,81	66,73	62,72	65,93	66,73	68,49
Média dos Teores		67,42			66,42			67,05	
Desvio Padrão (n=3)		0,7365			3,55			1,3	
DPR (%) (n=3)		1,09			5,35			1,95	

DPR=desvio padrão relativo

3.2.7.1.7.6. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação encontrados foram de 0,264 e 0,799 respectivamente, calculados como demonstrado abaixo:

$$LD = DP_a \times 3/IC \quad LQ = DP_a \times 10/IC$$

Em que, DP_a é o desvio-padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, três curvas analíticas construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação. IC é a inclinação da curva analítica.

3.2.7.1.7.7. Conclusão

A validação do método de análise por cromatografia líquida de alta eficiência da glimepirida em cápsulas demonstrou linearidade, seletividade, precisão, exatidão e robustez. Portanto, este método pode ser aplicado em análises de rotina em laboratórios de controle de qualidade na quantificação de glimepirida cápsulas.

3.2.8. Método Espectrofotométrico no UV

3.2.8.1. Obtenção da Curva de Ringbom

A curva de Ringbom foi realizada com o objetivo de determinar a faixa de concentração na qual o método espectrofotométrico na região de ultravioleta obedece à linearidade.

Pesaram-se, exatamente, em balança analítica, 10 mg de glimepirida e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL com o auxílio de hidróxido de sódio 5×10^{-3} mol/L. A solução foi mantida em ultrassom por 30 minutos e após isso, completou-se o menisco com solução de hidróxido de sódio 5×10^{-3} mol/L, obtendo-se uma solução com concentração final de 100 µg/mL. A partir desta solução mãe, foram preparadas soluções de glimepirida em concentrações crescentes, para obtenção da curva de Ringbom de 18 pontos. Soluções com concentrações de 1 a 34 µg/mL de glimepirida foram obtidas transferindo-se alíquotas da solução A para balão volumétrico de 10 mL e completando-se o volume com tampão fosfato monobásico de sódio pH 6,8. As leituras foram efetuadas no comprimento de onda de 228 nm.

A Tabela 7 apresenta as leituras espectrofotométricas que permitiram a construção da curva de Ringbom (Figura 13).

Tabela 7. Preparo da curva de Ringbom de solução padrão de glimepirida pelo método espectrofotométrico na região de ultravioleta a 228 nm.

Pontos	Volume (mL)	Concentração Final (µg/mL)	Absorvância ABS	100-T%
1	0,1	1	0,0383	8,4412
2	0,2	2	0,0671	14,3159
3	0,4	4	0,1306	25,9713
4	0,6	6	0,1940	36,0265
5	0,8	8	0,2520	44,0242
6	1,0	10	0,3115	51,1910
7	1,2	12	0,3754	57,8692
8	1,4	14	0,4353	63,2971
9	1,6	16	0,5002	68,3918
10	1,8	18	0,5475	71,6535
11	2,0	20	0,6307	76,5955
12	2,2	22	0,6772	78,9719
13	2,4	24	0,7312	81,4305
14	2,6	26	0,7898	83,7744
15	2,8	28	0,8440	85,6781
16	3,0	30	0,9235	88,0739
17	3,2	32	0,9581	88,9871
18	3,4	34	1,0234	90,5245

