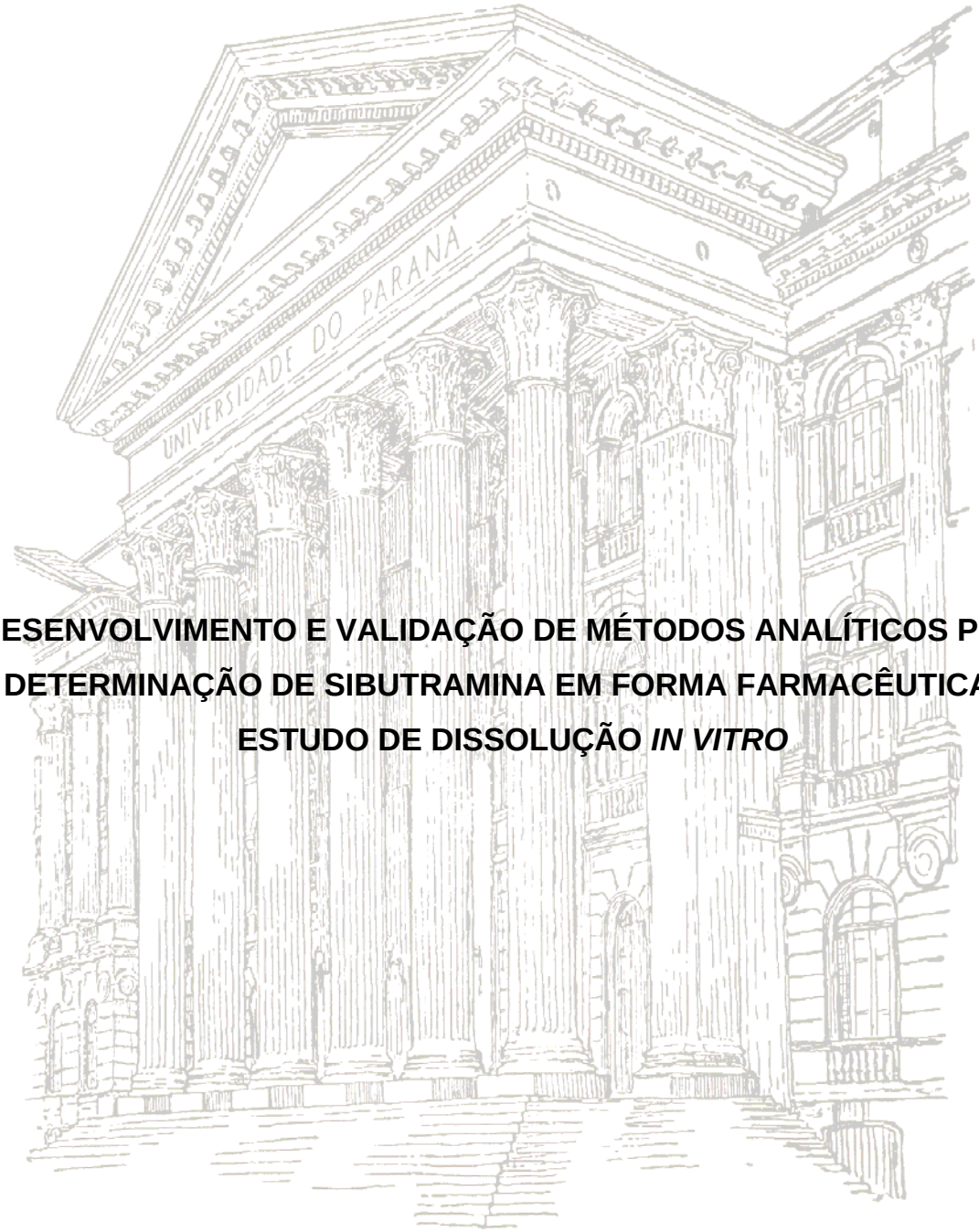
DANIELA FLORENCIO MALUF



DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE SIBUTRAMINA EM FORMA FARMACÊUTICA E ESTUDO DE DISSOLUÇÃO *IN VITRO*

CURITIBA

2008

DANIELA FLORENCIO MALUF

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE SIBUTRAMINA EM FORMA FARMACÊUTICA E ESTUDO DE DISSOLUÇÃO *IN VITRO*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo

CURITIBA

2008

A Deus, à minha mãe, aos meus amigos e mestres.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu coragem para enfrentar o desconhecido, força e ânimo para suportar as tempestades e garra para lutar até o fim. Que me protegeu nos dias de chuva nas estradas durante um ano e que Se fez presente em pessoas iluminadas que estiveram ao meu lado nas horas tristes e também nas mais felizes.

Dentre essas pessoas agradeço à minha família e em especial minha mãe. A carreira que quis seguir é resultante da boa educação que sempre me deu e do exemplo profissional que é para mim. Sinto um imenso orgulho de ter uma mãe tão competente em tudo que faz, reconhecida no trabalho, em casa quando cozinha com primor e em como trata qualquer pessoa de maneira igual. Sempre ao meu lado, me dizendo quando estava errada e sorrindo quando trilhava o caminho correto. Ensinando-me o caráter, a responsabilidade e a generosidade, quando deixou de fazer a sua pós-graduação para que eu pudesse fazer a minha. Essa etapa cumprida na minha vida é uma vitória nossa.

Ao meu orientador Professor Roberto Pontarolo, que me ensinou a disciplina e a amadurecer profissionalmente. Que me acolheu no dia da matrícula sem qualquer restrição e a partir de então possibilitou que eu realizasse esse trabalho, tanto quando agia com prontidão com os recursos necessários, quanto na minha orientação científica e intelectual. Por me ouvir com paciência e tolerância e me ensinado também, implicitamente, sobre relações interpessoais.

A um mestre incomparável, Professor Paulo Vítor Farago que me ensinou a caminhar, desde o período da graduação até hoje. Meus sinceros agradecimentos por me ensinar muito mais do que teoria, mas por me ouvir e sempre ter um conselho sereno para me dar, por estar sempre a disposição mesmo quando extremamente atarefado. E também por me dar o exemplo humano de ser professor e pesquisador.

A uma amiga inestimável, Professora Sandra Barreira, que me iniciou na carreira docente com muita calma e credibilidade e me faz admirá-la a cada dia mais pelo seu brilho, profissionalismo, seu bom humor, inteligência e caráter. Você é uma das pessoas fabulosas nas quais me espelho.

A minha orientadora de iniciação científica Noemi Nagata pela competência apresentada, dedicação ao trabalho na convivência de quase três anos, me fornecendo o embasamento intelectual necessário para que a seqüência, o mestrado, fosse possível.

Ao Professor Patrício e todo grupo de pesquisa que me ajudaram com paciência e boa vontade em todas as etapas deste trabalho. Inclusive Gilcélia e Juliana, sem vocês tudo seria mais difícil.

A todos os professores e amigos do programa de pós-graduação que entre uma necessidade ou outra me ajudaram ou simplesmente me ouviram. Levarei essas boas lembranças para sempre comigo.

Aos professores Aguinaldo e Cassyano pela pronta ajuda nas análises estatísticas.

As minhas amigas maravilhosas, de muito tempo, sempre presentes, em qualquer momento a qualquer distância. A vocês responsáveis por tantas vezes me deixarem em pé quando tinha vontade de cair, meus anjos: Graziele, minha amiguinha; Gracielle, a super; Fernanda, amizade que a distância não separa; minhas primas-irmãs; as amigas Daniele e Suzana, desde os tempos de graduação e pensionato. Eu admiro muito todas vocês.

“Não há fatos eternos, como não há verdades absolutas”.

Friedrich Nietszche

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 1
2 OBJETIVOS..... 3
2.1 OBJETIVO PRINCIPAL..... 3
2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS..... 3
3 REVISÃO DE LITERATURA..... 4
3.1 OBESIDADE..... 4
3.1.1 Aspectos Epidemiológicos..... 5
3.1.2 Diagnóstico..... 6
3.1.3 Tratamento..... 7
3.1.3.1 Tratamento cirúrgico..... 8
3.1.3.2 Tratamento farmacológico..... 8
3.1.3.2.1 inibidores do apetite..... 8
3.1.3.2.2 inibidores da reabsorção da gordura intestinal..... 9
3.1.3.2.3 estimulantes da saciedade..... 9
3.2 SIBUTRAMINA..... 10
3.2.1 Farmacologia..... 10
3.2.2 Vantagens do Tratamento Farmacológico Utilizando Sibutramina..... 11
3.2.3 Aspectos Físico-Químicos..... 12
3.3 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS..... 13
3.3.1 Espectroscopia no Ultravioleta..... 13
3.3.2 Espectroscopia no Infravermelho..... 14
3.3.2.1 Refletância difusa..... 15
3.4 CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA..... 16
3.4.1 Modelagem..... 17
3.4.2 Validação do Modelo..... 18
3.4.3 Pré-Processamentos..... 20
3.4.3.1 Correção do efeito espalhamento multiplicativo (Multiplicative Scatter Correction)..... 20
3.4.3.2 Detrend..... 21
3.4.3.3 Alisamento (Smooth)..... 21
3.4.4 Análise por Componentes Principais (Principal Component Analysis).... 22
3.4.5 Regressão pelos Mínimos Quadrados Parciais (Partial Least Squares Regression)..... 23
3.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA..... 25
3.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS..... 26
3.6.1 Seletividade/Especificidade..... 27
3.6.2 Linearidade..... 28
3.6.3 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)..... 28
3.6.4 Intervalo..... 29
3.6.5 Precisão..... 30
3.6.5.1 Repetitividade (precisão intra-corrida)..... 30
3.6.5.2 Precisão intermediária (precisão inter-corrida)..... 30
3.6.5.3 Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial)..... 30
3.6.6 Exatidão..... 31
3.6.6.1 Matérias-primas (fármacos)..... 32
3.6.6.2 Produtos acabados (forma farmacêutica)..... 32
3.6.7 Robustez..... 33

3.6.8 Sensibilidade..... 33
3.7 ESTUDO DA DISSOLUÇÃO *IN VITRO*..... 34
4 MATERIAL E MÉTODOS..... 37
4.1 DESENHO EXPERIMENTAL..... 37
4.2 MATERIAL..... 39
4.2.1 Material e Reagentes..... 39
4.2.2 Equipamentos e softwares..... 40
4.3. MÉTODOS..... 41
4.3.1 Espectroscopia por Ultravioleta..... 41
4.3.2 Validação..... 41
4.3.2.1 Especificidade..... 42
4.3.2.2 Linearidade..... 43
4.3.2.3 Intervalo..... 43
4.3.2.4 Precisão..... 44
4.3.2.4.1 repetitividade..... 44
4.3.2.4.2 precisão intermediária..... 44
4.3.2.5 Exatidão..... 45
4.3.2.6 Robustez..... 45
4.3.2.6.1 pH..... 45
4.3.2.6.2 tempo de leitura..... 46
4.3.2.6.3 temperatura..... 46
4.3.2.6.4 equipamentos..... 46
4.4 ESPECTROSCOPIA POR INFRAVERMELHO COM REFLETÂNCIA DIFUSA..... 46
4.4.1 Planejamento e Preparo das Misturas..... 47
4.4.2 Obtenção dos Espectros..... 48
4.4.3 Validação..... 48
4.4.3.1 Precisão..... 48
4.4.3.1.1 repetitividade..... 48
4.4.3.1.2 precisão intermediária..... 49
4.4.3.2 Exatidão..... 49
4.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA A ANÁLISE DOS MEDICAMENTOS..... 49
4.7 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FÁRMACO NAS AMOSTRAS COMERCIAIS..... 50
4.8 ESTUDO DA DISSOLUÇÃO *IN VITRO*..... 51
4.8.1 Especificações de Dissolução..... 51
4.8.2 Avaliação dos Perfis de Dissolução..... 53
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 54
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 55
5.1 ESPECTROSCOPIA POR ULTRAVIOLETA..... 55
5.2.1 Desenvolvimento do Método por Espectrofotometria UV-VIS..... 55
5.2.2 Validação Analítica..... 56
5.2.2.1 Especificidade..... 56
5.2.2.2 Linearidade..... 58
5.2.2.3 Intervalo..... 59
5.2.2.4 Precisão..... 59
5.2.2.4.1 repetitividade..... 59
5.2.2.4.2 precisão intermediária..... 60

5.2.2.5 Exatidão..... 61
5.2.2.6 Robustez..... 62
5.2.2.6.1 pH..... 62
5.2.2.6.2 tempo de leitura..... 63
5.2.2.6.3 temperatura..... 65
5.2.2.6.4 equipamentos..... 65
5.3 ESPECTROSCOPIA POR INFRAVERMELHO COM REFLETÂNCIA DIFUSA..... 67
5.3.1 Espectro no Infravermelho com Refletância Difusa..... 67
5.3.2 Análise Exploratória dos Dados (Principal Component Analysis)..... 69
5.3.3 Construção de Modelos Multivariados PLSR (Partial Least Squares Regression)..... 70
5.3.4 Validação do Método por DRIFTS e Calibração Multivariada..... 83
5.3.4.1 Precisão..... 84
5.3.4.1.1 repetitividade..... 84
5.3.4.1.2 precisão intermediária..... 85
5.3.4.2 Exatidão..... 82
5.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FÁRMACO NAS AMOSTRAS COMERCIAIS..... 85
5.5 ESTUDO DA DISSOLUÇÃO *IN VITRO*..... 86
5.5.1 Ajuste de Parâmetros dos Modelos Matemáticos e Simulação dos Perfis de Dissolução..... 89
6 CONCLUSÃO..... 95
REFERÊNCIAS..... 97

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - TABELA DE INDICE DE MASSA CORPORAL..... 07
TABELA 2 - DIAGNÓSTICO QUANTITATIVO DA OBESIDADE..... 07
TABELA 3- SUBDIVISÕES DO INFRAVERMELHO..... 14
TABELA 4 – CLASSIFICAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS DE ACORDO COM SUA FINALIDADE..... 26
TABELA 5 – ENSAIOS NECESSÁRIOS PARA A VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS DE ACORDO COM A SUA FINALIDADE..... 27
TABELA 6- FATORES QUE DEVEM SER CONSIDERADOS NA DETERMINAÇÃO DA ROBUSTEZ DO MÉTODO ANALÍTICO..... 33
TABELA 7 - SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA..... 35
TABELA 8 - COMPOSIÇÃO DA MISTURA DOS EXCIPIENTES..... 42
TABELA 9 – TAMPÕES UTILIZADOS PARA OS DIFERENTES VALORES DE pH..... 45
TABELA 10- REGIÕES ESPECTRAIS CONSIDERADAS NA CONSTRUÇÃO DOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO..... 48
TABELA 11 - PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS UTILIZADOS PARA A QUANTIFICAÇÃO DE SIBUTRAMINA POR CLAE..... 50
TABELA 12 – VALORES EXPERIMENTAIS OBTIDOS DO ENSAIO DE ESPECIFICIDADE DO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO POR ULTRAVIOLETA..... 57
TABELA 13- VALORES EXPERIMENTAIS OBTIDOS NO ENSAIO DE REPETITIVIDADE PELO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO NO ULTRAVIOLETA..... 60
TABELA 14 - VALORES EXPERIMENTAIS OBTIDOS NO ENSAIO DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA PELO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO NO ULTRAVIOLETA..... 61
TABELA 15- VALORES EXPERIMENTAIS OBTIDOS NA DETERMINAÇÃO DE SIBUTRAMINA PELO ENSAIO DE RECUPERAÇÃO..... 62
TABELA 16- ERROS RELATIVOS DOS MODELOS UTILIZANDO FAIXA ESPECTRAL COMPLETA SEM PRÉ-PROCESSAMENTO..... 72
TABELA 17- ERROS RELATIVOS DOS MODELOS UTILIZANDO FAIXA ESPECTRAL COMPLETA E PRÉ-PROCESSAMENTO MSC..... 72
TABELA 18- ERROS RELATIVOS DOS MODELOS UTILIZANDO FAIXA ESPECTRAL COMPLETA E PRÉ-PROCESSAMENTO SMOOTH..... 72
TABELA 19- ERROS RELATIVOS DOS MODELOS UTILIZANDO FAIXA ESPECTRAL COMPLETA E PRÉ-PROCESSAMENTO DETREND..... 73
TABELA 20- ERROS RELATIVOS DOS MODELOS UTILIZANDO INFRAVERMELHO MÉDIO SEM PRÉ-PROCESSAMENTO..... 73
TABELA 21- ERROS RELATIVOS DOS MODELOS UTILIZANDO INFRAVERMELHO MÉDIO E PRÉ-PROCESSAMENTO MSC..... 73
TABELA 22- ERROS RELATIVOS DOS MODELOS UTILIZANDO INFRAVERMELHO MÉDIO E PRÉ-PROCESSAMENTO SMOOTH..... 74
TABELA 23- ERROS RELATIVOS DOS MODELOS UTILIZANDO INFRAVERMELHO MÉDIO E PRÉ-PROCESSAMENTO DETREND..... 74
TABELA 24- ERROS RELATIVOS DOS MODELOS UTILIZANDO INFRAVERMELHO PRÓXIMO SEM PRÉ-PROCESSAMENTO..... 74
TABELA 25- ERROS RELATIVOS DOS MODELOS UTILIZANDO

INFRAVERMELHO PRÓXIMO E PRÉ-PROCESSAMENTO MSC..... 75
TABELA 26- ERROS RELATIVOS DOS MODELOS UTILIZANDO INFRAVERMELHO PRÓXIMO E PRÉ-PROCESSAMENTO SMOOTH..... 75
TABELA 27- ERROS RELATIVOS DOS MODELOS UTILIZANDO INFRAVERMELHO PRÓXIMO E PRÉ-PROCESSAMENTO DETREND..... 75
TABELA 28- ERROS RELATIVOS DOS MODELOS UTILIZANDO ESPECTRO FRAGMENTADO SEM PRÉ-PROCESSAMENTO..... 76
TABELA 29- ERROS RELATIVOS DOS MODELOS UTILIZANDO ESPECTRO FRAGMENTADO E PRÉ-PROCESSAMENTO MSC..... 76
TABELA 30- ERROS RELATIVOS DOS MODELOS UTILIZANDO ESPECTRO FRAGMENTADO E PRÉ-PROCESSAMENTO SMOOTH..... 76
TABELA 31- ERROS RELATIVOS DOS MODELOS UTILIZANDO ESPECTRO FRAGMENTADO E PRÉ-PROCESSAMENTO DETREND..... 77
TABELA 32- ERROS RELATIVOS DOS MODELOS UTILIZANDO ESPECTRO FRAGMENTADO E PRÉ-PROCESSAMENTO MSC..... 78
TABELA 33- ERROS RELATIVOS DOS MODELOS UTILIZANDO ESPECTRO FRAGMENTADO E PRÉ-PROCESSAMENTO DETREND..... 78
TABELA 34- ERROS RELATIVOS DOS MODELOS UTILIZANDO ESPECTRO FRAGMENTADO E PRÉ-PROCESSAMENTO SMOOTH..... 78
TABELA 35 – VALORES EXPERIMENTAIS DE REPETITIVIDADE PELO MÉTODO DRIFTS POR CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA..... 84
TABELA 36 - VALORES EXPERIMENTAIS DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA PELO MÉTODO DRIFTS POR CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA..... 84
TABELA 37 - VALORES EXPERIMENTAIS DE EXATIDÃO PELO MÉTODO DRIFTS POR CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA..... 85
TABELA 38- RESULTADOS DE MÉDIA E DESVIO PADRÃO DA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FÁRMACO NAS AMOSTRAS COMERCIAIS POR DIFERENTES MÉTODOS..... 86
TABELA 39 – FATORES DE DIFERENÇA ($f1$) E FATORES DE SIMILARIDADE ($f2$) PARA A DISSOLUÇÃO DA SIBUTRAMINA A PARTIR DOS MEDICAMENTOS GENÉRICO, SIMILAR E MAGISTRAL EM COMPARAÇÃO COM O REFERÊNCIA EM MEIO ÁCIDO..... 88
TABELA 40 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA EFICIÊNCIA DE DISSOLUÇÃO DA SIBUTRAMINA DE MEDICAMENTOS GENÉRICO E MAGISTRAL EM COMPARAÇÃO AO MEDICAMENTO DE REFERÊNCIA EM DIFERENTES MEIOS DE DISSOLUÇÃO..... 89
TABELA 41 – PARÃMETROS DA MODELAGEM MATEMÁTICA DA DISSOLUÇÃO EM SOLUÇÃO AQUOSA DOS MEDICAMENTOS ESTUDADOS 91
TABELA 42 – PARÃMETROS DO MODELO WEIBULL DA DISSOLUÇÃO EM MEIO ÁCIDO E TAMPONADO DOS MEDICAMENTOS ESTUDADOS..... 93

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURA QUÍMICA DO CLORIDRATO DE SIBUTRAMINA MONOHIDRATADO..... 12
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO DA REFLEXÃO ESPECULAR E DIFUSA EM UMA AMOSTRA PARTICULADA..... 16
FIGURA 3 - ESQUEMA DE REPRESENTAÇÃO DO MÉTODO DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA..... 19
FIGURA 4 - ALISAMENTO PARA MÉDIA MÓVEL..... 21
FIGURA 5- ESQUEMA REPRESENTANDO AS VARIÁVEIS ORIGINAIS DESCRITAS PELAS COMPONENTES PRINCIPAIS..... 23
FIGURA 6 - FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DA PESQUISA..... 38
FIGURA 7- GRÁFICO RELATIVO À LINEARIDADE DA SIBUTRAMINA NA FAIXA DE CONCENTRAÇÃO DE 0,1 A 100 $\mu g.mL^{-1}$ REPRESENTADO EM (a) DE 0,1 A 5,0 E (b) 10,0 A 100,0 $\mu g.mL^{1}$..... 56
FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA (a) CURVA ANALÍTICA E (b) EQUAÇÃO DA RETA DA SIBUTRAMINA OBTIDA POR ESPECTROMETRIA NO ULTRAVIOLETA..... 58
FIGURA 9 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DESCRITIVA DOS VALORES DE ABSORVÂNCIA, EM 223 nm, DE SOLUÇÕES DE SIBUTRAMINA 20 $\mu g.mL^{-1}$ EM DIFERENTES VALORES DE pH..... 63
FIGURA 10 – GRÁFICO DOS VALORES DE ABSORVÂNCIA DAS LEITURAS REALIZADAS NOS TEMPOS 0 E 24 HORAS APÓS O PREPARO DAS SOLUÇÕES DE SIBUTRAMINA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES 65
FIGURA 11- REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS VALORES DE ABSORVÂNCIA DAS LEITURAS REALIZADAS EM 223 nm NOS DIFERENTES EQUIPAMENTOS PARA SOLUÇÕES DE SIBUTRAMINA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES 66
FIGURA 12 –ESPECTROS NO INFRAVERMELHO COM REFLETÂNCIA DIFUSA DE SIBUTRAMINA COM ATRIBUIÇÕES DAS BANDAS DE MAIOR RELEVÂNCIA NAS REGIÕES DE (a) 4000 A 1000 cm^{-1} E (b)1500 A 80 cm^{-1}..... 67
FIGURA 13- ESPECTRO DA MISTURA PADRÃO DE EXCIPIENTES (a) COMPARADO AOS ESPECTROS DO FÁRMACO PURO E DA MISTURA FÁRMACO/EXCIPIENTES (b)..... 68
FIGURA 14- GRÁFICO DE SCORES EM PC 2 EM FUNÇÃO DE SCORES NA PC3..... 70
FIGURA 15 – ESPECTROS DO CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO..... 71
FIGURA 16- GRÁFICO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA SELEÇÃO DA REGIÃO ESPECTRAL..... 77
FIGURA 17- GRÁFICO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA SELEÇÃO DO TIPO DE PRÉ-PROCESSAMENTO E NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES..... 79
FIGURA 18- GRÁFICO DE RMSEC EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES DO MODELO SELECIONADO..... 81
FIGURA 19- GRÁFICO DO VETOR DE REGRESSÃO VERSUS VARIÁVEIS..... 81

FIGURA 20- GRÁFICO DE RESÍDUOS DE STUDENTS VERSUS LEVERAGE PARA O MODELO DESENVOLVIDO DE MELHOR DESEMPENHO..... 82
FIGURA 21- GRÁFICO DOS VALORES REAIS VERSUS VALORES PREVISTOS PARA O MODELO DESENVOLVIDO DE MELHOR DESEMPENHO..... 83
FIGURA 22 – COMPARAÇÃO ENTRE OS PERFIS DE DISSOLUÇÃO *IN VITRO* DO MEDICAMENTO REFERÊNCIA (REDUCTIL®) AOS MEDICAMENTOS GENÉRICO, SIMILAR (VAZY®) E MAGISTRAL, EM (a) MEIO ÁCIDO, (b) ÁGUA E (c) TAMPÃO FOSFATO..... 87
FIGURA 23 – COMPARAÇÃO ENTRE O PERFIL DE DISSOLUÇÃO *IN VITRO* DO MEDICAMENTO REFERÊNCIA (a), GENÉRICO (b), SIMILAR (c) E MAGISTRAL (d) ÁGUA DESTILADA..... 91
FIGURA 24 – COMPARAÇÃO ENTRE O PERFIL DE DISSOLUÇÃO *IN VITRO* DO MEDICAMENTO REFERÊNCIA (a), MAGISTRAL (b), GENÉRICO(c) E SIMILAR (d) EM FLUIDO GÁSTRICO SIMULADO (HCl 0,1 $mol.L^{-1}$)..... 92
FIGURA 25 – COMPARAÇÃO ENTRE O PERFIL DE DISSOLUÇÃO *IN VITRO* DO MEDICAMENTO (a) REFERÊNCIA, (b) GENÉRICO, (c) SIMILAR E (d) MAGISTRAL EM FLUIDO INTESTINAL SIMULADO (TAMPÃO FOSFATO pH 6,8)..... 93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Analysis of Variance
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMD - Concentração Média Determinada
CV - Coeficiente de Variação
DPR - Desvio Padrão Relativo
DRIFTS – Diffuse Reflection FT-IR Spectroscopy
ED – Eficiência de Dissolução
FDA - Food and Drug Adminstration
HDL – High Density Lipoprotein
HSL - Lipase Hormônio Sensível
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICH – International Conference of Harmonization
IMC – Índice de Massa Corporal
IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry
IV – Infravermelho
LD - Limite de Detecção
LDL – Low Density Lipoprotein
LPL - lipase lipoprotéica
LQ - Limite de Quantificação
MP – Matéria Prima
MSC – Multiplicative Scatter Correction
CSM – Critério de seleção do modelo
OMS – Organização Mundial da Saúde
PC – Componente Principal
PCA – Análise por Componentes Principais
PCR – Principal Components Regression
PLSR – Partial Least Square Regression
PRESS – Somatório dos quadrados dos erros de previsão
RDC – Resolução da Diretoria Colegiada
RMSEP – Root Mean Squared Error of Prediction
USP – United States Pharmacopeia
UV-VÍS – Ultravioleta-Visível
VL – Variável Latente
VLDL – Very Low Density Lipoprotein
XRP-D – X Ray Powder Diffraction
UFPR – Universidade Federal do Paraná
DAD – Diode Array Detector

RESUMO

O cloridrato de sibutramina monohidratado é um fármaco importante utilizado no tratamento para obesidade e sobrepeso como terapia de primeira escolha. Farmacopéias não apresentam, até o momento, monografia para quantificação dessa substância. No presente trabalho, foram desenvolvidos e validados diferentes métodos analíticos para determinação de sibutramina em forma farmacêutica. Em um primeiro momento, realizou-se o desenvolvimento e validação através de espectroscopia no ultravioleta. A validação do método foi feita de acordo com os critérios das normas vigentes (ANVISA e ICH). Para esse estudo, amostras foram dissolvidas em água e as medidas feitas a 223 nm. A linearidade obtida apresentou um coeficiente de correlação de 0,9997 para o intervalo analítico de 5 a 30 $\mu g.mL^{-1}$. Os valores calculados para limites de detecção e quantificação foram de 0,13 e 0,43 $\mu g.mL^{-1}$. A exatidão obtida apresentou resultados de recuperação de 99,95 ± 1,25% para concentração final de 10,0 $\mu g.mL^{-1}$; 99,57 ± 1,17% para 20,0 $\mu g.mL^{-1}$ e 99,48 ± 0,98% para 30,0 $\mu g.mL^{-1}$. A repetitividade e a precisão intermediária apresentaram valores de coeficiente de variação de 1,36% e 1,44%, respectivamente. A robustez foi avaliada em função da variação do pH, temperatura e tempo de leitura. Esses parâmetros não afetaram a robustez do método de modo estatisticamente significativo. O método foi específico para quantificação do fármaco avaliando a interferência dos excipientes. A espectrometria no infravermelho é uma análise muito rápida, não destrutiva. No entanto, a sobreposição de sinais dos excipientes, já que estes estão presentes em concentração 20 vezes maior no espectro da sibutramina, torna a análise univariada prejudicada. Os modelos multivariados foram desenvolvidos a partir de 22 amostras contendo entre 1 e 30 mg de sibutramina, diluídas em uma mistura padrão de excipientes. Cinco amostras preparadas em idêntica forma foram reservadas para a fase de previsão. Diversos modelos multivariados foram desenvolvidos, utilizando-se diversas faixas espectrais, diferentes tipos de pré-processamento de sinais (detrend, alisamento e MSC) e números de variáveis latentes. O melhor modelo foi aquele que utilizou espectro fragmentado, 10 variáveis latentes, e espectros alisados. Nestas condições, erros médios de validação da ordem de 1,8% foram observados, assim como recuperações entre 94 e 112% na análise de medicamentos. Os perfis de dissolução *in vitro* demonstraram dissolução de aproximadamente 100% do fármaco em 120 minutos. A metodologia f1/f2 demonstrou similaridade entre os perfis de todos os medicamentos testados e o de referência. A metodologia de eficiência de dissolução demonstrou não haver diferença estatística desses dados para os medicamentos testados. A modelagem matemática demonstrou que o modelo matemático sigmoidal Weibull é o mais adequado para descrever os dados experimentais.