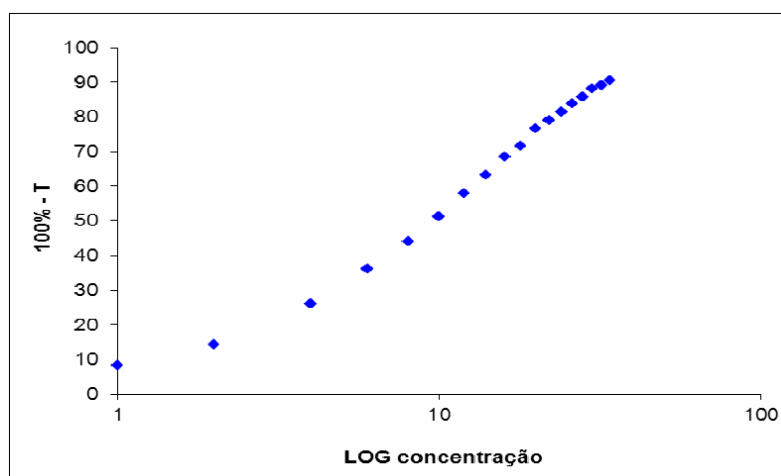


Figura 13. Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região de ultravioleta para solução padrão de glimepirida, utilizando tampão fosfato monobásico de sódio pH 6,8 como solvente, no comprimento de onda de 228 nm.

Através da curva de Ringbom foram determinados seis pontos da curva analítica.

3.2.8.2. Obtenção da curva analítica

Foram preparadas soluções de glimepirida de 8 a 28 µg/mL para obtenção da curva analítica de seis pontos. Transferiram-se alíquotas crescentes de 0,8-2,8 mL da solução-mãe de 100 µg/mL para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com solução tampão fosfato monobásico de sódio pH 6,8. Cada concentração foi preparada em triplicata. As leituras das soluções foram efetuadas a 228 nm, utilizando hidróxido de sódio 5×10^{-3} mol/L e solução tampão fosfato monobásico de sódio pH 6,8, em concentrações adequadas, como branco.

A Tabela 8 demonstra os valores de absorvância determinados para a curva

analítica de solução padrão de glimepirida obtidos pelo método espectrofotométrico na região de ultravioleta a 228 nm.

Tabela 8. Valores de absorvância determinados para a curva analítica de solução padrão de glimepirida pelo método espectrofotométrico na região de ultravioleta a 228 nm.

Concentração µg/mL	ABS	ABS Média	DPR %
8	0,25360	0,2484	1,9932
	0,24793		
	0,24373		
12	0,37887	0,3872	2,3904
	0,38560		
	0,39717		
16	0,5002	0,5030	0,6800
	0,5068		
	0,5020		
20	0,64003	0,6444	1,1647
	0,64017		
	0,65310		
24	0,75803	0,7736	2,6375
	0,76617		
	0,79673		
28	0,88477	0,8887	0,4560
	0,88857		
	0,89287		

Cada valor corresponde a média de três determinações.

3.2.8.3. Linearidade

Para estabelecer a faixa de concentração na qual o método

espectrofotométrico na região de ultravioleta apresenta-se linear, foram construídas curvas analíticas com seis concentrações crescentes. A representação gráfica das equações das retas foi determinada pela análise de regressão linear, através do método dos mínimos quadrados, estatisticamente avaliadas pela análise de variância.

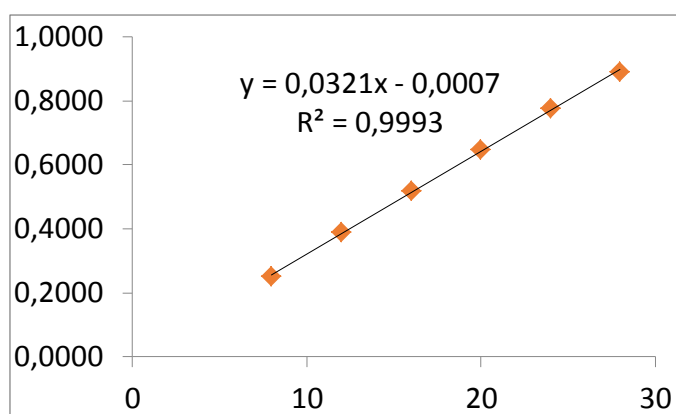


Figura 14. Representação gráfica da curva analítica de solução de padrão de glimepirida obtida pelo método espectrofotométrico na região de ultravioleta, no comprimento de onda de 228 nm.