Palavras-chave: Sibutramina, Calibração Multivariada, Refletância Difusa, Perfil de dissolução.

ABSTRACT

Sibutramine hydrochloride monohydrate is a widely used drug to obesity and overweight treatment used as a first choice therapy. The pharmacopoeias have not yet provided an official method for the quantification of this substance. The present study describe an ultraviolet spectrometric method for the quantification of sibutramine hydrochloride monohydrate in capsules. For this study, samples were dissolved in water and the measurements were performed at 223 nm. The linearity was obtained with the correlation coefficient of 0,9997 for the analytical range from 5 to 30 $\mu g.mL^{-1}$. The calculated values for the detection and quantification limits were 0,13 and 0,43 $\mu g.mL^{-1}$, respectively. Accuracy was employed by recovery experiments and the obtained values were 99,95 ± 1,25%, 99,57 ± 1,17% and 99,48 ± 0,98 % for the concentrations of 10, 20 and 30 $\mu g.mL^{-1}$, respectively. The intermediate precision and repeatability values presented a relative standard deviation (RSD) of 1,36% and 1,44%, respectively. The robustness was evaluated by pH, temperature and measurement time. These parameters did not affect the resulting absorbance significantly. The method was selective for the drug quantification in the presence of excipients. The infrared spectrometry is a rapid and non destructive analysis. Nevertheless, the overlapping of excipient signal is a problem, mainly because it is present in concentration 20 fold upper than sibutramine. Multivariate models were developed by 22 samples containing between 1 and 30 mg of sibutramine diluted on a mixture of excipients. Five samples prepared of the same way were reserved to the prediction phase. Different multivariate models were developed using different spectral range, pre-processing sign systems (detrend, smooth, MSC) and latent variable number. The best model was that presented fragmented spectra, 10 latent variables and smooth pre-processing. In this conditions, relatives errors of validation observed was 1,8% as recovery between 94% and 112% on drug analysis. The *in vitro* dissolution profile demonstrated a release of the drug near 100% in 120 minutes. The f1/f2 methodology demonstrated similarity between all the drugs tested and the reference drug. The dissolution efficiency did not presented statistical difference among the drugs tested data. The mathematical modeling demonstrated that Weibull is the most appropriated model to describe the experimental data.

Key-words: Sibutramine, Multivariate Calibration, Diffuse Reflectance, Dissolution Profile.

1 INTRODUÇÃO

O excesso de peso e a obesidade têm se tornado um grave problema de saúde pública em todo o mundo. Pacientes obesos têm maiores riscos de doenças arteriais coronarianas, hipertensão, hiperlipidemia, *Diabetes mellitus*, acidente vascular cerebral, osteoartrite e doença pulmonar obstrutiva (MARINHO et al., 2003). Dentre as medidas de tratamento disponíveis estão intervenções farmacológicas, não-farmacológicas ou cirúrgicas. As medidas farmacológicas incluem medicamentos inibidores do apetite como as anfetaminas, inibidor da reabsorção intestinal de gorduras, o orlistat, e estimulantes da saciedade, como a sibutramina (XAVIER, SUNYER, 2006).

Os fármacos, orlistat e sibutramina, vêm sendo usados globalmente para o tratamento da obesidade. No entanto, a sibutramina apresenta maior eficácia quando comparada ao inibidor da reabsorção intestinal de gorduras (HALFORD, 2006).

Inicialmente desenvolvido como um antidepressivo, o cloridrato de sibutramina monohidratado é um fármaco de primeira escolha para o tratamento da obesidade. Age como um inibidor da recaptação de aminas causando o aumento da saciedade (ELFHAG et al., 2005) além de estimular a termogênese (PADWAL, MAJUMBAR, 2007).

A sibutramina é um fármaco aprovado pelas agências reguladoras, inclusive ANVISA, para uso em longo prazo, disponível em doses de 10 e 15 mg/dia. Trata-se de um medicamento de bastante aceitação pelos médicos. Apesar dos muitos estudos publicados a respeito deste fármaco não foi encontrada monografia farmacopéica com parâmetros estabelecidos para o seu controle de qualidade. Uma etapa importante na análise da sibutramina é a determinação do teor seja para matéria prima seja para forma farmacêutica. Na pesquisa bibliográfica realizada encontramos apenas trabalhos de determinação quantitativa por CLAE. A sibutramina é uma substância que possui um cromóforo característico com intensa absorção na região do ultravioleta o que justifica a possibilidade de desenvolvimento de um método espectrométrico.

O doseamento por CLAE tem sido o método de escolha para a identificação e quantificação de muitos fármacos pelo fato da técnica combinar método de separação e quantificação, o que confere mais segurança quando estão presentes outras substâncias, possíveis interferentes, como impureza, substâncias aparentadas e produtos de degradação, além de boa sensibilidade. Apesar das vantagens, é um método ainda caro e o preparo da formulação pode requerer um tratamento prévio de extração e pré-purificação, nem sempre disponível em laboratórios de pequeno ou médio porte ou, o que é mais preocupante, em unidades menores como farmácias magistrais em que o controle de qualidade é uma exigência legal (ANVISA, 2007).

A indústria está procurando por métodos mais rápidos. As espectroscopias no ultravioleta e no infravermelho combinadas com a calibração multivariada parece ser uma alternativa promissora (LUYPAERT, 2002).

As espectroscopias apresentam um conjunto de características que as tornam ferramentas analíticas alternativas, quando se consideram os custos e a facilidade de execução da técnica.

Espectroscopia no ultravioleta é uma técnica rápida, robusta, de baixo custo, não necessita de mão de obra especializada e bastante sensível (MARKOPOLOU, MALLIOU, KOUNDOURELLIS, 2005).

Por todas estas qualidades, esta técnica pode ser até mesmo introduzida em farmácias magistrais para o controle de qualidade, tornando o medicamento produzido ainda mais confiável.

Espectroscopia no infravermelho com refletância difusa associada à calibração multivariada tem se apresentado como um método eficiente para a determinação de fármacos em formas farmacêuticas. Através desse método é possível executar a quantificação desses fármacos sem a necessidade de tratamento prévio da amostra, como etapa de extração ou pré-purificação devido o método ser não destrutivo e facilitando a rotina do controle de qualidade de medicamentos.

Não se encontrou também na literatura informação em relação ao seu perfil de dissolução. O presente estudo tem por objetivo também desenvolver um método para avaliar a dissolução de especialidades farmacêuticas contendo sibutramina disponíveis no mercado.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Desenvolver e validar métodos para a determinação de cloridrato de sibutramina monohidratado em forma farmacêutica, utilizando métodos espectrofotométricos e calibração multivariada, além de avaliar a dissoução do fármaco *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

Desenvolver e validar um método para quantificação por espectroscopia no ultravioleta para quantificação de sibutramina em matéria-prima e forma farmacêutica de acordo com normas internacionais;

Desenvolver modelos de calibração multivariada para a espectroscopia no infravermelho com refletância difusa utilizando misturas do padrão farmacêutico com excipientes (placebo) em diferentes faixas espectrais e testar a capacidade de previsão dos modelos de calibração multivariada com validação externa de amostras;

Identificar o sistema de melhor desempenho e validá-lo para determinação do fármaco em especialidades farmacêuticas;

Desenvolver estudos de dissolução *in vitro* para formas farmacêuticas contendo sibutramina comparando as diferentes especialidades farmacêuticas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 OBESIDADE

A obesidade emergiu como epidemia no final do século XX, nos países desenvolvidos, e atualmente atinge qualquer nível socioeconômico sem distinção de região, país ou grupo étnico (BERNARDI; CICHELERO; VITOLO, 2005). A definição primária dessa patologia é acúmulo excessivo de lipídeo no corpo, classificada a partir de um IMC superior a 30 $kg.m^{-2}$ (VASQUES; MARTINS; AZEVEDO, 2004). Apresenta hiperfagia sem correspondente elevação no gasto energético ou deficiência no metabolismo e utilização de substratos (SWEETMAN, 2006).

A prevalência da obesidade e suas comorbidades têm aumentado por todo mundo. Obesidade abdominal ou visceral esta intimamente ligada à hipertensão, intolerância a glicose, hipertrigliceridemia com baixos níveis de HDL-c e hiperinsulinemia, acidente vascular cerebral, doença pulmonar obstrutiva e apnéia do sono resultando na chamada síndrome metabólica, com aumentado risco de doença cardiovascular (DAMASO, 2003).

Obesidade é também um fator de risco para condições ortopédicas, dermatológicas e tromboembólicas. Além disso, o excesso de peso é um componente de discriminação na sociedade como um todo. Atualmente há fortes evidências que a perda de peso em pessoas obesas e acima do peso reduz riscos cardiovasculares (HALPERN, 2002).

A obesidade alcança proporções epidêmicas, na maioria dos países industrializados, em função do estilo de vida moderno que expõe os indivíduos a alimentos altamente calóricos além do comportamento sedentário decorrente das comodidades criadas pelos avanços tecnológicos, podendo tornar-se uma epidemia global (PARK et al., 2004).

Fatores genéticos, ambientais, metabólicos e comportamentais têm papel relevante. Assim, a obesidade pode ser classificada em dois contextos: exógena, influenciada por fatores externos de origem comportamental, dietética e/ou ambiental, os quais representam 95 % ou mais dos casos; e endógena relacionada a componentes genéticos, neuropsicológicos, endócrinos e

metabólicos, os quais representam aproximadamente 5% dos casos (GOTTO, 2006).

3.1.1 Aspectos Epidemiológicos

O excesso de peso (IMC maior ou igual a 25 $Kg.m^{-2}$) se apresenta como grave problema de saúde pública nas sociedades emergentes e países em desenvolvimento. Há uma correlação negativa entre excesso de peso e obesidade com status social, principalmente entre mulheres.

Embora encarada por muitos como um problema de estética, a obesidade vem sendo associada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, ao cálculo biliar, doença respiratória, osteoartrite e algumas formas de câncer. Em países como a Índia e a China o aumento de 1% na prevalência de obesidade gera 20 milhões de novos casos (SWEETMAN, 2006).

Nas últimas três décadas temos observado nas nações em desenvolvimento um fenômeno chamado de inversão epidemiológica. Isto significa que as doenças infecto-contagiosas, que antes eram o principal problema de saúde pública agora foram superadas por um grupo de enfermidades conhecidas como crônico-degenerativas como *Diabetes* tipo 2, as dislipidemias, as enfermidades cardiovasculares e a hipertensão arterial (DAMASO, 2003).

De acordo com pesquisas realizadas no Brasil, a Pesquisa de Orçamentos Familiares (2002-2003), a região Norte apresenta a maior prevalência de obesidade e excesso de peso, seguida das regiões Sudeste e Centro-Oeste enquanto as regiões Sul e Nordeste encontram-se com as menores porcentagens (IBGE, 2003).

O sedentarismo e a transição nutricional caracterizada pelo consumo de gorduras, açúcar e cereais refinados além da redução do consumo das fibras têm feito da obesidade a “síndrome do novo mundo”. Estas pesquisas sugerem que famílias mais pobres tendem a consumir dietas de alta densidade calórica em função do preço acessível, ao passo que seu lazer se restringe a assistir televisão. Além disto, a obesidade parece ser um problema feminino segundo as prevalências maiores que no sexo masculino (MARINHO et al., 2003).

Segundo o IBGE, no Brasil 31,9% da população acima de 20 anos encontra-se acima do peso desejável, afetando 8,9% dos homens, 13,1% das mulheres e 15% das crianças (IBGE, 2003).

O problema fica ainda mais importante quando analisamos a obesidade na população infantil. No Brasil, em 1989, existiam cerca de um milhão e meio de crianças obesas, sendo que a prevalência era maior entre meninas do que meninos. Em 1999, 12% das crianças entre 6 e 11 anos e 14 % das crianças entre 12 e 19 anos estavam acima do peso (DAMASO, 2003).

Entre as crianças pertencentes às famílias de renda maior, a proporção de obesos era em torno de 8%, comparada com 2,5 % nas pertencentes às famílias de renda menor (ABRANTES et al., 2002).

Além disso, o aumento nas taxas de obesidade é traduzido como aumento nos custos para o sistema de saúde devido a uma maior necessidade de atendimento especializado e incapacitação do doente (GOTTO, 2006).

3.1.2 Diagnóstico

O limite entre peso normal (peso da população associado à menor mortalidade para altura) é arbitrário, podendo haver diferenças entre as populações estudadas. Podem-se estabelecer basicamente dois tipos de diagnósticos frente a um paciente: um diagnóstico quantitativo, que se refere à massa corpórea ou à massa de tecido adiposo e um diagnóstico qualitativo que se refere ao padrão de distribuição de gordura corporal, que por sua vez é um forte indicador da presença de adiposidade visceral. As tabelas 1 e 2 mostram esses diagnósticos.

TABELA 1 - TABELA DE INDICE DE MASSA CORPORAL

Categoria	IMC (Kg.m^{-2})	
Abaixo do peso	Abaixo de 18,5	Peso Saudável equivale ao peso Normal.
Peso normal	18,5 - 24,9	
Sobrepeso	25,0 - 29,9	
Obesidade Grau I	30,0 - 34,9	
Obesidade Grau II	35,0 - 39,9	
Obesidade Grau III	40,0 e acima	

FONTE: www.abeso.org.br

TABELA 2 - DIAGNÓSTICO QUALITATIVO DE OBESIDADE

Métodos mais utilizados para diagnosticar obesidade (qualitativo)
Medida do maior perímetro abdominal entre a última costela e a crista ilíaca
Relação cintura-quadril
Absorpciometria dual de raios x (DXA)*
Ultra-sonografia*
Tomografia computadorizada e ressonância nuclear magnética*

FONTE: www.abeso.org.br
*Métodos de uso experimental e de uso limitado na prática clínica.

3.1.3 Tratamento

O tratamento da obesidade pode ser dividido em intervenções farmacológicas, não-farmacológicas ou cirúrgicas (GOTTO, 2006).

Para a perda e manutenção do peso, o regime considerado mais efetivo atualmente combina terapia comportamental, dieta hipocalórica e aumento das atividades físicas. Essas medidas devem ser seguidas por no mínimo três meses (WANNMACHER, 2004).

As diretrizes responsáveis pelas principais entidades internacionais de obesidade são unânimes em recomendar o uso de medicamentos para pacientes com um IMC maior que 30 kg.m^{-2} ou 25 kg.m^{-2} com alguma doença associada, como *Diabetes*, hipertensão ou hipercolesterolemia. Para alguns casos, admite-se hoje utilizar medicamentos até pela vida toda (LEAN, 2006).

Conseguida uma mudança de hábitos de vida durante um tratamento de seis meses com fármacos, em muitos casos a medicação poderá ser interrompida sem que o paciente recupere o peso perdido. Considera-se um prazo mínimo de seis meses para que tais mudanças possam estar consolidadas (WANNMACHER, 2004).

3.1.3.1 Tratamento cirúrgico

A cirurgia bariátrica é uma opção para pacientes obesos mórbidos ou naqueles com IMC superior a 35 $Kg.m^{-2}$ com comorbidades associadas. Indivíduos incapazes de manter a perda de peso após medidas não cirúrgicas adequadas, sem contra indicações para a cirurgia e motivados para longo seguimento são candidatos a este procedimento (WANNMACHER, 2004).

3.1.3.2 Tratamento farmacológico

Os medicamentos mais usados atualmente em tratamento para o emagrecimento podem agir de três diferentes maneiras: inibindo o apetite, estimulando a saciedade ou bloqueando a absorção intestinal de gorduras.

3.1.3.2.1 inibidores do apetite

Essa classe compreende as anfetaminas simpatomiméticas e fármacos relacionados. Atravessam facilmente a barreira hematoencefálica, explicando-se seus efeitos centrais (GOODMAN, GILMAN, 2006).

São fármacos anorexígenos utilizadas por várias décadas para tratamento em curto prazo devido aos seus efeitos colaterais e elevado potencial de abuso e dependência. Por razões de segurança seu uso foi proibido nos países da Comunidade Européia. A tendência atual é utilizá-los apenas para os pacientes que não possam adquirir a sibutramina e o orlistat ou que não consigam emagrecer com eles. Temos três substâncias deste grupo disponíveis no Brasil atualmente: a dietilpropiona (anfepramona), o femproporex e o mazindol (VASQUES;,MARTINS, AZEVEDO, 2004).

3.1.3.2.2 inibidores da reabsorção da gordura intestinal

O maior representante deste grupo é o orlistat, trata-se de um dos tratamentos farmacológicos que podem ser utilizados em longo prazo. Ele age inibindo a lipase pancreática diminuindo a absorção de gordura no trato gastrintestinal promovendo perda de peso. Contudo não apresenta efeito supressor em episódios de compulsão alimentar por não haver ação central (VASQUES;,MARTINS, AZEVEDO, 2004).

3.1.3.2.3 estimulantes da saciedade

O terceiro grupo, dos sacietógenos, reúne os medicamentos que têm como principal mecanismo de ação o estímulo da sensação de saciedade. Estes fazem com que a pessoa sinta fome, porém, com uma menor quantidade de alimentos fica satisfeita.

O principal representante deste grupo é a sibutramina, que além do orlistat, é também indicada em tratamentos em longo prazo, e pode apresentar uma segunda ação que ajuda no emagrecimento: o aumento do gasto energético.

Outros possíveis sacietógenos são medicamentos utilizados como antidepressivos, como a fluoxetina e a sertralina. Atualmente não têm sido considerados agentes antiobesidade, apesar de reconhecer-se que possam ser úteis em algumas situações, como na obesidade associada à depressão ou à compulsão alimentar (LEAN, 2006).

Qualquer que seja o mecanismo de ação dos medicamentos para emagrecer, já está comprovado que os resultados do tratamento são mais eficazes quando se dá a devida ênfase à prática de atividades físicas e à melhoria no hábito alimentar.

3.2 SIBUTRAMINA

Sibutramina, introduzida no mercado em 1997, é um fármaco antiobesidade com duplo mecanismo de ação. Ela contém um potente inibidor da recaptação de serotonina e noradrenalina e pode estimular a termogênese por ativação de $ß_3$-adrenoceptores no tecido adiposo (HALPERN et al., 2002).

Estudos subseqüentes mostraram um efeito significante do fármaco na perda de peso (redução de no mínimo 5% do peso inicial) devido a efeitos sacietógenos e calorigênicos (LEAN, 2006).

É administrada por via oral em doses iniciais de 10 mg, geralmente administrada pela manhã. A dose deve ser aumentada num máximo de 15 mg ao dia devido aos efeitos do fármaco sobre os batimentos cardíacos e sobre a pressão sanguínea. Já existe um sal de sibutramina comercializado na forma de mesilato hemidratado (PARK et al., 2004).

3.2.1 Farmacologia

A administração de sibutramina resulta na perda de peso, em média, de 8%, redução no IMC 7,4% e redução nas medidas 7%. O mecanismo de ação da sibutramina ocorre por inibir a recaptação de serotonina e noradrenalina e, consequentemente, incrementar funções centrais desses neurotransmissores através de receptores $5\text{-}HT_{2A/2C}$ e $ß_1$-adrenérgico, respectivamente, conseqüentemente, aumentando a taxa metabólica (HALPERN et al., 2002).

O fármaco, sibutramina (BTS 54 524), depois de absorvido, é rapidamente e extensamente metabolizado por N-desmetilação a metabólitos de aminas primárias e secundárias (BTS 54 354 e BTS 54 505). A função *in vivo* da sibutramina é predominantemente em função destes dois metabólitos (RADHAKRISHNA et al., 2000).

Os metabólitos ativos têm perfis farmacológicos semelhantes, mas são 100 vezes mais ativos que sibutramina como inibidores de recaptação, apesar de suas concentrações plasmáticas serem muito baixas quase indetectáveis (CHEN et al., 2002).

O metabolismo oxidativo resulta em aminas hidroxiladas que são excretadas como glicuronídeos conjugados (JEFFERY et al., 1996).

3.2.2 Vantagens do Tratamento Farmacológico Utilizando Sibutramina

Estudos demonstram que a sibutramina apresenta a função serotoninérgica, nas concentrações extracelulares, de forma dose dependente.

Agentes liberadores de serotonina exercem seus efeitos por entrar nos nervos terminais pela alta afinidade pelos transportadores, onde eles deslocam serotonina das vesículas de armazenamento. Porém, a administração crônica de sibutramina não tem mostrado efeito significativo no número de sítios nas regiões cerebrais. A sibutramina protege contra a depleção de sítios de recaptação de serotonina, produzida, por exemplo, por altas doses de fenfluramina. Além disso, sibutramina claramente não tem potencial de ser neurotóxica a doses farmacologicamente relevantes (CHEETHAM et al., 2000).

Associada a hábitos de vida saudáveis, o uso de sibutramina resulta em relevante melhora na função endotelial arterial braquial em obesos não hipertensos. A perda de peso com o uso desse fármaco e seus efeitos metabólicos associados podem ser parcialmente responsáveis por uma melhoria na função arterial, parte da qual pode ser atribuída a um aumento na sensibilidade de insulina, além de modestos aumentos nas taxas de HDL-c, portanto um discreto aumento no controle de glicemia de diabéticos (SHECHTER et al., 2005).

Observou-se, também, que pacientes depressivos tratados com sibutramina tiveram uma redução da depressão comparada com pacientes depressivos que não faziam uso deste medicamento. Além disto, há um grande benefício em pacientes com síndrome do comer compulsivo. Também se observa um efeito positivo no humor de pacientes tratados com sibutramina (ELFHAG et al., 2005).

Existem, ainda, estudos quanto à ação da sibutramina em pacientes obesos com a síndrome do ovário policístico, que relatam um efeito benéfico de incremento nas taxas de hiperandrogenemia e hirsutismo, concluindo que a sibutramina exibe ações úteis em parâmetros cosméticos, hormonais, metabólicos e risco cardiovascular. Deve ser evitada em pacientes com transtorno afetivo

bipolar onde existe maior disponibilidade de neurotransmissores (SABUNCU et al., 2003).

3.2.3 Aspectos Físico-Químicos

A sibutramina é uma amina terciária pertencente à classe dos derivados de cicloalquilaminas, as quais foram inicialmente sintetizadas como agentes antidepressivos. Atualmente pertence à terapia de primeira escolha para o tratamento de obesidade.

É identificada quimicamente como uma mistura racêmica dos enantiomêros (+) e (-) do cloridrato de *N*-(1-(4-cloro-fenil-ciclobutil)-3-metilbutil)-*N*-*N* dimetilamina (RADHAKRISHNA et al., 2000).

Pó branco cristalino leitoso, massa molecular de 334,35 g/mL, solúvel em água: 2,9 $mg.mL^{-1}$ a pH 5,2 e também em metanol. O coeficiente de partição da sibutramina octanol:água é 30,9 em pH 5,0 (MERCK INDEX, 2001).

O ponto de fusão do cloridrato de sibutramina monohidratado é de 191-192°C (JEFFERY et al., 1996).

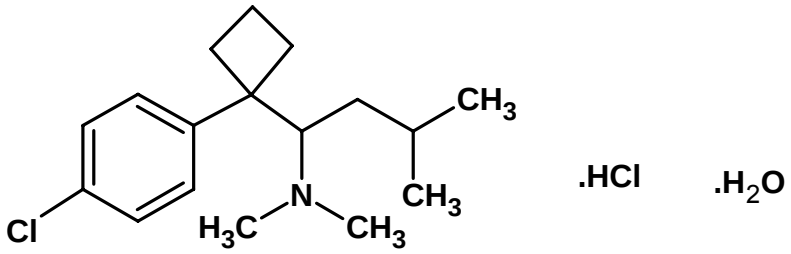


FIGURA 1 - ESTRUTURA QUÍMICA DO CLORIDRATO DE SIBUTRAMINA MONOHIDRATADO

Seu espectro no infravermelho caracteriza-se por $\upsilon_{máx}$ /(KBr) cm^{-1} em 2963 e 2866 (estiramento CH_3, CH_2 e CH), 2700 (estiramento NH), 1492 (estiramento C=C aromático), 1483 e 1474 (isobutil CH_3 e vibração em tesoura CH_2), 1428 e 1407 (NCH_3) 1395 e 1370 (isobutil CH_3), 1902 (aromático *p*-substituído), 1011 (CH aromático em plano), 834 e 823 (CH aromático fora do plano) (JEFFERY et al., 1996).

Estudos pré-clínicos indicam que os derivados hidroxilados da sibutramina são recaptadores da serotonina muito potentes e podem ser potencialmente

utilizados para tratamento de desordens do sistema nervoso central (LU et al., 2005).

3.3 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

Métodos espectroscópicos são usados como chave na solução de quase toda a química orgânica e analítica. Dois destes métodos baseiam-se na absorção seletiva de radiação eletromagnética. A introdução das espectroscopias, no ultravioleta na década de 1930 e no infravermelho na década de 1940, forneceu métodos efetivos de reconhecimento da funcionalidade das moléculas orgânicas (DUDLEY; FLEMING, 1997).

O método por UV-VIS distingue-se do infravermelho basicamente pela faixa espectral de interesse. O espectro em ultravioleta abrange a região de 200 a 400 nm do espectro eletromagnético, e na faixa do visível abrange os comprimentos de 400 a 800 nm. O espectro no infravermelho compreende a região de 12800 a 10 cm^{-1}, e subdivide-se em próximo, médio e distante.

Os métodos quantitativos no infravermelho diferem dos métodos espectroscópicos comuns no UV-VIS devido a maior complexidade dos espectros, à menor largura das bandas e às limitações instrumentais do aparelho de infravermelho (SKOOG, HOLLER, NIEMAN, 2002).

3.3.1 Espectroscopia no Ultravioleta

Métodos farmacopéicos contam fortemente com a análise simples por espectroscopia no ultravioleta para determinar substâncias ativas em uma formulação (WATSON, 2000).

A espectroscopia ultravioleta é usada para detectar sistemas conjugados pela possibilidade de transição dos elétrons do estado fundamental para o estado excitado de tais sistemas (DUDLEY, FLEMING, 1997).

É um método de determinação aplicado especificamente a sistemas conjugados. Quando uma molécula conjugada é irradiada com luz ultravioleta, a energia de absorção ocorre e um par de elétrons é promovido de um orbital

molecular ocupado mais elevado para um orbital molecular desocupado menos elevado (McMURRY, 1999).

A medida da absorção da luz pela solução é governada pela lei de Lambert-Beer, onde o resultado de absorção da solução é a diferença entre a intensidade da radiação incidida e da radiação transmitida através da solução. Obtém-se um espectro do comprimento de onda em função da absorvância ou transmitância (VOGEL, 1989).

Dentre as várias técnicas analíticas, a espectroscopia no ultravioleta é uma das mais populares. O ultravioleta, assim como infravermelho, usualmente contém dados não específicos que podem ser convertidos em informações úteis por derivação ou métodos de calibração multivariada (MARKOPOLOU, MALLIOU, KOUNDOURELLIS 2005).