Foi construída a curva analítica das soluções padrão de glimepirida com concentrações de 8-28 µg/mL e o coeficiente de determinação para o padrão foi igual a 0,9993, enquanto que a equação da reta foi $y = 0,0321x - 0,0007$. Portanto, o valor obtido para o coeficiente de determinação demonstra que o método é linear.

3.2.8.4. Seletividade

Para determinar a ausência de resposta aos adjuvantes na formulação, verificou-se a seletividade do método utilizando os placebos. Os placebos das cápsulas foram submetidos às mesmas condições analíticas empregadas na

amostra. A seletividade do método foi confirmada pela comparação das absorvâncias da substância química de referência e das amostras A, B e C. Pode-se concluir que não houve interferência dos adjuvantes na análise e de cápsulas de glimepirida.

3.2.8.5. Precisão

A precisão foi avaliada aos níveis de repetibilidade (intradias) e precisão intermediária (interdias). Ao nível de repetibilidade foram construídas seis soluções na concentração média da curva analítica de cada método desenvolvido. Na precisão intermediária, o procedimento foi repetido em um segundo dia por um segundo analista. A precisão dos métodos foi avaliada pelo coeficiente de variação entre as determinações.

Tabela 9. Valores obtidos para a repetibilidade intermediária do método espectrofotométrico na região de ultravioleta a 228 nm das amostras de glimepirida.

Dia	Amostras	Absorvâncias médias	DPR (%)
1	A	0,5861	0,9995
	B	0,6985	0,9634
	C	0,4972	0,7718
2	A	0,6031	0,6031
	B	0,6843	0,6843
	C	0,4600	0,4609
3	A	0,5769	0,5769
	B	0,6854	0,6854
	C	0,4619	0,4619

Tabela 10. Valores obtidos para a precisão intermediária do método espectrofotométrico na região de ultravioleta a 228 nm das amostras de glimepirida.

Amostras	Absorvâncias médias	DPR (%)
A	0,5887	2,05
B	0,6894	1,15
C	0,4733	3,74

Para o teste de precisão intermediária, os desvios de padrão relativo foram de 2,05%, 1,15% e 3,74%. Assim, os desvios estão dentro do permitido, que é de, no máximo, 5% para produtos farmacêuticos, comprovando a precisão do método.

3.2.8.6. Exatidão do método avaliada pelo teste de recuperação

A exatidão foi estabelecida pelo teste de recuperação, que consiste em adicionar concentrações conhecidas da substância referência à amostra (USP, 2011). Foram preparadas soluções em vários níveis de concentração, de forma que as concentrações lidas sempre estejam dentro da faixa da curva analítica.

Tabela 11. Preparo das soluções para o teste de recuperação do método espectrofotométrico.

	Volume adicionado de amostra (μ L)	Volume adicionado de padrão (μ L)	Concentração final μ g/mL
Amostra	800	-	8
R1 (80%)	800	800	16
R2 (100%)	800	1200	20
R3 (120%)	800	1600	24
Padrão	-	800	8

*diluída em balão volumétrico de 10mL com água.

**cada nível de concentração foi preparado em triplicata.

A percentagem de glimepirida recuperada foi calculada pela equação da reta, seguido pela equação 1 (AOAC, 2002):

$$\%R = [(Cr - Ca) / Cp] \times 100$$

em que:

C_r = concentração da solução amostra adicionada da substância química de referência ($\mu\text{g/mL}$)

C_a = concentração da amostra ($\mu\text{g/mL}$)

C_p = concentração teórica da substância química de referência adicionada ($\mu\text{g/mL}$)

Na Tabela 12 estão apresentados os valores de recuperação obtidos para cada nível de concentração testado pelo método espectrofotométrico.

Tabela 12. Teste de recuperação de amostras de cápsulas de glimepirida no método espectrofotométrico.