3.3.2 Espectroscopia no Infravermelho

A espectroscopia em infravermelho é útil para detecção e identificação da vibração das moléculas, especialmente das características vibracionais de ligações duplas e triplas em vários grupamentos funcionais (DUDLEY, FLEMING, 1997).

A radiação espectral do infravermelho compreende radiação do espectro eletromagnético com números de onda no intervalo de aproximadamente 12800 a 10 cm^{-1} e divide-se em próximo, médio e distante conforme a tabela 3.

TABELA 3- SUBDIVISÕES DO INFRAVERMELHO

Designação	**Abreviação**	**Número de onda (cm^{-1})**
INFRAVERMELHO PRÓXIMO	NIR	12800 - 4000
INFRAVERMELHO MÉDIO	MIR	4000 - 200
INFRAVERMELHO DISTANTE	FIR	200 - 10

FONTE: SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002

A espectroscopia no infravermelho é uma técnica quantitativa analítica rápida e não destrutiva sem a necessidade de reagentes ou solventes.

Métodos espectroscópicos no infravermelho não somente atraem a indústria, mas também a pesquisa e têm crescido substancialmente em uso como

uma técnica de controle de qualidade na indústria farmacêutica (PASQUINI, 2003).

A técnica promove uma série de vantagens atrativas:

Permite o registro de um espectro para sólidos e formas líquidas, com pouco ou nenhum pré-tratamento da amostra;

Permite informação química e física sobre as amostras como viscosidade, conteúdo hidratante, polimorfismo;

Oferece determinações multiparâmetros de um único espectro (BLANCO & ALCALÁ, 2006).

Infelizmente, as baixas seletividades fazem com que sua aplicabilidade fique seriamente comprometida, quando há necessidade de se analisar matrizes complexas.

Muitas alternativas têm sido propostas para contornar os problemas surgidos. No entanto, a maior parte delas está fundamentada na aplicação de processos de separação prévios, os quais acrescentam etapas que atentam contra a reprodutibilidade da determinação. Grande parte dos fármacos apresenta um sinal bastante intenso na região do infravermelho, a sua determinação por espectroscopia é viável mesmo em concentrações traço. No entanto a presença de outras espécies inviabiliza a determinação, em função da intensa sobreposição de sinais.

Tendo em vista tal inconveniente busca-se associar a quimiometria, que é o uso de técnicas matemáticas e estatísticas para extrair informações relevantes dos dados analíticos. Seu uso qualitativo tem se tornado comum, por exemplo, para o controle de qualidade de fármacos basicamente na identificação de matéria-prima (PASQUINI, 2003).

3.3.2.1 Refletância difusa

Espectroscopia de refletância difusa é um método não destrutivo que não requer instrumentação cara e envolve pouquíssima preparação da amostra minimizando o risco de induzir transição polimórfica, como o X-RPD e a espectroscopia Raman (KIPOROUS et al., 2005).

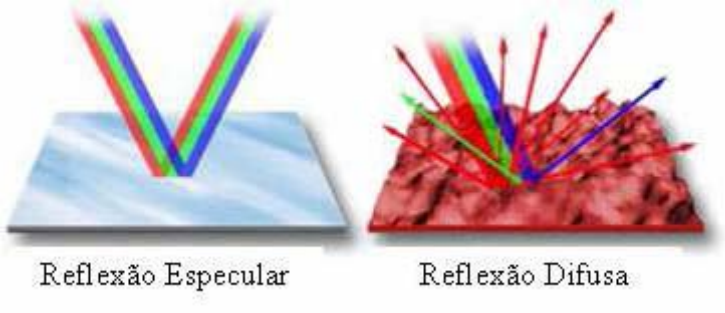


FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO DA REFLEXÃO ESPECULAR E DIFUSA EM UMA AMOSTRA PARTICULADA
FONTE: DAVISON et al., 2005.

Medidas de refletância difusa de amostras sólidas é um método distinto de medida aplicado à espectroscopia no infravermelho. Na refletância difusa, dispersão e absorvância pelos grânulos sólidos contribuem para mudar a intensidade do sinal. Esta análise ocorre em superfícies não totalmente planas, podendo a amostra ser contínua ou fragmentada (pó). Desta forma, o feixe incidente penetra a superfície da amostra interagindo com a matriz, retornando à superfície da mesma após absorção parcial e múltiplos espalhamentos (KONZEN et al., 2003).

A reflexão especular é de maior intensidade na região onde a amostra apresenta forte absorção, e neste caso, podem ocorrer distorções importantes nos espectros obtidos (FERRÃO, 2001).

Esse tipo de medida tem sido apropriado para determinação quantitativa de uma substância em comprimidos e cápsulas por causa do caminho óptico mais longo, resultando em dispersão interna, podendo oferecer informações as quais são melhores correlacionadas com o conteúdo das amostras do que a superfície dominada pelo sinal de refletância (PASQUINI, 2003).

3.4 CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

A aquisição e análise de dados eram atividades freqüentemente demoradas, entediantes nos laboratórios analíticos. O advento dos computadores ultra-rápidos aumentou grandemente a aquisição de dados e capacidade de

análises e tem provido ao analista oportunidades de usar muitas medidas para calibrar um instrumento (THOMAS, 1994).

A análise univariada pode apenas fornecer resultados exatos se o sinal medido não tiver contribuições de outras fontes. Portanto apenas o analito de interesse deve contribuir para o sinal medido (BRO, 2003).

Ao invés desta aplicação, técnicas de calibração multivariada baseado em dados multivariados obtidos de instrumentos analíticos têm sido propostas para eliminação das desvantagens de um único dado processado (DINÇ, OZDEMIR, 2005).

Quimiometria é uma área especificamente destinada à análise de dados químicos de natureza multivariada que emprega métodos matemáticos e estatísticos para planejar ou selecionar experimentos de forma otimizada e para fornecer o máximo de informações químicas com a análise dos dados obtidos (FERREIRA et al., 1999).

As principais vantagens do uso da quimiometria incluem redução do ruído, por usar mais medidas para um mesmo fenômeno, manipulação dos interferentes, análise exploratória e controle de *outliers* (BRO, 2003).

A pesquisa contínua, desenvolvimento e verificação de tais métodos continuam a enfatizar o potencial significativo da quimiometria na prática, química moderna e análises farmacêuticas (NI, KOKOT, 2006).

O processo geral de calibração consiste de duas etapas: modelagem, que estabelece uma relação matemática entre as matrizes **X** e **Y,** durante a calibração, e a validação do modelo, que otimiza a descrição do analito de interesse (FERREIRA et al., 1999).

3.4.1 Modelagem

É o procedimento para encontrar um algoritmo matemático que produza propriedades de interesse a partir dos resultados registrados pelo instrumento.

Esse algoritmo poderá prever a concentração do componente de interesse em amostras de composição desconhecida, usando a resposta instrumental das mesmas, conforme equação 1 (FERREIRA, et al., 1999).

$$X = \begin{bmatrix} X_{11} & X_{12} & \cdots & X_{1n} \\ X_{21} & X_{22} & \cdots & X_{2n} \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ X_{n1} & X_{n2} & \cdots & X_{np} \end{bmatrix} \qquad \text{(Equação 1)}$$

Na fase da calibração, "n" espectros para um conjunto de amostras com composição conhecida são obtidos em "p" valores de comprimento de onda diferentes, formando uma matriz X, com "n" linhas e "p" colunas (Equação 1).

Um modelo matemático é desenvolvido de forma que possa reproduzir Y através dos dados de X. O modelo descreve a variância obtida em função do número de variáveis latentes que descrevem a variação entre os pontos usando um menor número de eixos (FERREIRA et al., 1999).

3.4.2 Validação do Modelo

Antes da aplicação do modelo construído, o mesmo deve ser validado com o objetivo de testar a sua capacidade preditiva. O método de validação cruzada consiste em testar o modelo prevendo concentrações de amostras, não usadas na sua construção, para estabelecer se ele de fato irá refletir o comportamento do analito de interesse (FERREIRA et al., 1999).

Esse procedimento é feito retirando uma das amostras do conjunto de calibração reservando-a como elemento de previsão. Este processo é repetido "n" vezes, até que todos os padrões de calibração participem como elementos de previsão. Desta forma obtém-se o erro de previsão que compara a concentração prevista para cada padrão com os seus valores verdadeiros (WOLD; SJÖSTÖM; ERIKSSON, 2001).

A somatória dos quadrados dos erros de previsão ($PRESS$) é definida através da equação 2.

$$PRESS = r\,(y' - y)^2 \qquad \text{(Equação 2)}$$

Onde: y' e o valor conhecido e y é o valor calculado.

O menor número possível de variáveis latentes é selecionado, excluindo-se aquelas responsáveis por parcelas que pouco contribuem à variância total.

Através da validação cruzada são detectados os *outliers*, utilizando-se duas grandezas complementares: *leverage* e resíduos de *Student*.

Os resíduos de *Student* indicam se as amostras estão incluídas na distribuição normal, considerando-se um intervalo de confiança de 95 %. Como os resíduos de *Student* são definidos em unidades de desvio padrão do valor médio, os valores além de ± 2,5 são considerados altos sob as condições usuais da estatística.

A *leverage* é uma medida da influência de uma amostra no modelo de regressão. Um valor de *leverage* pequeno indica que a amostra em questão influencia pouco na construção do modelo de calibração (FERREIRA et al., 1999).

A validação externa é o passo final no desenvolvimento de um modelo quantitativo. O uso de um conjunto amostral de previsão e RMSEP (raiz quadrada do erro padrão de previsão) são recomendados porque produzem resultados mais realísticos os quais são independentes de qualquer dado empregado na construção do modelo e durante a otimização do seu tamanho (PASQUINI, 2003).

O modelo que se apresentar mais robusto é escolhido para ser utilizado na fase de previsão para estimar as concentrações do analito de interesse de novas amostras. Os dados utilizados nesta fase formam o conjunto de teste, conforme mostra a figura 3.

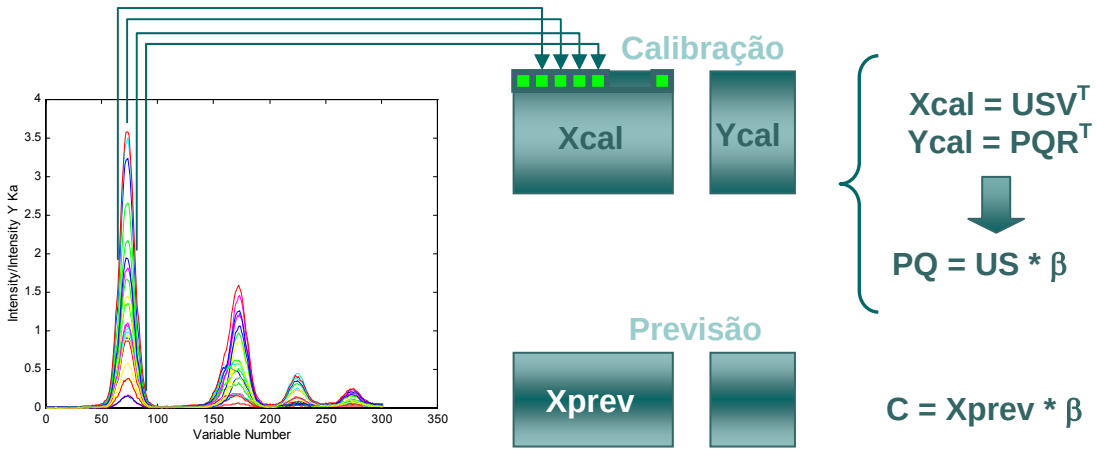


FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO DO MÉTODO DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

Um pré-processamento nos dados originais é necessário quando medidas em diferentes unidades e variáveis com diferentes variâncias tornam os dados originais com uma distribuição inadequada para a análise, dificultando a extração de informações úteis e interpretação dos mesmos. Tamanho de partícula, temperatura, umidade são parâmetros refletidos no espectro que justificam o uso comum de métodos de pré-processamento para reduzir o efeito da variância destes interferentes (LUYAPAERT et al., 2004).

Para verificar e tentar melhorar a eficiência dos modelos multivariados, pré-processamentos fundamentados em alisamento (Smooth), Detrend e Correção do Efeito Espalhamento Multiplicativo (MSC), podem ser utilizados.

3.4.4 Pré-Processamentos

3.4.4.1 Correção do efeito espalhamento multiplicativo (Multiplicative Scatter Correction)

MSC corrige por diferença na luz do espalhamento entre amostras ou mudanças nos efeitos no caminho da luz para cada amostra relativa à média do conjunto de calibração por deslocamentos e rotação no espectro até que se modele de acordo com o espectro médio do conjunto de dados (KACHRIMANIS; BRAUN; GRIESSER, 2007).

O espectro médio do conjunto de calibração é escolhido como o espectro de referência. Então cada espectro x_i é primeiramente modelado como a seguir (Equação 3).

$$x_i = a_i + b_i x_{médio} + c_i \qquad \text{(Equação 3)}$$

Onde c_i é o vetor de resíduos representando a diferença entre x_i e $x_{médio}$ (e_i representa a informação química em x_i) a_i é o intercepto e b_i a inclinação, a_i e b_i e e_i podem ser estimados por regressão linear de x_i versus $x_{médio}$ (LUYAPERT et al., 2002)

O espectro corrigido s_i é descrito conforme a equação 4.

$$s_i = \frac{(x_i - a_i)}{b_i} \qquad \text{(Equação 4)}$$

Cada espectro é corrigido de forma que todas as amostras tenham o mesmo nível de espalhamento da amostra de referência. Essa correção assume que o coeficiente de espalhamento é o mesmo para todos os comprimentos de onda, ignorando-se variações devidas às variações químicas (FERRARINI, 2004).

3.4.4.2 Detrend

Detrend é aplicado no espectro para remover efeitos de deslocamento de linha de base e curvilinearidades. O método consiste em modelar a linha de base em função do comprimento de onda com um polinômio de segundo grau e sua função é então subtraída de cada espectro independentemente (LUYAPERT et al., 2002).

$$x_{i,d} = x_i - b_i \qquad \text{(Equação 5)}$$

Onde b_i é o espectro da linha de base no comprimento de onda $_i$ computado com o modelo de segundo grau (Equação 5).

3.4.3.3 Alisamento (Smooth)

A aplicação de técnicas de alisamento tem por objetivo reduzir matematicamente o ruído aleatório que acompanha o sinal analítico. Existem diferentes métodos como a média móvel (APARICIO, 2002).

O procedimento de alisamento é dado por uma média móvel. Neste procedimento é empregado um número de pontos fixos, onde os dados são ordenados em grupos. O primeiro grupo é formado com esse número de pontos, que corresponde aos primeiros valores. Obtém-se a média para o ponto central desse grupo usando a série de valores à esquerda e à direita do ponto central, onde cada número do bloco é multiplicado pelo valor correspondente tabelado. O

próximo grupo é formado movendo-se um ponto acima do primeiro valor, obtendo-se da mesma forma a média para o ponto central desse grupo, assim sucessivamente são formados os grupos seguintes e obtidos os valores médios para cada grupo. O ajuste dos pontos é feito pelo critério dos mínimos quadrados (RUFINO, 2004).

Neste procedimento os ruídos são reduzidos aproximadamente pela raiz quadrada do número de pontos utilizados, reduzindo os efeitos de ruído (BROAD, et al. 2001).

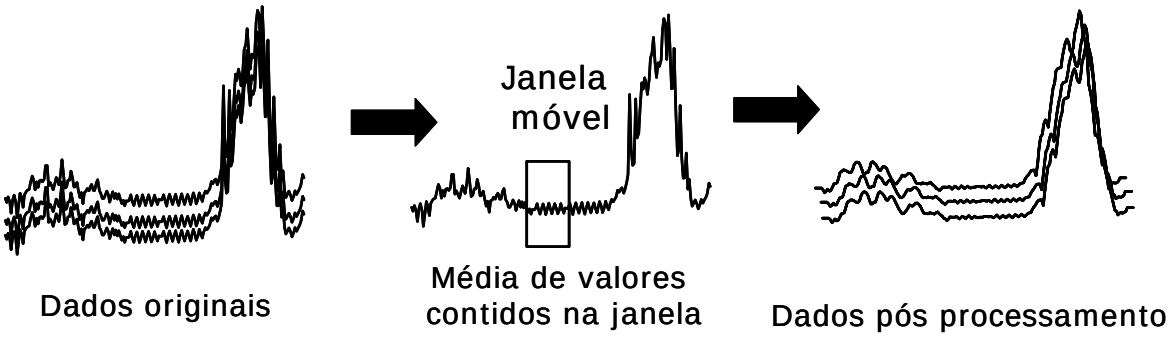


FIGURA 4 - ALISAMENTO PARA MÉDIA MÓVEL
FONTE: SAUER-LEAL, 2007

3.4.4 Análise por Componentes Principais (Principal Component Analysis)

PCA (Principal Component Analysis) consiste numa manipulação da matriz de dados com objetivo de representar as variações presentes em muitas variáveis, através de um número menor de fatores. Para isso, constrói-se um novo sistema de eixos (componentes principais ou variáveis latentes) que representam as amostras, de forma que a natureza multivariada dos dados pode ser visualizada em poucas dimensões (EKLÖV; MARTENSSON; LUNDSTRÖM, 1999).

A primeira componente principal PC1 tem uma direção tal que descreve o máximo espalhamento das amostras, mais que qualquer uma das duas variáveis originais. A componente principal (os *loadings* e *scores*) é definida como o peso médio de todas as variáveis (FERREIRA et al., 1999).

O modelo é dado por três partes diferentes: o vetor *loading* fornece informação qualitativa sobre as amostras, que é a forma comum que descreve a forma de todos os perfis medidos e os *scores* que é a informação específica e quantitativa da amostra. A última parte do modelo são os resíduos, que desviam da forma comum. Idealmente, os resíduos são medidas de ruído (FERREIRA et al., 1999).

A principal diferença entre variáveis originais e componentes principais é que estas carregam informação de todas as variáveis originais simultaneamente. Apenas utilizando médias de pesos de todas as amostras que se minimiza a influência do ruído obtido conferindo robustez a artefatos randômicos (BRO, 2003).

A figura 5 mostra como as componentes principais descrevem as variáveis originais.

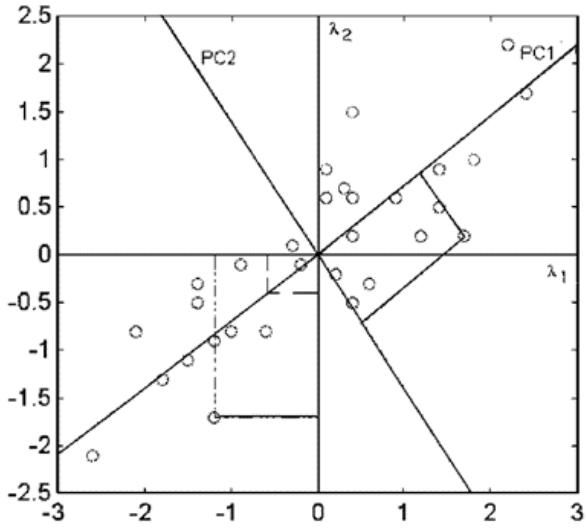


FIGURA 5- ESQUEMA REPRESENTANDO AS VARIÁVEIS ORIGINAIS DESCRITAS PELAS COMPONENTES PRINCIPAIS

FONTE: FERREIRA et al., 1999

3.4.5 Regressão pelos Mínimos Quadrados Parciais (Partial Least Squares Regression)

Os bens conhecidos métodos de análise multivariada, PCR (Principal Component Regression) e PLS são ferramentas estatísticas envolvendo análise

fatorial. Ambos PCR e PLS são métodos baseados em fatores e envolvem decomposição espectral.

Para PCR a decomposição é baseada inteiramente nas variações espectrais sem consideração com as concentrações do analito, e a decomposição em PCR é significantemente influenciada pelas variações as quais não tem relevância para as concentrações do analito (BRO, 2003).

PLS é a técnica mais popular devido o fato de contornar a dificuldade característica do PCR usando a informação das concentrações na obtenção dos fatores. Todas as variáveis relevantes são incluídas nos modelos, o que implica que a calibração pode ser realizada eficientemente mesmo na presença de interferentes, não havendo necessidade do conhecimento do número e natureza dos mesmos (ESCANDAR, 2006).

É um método robusto, pois seus parâmetros praticamente não se alteram com a inclusão de novas amostras no conjunto de calibração. Fato este que o torna de suma importância para resolução de ruídos experimentais, colinearidades e não linearidades (PASQUINI, 2003).

PLS pode ser considerada técnica de calibração padrão para espectroscopia no infravermelho. A principal vantagem desta técnica é evitar problemas de colinearidade permitindo trabalhar com um número de variáveis maior do que o número de amostras. Usualmente produz bons modelos usando um número menor de componentes principais do que modelos de PCR (LUNDSBERG, 2002).

A escolha do método de concentração freqüentemente depende das condições experimentais particulares. Contudo estudos sugerem que PLS parece ter melhor desempenho em muitas circunstâncias (NI, KOKOT, 2005).

A base do método por regressão dos mínimos quadrados parciais (PLS) está na decomposição de uma matriz de dados X, em termos da soma de várias matrizes M_i, que não podem mais ser expandidas, mais uma matriz de erros (Equação 6).

As matrizes M_i constituem os chamados componentes principais, e são formadas pelo produto de dois vetores, t (os scores) e p (os loadings):

$$X = M_1 + M_2 + \ldots M_n + E \; ou$$
$$X = t_1 p_1 + t_2 p_2 + \ldots t_n p_n + E \; ou \qquad \text{(Equação 6)}$$
$$X = tp' + E$$

A dimensionalidade do espaço original é igual ao número de colunas em X, ou seja, o número de variáveis originais. No novo modelo, a dimensionalidade é descrita pelo número de matrizes M_i necessárias para descrever X. Assim, se for possível descrever uma matriz X que tenha muitas variáveis, por um número pequeno destas matrizes M_i, haverá um decréscimo na dimensionalidade, sem perda de informação (WOLD, SJÖSTÖM, ERIKSSON, 2001).

3.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

CLAE tem se tornado a técnica de referência em muitas indústrias já que oferece vantagens sobre outras técnicas avaliadas pelo tempo. Oferece um meio de análise automatizado, preciso, sensível e reprodutível para uma variedade muito grande de analitos.

Laboratórios industriais têm com isso investido fortemente em equipamento e treinamento de equipe. É uma técnica cara, intensivamente laboriosa, dispende tempo e produz perda química (BLANCO, ALCALÁ, 2006).

Outra desvantagem é a possível interferência de um produto de degradação ou uma impureza que tenha mesmo tempo de retenção cromatográfica que o composto alvo (SENA, POPPI, 2004).

O método por CLAE como um método de comparação tem sido aplicado à determinação quantitativa de analitos nas amostras. A aplicação da CLAE clássica consiste no uso de cromatogramas obtidos de um único comprimento de onda (DINÇ, OZDEMIR, 2005).

A fase estacionária consiste de um pó finamente sólido adsorvente empacotado em uma coluna de metal e a fase móvel consiste de um solvente eluente forçado através da coluna por uma bomba de alta pressão. A mistura a ser analisada é injetada e monitorada por um detector (KAROUI, 2007).

Estudos com sibutramina em forma farmacêutica e separação enantiomérica por CLAE (RADHAKRISHNA et al., 2000), determinação de seus metabólitos ativos por CL-eletronspray de ionização de massa (CHEN, 2003; DING, 2003), além de estudos sobre a preparação de sibutramina enantiomericamente pura por resolução quiral ácida (FANG, 1999), estão descritos na literatura.

3.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Estudos de validação devem ser representativos e conduzidos de modo que a variação da faixa de concentração e os tipos de amostras sejam adequados (PASQUINI, 2004).

Os métodos analíticos podem ser classificados de acordo com a sua finalidade, como mostra a tabela 4.

TABELA 4 – CLASSIFICAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS DE ACORDO COM SUA FINALIDADE

Categoria	**Finalidade do teste**
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias–primas
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
III	Testes de performance (por exemplo: dissolução do ativo)
IV	Testes de identificação

FONTE: ANVISA, 2003

De modo geral, os parâmetros a serem analisados em um método são: especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade e exatidão. No entanto, cada categoria exige um determinado conjunto de testes, conforme relacionados na tabela 5.

TABELA 5 – ENSAIOS NECESSÁRIOS PARA A VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS DE ACORDO COM A SUA FINALIDADE

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativo	ensaio limite		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Repetitividade Intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

FONTE: ANVISA, 2003
NOTAS: * Pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.
** Se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da precisão intermediária.

3.6.1 Seletividade/Especificidade

É a capacidade que um método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes, esperado estarem presentes, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (USP, 2006).

Os procedimentos para demonstrar especificidade dependerão do objetivo do procedimento analítico (LEITE, 2002).

Para análises quantitativas e análises de pureza, a especificidade de um método para análise de produtos acabados pode ser estabelecida pela comparação dos resultados obtidos quando o método é aplicado à substância pura com aqueles obtidos das amostras de fármaco mais excipiente demonstrando que os resultados não são afetados por estes compostos (ANVISA, 2003; SHARP, 2000).

Quando impurezas e produtos de degradação estão disponíveis a especificidade pode ser demonstrada pela comparação dos resultados das amostras testes com um segundo método bem caracterizado (USP, 2006).

A seletividade de um método se refere à extensão pela qual este pode determinar um analito particular em uma mistura complexa. Um método que é perfeitamente seletivo para um analito ou grupo de analitos é dito específico. Especificidade é a habilidade de um método não separativo de distinguir entre

diferentes componentes enquanto seletividade é a habilidade de um método separativo de resolver diferentes componentes (VESSMAN, 1996; SHARP, 2000).

Testes de pureza de pico cromatográfico podem ser úteis para mostrar que o pico cromatográfico do analito não é atribuído a mais de um componente (USP, 2006; RIBANI, 2004).

3.6.2 Linearidade

O parâmetro linearidade avalia a capacidade de um método analítico demonstrar que os resultados obtidos (sinal ou resposta do aparelho) são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (ICH, 2005).

A linearidade deve ser avaliada por inspeção visual de uma representação gráfica dos sinais obtidos em função da concentração. Se houver uma relação linear, os resultados devem ser avaliados por métodos estatísticos apropriados, ou seja, determinação do coeficiente de correlação, intersecção com o eixo Y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo (USP, 2006; ANVISA, 2003).

Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (ANVISA, 2003; RIBANI, 2004).

3.6.3 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Para muitas aplicações farmacêuticas o limite de quantificação é geralmente um parâmetro mais útil que o limite de detecção. O limite de detecção é a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando determinados procedimentos experimentais, dados pela equação 7.

$$LD = \frac{DPa\ x\ 3}{IC} \qquad \text{(Equação 7)}$$

Onde DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo y de no mínimo 3 curvas de calibração construídas contendo a concentração do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação; e IC é a inclinação da curva de calibração (ANVISA, 2003).

O limite de quantificação é a menor concentração da substância em exame que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (Equação 8).

$$LQ = \frac{DPa\ x\ 10}{IC} \qquad \text{(Equação 8)}$$

Onde DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo y de no mínimo 3 curvas de calibração construídas contendo a concentração do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação; e IC é a inclinação da curva de calibração (ANVISA, 2003).

3.6.4 Intervalo

O intervalo é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método. É estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequadas quando aplicado a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado (USP, 2006; ANVISA, 2003).

É a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico que possa ser determinada com precisão e exatidão, usando o método como escrito (USP, 2006; BRITO et al., 2003).

Conforme o tipo de ensaio, diferentes intervalos podem ser especificados (ANIVSA, 2003):

Para determinação quantitativa de matéria prima ou produtos acabados: normalmente de 80-120% da concentração teórica do teste; Para a determinação de impurezas: do nível de impureza esperado até 120% do limite máximo especificado; Para ensaio de uniformidade de conteúdo: de 70 % a 130% da concentração técnica do teste; Para ensaios de dissolução: $\pm$ 20% sobre o valor especificado no intervalo.

3.6.5 Precisão

A precisão consiste na avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (ICH, 2005). É expressa como desvio padrão ou coeficiente de variação de uma série de medidas (USP, 2006).

Limites compendiais, para determinação em matéria prima, são freqüentemente entre 98,5-100,5% e para produtos acabados entre 95-105% (ANVISA, 2003; SHARP, 2000). A precisão pode ser considerada em três níveis: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

3.6.5.1 Repetitividade (precisão intra-corrida)

Repetitividade refere-se ao uso do procedimento analítico dentro de um laboratório sob um curto período de tempo, efetuado pelo mesmo analista com o mesmo equipamento (USP, 2006).