	Glimepirida SQR adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	Glimepirida SQR encontrada ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)	Recuperação (média)
Recuperação 1	16,0	15,805	98,781	98,888
	20,0	19,700	98,500	
	24,0	23,852	99,383	
Recuperação 2	16,0	15,987	99,918	98,794
	20,0	20,024	100,120	
	24,0	23,123	96,345	
Recuperação 3	16,0	16,200	101,250	102,200
	20,0	20,345	101,725	
	24,0	24,870	103,625	

A exatidão do método foi comprovada pelo ensaio de recuperação, sendo a média de 98,888% para a amostra A, 98,794% para a amostra B e 102,200% para a amostra C.

3.2.8.7. Robustez

A robustez do método espectrofotométrico foi analisada através de pequenas e deliberadas variações nas condições analíticas otimizadas. As seguintes variações foram realizadas: pH do solvente (pH 6,6 e pH 7,0), comprimento de onda (224 nm e 232 nm) e tempo de extração no ultrassom (25 minutos e 35 minutos). O ensaio foi realizado para as três amostras (A, B e C) e as respostas analíticas foram o teor de cada amostra em cada condição ensaiada, o qual foi obtido através da comparação das absorvâncias das amostras com a absorvância de uma solução padrão nas mesmas condições e mesma concentração. Para avaliar se o método foi robusto, uma comparação estatística foi realizada entre o teor da amostra obtido nas condições ótimas e o teor obtido nas condições ensaiadas, através de um teste *t Student* ao nível de significância de 5%.

A Tabela 13 demonstra os resultados de doseamento obtidos sob as condições ensaiadas no teste de robustez. Os valores assinalados com um asterisco diferem estatisticamente das condições ótimas ao nível de significância de 5%, indicando que o método não é robusto sob a variação considerada. Os valores de teor das cápsulas de glimepirida abaixo foram encontrados através do cálculo da área dos picos dos cromatograma obtidos sob as condições descritas.

Tabela 13. Teores das cápsulas de glimepirida no ensaio de robustez de método espectrofotométrico

Amostra	pH			Comprimento de onda (nm)			Tempo de ultrassom (minutos)		
	6,6	6,8 (ótima)	7,0	224	228 (ótima)	230	25	30 (ótima)	35
A	138,18	137,68	137,33	140,70*	137,85	139,03	133,76*	137,86	138,82
B	159,57	159,03	159,94	162,25*	159,02	159,27	158,38	159,03	156,14*
C	112,24	111,14	112,3	115,12*	111,14	113,63*	110,21	111,14	110,77

*teores diferem estatisticamente da condição ótima ao nível de significância de 5%.

Com a observação da Tabela 13 é possível concluir que o método é robusto para variações no pH da solução solvente. Entretanto, pequenas variações no comprimento de onda do detector alteram a resposta analítica, o que era de se esperar, pois durante o desenvolvimento do método foi observado que o comprimento de onda de máxima absorvância do padrão e que não produz interferência dos adjuvantes é 228 nm. Portanto, esta condição deve ser estritamente controlada para evitar eventuais alterações na resposta analítica. Com relação ao tempo de extração no ultrassom, foi observado que o método também não é robusto, sendo que um tempo de 25 minutos para a amostra A não foi suficiente para permitir uma solubilização completa da glimepirida. Para a amostra B, um tempo de extração maior resultou em uma menor extração. A hipótese para este fenômeno não esperado é que um maior tempo de ultrassom pode promover uma interação da glimepirida com os adjuvantes presentes nas cápsulas, o que provavelmente irá subestimar o resultado de teor de algumas amostras. Portanto, o

método também não foi robusto para o tempo de extração no ultrassom, e a condição de 30 minutos também deve ser estritamente controlada.

3.2.8.8. Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) dos métodos foram determinados de acordo com as seguintes fórmulas: $LD = 3 \times Dpa/IC$; $LQ = 10 \times Dpa/IC$ em que: DPa é o desvio padrão de 20 determinações do branco e IC é a inclinação da curva analítica. Os valores absolutos encontrados para LD e LQ foram 0,24 e 0,80 µg/mL, respectivamente.