Pode ser verificada pela avaliação de um mínimo de nove determinações de um mínimo de três níveis de concentrações, de acordo com o intervalo especificado, ou num mínimo de seis determinações para uma única concentração teste (ICH, 2005).

3.6.5.2 Precisão intermediária (precisão inter-corrida)

Concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas ou equipamentos diferentes. Recomenda-se um mínimo de dois dias diferentes, com analistas ou equipamentos diferentes (ANVISA, 2003).

3.6.5.3 Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial)

Concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes. Refere-se aos resultados de colaboração entre laboratórios e deve ser

considerada em situações como a padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos, por exemplo, em farmacopéias.

A ICH sugere um mínimo de nove determinações de um mínimo de três níveis de concentrações, de acordo com o intervalo especificado, ou um mínimo de seis determinações para uma única concentração teste.

A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV %), segundo a equação 9.

$$DPR = \frac{DP\ x\ 100}{CMD} \qquad \text{(Equação 9)}$$

Em que, DP é o desvio padrão e CMD a concentração média determinada. O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com o método empregado, a concentração do analito na amostra, o tipo da matriz e a finalidade do método (ANVISA, 2003).

3.6.6 Exatidão

O parâmetro exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro. A exatidão de um método deve ser estabelecida através de um intervalo (USP, 2006).

A exatidão pode ser determinada pela aplicação do método analítico a um analito de pureza conhecida (padrão de referência) ou pela comparação dos resultados do método a um segundo método bem caracterizado, onde a exatidão deste deve ser bem definida (USP, 2006).

Pode ser obtida pela substância pura em que quantidade de excipientes ou impurezas tenha sido contaminada com quantidade conhecida do analito puro e mostrar que os resultados comparados com amostras sem adição de impurezas não são afetados (SHARP, 2000).

Em produtos acabados um fator complicante é a fase de extração do fármaco de sua matriz. Uma maneira comum de determinar a exatidão em produtos acabados é pelo ensaio de recuperação no qual o ensaio é realizado em

misturas de excipientes que tenham sido adicionadas quantidade exatamente medida de fármaco.

Na determinação de exatidão de um método a faixa relativa de tolerância comum em especificações para matéria prima na forma de pós é de 99,5-100,5% e para formas farmacêuticas uma variação de 2% pode ser considerada adequada (SHARP, 2000).

3.6.6.1 Matérias-primas (fármacos)

Pela aplicação da metodologia analítica proposta na análise de uma substância de pureza conhecida (padrão de referência) ou pela comparação dos resultados obtidos com aqueles resultantes de uma segunda metodologia bem caracterizada, cuja exatidão tenha sido estabelecida (USP, 2006).

3.6.6.2 Produtos acabados (forma farmacêutica)

Pela análise de uma amostra em que quantidade conhecida do fármaco foi adicionada a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado) ou, na indisponibilidade de todos os componentes do medicamento, a análise pelo método de adição de padrão, em que se adiciona quantidade conhecida do analito (padrão de referência) ao medicamento (USP, 2006).

A ICH estabelece que um mínimo de nove determinações envolvendo um mínimo de três diferentes níveis de concentração deve ser obedecido, cobrindo o intervalo.

Deve ser expressa como o percentual de fármaco recuperado no ensaio (Equação 10), em relação ao valor aceito como verdadeiro, que corresponde a 100% (ICH, 2005).

$$Exatidão = \frac{concentração\ média\ \ experimental\ x100}{concentração\ teórica} \qquad \text{(Equação 10)}$$

3.6.7 Robustez

A robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta em face de pequenas variações, quando não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros (INMETRO, 2003).

Existe uma diferenciação do termo robustez em inglês. O termo *ruggdness* é descrito como o parâmetro que mede a replicabilidade dos resultados de um mesmo conjunto de amostras quando analisadas em condições normais de teste (contendo erros aleatórios e não propositais). Já o termo *robustness* se refere ao parâmetro que mede a replicabilidade de um mesmo conjunto de amostras quando analisadas em condições de análise contendo modificações pequenas e propositais em relação à condição original. Atualmente o termo *robustness* refere-se apenas a esta última situação, deixando a avaliação de *ruggdness* implícita na análise de precisão do método (USP, 2006).

Os fatores que podem ser avaliados em um ensaio de robustez estão relacionados com o preparo da amostra e com o tipo da análise conforme ilustrado no tabela 6.

TABELA 6- FATORES QUE DEVEM SER CONSIDERADOS NA DETERMINAÇÃO DA ROBUSTEZ DO MÉTODO ANALÍTICO

Preparo das Amostras	·Estabilidade das soluções analíticas ·Tempo de extração
Espectrofotometria	·Variação do pH da solução ·Temperatura ·Diferentes fabricantes de solventes
Cromatografia Líquida	·Variação do pH da fase móvel ·Variação na composição da fase móvel ·Diferentes lotes ou fabricantes de colunas ·Temperatura ·Fluxo da fase móvel
Cromatografia Gasosa	·Diferentes lotes ou fabricantes de colunas ·Temperatura ·Velocidade do gás de arraste

FONTE: ANVISA, 2003

3.6.8 Sensibilidade

A sensibilidade é definida como a capacidade de um método em distinguir, com determinado nível de segurança, duas concentrações próximas ou como a

capacidade de um método analítico reportar pequenas variações na concentração do analito (SHARP, 2000).

Indica quão responsivo é o método a pequenas mudanças na concentração do analito. Pode ser vista em função da inclinação da reta obtida no gráfico da curva analítica (WATSON, 2000).

3.7 ESTUDO DE DISSOLUÇÃO *IN VITRO*

A taxa de dissolução de um fármaco é um ponto crucial para determinar sua biodisponibilidade. Para a dissolução da fase sólida esta taxa é definida como quantidade de substância ativa que se solubiliza por unidade de tempo sob condições padronizadas de interface líquido/sólido, temperatura e composição do solvente (LEGNEROVA et al., 2004).

Evidências científicas têm mostrado que testes de dissolução fornecem dados para avaliar parâmetros farmacêuticos críticos como biodisponibilidade e a informação necessária para uma formulação mais eficaz e formas de dosagens terapêuticas ótimas.

Os ensaios de dissolução *in vitro* para formas farmacêuticas sólidas, como cápsulas, são utilizados para garantir qualidade lote-a-lote, orientar o desenvolvimento de novas formulações e garantir a qualidade e o desempenho do medicamento depois de determinadas mudanças (ANVISA, 2004).

De acordo com FDA (Food and Drug Adminstration), os testes de biodisponibilidade em humanos devem ser evitados sendo o desenvolvimento e implantação de testes *in vitro*, que simulam o desempenho *in vivo*, mais aconselhável (CARVALHO-SILVA et al., 2004).

É necessário o conhecimento de solubilidade e permeabilidade para definição dos parâmetros de dissolução. A solubilidade de um fármaco é determinada pela dissolução da dosagem mais alta de um medicamento em 250 mL de uma solução tampão de pH entre 1,0 e 8,0. É considerado altamente solúvel o fármaco que, em volume, tenha resultado da relação dose/solubilidade menor ou igual a 250 mL. É considerado um fármaco altamente permeável quando a biodisponibilidade absoluta é maior que 90% (ANVISA, 2004).

A partir das informações de solubilidade e permeabilidade é possível enquadrar o fármaco em um sistema de classificação biofarmacêutica que, para cada caso, irá orientar as melhores condições de ensaio, conforme a tabela 7.

TABELA 7 - SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA

Classe I	Alta solubilidade e alta permeabilidade
Classe II	Baixa solubilidade e alta permeabilidade
Classe III	Alta solubilidade e baixa permeabilidade
Classe IV	Baixa solubilidade e baixa permeabilidade

FONTE: EMEA, 2001

Geralmente a água é o meio mais utilizado para dissolução imediata de formas sólidas. Soluções de tampão aquosas e diluídas em ácido clorídrico também podem ser empregadas. Surfactantes podem ser adicionados para melhorar a solubilidade. A pá é um aparato comumente utilizado para comprimidos a uma agitação de 50 rpm. Já a cesta é preferível para as formas farmacêuticas de cápsulas que tendem a flutuar no meio de dissolução e neste caso a agitação é de 100 rpm. No caso de análise em que a formulação possui apenas um ativo não é necessário o uso de técnicas de separação. O valor de pKa e coeficiente de partição devem ser considerados para a definição das condições do teste (EMEA, 2001).

O modelo mais adotado para avaliar e comparar os perfis de dissolução é o modelo independente simples que emprega o fator de diferença (f_1) e o fator de similaridade (f_2) e a aplicação destes métodos requer no mínimo 12 análises de dosagens unitárias individuais. Este modelo é mais usado para comparar duas formulações diferentes tendo uma como referência. Também análises estatísticas como análise de variância (ANOVA) ou teste t podem ser usados para estimar a equivalência entre dois produtos sob as mesmas condições (ANVISA, 2004).

A eficiência de dissolução pode ser definida como área sob a curva de dissolução em um tempo específico. Esse parâmetro está relacionado com a quantidade real de fármaco dissolvida no meio e, desta forma, pode-se ter um melhor prognóstico dos resultados *in vivo* (KHAN, RHODES, 1975).

A legislação vigente preconiza que estudos de equivalência farmacêutica devam ser realizados entre o medicamento teste e o de referência comercializado no país, com amostras de até seis meses de fabricação (ANVISA, 2004).

Quase todas as monografias de formas farmacêuticas sólidas, nas farmacopéias oficiais, fornecem condições para teste de dissolução. Contudo, parâmetros para realizar teste de dissolução deveriam ser pesquisados e definidos para fármacos que não possuem monografia oficial, ou quando a monografia existente não especifica condições de teste de dissolução (CARVALHO-SILVA et al., 2004).

Este é o caso da sibutramina que não possui, até o momento, monografia oficial em diversas farmacopéias incluindo a farmacopéia dos Estados Unidos (USP) 30ª edição.

Quando o teste de dissolução não é definido na monografia ou esta não é disponível, a comparação de perfis de dissolução é recomendado em três diferentes meios na faixa de pH de 1 a 7,5 (USP, 2006).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENHO EXPERIMENTAL

A pesquisa corresponde a três etapas distintas. A primeira etapa compreende o desenvolvimento e validação de método espectrofotométrico (UV-VIS) para determinação de sibutramina na matéria prima e em forma farmacêutica. No desenvolvimento foram testados diferentes solventes para avaliar a solubilidade do fármaco, definido o comprimento de onda mais adequado para o ensaio, avaliação da absortividade e definição das condições de preparo da amostra. A validação foi realizada para os parâmetros: linearidade, repetitividade, precisão intermediária, seletividade, exatidão e robustez. Na segunda etapa foi realizado o desenvolvimento do método por espectroscopia em infravermelho com refletância difusa e teste da capacidade preditiva de modelos de calibração multivariada. Na terceira etapa foi realizado o estudo do perfil de dissolução da sibutramina em diferentes especialidades farmacêuticas: medicamento referência, medicamento genérico (Medley), similar (EMS), magistral. As etapas descritas estão esquematizadas no fluxograma da figura 6.

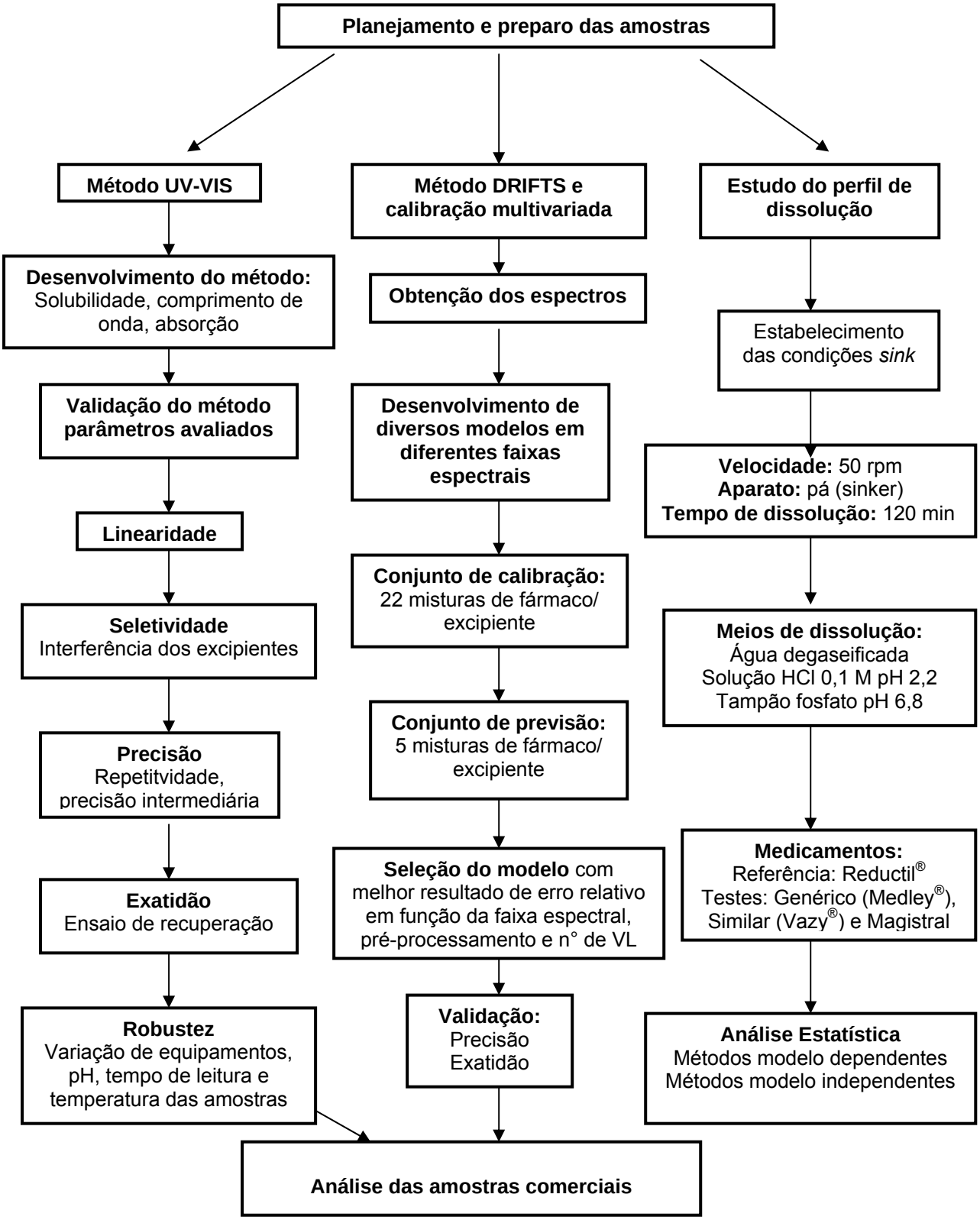


FIGURA 6 - FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DA PESQUISA

4.2 MATERIAL

4.2.1 Material e Reagentes

A matéria prima cloridrato de sibutramina monohidratado (teor 99,95%) e os excipientes, microcelulose cristalina, lactose, estearato de magnésio e dióxido de silício coloidal, todos atendiam o requisito de pureza grau farmacêutico.

O padrão de sibutramina utilizado como referência era da marca Axxora®, obtido da empresa Bioagency (99,99%).

As especialidades farmacêuticas analisadas foram:

Medicamento de referência: Reductil® (Medley) 15 mg
Lote: 440398F04
Data de fabricação: 08/06
Data de validade: 08/08

Medicamento genérico: Cloridrato de sibutramina monohidratado® (Medley) 15 mg
Lote: 480128F02
Data de fabricação: 12/06
Data de validade: 12/08

Medicamento similar: Vazy® (EMS) 15 mg
Lote: 109934-1
Data de fabricação: 07/07
Data de validade: 07/09

Medicamento magistral: Cloridrato de sibutramina monohidratado
Data de fabricação: 06/07
Data de validade: 12/07

Os reagentes utilizados atendiam a especificação grau analítico (PA): ácido fosfórico, fosfato monobásico de potássio, ácido clorídrico, cloreto de potássio e hidróxido de sódio.

Os solventes utilizados foram: água ultrapura, trietilamina e acetonitrila atenderam à especificação de grau HPLC.

Para a filtração de fase móvel utilizou-se membrana de éster de celulose diâmetro do poro 0,22 μm.

Todas as filtrações realizadas foram em papel de filtro utilizado, Framex® quantitativo, contendo as especificações: 11 cm de diâmetro, faixa preta, teor de cinzas 0,00007.

Cubetas de quartzo (transparência na faixa de 190 a 400 nm) com caminho óptico de 1 cm.

4.2.2 Equipamentos e softwares

Balança analítica Mettler-Toledo AG 245 (0,01 mg)

Aparelho de ultra-som Transsonic 460/H Elma® .

Potenciômetro Hanna Instruments HI8519®.

Aparelho de ponto de fusão koefler Büchi® SMP-20.

Espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu® modelo UV-1601PC.

Espectrofotômetro UV-VIS Hewlett Packard®, 8452A com

Espectrofotômetro Excalibur® modelo FTS-4000 Bio-Rad, equipado com acessório de refletância difusa.

Cromatógrafo líquido de alta eficiência Varian® Pro Star: bomba Pro Star 230, auto sampler Pro Star 410, detector UV-VIS Pro Star 335 e detector de arranjo de fotodiodos, workstation Pro Star 6,0.

Software Origin 7,0® e o aplicativo PLS-toolbox que opera em ambiente Matlab 6,5®.

Dissolutor Pharma Test®.

Software MicroMath Scientist® versão 2,01.

Software SPSS®for windows versão 12,0.

4.3. MÉTODOS

4.3.1 ESPECTROSCOPIA POR ULTRAVIOLETA

A sibutramina é um fármaco que apresenta um cromóforo característico que apresenta intensa absorção na região do ultravioleta sendo, portanto viável o desenvolvimento de um método por espectrometria nesta região para sua quantificação.

Para o desenvolvimento do método inicialmente foi avaliada a solubilidade seletiva do fármaco em diferentes solventes com o objetivo de definir o solvente mais adequado para o preparo de soluções do analito (sibutramina). Os solventes testados foram: água, metanol e etanol.

Para a escolha do comprimento de onda mais adequado foram obtidos espectros de varredura na região do ultravioleta e visível de solução aquosa de sibutramina de diferentes concentrações (5 a 30 $\mu g.mL^{-1}$). A partir dos espectros foram traçadas curvas analíticas de absorvância em função da concentração para cada comprimento de onda na região onde o analito apresentou intensa absorção. Nas diferentes curvas analíticas foi calculado o coeficiente de correlação. Um gráfico de coeficiente de correlação em função do comprimento de onda foi obtido.

Para definir o intervalo de linearidade, uma faixa de concentração onde o método apresenta correlação linear entre concentração e absorvância, uma curva analítica foi construída a partir de solução aquosa de sibutramina na faixa de concentração de 0,1 a 100 $\mu g.mL^{-1}$ e lidas espectrofotometricamente a 223 nm.

4.3.2 Validação

A validação foi realizada seguindo os parâmetros propostos pela farmacopéia americana (United States Pharmacopeia, 2005), pela resolução RDC 899, de 29 de maio de 2003 (ANVISA, 2003) e os documentos da Conferência Internacional de Harmonização (ICH, 2005).

Para os ensaios de linearidade e exatidão foi utilizado padrão de referência USP do fármaco.

4.3.2.1 Especificidade

Nesta etapa, partiu-se de uma solução estoque de sibutramina de 125,0 $\mu g.mL^{-1}$ à qual foi acrescentada 190 mg da mistura dos excipientes (mimetizando a proporção em que fármaco e excipientes ocorrem no medicamento). Através de diluições adequadas desta mistura foram obtidas amostras com concentrações de sibutramina 20,0 $\mu g.mL^{-1}$ (n=6). Os resultados das leituras dessas soluções foram comparados aos resultados obtidos de outro conjunto de soluções (n=6) contendo 20,0 $\mu g.mL^{-1}$ de sibutramina resultante da diluição de outra solução estoque sem adição de excipientes.

A mistura de excipientes utilizados na avaliação deste parâmetro foi como descrito na tabela 8.

TABELA 8 - COMPOSIÇÃO DA MISTURA DOS EXCIPIENTES

Estearato de magnésio	0,5 %
Dióxido de silício coloidal	1,0 %
Microcelulose cristalina	40,0 %
Lactose	58,5 %

FONTE: ROWE, SHESKEY, WELLER, 2001

Todas as soluções antes de completar o volume foram submetidas à agitação manual vigorosa por 20 minutos para solubilizar o fármaco. Em seguida, o volume foi completado e a solução filtrada.

Foram testados diferentes tipos e marcas de papel de filtro, com o objetivo de avaliar a interferência do mesmo no resultado da análise. Para isso foi preparada uma solução do padrão de sibutramina de 125 $\mu g.mL^{-1}$ e após diluição a solução foi dividida em duas porções sendo uma filtrada antes da leitura e a outra lida sem filtrar e os resultados comparados.

As soluções contendo fármaco mais excipiente bem como as soluções contendo apenas o fármaco foram filtradas em papel de filtro antes da realização da leitura em 223 nm.

Os resultados obtidos das amostras na presença e na ausência dos excipientes foram avaliados estatisticamente através do teste de wilcoxon.

4.3.2.2 Linearidade

Três curvas analíticas de concentrações de 5 $\mu g.mL^{-1}$ a 30,0 $\mu g.mL^{-1}$ (5,0 $\mu g.mL^{-1}$, 7,5 $\mu g.mL^{-1}$, 10,0 $\mu g.mL^{-1}$, 12,5 $\mu g.mL^{-1}$, 15,0 $\mu g.mL^{-1}$ 17,5 $\mu g.mL^{-1}$, 20,0 $\mu g.mL^{-1}$, 22,5 $\mu g.mL^{-1}$, 25,0 $\mu g.mL^{-1}$, 27,5 $\mu g.mL^{-1}$ e 30,0 $\mu g.mL^{-1}$) foram preparadas, a partir de três soluções estoque do fármaco (125,0 $\mu g.mL^{-1}$) onde foram dissolvidas em água purificada e lidas em espectrofotômetro UV-VIS em 223 nm.

Para cada uma das três curvas analíticas foi obtida a equação da reta obtendo-se a intersecção com o eixo Y, coeficiente angular e desvio padrão relativo. Calculou-se a equação da reta média e seu respectivo coeficiente de correlação. Dentro da faixa de linearidade foi escolhida a melhor concentração de trabalho.

Utilizando os parâmetros obtidos foram calculados os limites de detecção e quantificação do método através das equações 7 e 8 conforme descrito na revisão bibliográfica.

$$LD = \frac{DPa\ x\ 3}{IC} \qquad \text{(Equação 7)}$$

$$LQ = \frac{DPa\ x\ 10}{IC} \qquad \text{(Equação 8)}$$

4.3.2.3 Intervalo

O intervalo especificado deriva do estudo da linearidade e depende da aplicação pretendida do método. A definição da faixa de trabalho deve considerar a concentração mediana (concentração teste), abrangendo pontos de concentração ao redor desse valor, compreendendo a variação de $\pm$ 20 % da concentração teórica teste recomendada para determinação quantitativa de matéria-prima e produtos acabados (ANVISA, 2003).

As soluções para a confecção do gráfico de intervalo foram as mesmas utilizadas para avaliação da linearidade, conforme descrito no item 4.3.2.2.

4.3.2.4 Precisão

A precisão foi avaliada através de ensaios de repetitividade e precisão intermediária.

4.3.2.4.1 repetitividade

Foram preparadas, no mesmo dia, com o mesmo analista e o mesmo equipamento, soluções de diferentes concentrações (10,0 $\mu g.mL^{-1}$, 20,0 $\mu g.mL^{-1}$, 30,0 $\mu g.mL^{-1}$) em triplicata a partir de três diferentes soluções estoque (125,0 $\mu g.mL^{-1}$) e efetuada a leitura em 223 nm. Para os resultados obtidos calcularam-se a média e a estimativa de desvio padrão e o coeficiente de variação, considerando-se os valores satisfatórios inferiores a 5% (ANVISA, 2003).

4.3.2.4.2 precisão intermediária

A precisão intermediária foi avaliada através da comparação dos resultados obtidos em três dias consecutivos pela análise de amostras em triplicatas nas concentrações de: 10,0, 20,0 e 30,0 $\mu g.mL^{-1}$, com analistas diferentes, sendo as leituras realizadas em 223 nm e calculando-se posteriormente o CV% inter-dia.

4.3.2.5 Exatidão

A exatidão foi determinada através do teste de recuperação, realizado adicionando-se quantidade conhecida do padrão de sibutramina (12,5 mg) à mistura de excipiente (190 mg). A partir dessa mistura, foram feitas diluições para se obter soluções de concentrações de 10,0, 20,0 e 30,0 $\mu g.mL^{-1}$. As soluções foram lidas em espectrofotômetro a 223 nm e calculado a porcentagem de recuperação (ANVISA, 2003).

4.3.2.6 Robustez

Para se avaliar a capacidade do método de não ser afetado por pequenas variações, porém deliberadas, e fornecer um indicativo de confiança para o uso rotineiro foram realizados testes de variação de pH do meio, tempo de leitura, temperatura e equipamentos diferentes.

4.3.2.6.1 pH

Para se avaliar a influência do pH foram utilizadas amostras contendo sibutramina na concentração de 20,0 $\mu g.mL^{-1}$, em meios tamponados para os diferentes valores de pH (tabela 9). O ensaio foi realizado em triplicata.

TABELA 9 – TAMPÕES UTILIZADOS PARA OS DIFERENTES VALORES DE pH

pH	**Tampão**
1,3	HCl - KCl
2,3	HCl – KCl
4,5	NaOH-KH_2PO_4
5,5	NaOH-KH_2PO_4
6,0	NaOH-KH_2PO_4
7,0	NaOH-KH_2PO_4
8,0	NaOH-KH_2PO_4
9,0	NaOH, KCl/H_3BO_3
10,0	NaOH, KCl/H_3BO_3

FONTE: USP, 2006

As médias dos resultados obtidos em cada valor de pH foram comparadas, entre elas, duas a duas, através do teste t.

4.3.2.6.2 tempo de leitura

Para avaliação do tempo de leitura foi preparada uma curva analítica a partir de solução estoque de 125,0 $\mu g.mL^{-1}$ de sibutramina, abrangendo as concentrações: 5,0 $\mu g.mL^{-1}$, 7,5 $\mu g.mL^{-1}$, 10,0 $\mu\mu g.mL^{-1}$, 12,5 $\mu g.mL^{-1}$, 15,0 $\mu g.mL^{-1}$, 17,5 $\mu g.mL^{-1}$, 20,0 $\mu g.mL^{-1}$, 22,5 $\mu g.mL^{-1}$, 25,0 $\mu g.mL^{-1}$ e

30,0 μg.mL^{-1}. As soluções foram lidas espectrofotometricamente em 223 nm no tempo 0 e após 24 horas, em triplicata. No período de 24 horas as soluções foram mantidas em condições ambiente (temperatura média de 25 °C). Os resultados das leituras no tempo 0 e após 24 horas foram comparados por análise de variância.

4.3.2.6.3 temperatura

A avaliação da influência da temperatura na robustez do método foi realizada a partir de seis soluções aquosas de sibutramina na concentração de 20,0 μg.mL^{-1}. Sendo que três soluções foram resfriadas a temperatura de 4°C e as outras três soluções foram aquecidas a temperatura de 30°C. Após o ajuste de temperatura, foram realizadas as leituras espectrofotométricas a 223 nm. Os resultados foram representados graficamente e analisados pelo teste de wilcoxon.

4.3.2.6.4 equipamentos

Neste experimento foram utilizadas soluções aquosas de sibutramina em diferentes concentrações (5,0 μg.mL^{-1}, 10,0 μg.mL^{-1}, 15,0 μg.mL^{-1}, μg.mL^{-1}, 22,5 μg.mL^{-1}, 25,0 μg.mL^{-1}, 27,5 μg.mL^{-1} e 30,0 μg.mL^{-1}) as quais foram lidas espectrofotometricamente a 223 nm em dois equipamentos (Shimadzu® modelo UV-1601PC e Hewlett Packard® 8452 A), no mesmo dia. As retas obtidas foram avaliadas estatisticamente por análise de variância.

4.4 ESPECTROSCOPIA POR INFRAVERMELHO COM REFLETÂNCIA DIFUSA

4.4.1 Planejamento e Preparo das Misturas

O fármaco foi manipulado juntamente com a mistura padrão de excipiente, de forma a se obter um conjunto de amostras com diferentes concentrações. Para o preparo destas amostras foram pesadas quantidades calculadas de sibutramina e de excipiente separadamente, que posteriormente foram misturados e triturados

até a obtenção de um conjunto de misturas homogêneas com diferentes concentrações do fármaco. Cada amostra foi triturada em gral de ágata e armazenada em frasco âmbar.

O conjunto de 27 amostras produzidas compreendeu concentrações entre 1 a 30 mg de sibutramina diluídos para 200 mg de excipiente, resultando em concentrações que variaram de 0,5% a 1,5% em teor de fármaco. Destas amostras 22 foram utilizadas para o desenvolvimento dos modelos de calibração e 5 para avaliar a capacidade preditiva dos mesmos.

As misturas sintéticas e as amostras de validação foram lidas em espectrofotômetro no infravermelho ao qual foi acoplado o dispositivo de refletância difusa.

Esta faixa de trabalho foi definida levando-se em consideração as dosagens dos medicamentos comercialmente disponíveis (10 mg e 15 mg) com concentrações de 5% e 7,5% de sibutramina.

4.4.2 Obtenção dos Espectros

Os espectros foram adquiridos com resolução de 4 cm^{-1}, acumulando-se 128 varreduras.

As leituras dos espectros das misturas e das substâncias puras foram feitas na faixa espectral de 7000 a 400 cm^{-1} utilizando-se resolução 4 e 128 scans.

Os espectros foram processados para obtenção dos modelos considerando toda faixa espectral obtida do equipamento, regiões do infravermelho médio (4000 a 400 cm^{-1}), do infravermelho próximo (7000 a 4000 cm^{-1}) e determinadas regiões espectrais, como mostra a tabela 10.

TABELA 10- REGIÕES ESPECTRAIS CONSIDERADAS NA CONSTRUÇÃO DOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO

Modelos	Intervalos de números de onda considerado (cm^{-1})	Região espectral
Modelos A	7000 a 400	Faixa espectral completa (3424 números de onda)
Modelos B	7000 a 4000	Infravermelho próximo (1557 números de onda)
Modelos C	4000 a 400	Infravermelho médio (1867 números de onda)
Modelos D	750-1150/ 1350-1500/ 1850-1950/ 2600-2900	Infravermelho médio (950 números de onda)

As regiões espectrais dos modelos A, B e C foram escolhidas utilizando toda a informação espectral fornecida pelo instrumento e de acordo com a divisão clássica em infravermelho próximo e médio. A escolha das regiões para construção dos modelos D foi baseada nas bandas de maior caracterização funcional no espectro da sibutramina de acordo com o relatado na literatura (JEFFERY et al., 1996).

4.4.3 Validação

Com o objetivo de conferir validade aos resultados obtidos pelo modelo multivariado, os ensaios de precisão e exatidão foram realizados de acordo com critérios estabelecidos pela ANVISA.

4.4.3.1 Precisão

A precisão foi avaliada com base nos parâmetros de repetitividade e precisão intermediária.

4.4.3.1.1 repetitividade

Para este ensaio, foram preparadas misturas de sibutramina e excipiente abrangendo as concentrações de 10, 20 e 30 mg de sibutramina e completado com excipientes para 200 mg de massa final, em triplicata, correspondente à concentração inferior, média e superior do conjunto amostral. Essas amostras

foram preparadas e lidas no mesmo dia pelo mesmo analista, em espectrofotômetro no infravermelho com refletância difusa, e processadas pelo modelo escolhido utilizando corte espectral, alisamento e 10 variáveis latentes.

4.4.3.1.2 precisão intermediária

Foi procedido o preparo das misturas de 10, 20 e 30 mg de sibutramina para 200 mg de massa final, em triplicata, porém preparadas em dois dias consecutivos por operadores diferentes e analisadas através do modelo escolhido.

4.4.3.2 Exatidão

A exatidão do modelo multivariado foi avaliada por ensaio de recuperação em que quantidade conhecida do fármaco foi adicionada ao excipiente.

Um conjunto de 9 amostras, contendo 10, 20 e 30 mg de sibutramina diluídas para 200 mg de excipiente, foi preparado, e após obtenção dos dados de leitura em espectrofotômetro no infravermelho foram processados pelo modelo multivariado que descreveu as porcentagens obtidas de recuperação.

4.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA A ANÁLISE DOS MEDICAMENTOS

A análise dos medicamentos por cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada pelo método desenvolvido e validado por Radhakrishna et al. para determinação de sibutramina em forma farmacêutica, cujos parâmetros encontram-se na tabela 11. Uma curva analítica do fármaco padrão sibutramina foi preparada em triplicata utilizando-se soluções de concentrações de 0,1 $mg.mL^{-1}$, 0,2 $mg.mL^{-1}$, 0,3 $mg.mL^{-1}$, 0,4 $mg.mL^{-1}$ e 0,5 $mg.mL^{-1}$ sendo o solvente a própria fase móvel (70 % acetonitrila: 30 % tampão trietilamina). As amostras foram filtradas em filtro do tipo milex e transferidas para viais para análise em cromatógrafo.

TABELA 11 - PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS UTILIZADOS PARA A QUANTIFICAÇÃO DE SIBUTRAMINA POR CLAE

Característica	**Descrição**
Detecção	UV (λ =225 nm)
Fluxo	1,5 mL/min
Coluna	Hypersil C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm
Temperatura do forno	30°C
Fase móvel	Solução de trietanolamina 10% (pH ajustado com ácido orto-fosfórico a 6,0) Acetonitrila Proporção: 30/70 - isocrático
Volume de injeção	10 µL

FONTE: RADHAKRISHNA et al., 2000

O uso de trietilamina como parte da fase móvel é justificado para melhorar o fator de *Tailing* de cromatogramas de sibutramina (DING, 2003).

A partir da curva média foi obtida uma equação de reta e coeficiente de correlação (r). Os resultados obtidos foram registrados conforme relatórios de *system suitability*, cromatogramas, relatórios de área do pico e concentração de cada amostra.

4.7 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FÁRMACO NAS AMOSTRAS COMERCIAIS

A análise das amostras comerciais envolveu 20 cápsulas de cada especialidade do medicamento referência, genérico, similar e magistral, na dosagem 15 mg. As cápsulas foram pesadas cheias e vazias, para a determinação do peso médio. Os conteúdos correspondentes a cada uma das 20 cápsulas foram homogeneizados por trituração em gral em seguida analisadas pelos 3 métodos: DRIFT, UV e CLAE e os resultados foram comparados estatisticamente.

Para análise no infravermelho com refletância difusa uma alíquota do homogeneizado, quantidade suficiente foi colocada no porta-amostra para leitura em espectrofotômetro no infravermelho e foram obtidos os espectros e dados para análise multivariada.

Para análise no ultravioleta, quantidade equivalente ao conteúdo de sibutramina em uma cápsula (15 mg) foi pesada, em triplicata, diluído em água purificada, submetido ao banho de ultra-som e o volume completado em balão

volumétrico e procedida à diluição para obter concentração (24 μg/mL) adequada ao intervalo do método.

Para análise em CLAE, quantidade equivalente a ao conteúdo de sibutramina em uma cápsula (15 mg) foi pesada, em triplicata, diluído em fase móvel (70 % acetonitrila: 30 % tampão trietilamina), submetido ao banho de ultra-som e o volume completado em balão volumétrico para obter concentração (0,3 mg/mL) adequada ao intervalo do método.

4.8 ESTUDO DE DISSOLUÇÃO *IN VITRO*

4.8.1 Especificações de Dissolução

Considerando que a sibutramina não apresenta método farmacopéico disponível, as condições para teste foram definidas a partir da monografia existente de um fármaco da mesma classe terapêutica e fórmula química semelhante, o cloridrato de fluoxetina (USP, 2006).

O aparato utilizado foi o aparato USP 2 (pá) com auxílio de um dispositivo constituído de uma espiral de material inerte que envolve cada cápsula para evitar a flutuação. O estudo foi feito em sextuplicata, sob agitação à velocidade de 50 rpm, utilizando três meios de dissolução: água purificada e degaseificada; solução HCl 0,1 M pH 2,2 a fim de simular o conteúdo gástrico e tampão fosfato pH 6,8 simulando o conteúdo intestinal. O volume dos meios de dissolução testados foi de 900 mL. O ensaio foi realizado a temperatura de 37°C com variação de 0,2°C.

Deve-se obter no mínimo 5 pontos de amostragem, dos quais 3 devem corresponder a valores de porcentagem de fármaco dissolvido menores que 65% e o último ponto seja relativo a um tempo de coleta de no mínimo o dobro do tempo anterior (ANVISA, 2004).

Com o propósito de atender essa condição, estabeleceram-se coletas de alíquotas de 10 mL de cada uma das 6 cubas de dissolução, sem reposição do meio, nos tempos: 1, 3, 5, 8, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos após o início do teste para cada meio utilizado.

No caso de medicamentos em que especificações farmacopéicas e ensaio de dissolução não estão disponíveis recomenda-se estabelecer perfis de

dissolução comparativos empregando medicamento teste e referência sob condições de três meios de dissolução diferentes (ANVISA, 2004).

Já que a sibutramina enquadra-se neste quesito, optou-se por comparar medicamentos teste (genérico, similar e magistral) ao medicamento referência (Reductil®).

As alíquotas foram coletadas, filtradas e lidas em espectrofotômetro no ultravioleta na região de 223 nm para quantificação conforme o método descrito e validado anteriormente.

4.8.2 Avaliação dos Perfis de Dissolução

Os perfis de dissolução *in vitro* foram analisados por meio dos seguintes métodos modelo dependentes: teste da razão ou eficiência de dissolução, fator de similaridade e fator de diferença e métodos modelo independentes através da modelagem matemática.

A eficiência de dissolução é definida pela área sob a curva de dissolução, expressa como a porcentagem da área de um retângulo que descreve 100 % da dissolução, em um determinado período de tempo (Equação 13).

$$ED = \frac{\int_0^t y.dt}{y_{100}.t} x\,100\% \qquad \text{(Equação 11)}$$

Sendo, *y* a porcentagem de fármaco dissolvido no tempo *t* (KHAN, 1975).

O fator de similaridade ($f2$) e o fator de diferença ($f1$) foram aplicados segundo Shah e colaboradores (1998). O fator de diferença mede a porcentagem de erro entre duas curvas em todos os tempos (Equação 12). O fator de similaridade, por sua vez, é a transformação logarítmica da soma dos quadrados da diferença dos erros entre as formulações teste e referência em todos os tempos (Equação 13). Valores de $f2$ superiores a 50, bem como valores de $f1$ inferiores a 15 indicam similaridade entre os perfis.

$$f1 = \frac{\sum_{j=1}^{n} \left| R_j - T_j \right|}{\sum_{j=1}^{n} R_j} x100 \qquad \text{(Equação 12)}$$

$$f2 = 50.\log\left\{ \left[1 + (1/n) \sum_{j=1}^{n} \left| R_j - T_j \right|^2 \right]^{-0,5} x100 \right\} \qquad \text{(Equação 13)}$$

Onde: n é o número de amostras; R_j e T_j são as porcentagens dissolvidas dos produtos referência e teste em cada tempo j.

A descrição matemática dos perfis de dissolução *in vitro* foi realizada pelo ajuste dos dados experimentais ao modelo monoexponencial (Equação 14), ao modelo biexponencial (Equação 15), modelo de ordem zero (Equação 16), modelo sigmoidal de Weibull (Equação 17) e ao modelo monolag (Equação 18), considerando os resultados do critério de seleção de modelo (CSM), do coeficiente de correlação, do ajuste gráfico e da coerência dos valores encontrados para as constantes de velocidade para cada modelo.

$$\%D = 100(1 - e^{-kt}) \qquad \text{(Equação 14)}$$

$$\%D = 100[1 - (Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t})] \qquad \text{(Equação 15)}$$

$$\%D = kt \qquad \text{(Equação 16)}$$

$$\%D = 100[1 - e^{-(t/TD)b}] \qquad \text{(Equação 17)}$$

$$D = 100[1 - e^{-k(t-x)}] \qquad \text{(Equação 18)}$$

Sendo, *%D*, o percentual do fármaco dissolvido no tempo *t*; *k*, *α* e *β*, as constantes cinéticas de dissolução verificadas; *A* e *B*, as concentrações iniciais do fármaco que contribuem para as duas fases de dissolução; TD, o tempo no qual

63,2% do fármaco está dissolvido e b é o parâmetro relacionado às características estruturais e geométricas da forma farmacêutica.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação estatística dos resultados de validação foram realizadas através da análise de variância ANOVA para comparação entre os grupos e teste de *Tukey* para comparação entre médias, ao nível de significância de 5 %, utilizando programa Microsoft Excell®. O teste de Wilcoxon foi escolhido para análises não paramétricas com menor valor de n, considerando $p < 0,05$, utilizando o software SPSS® for windows.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O cloridrato monohidratado de sibutramina matéria prima utilizada neste trabalho apresentou características organolépticas, solubilidade, pH da solução e ponto de fusão semelhantes àqueles descritos na literatura (MERCK INDEX, 2001), ou seja, apresentou-se na forma de pó branco cristalino leitoso, solúvel em água: 2,9 $mg.mL^{-1}$ resultando em solução de pH 5,2 e também solúvel em metanol. O ponto de fusão obtido foi de 191 -192°C, confirmando a pureza e boa qualidade da matéria prima com a qual foi trabalhada (JEFFERY et al., 1996).

5.1 ESPECTROSCOPIA POR ULTRAVIOLETA

A sibutramina é um fármaco que apresenta um cromóforo característico com intensa absorção na região do ultravioleta, o que justifica o desenvolvimento de um método por espectrometria nesta região para sua quantificação.

A sibutramina apresentou solubilidade satisfatória em todos os solventes testados, porém o solvente escolhido foi água purificada pelo fato de ser não poluente e de custo reduzido, além de solubilizar o fármaco de forma adequada.

A definição do comprimento de onda mais adequado para quantificação da sibutramina foi feita através das curvas analíticas traçadas das diferentes concentrações (5 a 30 $\mu g.mL^{-1}$) em função de cada comprimento de onda unitário no intervalo entre 200 e 350 nm. A escolha baseou-se no coeficiente de correlação de retas que foram obtidas da representação gráfica da absorvância *versus* concentração em cada comprimento de onda. Este gráfico mostrou que o coeficiente de correlação entre absorvância e concentração para cada comprimento de onda no intervalo entre 220 a 229 foram superiores a 0,999 e com valores muito próximos o que significa uma boa correlação linear entre essas grandezas.

O comprimento de onda escolhido foi em 223 por apresentar boa correlação entre as grandezas (r=0,9997) além de o fármaco ter apresentado absorção máxima.

O método demonstrou ser linear entre 0,1 e 100 μg.mL^{-1} (figura 7) tendo em vista que o coeficiente de correlação, que mede a correlação linear entre duas variáveis, apresentou um valor muito próximo de um (0,9998) (Equação 19), indicando a excelência do ajuste dos dados .

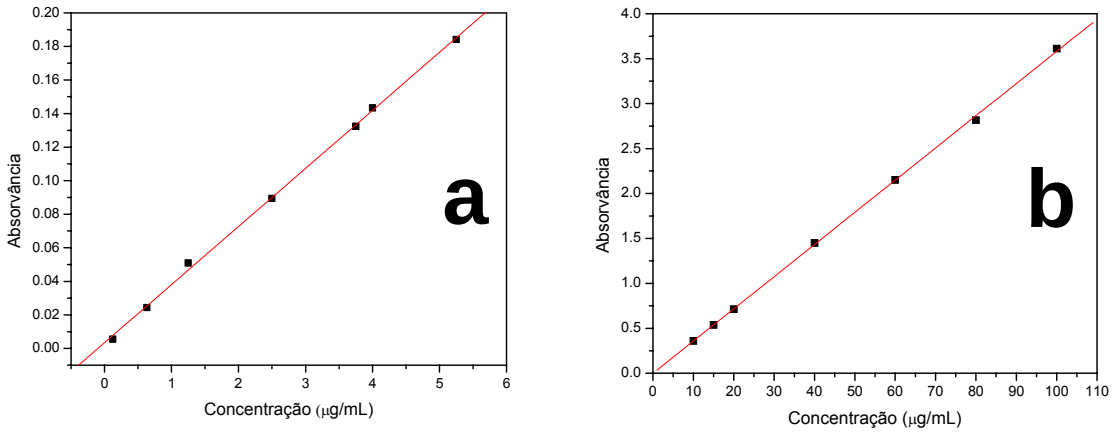


FIGURA 7- GRÁFICO RELATIVO À LINEARIDADE DA SIBUTRAMINA NA FAIXA DE CONCENTRAÇÃO DE 0,1 A 100 μg.mL^{-1} REPRESENTADO EM (a) DE 0,1 A 5,0 E (b) 10,0 A 100,0 μg.mL^{-1}

$$y = 0{,}03578\ x + 0{,}002093$$
$$r = 0{,}9998 \qquad \text{(Equação 19)}$$

O intervalo de trabalho foi escolhido a partir do gráfico de linearidade tomando-se como referência valores de absorvância entre 0,2 e 1,0 U.A. que corresponde a faixa de concentração de 10 a 30,0 μg.mL^{-1}.

5.2.2 Validação Analítica

5.2.2.1 Especificidade

A especificidade do método foi avaliada frente aos excipientes, que em geral, fazem parte da forma farmacêutica e que podem interferir na quantificação do fármaco. Os excipientes utilizados foram os mesmos que fazem parte da composição do medicamento industrializado. A proporção de cada excipiente na mistura segue o Handbook of Pharmaceutical Excipients para a composição de cápsulas.

As soluções contendo fármaco mais excipiente foram filtradas antes da leitura em espectrofotômetro, com o objetivo de separar os excipientes insolúveis nas condições do ensaio. Como meios filtrantes foram testados diferentes tipos e marcas de papel de filtro, com o objetivo de avaliar a interferência dos mesmos nos resultados das análises. Muitos dos papéis de filtro testados apresentaram interferência no ensaio, reduzindo significativamente o valor da absorvância, ou seja, os valores de absorvância das leituras em espectrofotômetro a 223 nm foram diferentes para uma solução do padrão lida antes e após a filtração. O papel de filtro quantitativo Framex® demonstrou ser adequado por não apresentar nenhuma interferência perceptível nas condições do ensaio, ou seja, os valores de absorvância foram idênticos para uma solução do padrão lida antes e após a filtração. Sendo assim, recomenda-se testar o papel de filtro utilizado a cada mudança de marca ou fornecedor.

Os resultados da concentração obtidos da análise com e sem adição de excipientes mostraram valores muito semelhantes (tabela 12), ou seja, não há diferença significativa entre os mesmos, tendo em vista que na comparação dos resultados através do teste estatístico de Wilcoxon o valor de p (0,06) foi maior que 0,05.

TABELA 12 – VALORES DE CONCENTRAÇÃO OBTIDOS NO ENSAIO DE ESPECIFICIDADE DO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO POR ULTRAVIOLETA

C. ($\mu g.mL^{-1}$) teórica	**C. ($\mu g.mL^{-1}$) com excipientes**	**Erro (%)**	**C. ($\mu g.mL^{-1}$) sem excipientes**	**Erro (%)**
	20,10	0,50	19,65	1,75
	19,74	1,30	19,78	1,10
20	19,87	0,65	20,12	0,60
	20,33	1,65	20,10	0,50
	20,06	0,30	19,81	0,95
	20,05	0,25	20,11	0,55
Média		**0,78**		**0,91**

C = concentração

5.2.2.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada por inspeção visual através da representação gráfica dos valores de absorvância obtidos em função da concentração e também pelo método dos mínimos quadrados. A figura 8 ilustra a representação gráfica da

reta média obtida das três curvas analíticas de sibutramina, fornecendo a equação da reta e o valor de r encontrado (Equação 20).

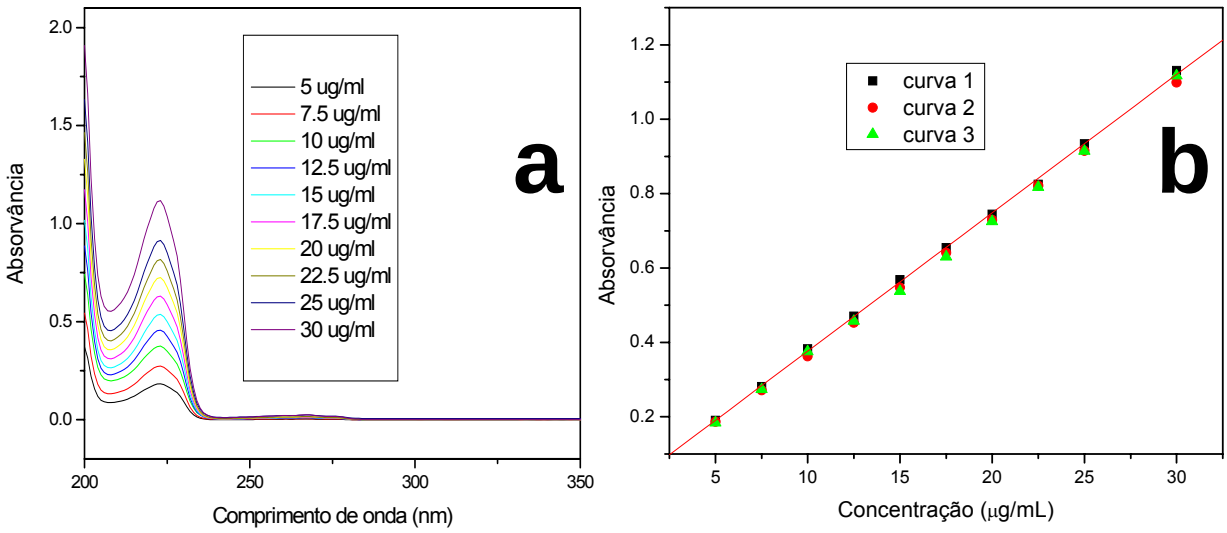


FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA CURVA ANALÍTICA (a) E EQUAÇÃO DA RETA DA SIBUTRAMINA OBTIDA POR ESPECTROMETRIA NO ULTRAVIOLETA (b)

$$y = 0{,}0369\ x + 0{,}0008524$$
$$r = 0{,}9997 \qquad \text{(Equação 20)}$$

A inclinação da reta média obtida foi de 0,0369 e o desvio padrão do intercepto das curvas encontrado foi de 0,001589. O valor de r médio obtido a partir da média aritmética do coeficiente de correlação das três retas (r_1, r_2 e r_3) foi calculado em 0,9997. Esses resultados mostram que o método é linear e apresenta um coeficiente de correlação médio superior a 0,999, considerado evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (RIBANI, 2004).

A partir do intercepto da curva média e da estimativa dos valores de desvio padrão do intercepto com o eixo y, foram obtidos os valores de limite de detecção (LD= 0,13 μg.mL^{-1}) e limite de quantificação (LQ= 0,43 μg.mL^{-1}).

5.2.2.3 Intervalo

Considerando a concentração de 20,0 μg.mL^{-1} como a concentração teste, o intervalo definido para faixa de trabalho foi de 10,0 a 30,0 μg.mL^{-1}. Esse

intervalo abrange uma faixa de trabalho mais ampla que a maior faixa definida pela ANVISA (2003) que é de 70 -130 % da concentração teste no caso de ensaios de uniformidade de conteúdo. Portanto, esse intervalo também atende os limites estabelecidos para ensaio de perfil de dissolução.

5.2.2.4 Precisão

A precisão foi avaliada através dos ensaios de repetitividade e precisão intermediária.

5.2.2.4.1 repetitividade

Para avaliação da repetitividade de um método espectrométrico, várias pesagens podem ser feitas ou várias alíquotas podem ser obtidas e diluídas à concentração requerida para análise (WATSON, 2000).

Neste trabalho, várias alíquotas foram diluídas para cada nível de concentração teórica (10, 20 e 30 $\mu g.mL^{-1}$) e a partir das concentrações determinadas foram obtidas estimativas de desvio padrão e média (tabela 13).

A média do coeficiente de variação foi de 1,36%, o que indica que o método apresenta uma boa repetitividade, pois este valor é inferior a 5%, o que satisfaz a exigência para se afirmar que o ensaio atende o requisito da repetitividade (ANVISA, 2003).

TABELA 13- VALORES OBTIDOS DO ENSAIO DE REPETITIVIDADE PELO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO NO ULTRAVIOLETA

C. teórica ($\mu g.mL^{-1}$)	**C. prática ($\mu g.mL^{-1}$)**	**Média**	**DP**	**CV (%)**
10	10,16			
10	9,92	10,01	0,13	1,28
10	9,96			
20	19,90			
20	19,48	19,59	0,27	1,37
20	19,40			
30	30,27			
30	29,41	29,86	0,43	1,44
30	29,90			
Média				**1,36**

C= concentração

5.2.2.4.2 precisão intermediária

Os resultados obtidos no ensaio para a avaliação da precisão intermediária, em diferentes dias, com analistas diferentes apresentaram uma média do coeficiente de variação de 2,05%. Considerando que esse valor é inferior a 5%, o método pode ser considerado satisfatório quanto a esse parâmetro (ANVISA, 2003; ICH, 2005). Os resultados do ensaio de precisão intermediária estão resumidos na tabela 14.

TABELA 14 - VALORES EXPERIMENTAIS OBTIDOS NO ENSAIO DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA PELO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO NO ULTRAVIOLETA

C. teórica ($\mu g.mL^{-1}$)	**Variação de dias**	**Operador**	**C. prática ($\mu g.mL^{-1}$)**	**Média**	**DP**	**CV (%)**
10	**Dia 1**	**1**	10,12			
10	**Dia 2**	**2**	9,63	9,87	0,35	3,51
10	**Dia 3**	**3**	10,01			
20	**Dia 1**	**1**	19,15			
20	**Dia 2**	**2**	19,48	19,31	0,23	1,21
20	**Dia 3**	**3**	19,59			
30	**Dia 1**	**1**	28,84			
30	**Dia 2**	**2**	29,43	29,13	0,42	1,43
30	**Dia 3**	**3**	29,86			
Média						**2,05**

C= concentração

Considerando que o método apresentou resultados satisfatórios no ensaio de repetitividade e precisão intermediária, podemos considerar que o mesmo satisfaça o requisito de precisão.

5.2.2.5 Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo ensaio de recuperação no qual uma quantidade conhecida do fármaco (sibutramina) é adicionada à mistura sintética dos componentes da forma farmacêutica (excipientes) e em seguida faz-se a quantificação avaliando-se a porcentagem de recuperação do fármaco. Os valores de recuperação obtidos nesse ensaio encontram-se na tabela 15.

TABELA 15- VALORES EXPERIMENTAIS OBTIDOS NA DETERMINAÇÃO DE SIBUTRAMINA PELO ENSAIO DE RECUPERAÇÃO

C. teórica ($\mu g.mL^{-1}$)	C. prevista ($\mu g.mL^{-1}$)	Recuperação (%)	%Média ± DP
10	10,12	101,2	
10	9,93	99,30	99,95± 1,25
10	9,87	98,70	
20	20,15	100,75	
20	19,68	98,40	99,57± 1,17
20	19,81	99,05	
30	30,14	100,46	
30	29,43	98,10	99,48± 0,8
30	29,55	98,50	

C= concentração

As médias das porcentagens de recuperação obtidas foram de: 99,95% ± 1,25 para concentração de 10,0 $\mu g.mL^{-1}$; 99,57% ± 1,17 para 20,0 $\mu g.mL^{-1}$ e 99,48% ± 0,98 para 30,0 $\mu g.mL^{-1}$, valores estes muito próximos de 100% indicando que o método desenvolvido apresenta exatidão adequada para a quantificação do fármaco sibutramina em forma farmacêutica. Na maioria dos procedimentos analíticos de validação, recuperação dentro da faixa de 70% a 120% são aceitos (ICH, 2005).

5.2.2.6 Robustez

O ensaio de robustez mede a confiabilidade do método em condições normais de operação, permitindo fixar as tolerâncias dos parâmetros críticos do método. No ensaio de robustez foram avaliados os parâmetros: tempo de leitura, pH, temperatura e equipamentos.

5.2.2.6.1 pH

A figura 9 mostra os resultados da avaliação da influência do pH, no intervalo de 1 a 10, nos valores de absorvância para soluções de sibutramina.