3.2.8.9. Conclusão

O método espectrofotométrico na região ultravioleta a 228 nm proposto para análise de teor de cápsulas de glimepirida foi adequado uma vez que cumpriu com as exigências da legislação brasileira vigente em relação à validação de métodos analíticos. Além disso, é uma técnica de fácil e rápida execução, uso de solvente não tóxico e de baixo custo.

3.2.9. Método espectrofotométrico de absorção na região do UV-Visível

A espectrofotometria na região do visível em análise farmacêutica é amplamente usada para a identificação e doseamento de fármacos e medicamentos. Todas as técnicas espectrofotométricas são baseadas na interação de uma substância química com energia radiante e, na maioria dos casos, o efeito desta interação é a absorção de energia pela substância que está sendo analisada (WATSON, 1999; OHANNESIAN, 2002).

A identificação de um fármaco pode ser feita através da análise de seu espectro de absorção na região visível (400 - 800 nm). A espectrofotometria é

recomendada pela 5ª edição da Farmacopeia Brasileira (2010) tanto para substâncias naturalmente coradas como para aquelas que podem sofrer reação química, em que se forma estequiométrica uma substância corada.

3.2.9.1. Reação com cloreto férrico (FeCl_3)

Em métodos espectrofotométricos, o íon ferro (Fe^{+3}) é bastante utilizado, pois é capaz de formar complexos de coloração amarelada com alguns fármacos absorvendo em um comprimento de onda máximo de 430 nm (SULTAN e SULIMAN, 1992). Devido a isso, foram realizadas reações entre o reagente cloreto férrico (III) e a solução padrão de glimepirida, com a finalidade de formação de complexo entre as hidroxilas da molécula de glimepirida e o íon ferro.

3.2.9.1. Material

As determinações foram realizadas com espectrofotômetro SHIMADZU – UV Mini – 1240, utilizando cubetas de quartzo de 1cm de caminho óptico. Utilizou-se metanol com solvente e cloreto férrico 1% como reagente.

A substância química de referência e as amostras utilizadas foram preparadas conforme descritos nas seções 3.2.1. e 3.2.2.

3.2.9.2. Preparo da solução padrão de glimepirida

Foram pesados, exatamente, 20 mg de padrão de glimepirida e transferiu-se para balão de 25 mL com auxílio de metanol. Levou-se ao ultrassom por 5 minutos para garantir sua total dissolução e completou-se com metanol, obtendo-se concentração final de 800 $\mu\text{g/mL}$.

3.2.9.3. Preparo do reagente cloreto férrico 1,0%

Foi pesado, exatamente, 1,0 g de cloreto férrico (III) e transferido para

balão volumétrico de 100 mL com auxílio de água purificada (Milli-Q®). Levou-se ao ultrassom por 10 minutos a fim de obter solubilização total e completou-se com água, obtendo-se reagente com concentração final de 1,0%.

3.2.9.4. Método

Foram testadas concentrações de 100-600 µg/mL de solução padrão de glimepirida. Em balão volumétrico de 10mL adicionou-se alíquotas de 1,25-7,5 mL de solução padrão de glimepirida descrita no 3.2.7.1.2. e 1,0 mL de solução reagente de cloreto férrico 1,0%. O volume foi completado com metanol para obtenção de solução com concentração final de 100-600 µg/mL. As leituras foram efetuadas imediatamente, após 15 minutos e após 30 minutos, em espectrofotômetro contra um branco preparado da mesma forma, exceto pela adição do fármaco.

3.2.9.5. Resultados e Discussão

Não foi observado nenhum pico de absorção no comprimento de onda de 400-800 nm para glimepirida dissolvida em metanol nas concentrações de 100-600 µg/mL. Como não houve formação de complexo amarelado entre o íon ferro e a glimepirida na região do visível, não foi possível a utilização deste reagente para a análise qualitativa deste fármaco. Foi testado também hidróxido de sódio 5×10^{-3} mol/L como solvente, diferentes concentrações de reagente cloreto férrico 1% e a adição de tampão fosfato pH 6,8 e tampão universal pH 3,5 às soluções, com o objetivo de protonação da molécula de glimepirida antes de sua complexação com o reagente. Entretanto, não foi observado nenhum complexo na região do visível.