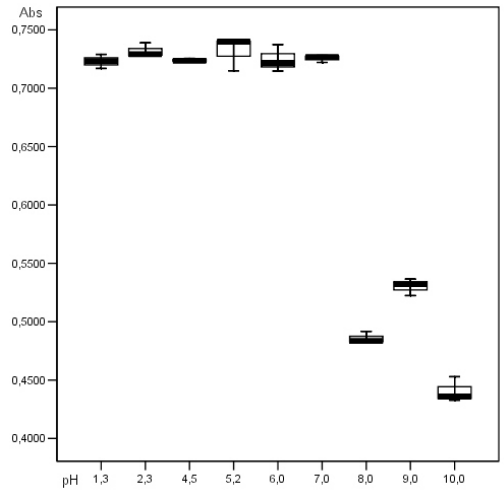


FIGURA 9 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DESCRITIVA DOS VALORES DE ABSORVÂNCIA, EM 223 nm, DE SOLUÇÕES DE SIBUTRAMINA 20 $\mu g.mL^{-1}$ EM DIFERENTES VALORES DE pH

Pode-se observar que para valores de pH de 1,3 a 7 praticamente não houve variação dos valores de absorvância, porém em valores de pH acima de 8 houve uma redução na intensidade da absorção.

Os valores de *p* encontrados, através do teste t, para a variação de pH entre 1,3 e 7,0 foram superiores a 0,05 demonstrando que não houve realmente diferença estatística significativa, nos valores de absorvância, nesse intervalo de pH.

Já para o intervalo na faixa alcalina, a partir do pH 8,0, os valores de *p* encontrados foram inferiores a 0,05, o que indica que existe diferença estatística para os valores de absorvância nesta faixa de pH.

Uma possível explicação para este resultado é que tenha ocorrido uma modificação química na molécula alterando o arranjo eletrônico e, por conseguinte, a sua característica de absorção. Essa alteração química pode ser conseqüência do valor do pKa da sibutramina (pKa=8,5).

Esse fato limita o método a ser utilizado apenas em pH neutro ou ácido.

5.2.2.6.2 tempo de leitura

Um fator importante é a avaliação do tempo de espera da amostra para leitura. Métodos analíticos para produtos acabados tendem a ser desenvolvidos e

validados utilizando amostras recém preparadas, quando deveria ser demonstrada sua aplicação com amostras menos recentes (SHARP, 2000).

Neste ensaio de validação, trabalhou-se com um conjunto de soluções abrangendo o intervalo do método, sendo realizadas leituras de amostras recém-preparadas e após 24 horas. A avaliação da influência do tempo de espera para a leitura foi feita através da correlação entre os dados de leituras no tempo zero e dados de leitura no tempo 24 horas através da representação gráfica destes dados (figura 10). A semelhança entre os resultados obtidos nestes dois tempos foi avaliada através do coeficiente de correlação e análise de variância. O coeficiente de correlação obtido a partir da representação gráfica destes conjuntos de dados foi de 0,9996. Esse valor indica um ajuste linear dos dados os dados.

Utilizando a análise de variância (ANOVA), foi verificado que não há diferença significativa entre os conjuntos das leituras obtidas das soluções nos diferentes tempos, tendo em vista que o valor de f encontrado é muito inferior ao f crítico conforme a equação [$f(8,2854) = 0,000362$, $p = 0,985$]. Além disso, foi observado que o valor de variância dentro de cada grupo (0,08712) é superior ao valor da variância das médias ($3,15 \times 10^{-5}$), indicando a inexistência de variância significativa entre os grupos avaliados ao nível de significância de 5%.

Os resultados do coeficiente de correlação e análise de variância mostraram que a espera de até um dia após o preparo das amostras não levou a variação significativa nos valores de absorvância (figura 10).

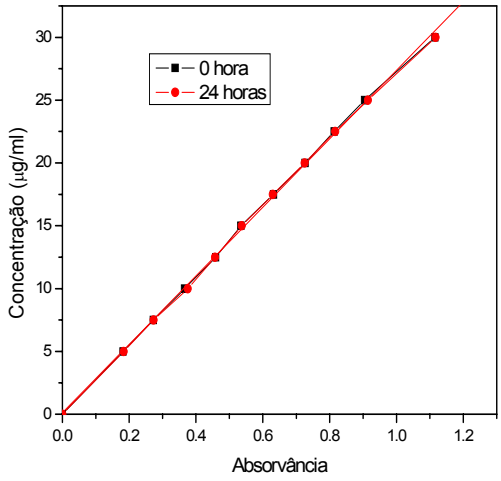


FIGURA 10 – GRÁFICO DOS VALORES DE ABSORVÂNCIA DAS LEITURAS REALIZADAS NOS TEMPOS 0 E 24 HORAS APÓS O PREPARO DAS SOLUÇÕES DE SIBUTRAMINA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES

5.2.2.6.3 temperatura

A variação de temperatura foi testada no ensaio de robustez tendo em vista a ocorrência de variações significativas de temperatura nas diferentes regiões do país, nas diferentes estações do ano e até mesmo variações deliberadas ocorridas dentro de um laboratório, uma vez que nem todos os laboratórios são climatizados.

Os valores médios de absorvância, das leituras em triplicata, para as soluções de sibutramina, 20,0 $\mu g.mL^{-1}$, quando lidas a 4°C e 30°C não mostraram diferença significativa, considerando que o teste estatístico de wilcoxon não apontou diferença estatística (p=0,276) entre as médias nas temperaturas avaliadas.

5.2.2.6.4 equipamentos

Segundo Sharp (2000) no ensaio de robustez de um método espectrofotométrico devem-se considerar também os diferentes tipos de equipamentos.

Neste experimento um conjunto de soluções de sibutramina de concentrações no intervalo de 5 a 30 $\mu g.mL^{-1}$ foram lidas, a 223 nm, em dois

espectrofotômetros de marcas diferentes: Shimadzu® modelo UV-1601PC e Hewlett Packard® 8452A. Os valores obtidos de cada equipamento foram representados graficamente (Absorvância x Concentração) aos quais se aplicou a análise por regressão linear obtendo-se uma única reta para os dois conjuntos (figura 11), cujo coeficiente de correlação obtido (r = 0,9995) indicou um bom ajuste linear dos dados.

A análise de variância revelou que não existe diferença significativa entre os valores de absorvância obtidos nos diferentes equipamentos utilizados, pois o valor de f encontrado é inferior ao de f crítico [f(8,8616) = 6,233 x 10^{-7}, p = 0,9993] ao nível de significância de 5 %. Ainda, o valor de variância dentro de cada grupo (0,08487) é superior ao valor da variância das médias (5,29 x 10^{-8}), indicando não haver variância significativa entre os grupos avaliados.

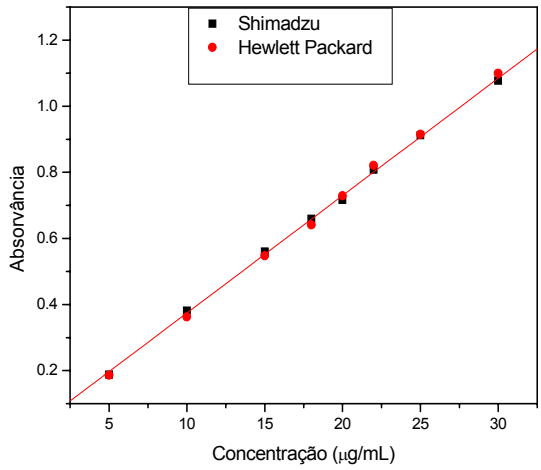


FIGURA 11- REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS VALORES DE ABSORVÂNCIA DAS LEITURAS REALIZADAS EM 223 nm NOS DIFERENTES EQUIPAMENTOS PARA SOLUÇÕES DE SIBUTRAMINA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES

5.3 ESPECTROSCOPIA POR INFRAVERMELHO COM REFLETÂNCIA DIFUSA

5.3.1 Espectro no Infravermelho com Refletância Difusa

Na figura 12 está representado o espectro de infravermelho do fármaco sibutramina onde é possível observar as bandas de absorção características da molécula, (2963 e 2866 -estiramento CH_3, CH_2 e CH; 2700 -estiramento NH; 1492 -estiramento C=C aromático; 1483 e 1474 - isobutil CH_3 e vibração em tesoura

CH_2; 1428 e 1407 - NCH_3; 1395 e 1370 - isobutil CH_3; 1902 -aromático p-substiuído; 1011 - CH aromático em plano; 834 e 823 - CH aromático fora do plano), como descrito por Jeffery (1996).

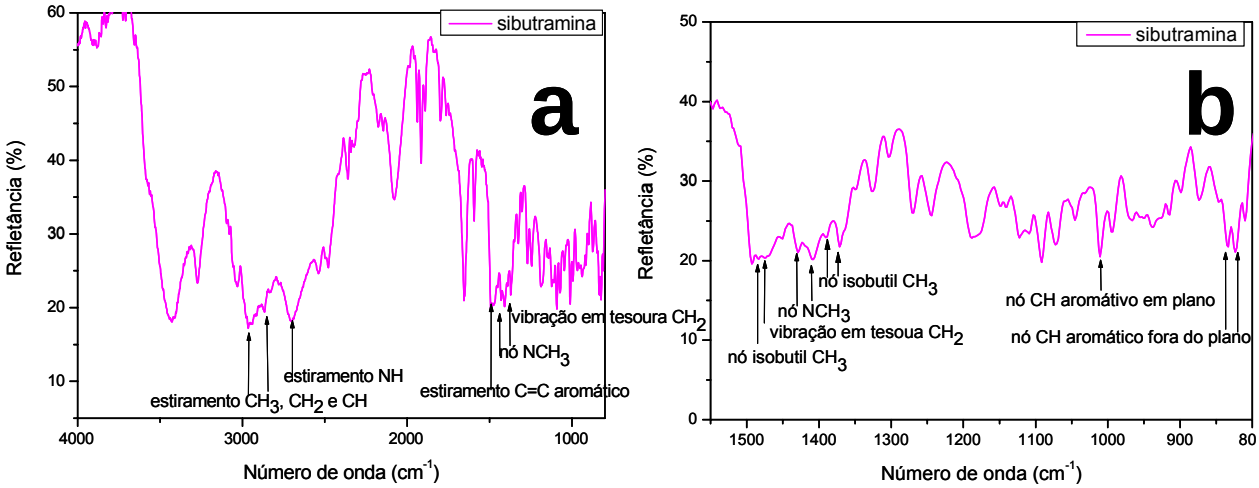


FIGURA 12 –ESPECTROS NO INFRAVERMELHO COM REFLETÂNCIA DIFUSA DE SIBUTRAMINA COM ATRIBUIÇÕES DAS BANDAS DE MAIOR RELEVÂNCIA NAS REGIÕES DE (a) 4000 A 1000 cm^{-1} E (b) 1500 A 80 cm^{-1}

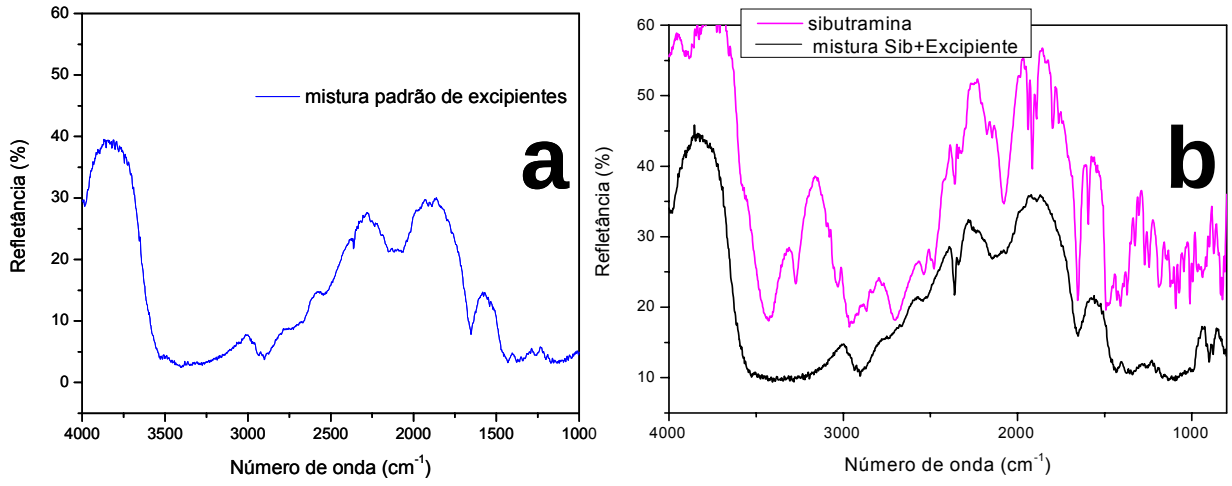


FIGURA 13- ESPECTRO DA MISTURA PADRÃO DE EXCIPIENTES (a) COMPARADO AOS ESPECTROS DO FÁRMACO PURO E DA MISTURA FÁRMACO/EXCIPIENTES (b)

Quando se compara o espectro da sibutramina (figura 12) com o espectro da mistura de excipientes (figura 13 a) observa-se que eles apresentam diferenças em seus perfis de absorção principalmente nos números de onda

correspondentes a grupos químico específicos da sibutramina. Porém quando comparamos o espectro da mistura de excipientes sem sibutramina (figura 13 a) e com sibutramina (figura 13 b) pode-se observar que eles são muito semelhantes. Isso pode ser explicado pelo fato do fármaco estar presente em concentração em quantidade 19 vezes menor que a do excipiente (15 mg: 200 mg) relação esta em que ele se encontra presente na forma farmacêutica dificultando uma possível análise univariada.

A sobreposição dos sinais na mistura fármaco e excipientes dificulta a seleção de uma região espectral para elaboração de um modelo univariado para quantificação de sibutramina na forma farmacêutica e a determinação no infravermelho com refletância difusa torna-se uma análise inviável.

Tal constatação justifica o uso de modelos multivariados como uma ferramenta adequada a ser utilizada para quantificação do fármaco na forma farmacêutica.

5.3.2 Análise Exploratória dos Dados (Principal Component Analysis)

Uma análise exploratória dos dados de todo o conjunto de amostras, incluindo as de calibração e previsão, foi realizada por análise de componentes principais. A PCA permite descobrir se as amostras fazem parte de um conjunto homogêneo, ou se há possível presença de *outliers*, ou seja, amostras anômalas.

Para isso, um modelo de análise de componentes principais, utilizando toda a informação espectral fornecida pelo equipamento e pré-processamento MSC, foi construído resultando na porcentagem de variância mostrada no quadro 1.

N° CP	Cov(X)	% Variância capturada CP	% Variância Total
1	7,01e+006	99,86	99,86
2	2,23e+003	0,03	99,89
3	1,53e+003	0,02	99,92
4	9,76e+002	0,01	99,93
5	6,87e+002	0,01	99,94
6	5,02e+002	0,01	99,95
7	3,69e+002	0,01	99,95
8	3,41e+002	0,00	99,96
9	2,76e+002	0,00	99,96
10	2,64e+002	0,00	99,97
11	2,46e+002	0,00	99,97
12	2,24e+002	0,00	99,97
13	2,09e+002	0,00	99,97
14	1,87e+002	0,00	99,98
15	1,78e+002	0,00	99,98
16	1,59e+002	0,00	99,98
17	1,52e+002	0,00	99,98
18	1,49e+002	0,00	99,99
19	1,44e+002	0,00	99,99
20	1,34e+002	0,00	99,99

QUADRO 1- PORCENTAGEM DE VARIÂNCIA CAPTURADA NO MODELO PCA

Foram escolhidas 10 variáveis latentes por descreveram a maior variância capturada (99,97 %) dos dados originais e não um valor superior a fim de não incrementar ruído e prejudicar a robustez do modelo.

A partir de então, obteve-se o gráfico de *scores* mostrado na figura 14.

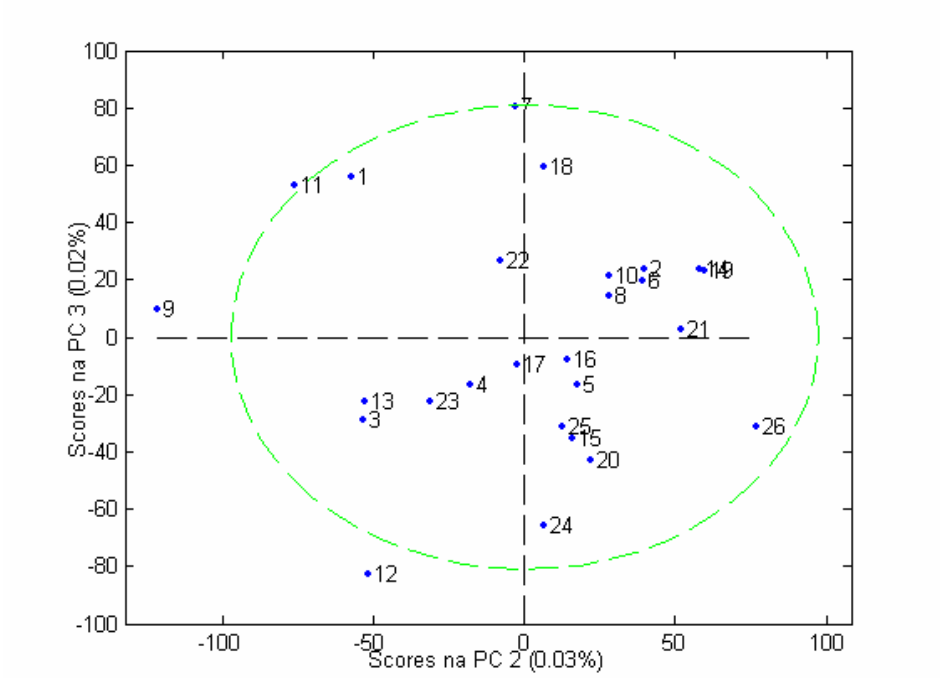


FIGURA 14 - GRÁFICO DE SCORES EM PC 2 EM FUNÇÃO DE SCORES EM PC 3

Esse gráfico ilustra a correlação obtida entre as amostras descrita pela PCA. Observa-se alta correlação entre os dados, assegurando que as amostras formam um conjunto homogêneo. Partindo desse pressuposto, iniciou-se a análise multivariada por PLSR.

5.3.3 Construção de Modelos Multivariados PLSR (Partial Least Squares Regression)

Nesta etapa, quatro regiões espectrais foram avaliadas de acordo com presença ou não de pré-processamento. O primeiro conjunto envolve toda a faixa espectral obtida (7000 a 400 cm^{-1}), um segundo envolve apenas a região do infravermelho médio (4000 a 400 cm^{-1}), o terceiro utilizando somente a região do infravermelho próximo (7000 a 4000 cm^{-1}) e o último utilizando corte de faixa espectral (750-1150/ 1350-1500/ 1850-1950/ 2600-2900 cm^{-1}) selecionando as regiões de maior informação sobre a molécula de sibutramina.

Os espectros das 22 misturas utilizadas na construção dos modelos de calibração multivariada e das 5 misturas de previsão estão representados na figura 15.

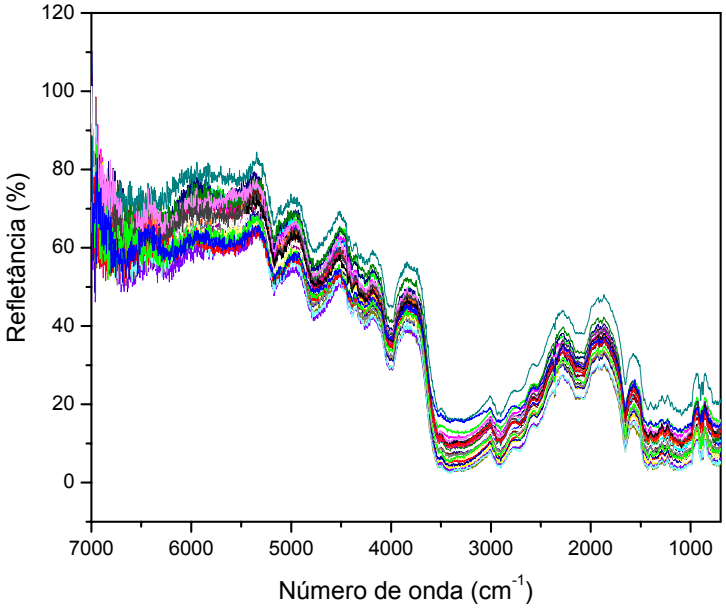


FIGURA 15 – ESPECTROS DO CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO

Com a finalidade de remover ou reduzir fontes de variação irrelevantes como erros sistemáticos, três tipos de pré-processamentos foram avaliados: MSC, alisamento e detrend para todos os conjuntos de regiões. Foram avaliados três diferentes números de variáveis latentes (6, 12 e 18), escolhidas de acordo com o percentual de variância capturada.

Avaliando-se a capacidade de previsão dos diversos modelos desenvolvidos em relação as 5 misturas sintéticas de fármaco e composição padrão de excipientes reservadas para validação (25 mg.200mg^{-1}, 50 mg.200 mg^{-1}, 85 mg.200 mg^{-1}, 115 mg.200mg^{-1} e 145 mg.200mg^{-1}), obtiveram-se os resultados apresentados nas tabelas a seguir sob a forma de erro relativo. Os resultados geraram gráficos de superfície de resposta que, num primeiro momento, definiu a melhor região a ser utilizada e depois o melhor pré-processamento e número de variáveis latentes.

TABELA 16- ERROS RELATIVOS DOS MODELOS UTILIZANDO FAIXA ESPECTRAL COMPLETA SEM PRÉ-PROCESSAMENTO

	Concentração encontrada					
	6 VL		12 VL		18 VL	
C. teórica		Erro (%)		Erro (%)		Erro (%)
25	22,22	11,12	20,32	18,72	20,32	18,72
50	53,23	6,46	51,61	3,22	51,61	3,22
85	68,03	19,96	68,79	19,07	68,79	19,07
115	91,22	20,68	89,60	22,09	89,6	22,09
145	125,20	13,66	124,21	14,34	124,21	14,34
		14,38		15,49		15,49

C=concentração

TABELA 17- ERROS RELATIVOS DOS MODELOS UTILIZANDO FAIXA ESPECTRAL COMPLETA E PRÉ-PROCESSAMENTO MSC

	Concentração encontrada					
	6 VL		12 VL		18 VL	
C. teórica		Erro (%)		Erro (%)		Erro (%)
25	18,73	25,08	18,18	27,28	18,18	27,28
50	60,99	21,98	60,57	21,14	60,57	21,14
85	71,80	15,53	72,09	15,19	72,09	15,19
115	91,76	20,21	92,08	19,93	92,08	19,93
145	121,94	15,90	122,5	15,52	122,5	15,52
		19,74		19,81		19,81

TABELA 18- ERROS RELATIVOS DOS MODELOS UTILIZANDO FAIXA ESPECTRAL COMPLETA E PRÉ-PROCESSAMENTO SMOOTH

	Concentração encontrada					
	6 VL		12 VL		18 VL	
C. teórica		Erro (%)		Erro (%)		Erro (%)
25	11,38	54,48	10,61	57,56	10,56	57,76
50	48,37	3,26	42,23	15,54	42,11	15,78
85	58,36	31,34	68,13	19,85	67,99	20,01
115	103,38	10,10	100,54	12,57	100,5	12,61
145	134,15	7,48	130,82	9,78	130,8	9,79
		21,33		23,06		23,19

TABELA 19- ERROS RELATIVOS DOS MODELOS UTILIZANDO FAIXA ESPECTRAL COMPLETA E PRÉ-PROCESSAMENTO DETREND

	Concentração encontrada					
	6 VL		**12 VL**		**18 VL**	
C. teórica		Erro (%)		Erro (%)		Erro (%)
25	20,32	18,72	20,93	16,28	20,93	16,28
50	62,52	25,04	63,18	26,36	63,18	26,36
85	85,8	0,94	85,89	1,05	85,89	1,05
115	91,35	20,57	91,44	20,49	91,44	20,49
145	132,95	8,31	133,17	8,16	133,17	8,16
		14,71		14,47		14,47

TABELA 20- ERROS RELATIVOS DOS MODELOS UTILIZANDO INFRAVERMELHO MÉDIO SEM PRÉ-PROCESSAMENTO

	Concentração encontrada					
	6 VL		**12 VL**		**18 VL**	
C. teórica		Erro (%)		Erro (%)		Erro (%)
25	32,59	30,36	33,94	35,76	33,99	35,96
50	56,89	13,78	59,07	18,14	59,11	18,22
85	98,04	15,34	92,14	8,40	92,16	8,42
115	102,85	10,57	116,66	1,44	116,63	1,42
145	140,13	3,36	149,06	2,80	149,04	2,79
		14,68		13,31		13,36

TABELA 21- ERROS RELATIVOS DOS MODELOS UTILIZANDO INFRAVERMELHO MÉDIO E PRÉ-PROCESSAMENTO MSC

	Concentração encontrada					
	6 VL		**12 VL**		**18 VL**	
C. teórica		Erro (%)		Erro (%)		Erro (%)
25	28,52	14,08	32,52	30,08	32,53	30,12
50	60,72	21,44	59,89	19,78	59,92	19,84
85	94,96	11,72	91,01	7,07	91,00	7,06
115	106,2	7,65	109,05	5,17	109,06	5,17
145	137,4	5,24	137,19	5,39	137,19	5,39
		12,03		13,5		13,52

TABELA 22- ERROS RELATIVOS DOS MODELOS UTILIZANDO INFRAVERMELHO MÉDIO E PRÉ-PROCESSAMENTO SMOOTH

	Concentração encontrada					
	6 VL		**12 VL**		**18 VL**	
C. teórica		Erro (%)		Erro (%)		Erro (%)
25	24,65	1,40	21,45	14,20	21,62	13,52
50	57,34	14,68	53,97	7,94	54,01	8,02
85	93,20	9,65	82,28	3,20	82,84	2,54
115	106,89	7,05	119,05	3,52	118,54	3,08
145	145,61	0,42	167,81	15,73	166,96	15,14
		6,64		8,92		8,46

TABELA 23- ERROS RELATIVOS DOS MODELOS UTILIZANDO INFRAVERMELHO MÉDIO E PRÉ-PROCESSAMENTO DETREND

	Concentração encontrada					
	6 VL		**12 VL**		**18 VL**	
C. teórica		Erro (%)		Erro (%)		Erro (%)
25	34,87	39,48	35,69	42,76	35,69	42,76
50	60,93	21,86	58,30	16,60	58,3	16,60
85	85,82	0,96	85,16	0,19	85,15	0,18
115	113,07	1,68	116,8	1,57	116,81	1,57
145	149,21	2,90	150,20	3,59	150,20	3,59
		13,37		12,94		12,94

TABELA 24- ERROS RELATIVOS DOS MODELOS UTILIZANDO INFRAVERMELHO PRÓXIMO SEM PRÉ-PROCESSAMENTO

	Concentração encontrada					
	6 VL		**12 VL**		**18 VL**	
C. teórica		Erro		Erro		Erro
25	26,09	4,36	25,53	2,12	25,53	2,12
50	63,83	27,66	64,46	28,92	64,42	28,84
85	65,78	22,61	65,47	22,98	65,47	22,98
115	80,27	30,20	80,63	29,89	80,63	29,89
145	116,49	19,66	117,99	18,63	117,99	18,63
		20,90		20,51		20,49

TABELA 25- ERROS RELATIVOS DOS MODELOS UTILIZANDO INFRAVERMELHO PRÓXIMO E PRÉ-PROCESSAMENTO MSC

	Concentração encontrada					
	6 VL		12 VL		18 VL	
C. teórica		Erro (%)		Erro (%)		Erro (%)
25	21,97	12,12	21,45	14,20	21,45	14,20
50	66,12	32,24	66,46	32,92	66,46	32,92
85	60,11	29,28	59,78	29,67	59,78	29,67
115	80,77	29,77	80,99	29,57	80,99	29,57
145	113,18	21,94	113,89	21,46	113,89	21,46
		25,07		25,56		25,56

TABELA 26- ERROS RELATIVOS DOS MODELOS UTILIZANDO INFRAVERMELHO PRÓXIMO E PRÉ-PROCESSAMENTO SMOOTH

	Concentração encontrada					
	6 VL		12 VL		18 VL	
C. teórica		Erro (%)		Erro (%)		Erro (%)
25	19,53	21,88	18,29	26,84	18,25	27,00
50	53,22	6,44	50,18	0,36	50,20	0,40
85	69,37	18,39	72,14	15,13	72,24	15,01
115	89,67	22,03	88,58	22,97	88,62	22,94
145	115,05	20,66	120,38	16,98	120,38	16,98
		18,88		16,46		16,46

TABELA 27- ERROS RELATIVOS DOS MODELOS UTILIZANDO INFRAVERMELHO PRÓXIMO E PRÉ-PROCESSAMENTO DETREND

	Concentração encontrada					
	6 VL		12 VL		18 VL	
C. teórica		Erro (%)		Erro (%)		Erro (%)
25	55,10	120,40	55,71	122,84	55,71	122,84
50	60,41	20,82	61,27	22,54	61,27	22,54
85	97,07	14,20	97,59	14,81	97,59	14,81
115	77,23	32,84	77,48	32,63	77,47	32,63
145	109,99	24,14	110,24	23,97	110,24	23,97
		42,48		43,36		43,36

TABELA 28- ERROS RELATIVOS DOS MODELOS UTILIZANDO ESPECTRO FRAGMENTADO SEM PRÉ-PROCESSAMENTO

	Concentração encontrada					
	6 VL		12 VL		18 VL	
C. teórica		Erro (%)		Erro (%)		Erro (%)
25	28,69	14,76	30,70	22,80	30,70	22,80
50	53,96	7,92	53,57	7,14	53,56	7,12
85	82,69	2,72	79,47	6,51	79,46	6,52
115	118,8	3,30	113,8	1,04	113,81	1,03
145	147,07	1,43	147,73	1,88	147,73	1,88
		6,02		7,87		7,87

TABELA 29- ERROS RELATIVOS DOS MODELOS UTILIZANDO ESPECTRO FRAGMENTADO E PRÉ-PROCESSAMENTO MSC

	Concentração encontrada					
	6 VL		12 VL		18 VL	
C. teórica		Erro (%)		Erro (%)		Erro (%)
25	25,72	2,88	26,76	7,04	26,75	7,00
50	54,33	8,66	55,05	10,10	55,05	10,10
85	83,66	1,58	81,42	4,21	81,42	4,21
115	112,87	1,85	112,01	2,60	112,01	2,60
145	142,00	2,07	140,16	3,34	140,17	3,33
		3,4		5,45		5,45

TABELA 30- ERROS RELATIVOS DOS MODELOS UTILIZANDO ESPECTRO FRAGMENTADO E PRÉ-PROCESSAMENTO SMOOTH

	Concentração encontrada					
	6 VL		12 VL		18 VL	
C. teórica		Erro (%)		Erro (%)		Erro (%)
25	27,25	9,00	25,34	1,36	25,4	1,60
50	55,41	10,82	50,56	1,12	50,86	1,72
85	83,96	1,22	79,60	6,35	79,87	6,04
115	119,97	4,32	115,39	0,34	115,26	0,23
145	147,91	2,01	145,22	0,15	145,32	0,22
		5,47		1,86		1,96

TABELA 31- ERROS RELATIVOS DOS MODELOS UTILIZANDO ESPECTRO FRAGMENTADO E PRÉ-PROCESSAMENTO DETREND

	Concentração encontada					
	6 VL		**12 VL**		**18 VL**	
C. teórica		Erro (%)		Erro (%)		Erro (%)
25	29,59	18,36	28,55	14,20	28,55	14,20
50	54,28	8,56	54,47	8,94	54,47	8,94
85	76,07	10,51	76,86	9,58	76,86	9,58
115	118,53	3,07	117,07	1,80	117,07	1,80
145	144,34	0,46	144,67	0,23	144,67	0,23
		8,19		6,95		6,95

De acordo com os resultados resumidos no gráfico tridimensional (figura 16), a melhor região espectral a ser utilizada é a região 4.

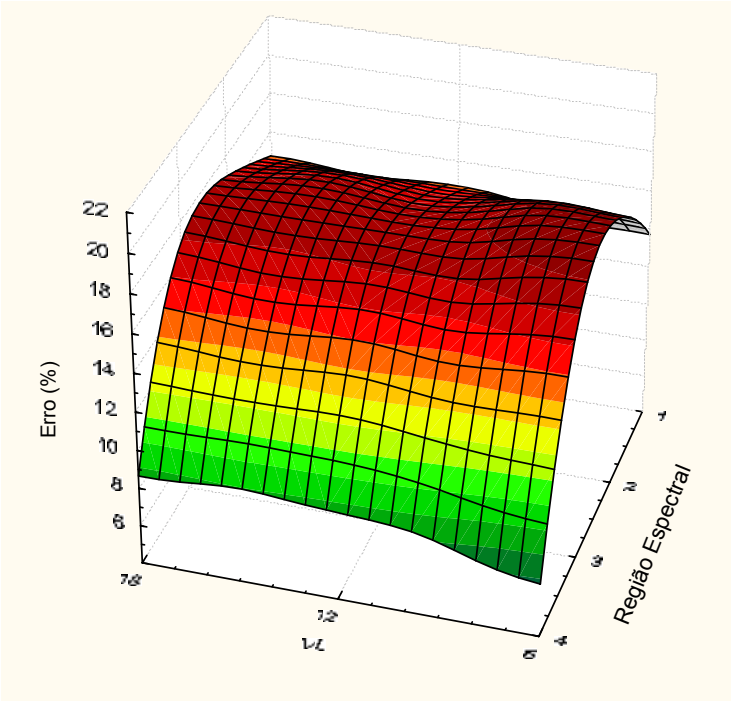


FIGURA 16- GRÁFICO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA SELEÇÃO DA REGIÃO ESPECTRAL

Legenda: **Regiões Espectrais**
(1) Faixa espectral completa
(2) Infravermelho médio
(3) Infravermelho próximo
(4) região de corte espectral
(VL) variáveis latentes

Além disso, observa-se que existe uma tendência no gráfico para melhores resultados entre 6 e 12 variáveis latentes. Por isso decidiu-se estudar cada número de variáveis latentes entre 6 e 12, ou seja, 7, 8, 9, 10 e 11, para descobrir

o número ideal a ser utilizado para o modelo mais adequado em analisar amostras comerciais.

TABELA 32- ERROS RELATIVOS DOS MODELOS UTILIZANDO CORTE ESPECTRAL E PRÉ-PROCESSAMENTO MSC

	Concentração prevista									
	7 VL		**8 VL**		**9 VL**		**10 VL**		**11 VL**	
C. teórica		Erro (%)		Erro (%)		Erro (%)		Erro (%)		Erro (%)
25	26,61	6,45	26,73	6,93	26,63	6,52	26,75	7,00	26,75	7,02
50	54,78	9,57	54,90	9,81	54,99	9,98	55,03	10,07	55,05	10,11
85	81,41	4,23	81,70	3,89	81,46	4,16	81,41	4,22	81,42	4,21
115	111,49	3,05	112,24	2,40	112,01	2,60	112,01	2,60	112,00	2,61
145	140,25	3,27	140,06	3,40	140,21	3,30	140,16	3,34	140,16	3,34
		5,31		5,28		5,31		5,45		5,46

TABELA 33- ERROS RELATIVOS DOS MODELOS UTILIZANDO CORTE ESPECTRAL E PRÉ-PROCESSAMENTO DETREND

	Concentração prevista									
	7 VL		**8 VL**		**9 VL**		**10 VL**		**11 VL**	
C. teórica		Erro (%)		Erro (%)		Erro (%)		Erro (%)		Erro (%)
25	28,26	13,04	28,27	13,10	28,52	14,08	28,55	14,21	28,55	14,21
50	54,19	8,37	54,57	9,14	54,53	9,05	54,50	9,00	54,47	8,95
85	77,58	8,73	77,05	9,36	76,84	9,60	76,85	9,59	76,86	9,57
115	117,78	2,41	117,18	1,90	117,09	1,82	117,08	1,81	117,07	1,80
145	145,17	0,11	144,98	0,02	144,79	0,15	144,67	0,23	144,67	0,23
		6,53		6,70		6,94		6,97		6,95

TABELA 34- ERROS RELATIVOS DOS MODELOS UTILIZANDO CORTE ESPECTRAL E PRÉ-PROCESSAMENTO SMOOTH

	Concentração prevista									
	7 VL		**8 VL**		**9 VL**		**10 VL**		**11 VL**	
C. teórica		Erro (%)		Erro (%)		Erro (%)		Erro (%)		Erro (%)
25	25,53	2,13	27,11	8,45	25,44	1,74	24,96	0,14	24,88	0,47
50	52,41	4,82	52,21	4,42	49,80	0,40	50,57	1,13	50,53	1,05
85	80,69	5,07	77,43	8,91	79,73	6,20	79,63	6,32	80,24	5,60
115	113,34	1,44	111,98	2,63	116,42	1,24	115,56	0,49	115,42	0,37
145	151,59	4,55	148,06	2,11	147,56	1,77	146,16	0,80	145,42	0,29
		3,6		5,3		2,27		1,78		1,56

Em posse dos resultados dos erros de previsão para o número de variáveis latentes em função do tipo de pré-processamento realizado (MSC, detrend, alisamento) obteve-se o segundo gráfico de superfície de resposta (figura 17).

Esse gráfico demonstra que dos pré-processamentos testados o mais adequado é o alisamento e que dentre as variáveis latentes utilizadas o modelo que apresenta menores erros de previsão é com 11 variáveis latentes chegando a um erro relativo inferior a 1,6%. Porém ao utilizar 10 variáveis latentes foi obtido um erro relativo de 1,78% considerado favorável para um ganho na robustez ao se diminuir o número de variáveis latentes, já que um número elevado pode acrescentar ruído ao modelo.

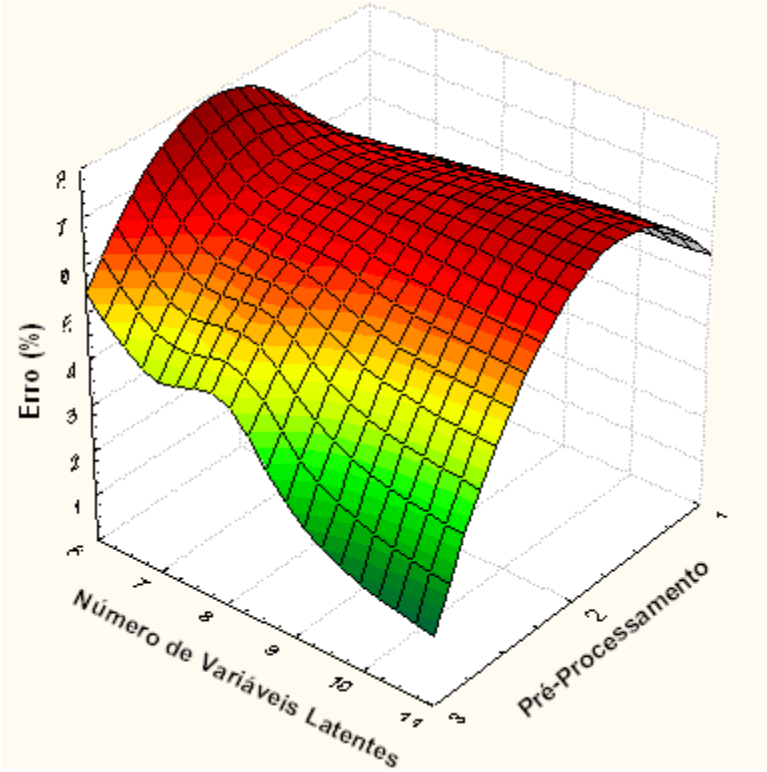


FIGURA 17- GRÁFICO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA SELEÇÃO DO TIPO DE PRÉ-PROCESSAMENTO E NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES

Legenda: **Tipos de pré-processamentos**
(1) MSC
(2) Detrend
(3) Alisamento

A variância capturada pelo modelo escolhido para analisar as amostras comerciais, utilizando corte espectral, alisamento e 10 variáveis latentes estão representados no quadro 2.

	-----Matriz X-----		-----Matriz Y-----	
N° VL	**Cada VL**	**Total**	**Cada VL**	**Total**
1	99,13	99,13	78,45	78,45
2	0,79	99,92	1,29	79,73
3	0,03	99,95	18,29	98,03
4	0,02	99,97	0,52	98,54
5	0,01	99,99	0,55	99,10
6	0,01	99,99	0,12	99,21
7	0,00	100,00	0,43	99,64
8	0,00	100,00	0,24	99,88
9	0,00	100,00	0,08	99,96
10	0,00	100,00	0,03	99,99
11	0,00	100,00	0,01	100,00
12	0,00	100,00	0,00	100,00
13	0,00	100,00	0,00	100,00
14	0,00	100,00	0,00	100,00
15	0,00	100,00	0,00	100,00
16	0,00	100,00	0,00	100,00
17	0,00	100,00	0,00	100,00
18	0,00	100,00	0,00	100,00
19	0,00	100,00	0,00	100,00
20	0,00	100,00	0,00	100,00

QUADRO 2 - PORCENTAGEM DE VARIÂNCIA CAPTURADA

O quadro acima mostra a porcentagem de variância capturada (matriz X e matriz Y) em função do número de variáveis latentes (VL) obtido através de validação interna, que utiliza os mesmos dados do conjunto de calibração, ou *cross-validation*. A primeira componente principal, ou variável latente descreve a variância de 78,45% dos dados originais. A segunda variável ortogonal e complementar a primeira, descreve 1,29%, e assim sucessivamente. Observa-se que com 10 variáveis latentes há uma porcentagem de variância que descreve 99,99% dos dados originais, corroborando com a opção anteriormente tomada do uso de 10 variáveis latentes.

O gráfico do RMSEC (raiz quadrada do erro padrão de calibração) em função do número de variáveis latentes ilustra o que foi descrito acima. Este gráfico define, também, a escolha do número de variáveis latentes.

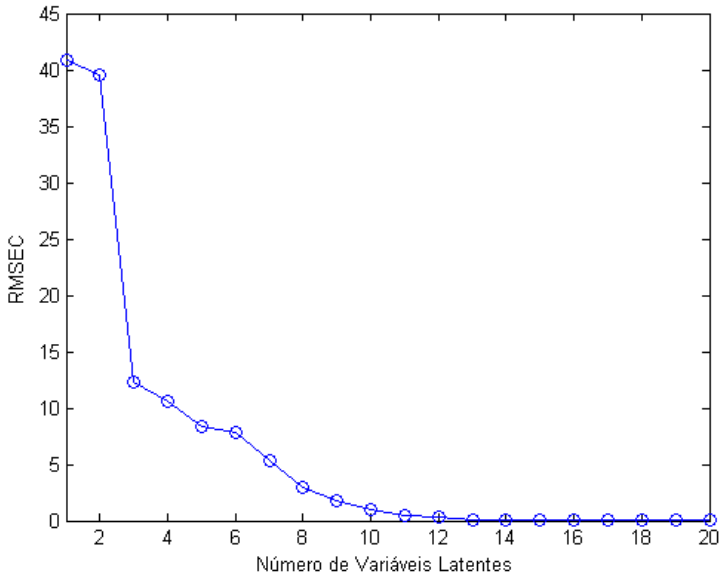


FIGURA 18- GRÁFICO DE RMSEC EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES DO MODELO SELECIONADO

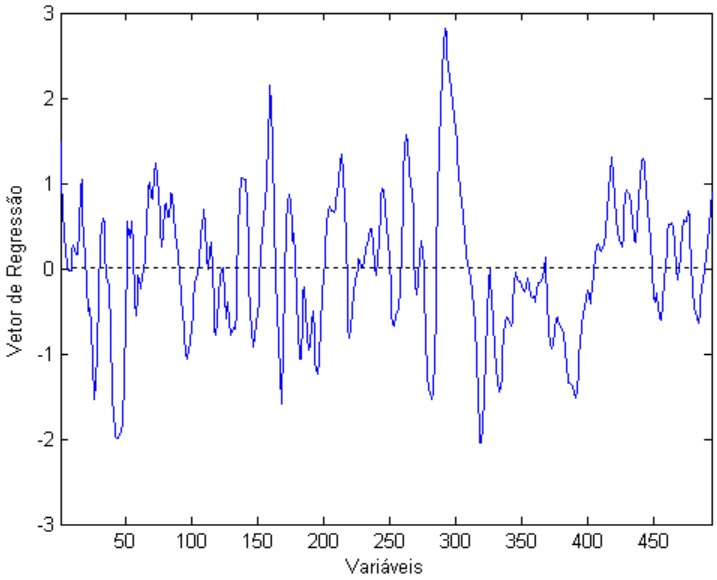


FIGURA 19- GRÁFICO DO VETOR DE REGRESSÃO VERSUS VARIÁVEIS

O gráfico de vetor de regressão (Figura 19) representa a importância que cada variável original teve na elaboração da primeira componente principal.

Os resíduos de *Student* são definidos em unidade de desvio padrão do valor médio, os valores além de ± 2,5, são considerados elevados na estatística usual.

Leverage é uma medida de influência de uma amostra no modelo de regressão. É uma função da distância à média e das correlações entre as variáveis, ou seja, a distância de uma amostra do centróide do conjunto de dados (Equação 22). Para distinguir amostras anômalas é feito um cálculo (FERREIRA et al., 1999).

$$h_{crítico} = \frac{3k}{n} \qquad \text{(Equação 22)}$$

Onde n é o número de amostras do conjunto de calibração e k é o número de variáveis latentes.

Com base nesse cálculo, considerando que o conjunto de calibração possui 22 amostras e que o número de variáveis latentes utilizado foi 10, o valor de $h_{crítico}$ é igual a 1,36.

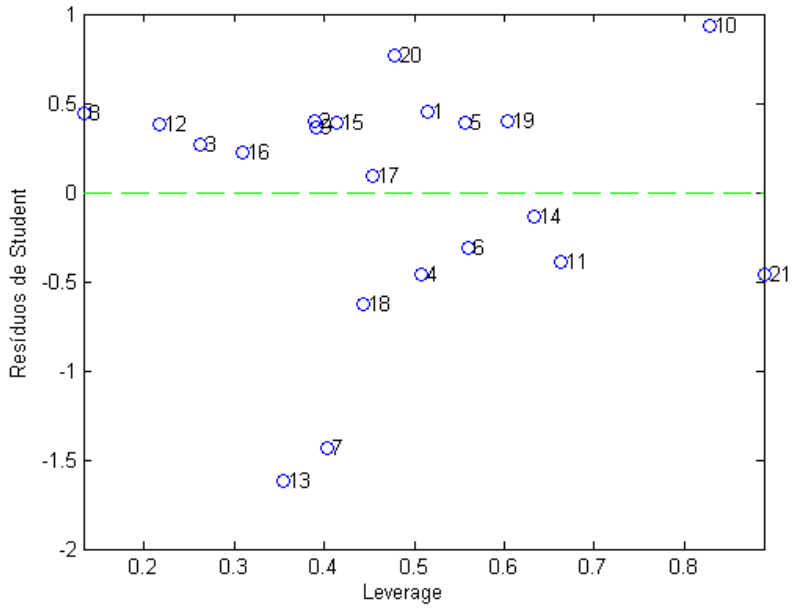


FIGURA 20- GRÁFICO DE RESÍDUOS DE STUDENTS VERSUS LEVERAGE PARA O MODELO DESENVOLVIDO DE MELHOR DESEMPENHO

Portanto, o gráfico de resíduos de *Student* em função do *leverage* nos mostra que não houve detecção de amostras anômalas que pudessem ser excluídas do modelo.

O ajuste do modelo pode ser verificado na figura 21, onde os valores reais estão intimamente correlacionados aos valores previstos.

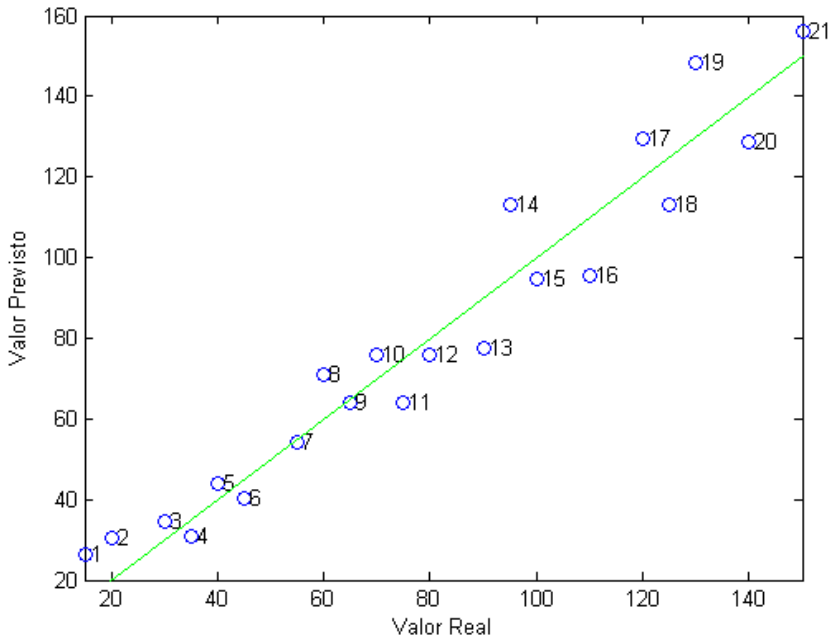


FIGURA 21- GRÁFICO DOS VALORES REAIS VERSUS VALORES PREVISTOS PARA O MODELO DESENVOLVIDO DE MELHOR DESEMPENHO

5.3.4 Validação do Método por DRIFTS e Calibração Multivariada

O método por calibração multivariada, pela sua natureza, não permite a realização de todos os ensaios exigidos para a validação de um método analítico de determinação do fármaco em forma farmacêutica. No entanto, por se tratar de um método estatístico, alguns parâmetros podem ser avaliados de tal maneira através dos valores de *leverage*, resíduos de *Student*, gráfico de valores reais pelos valores previstos e cálculo do RMSEC.

Portanto, para fins de comparação estatística, com o método espectrofotométrico univariado no ultravioleta e com o método descrito na literatura por CLAE, foram realizados os ensaios necessários de validação, exatidão e precisão, conforme preconiza a farmacopéia americana (USP, 2006).

5.3.4.1 Precisão

5.3.4.1.1 repetitividade

Para cada nível de concentração foram preparadas três soluções e a partir de suas absorvâncias foram obtidas estimativas de desvio padrão e média (tabela 35).

Calculadas as médias obteve-se o coeficiente de variação para cada nível e então a média do coeficiente de variação que foi igual a 3,47% (inferior a 5%).

TABELA 35 – VALORES EXPERIMENTAIS DE REPETITIVIDADE PELO MÉTODO DRIFTS POR CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

C. teórica (mg.ml^{-1})	**C. prática (mg.ml^{-1})**			**Média**	**DP**	**CV (%)**
10	10,28	9,36	9,91	9,88	0,46	4,68
20	19,3	21,09	20,55	20,13	0,92	4,56
30	29,67	29,55	30,21	29,74	0,35	1,18
Média						**3,47**

C=concentração

5.3.4.1.2 precisão intermediária

Os resultados obtidos da avaliação da precisão intermediária através da comparação das concentrações de 10,0, 20,0 e 30,0 mg.mL^{-1}, em triplicata, em diferentes dias apresentaram uma média do coeficiente de variação de 0,52% atendendo ao critério de coeficiente de variação inferior a 5%.

Os resultados de precisão estão resumidos na tabela 36.

TABELA 36 - VALORES EXPERIMENTAIS DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA PELO MÉTODO DRIFTS POR CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

C. teórica(mg.ml^{-1})	**Dia 1**	**Dia 2**	**Média**	**DP**	**CV (%)**
10	9,88	9,96	9,92	0,056	0,57
20	20,13	20,23	20,18	0,071	0,35
30	29,74	29,47	29,60	0,191	0,64
Média					**0,52**

C=concentração

5.3.4.2 Exatidão

A respeito da avaliação da exatidão, o método permitiu a recuperação de 100,26 ± 0,14% para concentração final de 10,0 mg.mL^{-1}; 100,36 ± 0,69% para 20,0 mg.mL^{-1} e 99,83 ± 1,15% para 30,0 mg.mL^{-1}, o que caracteriza o método como exato, segundo preceitos do ICH e ANVISA onde considera-se satisfatórios valores de recuperação entre 98 e 102%.

TABELA 37 - VALORES EXPERIMENTAIS DE EXATIDÃO PELO MÉTODO DRIFTS POR CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

C. teórica (mg.mL^{-1})	C. prevista (mg.mL^{-1})	Recuperação (%)	Média % ± DP
10	9,87	98,70	100,26 ± 0,14 %
	10,08	100,80	
	10,13	101,30	
20	19,92	99,60	100,36 ± 0,69 %
	20,11	100,55	
	20,19	100,95	
30	29,57	98,56	99,83 ± 1,15 %
	30,03	100,10	
	30,25	100,83	

C=concentração

5.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FÁRMACO NAS AMOSTRAS COMERCIAIS

Quando se é validado um método analítico é importante que amostras reais, distintas daquelas de misturas com excipientes, sejam testadas (SHARP, 2000). Com essa finalidade fez-se a determinação do teor de sibutramina em amostras comerciais que continham o teor declarado de 15 mg.

As amostras comerciais dos medicamentos analisados foram: Reductil® (referência), genérico Medley, Vazy® (similar) e magistral (medicamento manipulado em farmácia). Cada um desses medicamentos foram avaliados segundo os métodos UV e DRIFTS, ora desenvolvidos e validados, e comparativamente por análise cromatográfica, CLAE, método desenvolvido e validado por Radhakrishna et al (2000).

O teor de fármaco encontrado em cada uma das especialidades farmacêuticas analisadas, segundo os métodos que foram utilizados para

doseamento variou entre 77 e 112% (tabela 38). Considerando que não encontramos monografia farmacopéica para a sibutramina, e que os limites de variação tolerados para o teor de fármacos em formas farmacêuticas é em geral ± 10% do valor declarado, aplicando-se esse critério podemos considerar que os medicamentos industrializados (Reductil, genérico e Vazy) encontram-se satisfatórios quanto ao parâmetro teor, tendo em vista que para todos eles, independentemente do método utilizado, os teores encontrados estavam entre 90 e 110% do valor declarado. O medicamento manipulado apresentou os menores valores de teor, e também fora desses limites, independente do método usado na sua determinação.

TABELA 38- RESULTADOS DA MÉDIA E DESVIO PADRÃO DA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FÁRMACO NAS AMOSTRAS COMERCIAIS POR DIFERENTES MÉTODOS

Medicamentos	CLAE (% ± DP)	UV (% ± DP)	DRIFTS (% ± DP)
Referência	100,08 ± 0,09	100,30 ± 0,54	101,10 ± 1,82
Magistral	79,67 ± 0,67	79,75 ± 1,96	81,23 ± 2,59
Genérico	90,30 ± 3,56	92,42 ± 1,58	99,58 ± 8,89
Similar	96,76 ± 2,21	98,16 ± 2,38	99,83 ± 3,82

A proximidade dos resultados obtidos pelos diferentes métodos é um indicativo da equivalência dos métodos.

5.5 ESTUDO DA DISSOLUÇÃO *IN VITRO*

A dissolução do fármaco nos meios estudados (solução HCl 0,1 M pH 2,2; água purificada e tampão fosfato pH 6,8) foi investigada através de estudo do perfil de dissolução dos medicamentos Reductil®, genérico, Vazy® e magistral. O medicamento Reductil® será tomado como parâmetro de referência na comparação com os demais, tendo em vista que faz parte da relação de medicamentos de referência para a obtenção dos genéricos. A quantificação do fármaco no ensaio de dissolução foi realizada pelo método validado por UV-VIS.

Os perfis de dissolução em função do tempo são apresentados na figura 22.