3.2.10. Reação com sulfato de cobre

Foi desenvolvido método espectrofotométrico por FERREIRA et al. que se baseia na reação entre biureto e $\text{Cu}(\text{OH})_2(\text{s})$ e formação do complexo $\text{Cu}(\text{C}_2\text{N}_3\text{O}_2\text{H}_5)_2$ de coloração violeta cujo espectro apresenta máximo de absorção em 510 nm. Como o biureto é um composto orgânico formado durante a produção de ureia e a glimepirida é uma sulfonilureia, foram realizadas reações utilizando solução padrão de glimepirida e sulfato de cobre com a finalidade de formação de complexo violeta entre o cobre e a glimepirida.

3.2.10.1. Material

As determinações foram realizadas com espectrofotômetro SHIMADZU – UV Mini – 1240, utilizando cubetas de quartzo de 1cm de caminho óptico. Utilizou-se metanol com solvente e sulfato de cobre 8% como reagente.

A substância química de referência e as amostras utilizadas foram preparadas conforme descrito nas seções 3.2.1. e 3.2.2.

3.2.10.2. Preparo da solução padrão de glimepirida

Foram pesados, exatamente, 20 mg de padrão de glimepirida e transferiu-se para balão de 25mL com auxílio de metanol. Levou-se ao ultrassom por 5 minutos para garantir sua total dissolução e completou-se com metanol, obtendo-se concentração final de 800 $\mu\text{g/mL}$.

3.2.10.3. Preparo do reagente sulfato de cobre 8%

Foi pesado 8,0 g de sulfato de cobre e transferido para balão volumétrico de 100 mL com auxílio de água purificada (Milli-Q®). Levou-se ao ultrassom por 20

minutos, a fim de obter solubilização total e completou-se com água, obtendo-se reagente com concentração final de 8,0%.

3.2.10.4. Método

Foram testadas concentrações de 100-600 µg/mL de solução padrão de glimepirida. Em balão volumétrico de 10mL adicionou-se alíquotas de 1,25-7,5 mL de solução padrão de glimepirida descrita no 3.2.8.1.2. e 1,0 mL de solução reagente de sulfato de cobre 8,0%. Completou-se o volume com metanol para obtenção de solução com concentração final de 100-600 µg/mL. As leituras foram efetuadas imediatamente, após 15 minutos e após 30 minutos, em espectrofotômetro contra um branco preparado da mesma forma, exceto pela adição do fármaco.

3.2.10.5. Resultados e Discussão

Não foi observado nenhum pico de absorção no comprimento de onda de 400-800 nm para glimepirida dissolvida em metanol nas concentrações de 100-600 µg/mL. Como não houve formação de complexo esverdeado entre o íon cobre e a glimepirida na região do visível, não foi possível a utilização deste reagente para a análise qualitativa deste fármaco.

3.2.11. Reação com Vermelho de Congo

O vermelho de Congo foi utilizado na determinação de fármacos formando complexos de pares de íons com absorvância máxima em 496 e 520 nm. O mecanismo de ação envolve a formação de íons negativos de solução tampão e íons positivos do fármaco (AMIN et al; 2008). Foram feitas tentativas para determinação de glimepirida por meio de complexação entre o reagente vermelho de Congo com a substância padrão de glimepirida.

3.2.11.1. Material

As determinações foram realizadas com espectrofotômetro SHIMADZU – UV Mini – 1240, utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Utilizou-se hidróxido de sódio 5×10^{-3} mol/L como solvente e vermelho congo como reagente.

A substância química de referência e as amostras utilizadas foram preparadas conforme descrito nas seções 3.2.1. e 3.2.2.

3.2.11.2. Preparo da solução padrão de glimepirida

Foram pesados, exatamente, 10 mg de padrão de glimepirida e transferiu-se para balão de 100 mL com auxílio de hidróxido de sódio 5×10^{-3} mol/L. Levou-se ao ultrassom por 30 minutos para garantir sua total dissolução e completou-se com hidróxido de sódio 5×10^{-3} mol/L, obtendo-se concentração final de 100 µg/mL.

3.2.11.3. Preparo do reagente Vermelho de Congo

Foram pesados, exatamente, 139,0 g de sal vermelho de Congo e transferido para balão volumétrico. Adicionou-se 10,0 mL de metanol e completou-se com água destilada para volume final de 1 litro, obtendo-se uma concentração final de 2×10^{-3} mol/L do reagente vermelho de Congo.

3.2.11.4. Método

Foram testadas concentrações de 10-50 µg/mL de solução padrão de glimepirida. Em balão volumétrico de 10,0 mL adicionou-se alíquotas de 1,0-5,0 mL de solução padrão de glimepirida descrita no 3.2.9.1.2., 4,0 mL de tampão universal pH 3,5 e 0,2 mL de solução reagente vermelho congo, nesta ordem, necessariamente. Completou-se o volume com tampão universal pH=3,5 para obtenção de solução com concentração final de 10-50µg/mL. As leituras foram

efetuadas imediatamente e após 15 minutos em espectrofotômetro contra um branco preparado da mesma forma, exceto pela adição do fármaco.

3.2.11.5. Resultados e Discussão

Foi observado pico de absorção no comprimento de onda de 400-800 nm para glimepirida dissolvida em hidróxido de sódio 5×10^{-3} mol/L nas concentrações de 10-50 µg/mL. O pico máximo de absorção foi em 520 nm e nas leituras após 15 minutos de reação, as absorvâncias diminuía. Após isso, foi realizado o mesmo ensaio com os adjuvantes, para analisar a interferência destes no método. Constatou-se que os adjuvantes interferiram aproximadamente 3,5% no método, podendo-se inferir que estes compostos possam formar complexo com o reagente, pois a coloração também se tornou roxa. Portanto, o reagente Vermelho de Congo não pode ser usado para desenvolvimento de método espectrofotométrico no UV-Visível.

Além desses reagentes já descritos anteriormente, foram testados o ácido clorânico e o azul de bromotimol como reagentes para desenvolvimento de método espectrofotométrico no visível, entretanto, os resultados não foram satisfatórios, uma vez que não formaram complexos corados que permitisse a sua quantificação.

4. CONCLUSÃO

Este trabalho contemplou a validação do método de análise por cromatografia líquida de alta eficiência da glimepirida em cápsulas, o qual demonstrou linearidade, seletividade, precisão, exatidão e robustez. Portanto, este método pode ser aplicado em análises de rotina em laboratórios de controle de qualidade na quantificação de glimepirida cápsulas.

No que diz respeito ao estudo da interferência dos adjuvantes na identificação e quantificação de glimepirida em cápsulas, demonstrou-se a necessidade da aplicação do controle de qualidade dos produtos manipulados para garantir sua segurança e eficácia terapêutica dos medicamentos. A amostra B apresentou percentagens inadequadas de adjuvantes, que a torna inviável para análise e também para uso terapêutico, já que suas quantidades de adjuvantes estão acima do necessário. Isto demonstra a necessidade da escolha correta dos adjuvantes para o desenvolvimento de uma forma farmacêutica.

Com o estudo da interferência dos adjuvantes, foi possível a validação de método espectrofotométrico na região visível. O método foi adequado, uma vez que cumpriu com as exigências da legislação brasileira vigente em relação à validação de métodos analíticos. A técnica utilizada é de fácil e rápida execução, além do uso de solvente não tóxico e de baixo custo.

Não foi possível o desenvolvimento e a validação de método espectrofotométrico na região do visível pela não formação de complexo entre a glimepirida com os reagentes testados: cloreto férrico, sulfato de bário, vermelho de Congo, ácido clorânico e azul de bromotimol.

Portanto, no que diz respeito às análises químico-farmacêuticas de cápsulas de glimepirida, esse trabalho demonstra a necessidade da aplicação do controle de qualidade dos produtos manipulados para assegurar sua segurança e eficácia terapêutica dos medicamentos, além do desenvolvimento e validação de dois novos métodos analíticos para análise de cápsulas de glimepirida, já que não há método descrito na Farmacopeia Brasileira para a forma farmacêutica cápsula.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIN, A.S. Spectrophotometric Determination of Enrofloxacin, Lomefloxacin and Ofloxacin in Pure and in Dosage Forms Through Ion-Pair Complex Formation. *Arabian J. Chem.* v. 1, n. 2, p. 209-215, 2008.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. *Official methods of analysis*. 17th ed. Gaithersburg: AOAC, v.1, p.36, 2002.

BANSAL, G.; SINGH, M.; JINDAL, K.C.; SINGH, S. LC–UV–PDA and LC–MS studies to characterize degradation products of glimepirida. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 48, n. 3, p.788-795, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, 29 de maio de 2003, *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*. Diário Oficial da União, Brasília, 02 jun. 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 20 jul. 2013.

COOK, D.L. The B-cell response to oral hypoglycemic agents. *Diabetes Res. Clin. Pr.*, v. 28 (suppl), p. S81-89, 1995.

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, cap. 60, p.1478-1481, 2006.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 6ed. Strasbourg: Council of Europe 2008.

FARMACOPEIA Brasileira, 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

FDA. *Electronic Orange Book Query*. Disponível em:
http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Search.Label_ApprovalHistory. Acesso em: 20 jun. 2013.

FERREIRA, R.B.; FRANZINI, V.P.; GOMES NETO, J.A. Determinação de biureto em uréia agroindustrial por espectrofotometria. *Eclética Química*, v. 32, n. 1, 2007.

HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS 5ªed. Edited by Raymond C Rowe, Paul J Sheskey and Siân C Owen, 2006.

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. Acesso em: 16 jun. 2013.

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. Acesso em 16 jun. 2013.

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. 2013.

KATZUNG, B.G. *Farmacologia básica e clínica*. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 588-590, 2006.

KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F.A.C. *Dicionário Terapêutico Guanabara*. ed. 2006/2007. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 13-9, 2006.

LANGTRY, H.D.; BALFOUR J.A. Glimepiride: a review of its use in the management of type 2 diabetes. *Drugs*, v.55, p.563-584, 1998.

OHANNESIAN, S. *Handbook of Pharmaceutical Analysis*. New York: Informa HealthCare, p 585, 2002.

PAGE, C. et al. *Farmacologia integrada*. 2. ed. Barueri: Manole, p.296-98, 2004.

RANG, H. P. et al. *Farmacologia*. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p.442-447, 2004.

SILVA, P. *Farmacologia*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.17-820, 2006.

SONG, Y.K.; MAENG, J.E.; HWANG, H.R.; PARK, J.S.; KIM, B.C.; KIM J.K. Determination of glimepiride in human plasma using semi-microbore

high performance liquid chromatography with column-switching. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* v. 810, n.1, p 143-9, 2004.

SULTAN, S.M.; SULIMAN, F.E.O. Flow injection spectrophotometric determination of the antibiotic ciprofloxacin in drug formulations. *Analyst*, v.117, p.1523-1526, 1992.

USP. UNITED STATES PHARMACOPEIA. 34. ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2011.

YOUNG, E.C.; PIRES, M.L.E.; LIMA, M.B.C. *Cad. Bras. Med.*, XIV, p.1-4, 2001.

WATSON, D.G. Pharmaceutical analysis: a textbook for pharmacy students and pharmaceuticals chemists. London: Churchill Livingstone, p.337, 1999.

WILD, S.; ROGLIC G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global prevalence of diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, v. 27, p.1047-53, 2004.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. The prevention of diabetes and its complications. Disponível em: <http://www.who.int/diabetes/preventionflyer/en/>
Acesso em: 20 de Jun. 2013.