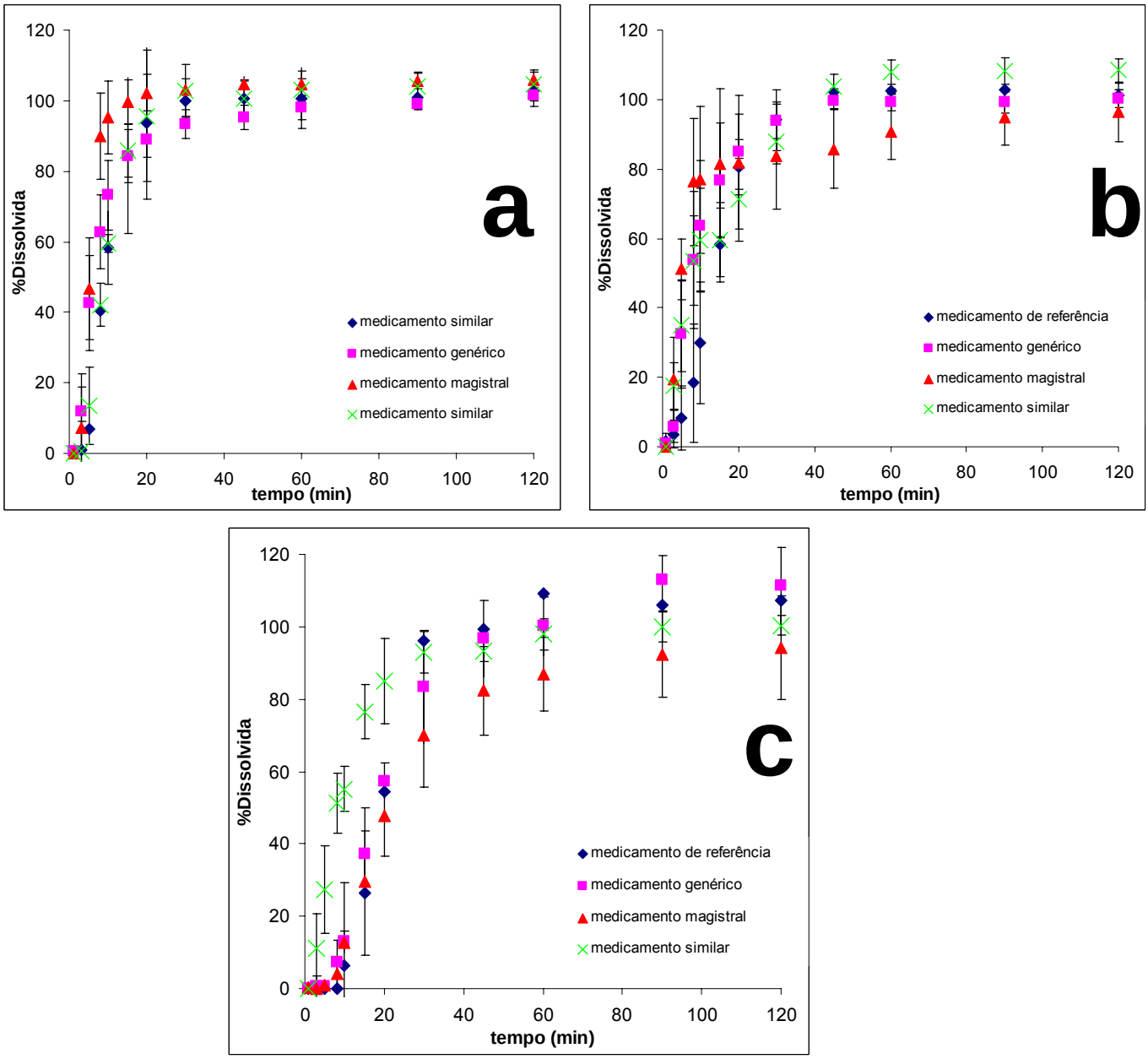


FIGURA 22 – COMPARAÇÃO ENTRE OS PERFIS DE DISSOLUÇÃO *IN VITRO* DO MEDICAMENTO REFERÊNCIA (REDUCTIL®) AOS MEDICAMENTOS GENÉRICO, SIMILAR (VAZY®) E MAGISTRAL, EM (a) MEIO ÁCIDO, (b) ÁGUA E (c) TAMPÃO FOSFATO

A figura mostra que a dissolução das cápsulas em meio ácido atinge valor próximo a 100% em aproximadamente 20 minutos. Todos os medicamentos apresentaram um perfil de dissolução semelhante em todos os meios. A pronta solubilidade foi maior no meio ácido seguida do meio aquoso, sendo mais lenta no meio tampão fosfato. Isto pode ser explicado considerando que se trata de uma forma farmacêutica de dissolução imediata e também pela boa solubilidade da sibutramina no meio aquoso.

A comparação entre os perfis de dissolução dos medicamentos estudados através dos fatores de similaridade ($f2$) e de diferença ($f1$) encontram-se na tabela 39.

TABELA 39 – FATORES DE DIFERENÇA ($f1$) E FATORES DE SIMILARIDADE ($f2$) PARA A DISSOLUÇÃO DA SIBUTRAMINA A PARTIR DOS MEDICAMENTOS GENÉRICO, SIMILAR E MAGISTRAL EM COMPARAÇÃO COM O REDUCTIL (REFERÊNCIA)

Medicamentos comparados	**Fator de diferença ($f1$)**	**Fator de similaridade ($f2$)**	**Conclusão**
MEIO HCL 0,1 M pH 1,2			
Reductil e Genérico	1,53	68,73	Similares
Reductil e Vazy	0,12	94,95	Similares
Reductil e Magistral	1,23	57,66	Similares
MEIO AGUA pH 6,0			
Reductil e Genérico	0,63	64,41	Similares
Reductil e Vazy	0,86	63,75	Similares
Reductil e Magistral	1,34	52,45	Similares
TAMPÃO FOSFATO pH 6,8			
Reductil e Genérico	0,0077	84,13	Similares
Reductil e Vazy	0,87	55,13	Similares
Reductil e Magistral	0,15	71,72	Similares

Em todas as comparações realizadas, os valores de $f2$ mostraram-se superiores a 50, enquanto os de $f1$ inferiores a 15, o que indica que existe semelhança entre os perfis de dissolução obtidos em todos os meios testados e para todas as especialidades testadas.

A avaliação da eficiência de dissolução também foi efetuada revelando valores de eficiência para a especialidade referência de 91,99% meio ácido, 89,13% e 87,49% nos meios aquoso e tamponado, respectivamente.

O medicamento teste genérico obteve eficiências de dissolução de 91,16%, 86,06% e 88,18% nos meios ácido, aquoso e tamponado, respectivamente.

O medicamento teste magistral apresentou eficiências de dissolução de 99,4% no meio ácido, 90,45% no meio aquoso e 73,40% no meio tamponado.

O último medicamento testado, o Vazy® (similar), demonstrou eficiência de dissolução em meio ácido de 94,11%, 93,87% em água e 89,25% em tampão fosfato.

A análise de variância é feita através dos perfis analisados em conjunto obtidos da comparação entre medicamento referência/genérico, referência/similar e referência/magistral em diferentes meios de dissolução, corroborou com os resultados obtidos pela análise dos fatores de diferença e similaridade. Ambas são concordantes quanto à similaridade dos medicamentos comparados por meio das condições de estudo especificadas (tabela 40).

TABELA 40 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA EFICIÊNCIA DE DISSOLUÇÃO DA SIBUTRAMINA DE MEDICAMENTOS GENÉRICO, SIMILAR E MAGISTRAL EM COMPARAÇÃO AO MEDICAMENTO DE REFERÊNCIA EM DIFERENTES MEIOS DE DISSOLUÇÃO

Medicamentos comparados	**F calculado**	**F crítico**	**Conclusão**
MEIO HCL 0,1 M pH 1,2			
Reductil e Genérico	0,1071		Similares
Reductil e Vazy	0,0110		Similares
Reductil e Magistral	0,7580		Similares
MEIO AGUA pH 6,0			
Reductil e Genérico	0,2950	4,3009	Similares
Reductil e Vazy	0,3046		Similares
Reductil e Magistral	0,5416		Similares
TAMPÃO FOSFATO pH 6,8			
Reductil e Genérico	0,0077		Similares
Reductil e Vazy	0,7631		Similares
Reductil e Magistral	0,1472		Similares

5.5.1 Ajuste de Parâmetros dos Modelos Matemáticos e Simulação dos Perfis de Dissolução

A partir dos perfis de dissolução obtidos pela dissolução do fármaco em meio ácido pH 2,2, aquoso e tampão fosfato pH 6,8 foi realizado um estudo comparativo baseado na modelagem matemática destes perfis. A descrição matemática das curvas cinéticas foi realizada pelo ajuste dos pontos

experimentais aos modelos ordem zero, monoexponencial, biexponencial, Weibull e monolag.

Os modelos matemáticos foram aplicados empregando o software *MicroMath Scientist*®. A seleção do melhor modelo foi desenvolvida, considerando os resultados obtidos para o coeficiente de correlação (r), critério de seleção do modelo (CSM), o ajuste gráfico e a coerência dos valores encontrados para as constantes cinéticas de dissolução.

Para os medicamentos referência, genérico e similar, em meio aquoso, o modelo sigmoidal Weibull (Figura 23 a, b e c) ajustou melhor os dados de dissolução que os demais modelos avaliados. Para o medicamento magistral (Figura 23 d), o melhor ajuste foi baseado na equação biexponencial, As constantes cinéticas de dissolução para este modelo foram α = 0,184 min^{-1} e β = 0,249 min^{-1}. Frente aos resultados evidenciados é possível sugerir uma influência da composição do excipiente na modificação do perfil de dissolução da sibutramina em meio aquoso, já que o medicamento magistral apresenta somente dois (sílica coloidal e microcelulose cristalina) enquanto que os medicamentos industrializados apresentam também lactose e estearato de magnésio.

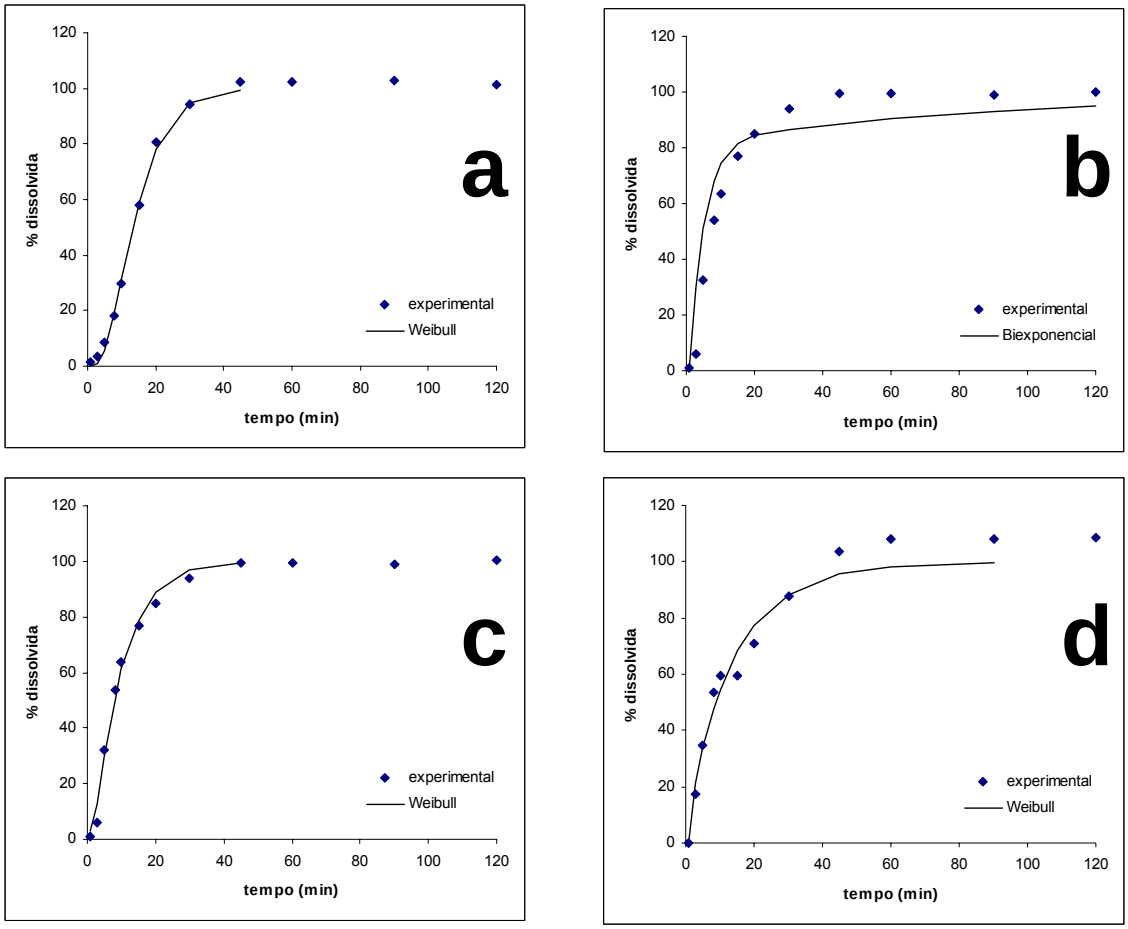


FIGURA 23 – COMPARAÇÃO ENTRE O PERFIL DE DISSOLUÇÃO *IN VITRO* DO MEDICAMENTO (a) REFERÊNCIA, (b) MAGISTRAL, (c) GENÉRICO E (d) SIMILAR EM ÁGUA DESTILADA

O valor da constante cinética calculada para a dissolução do fármaco no meio de dissolução água destilada e valores de CSM, r e TD estão dispostos na tabela 41.

TABELA 41 – PARÃMETROS DA MODELAGEM MATEMÁTICA DA DISSOLUÇÃO EM SOLUÇÃO AQUOSA DOS MEDICAMENTOS ESTUDADOS

	ß (min^{-1})	**CSM**	**r**	**TD (min)**
referência	4,46	5,24	0,9989	6,81
genérico	1,20	4,45	0,9967	7,85
similar	0,73	2,91	0,987	15,52
magistral	-------	3,14	0,988	--------

Para o meio HCl pH 2,2 (Figura 24) e tampão fosfato pH 6,8 (Figura 25), o melhor ajuste nos medicamentos referência, magistral, genérico e similar foi baseado na equação sigmoidal (tabela 42).

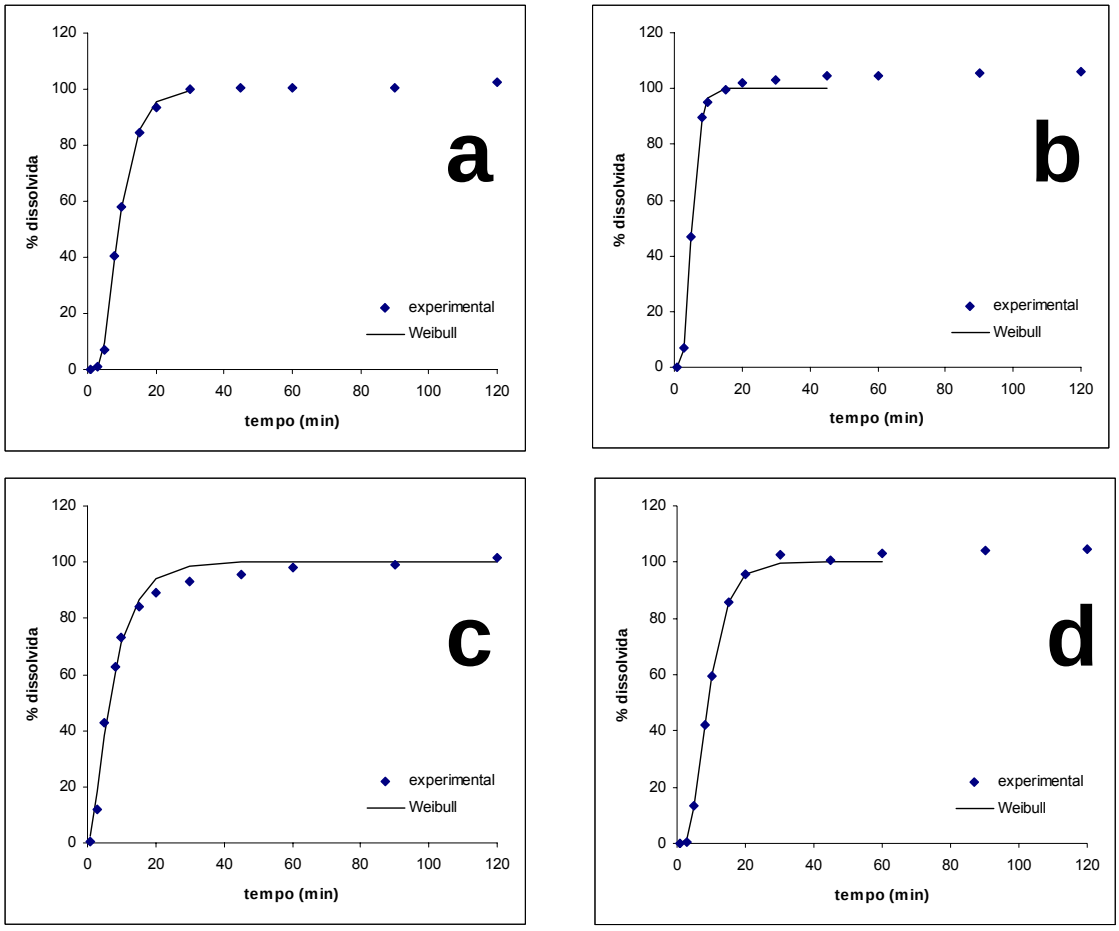


FIGURA 24 – COMPARAÇÃO ENTRE O PERFIL DE DISSOLUÇÃO *IN VITRO* DO MEDICAMENTO (a) REFERÊNCIA, (b) MAGISTRAL, (c) GENÉRICO E (d) SIMILAR EM FLUIDO GÁSTRICO SIMULADO (HCl 0,1 mol.L^{-1})

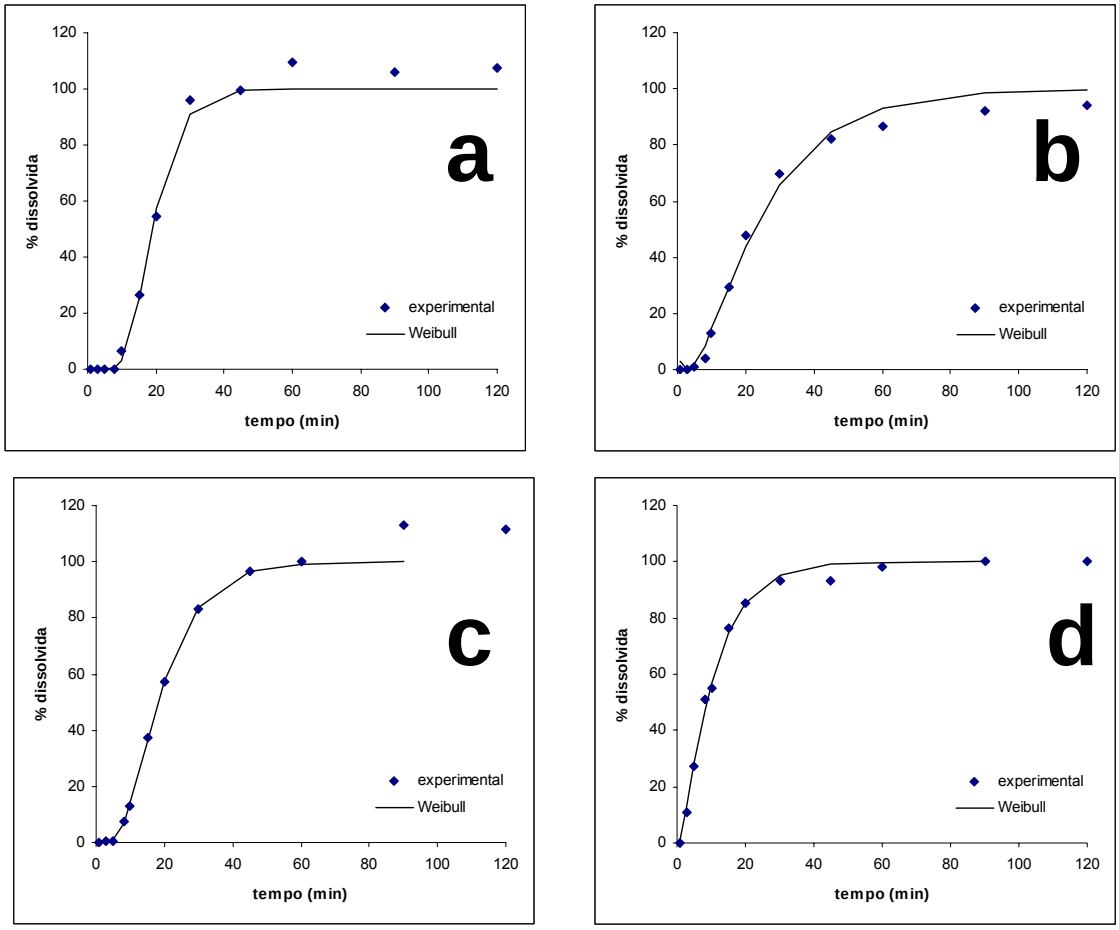


FIGURA 25 – COMPARAÇÃO ENTRE O PERFIL DE DISSOLUÇÃO *IN VITRO* DO MEDICAMENTO (a) REFERÊNCIA, (b) MAGISTRAL, (c) GENÉRICO E (d) SIMILAR EM FLUIDO INTESTINAL SIMULADO (TAMPÃO FOSFATO PH 6,8)

TABELA 42 – PARÃMETROS DO MODELO WEIBULL DA DISSOLUÇÃO EM MEIO ÁCIDO E TAMPONADO DOS MEDICAMENTOS ESTUDADOS

	ß (min^{-1})	**CSM**	**r**	**TD (min)**
MEIO HCl 0,1 M pH 1,2				
Reductil	3,35	5,98	0,9994	4,15
Genérico	1,18	3,94	0,995	6,31
Vazy	3,51	6,09	0,9996	4,25
Magistral	15,29	5,27	0,9991	1,64
TAMPÃO FOSFATO pH 6,8				
Referência	18,66	4,29	0,998	5,65
Genérico	3,37	4,24	0,9969	9,27
Similar	1,18	4,69	0,998	8,99
Magistral	1,68	4,05	0,996	17,61

Para os medicamentos referência, similar e genérico em meio aquoso; magistral e similar em meio ácido e referência e genérico em tampão fosfato a equação biexponencial não revelou coerência nos valores encontrados para as constantes cinéticas de dissolução ou resultou em um ajuste gráfico com porcentagens de dissolução negativas.

Coeficientes de correlação de 0,99 indicam ajuste satisfatório dos dados ao modelo (ANVISA, 2003). Os valores experimentais obtidos foram em sua maioria maiores que tal valor, quando não, os valores encontrados foram muito próximos.

As equações, de ordem zero, monoexponencial e monolag, apresentaram valores de r e CSM inferiores aos fornecidos pela equação Weibull.

A velocidade de dissolução variou conforme a formulação estudada e, embora os valores sejam muito próximos, pequenas variações podem ocasionar diferenças importantes na dissolução *in vivo*, interferindo também na absorção (OBACH, 2002).

6 CONCLUSÃO

O método desenvolvido e validado por espectroscopia no ultravioleta para determinação de sibutramina em forma farmacêutica atendeu aos limites pré-estabelecidos para os parâmetros de validação de um método analítico quantitativo conforme normas internacionais, apresentando boa especificidade, linearidade com r> 0,999, exatidão próxima a 100% e precisão com valores de CV% menores que 2,1%.

O método espectrométrico por UV-VIS apresenta-se como uma alternativa viável para análise de sibutramina, tanto matéria-prima como medicamento, com as vantagens de ser rápido, de baixo custo, de utilizar um solvente não poluente e de fácil acesso, viável para laboratórios de controle de qualidade de menor porte e farmácias de manipulação.

A espectroscopia no infravermelho com refletância difusa mostrou ser um método adequado para determinação de sibutramina em forma farmacêutica, sem a separação prévia do fármaco dos excipientes, o que gera interferências espectrais que foram solucionadas por método de calibração multivariada, o PLS.

O modelo que apresentou melhor desempenho em prever o teor do fármaco na forma farmacêutica foi aquele desenvolvido a partir do espectro fragmentado das misturas, em que se consideraram as regiões de boa reprodução das bandas da molécula de sibutramina.

Os pré-processamentos testados, MSC, Detrend e alisamento mostraram-se úteis para melhorar a capacidade preditiva do método, sendo que a melhora significativa no resultado de previsão ocorreu com o alisamento.

Os métodos propostos (UV-VIS e DRIFTS) mostraram semelhança ao método por CLAE quanto ao desempenho na determinação do teor do fármaco nos medicamentos industrializados e magistral.

Os perfis de dissolução *in vitro* mostraram que aproximadamente 100% do fármaco se dissolveu em 45 min. Na comparação que os medicamentos testados quanto a dissolução em relação ao medicamento referência demonstraram similaridade entre os perfis quando analisados segundo a metodologia fator de semelhança e fator de diferença (f1/f2) e análise de variância. O perfil de dissolução dos medicamentos segue uma cinética sigmoidal tendo em vista que o

modelo matemático de Weibull é o mais adequado para descrever os dados experimentais.

REFERÊNCIAS

ABRANTES, M.M.; LAMOUNIER, J.A.; COLOSIMO, E.A. Prevalência de sobrepeso e obesidade em crianças e adolescentes da região Sudeste e Nordeste. **Jornal de Pediatria**, v. 78, n°4, p. 335-340, 2002.

ANVISA, Resolução n° 64 de dezembro de 2007 que dispõe sobre Boas Práticas de Manipulação de Medicamentos para Uso Humano em farmácias Brasília: **Diário Oficial da União**, 18 dezembro de 2007.

ANVISA, Resolução n° 310 de 1° de setembro de 2004 que determina a Guia para realização do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução. Brasília: **Diário Oficial da União**, de 03 de setembro de 2004.

ANVISA, Resolução n° 899 de 29 de maio de 2003 que determina a publicação do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília: **Diário Oficial da União**, 02 fevereiro de 2003.

APARÍCIO, S. M. Metodologías Analíticas Basadas en Espectroscopia de infrarrojo y Calibración Multivariante. Apicación a la Industria Petroquímica. Tese de doutorado. Universitat Rovira i Virgili. Terragona. Espanha. 2002.

ARONNE, L.J. Current pharmacological treatments for obesity. In: FAIRBUIRN & BROWNELL. **Eating disorders and obesity**. 2 ed. New York: Guilford Press, 2003. p. 551-556.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E DA SÍNDROME METABÓLICA (ABESO). **Classificação e Diagnóstico**. Disponível em: <http://www.abeso.org.br/revista/revista11/metodos.htm>. Acesso em 3 de março de 2007.

BEEBE, K.R..; KOWALSKI, B.R. An introduction to multivariate calibration and analysis. **Analytical Chemistry**, v. 59, n° 17, p. 1007 A-1017 A, 1987.

BERNARDI, F.; CICHELERO, C.; VITOLO, A.R. Comportamento de restrição alimentar e obesidade. **Revista de Nutrição**, v. 18, p. 85-93, 2005.

BLANCO, M.; ALCALÁ, M. Simultaneous quantification of five active principles in a pharmaceutical preparation: development and validation of a near infrared spectroscopic method. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, p. 280-286, 2006.

BRITO, N. M. et al. Validação de métodos analíticos: estratégias e discussão. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v.13, p. 129-146, 2003.

BRO, R. Multivariate calibration. What is in chemometrics for the analytical chemist? **Analytica Chimica Acta**, v. 500, p. 185-194, 2003.

BROAD, N. W.; JEE, R. D.; MOFFAT, A. C.; and SMITH, M. R. Application of transmission near-infrared spectroscopy to uniformity of content testing of intact steroid tablets. p. 2207-2211. **Analyst**. 2001.

CARVALHO-SILVA, B. et al. Optimization and statistical evaluation of dissolution tests for indinavir sulfate capsules. **Il Fármaco**, v. 59, p. 921-927, 2004.

CHEETHAM, S.C. et al. Sibutramine does not decrease the number of 5-HT re-uptake sites in rat brain and, like fluoxetina, protects against the deficits produced by dexfenfluramine. **Neuro Pharmacology**, v. 39, p. 2028-2035, 2000.

CHEN, J. et al. Determination of active metabolite of sibutramine by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 785, p. 197-203, 2003.

DAMASO, A. **Obesidade**. Rio de Janeiro: Medsi, 2003.

DAVIDSON, M.W., PARRY-HILL, M. J., SUTTER, R. T. **Reflection of Light**. Disponível em: <http://micro.magnet.fsu.edu/optics/lightandcolor/reflection.html>. Acesso em 20 de maio 2007.

DINÇ, E.; OZDEMIR, A. Linear regression analysis and its application to multivariate chromatographic calibration for the quantitative analysis of two-component mixtures. **Il Farmaco**, v. 60, p. 591-597, 2005.

DING, L. et al. Simultaneous determination of sibutramine and its N-desmethyl metabolites in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry Method and clinical applications. **Analytica Chimica Acta**, v. 492, p. 241-248, 2003.

DOU, Y.; et al. Artificial neural network for simultaneous determination of two components of compound paracetamol and diphenhydramine hydrochloride powder on NIR spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 528, p. 55-61, 2005.

DUDLEY, W.H.; FLEMING, I. **Spectroscopic methods in organic chemistry**. 5 ed. London: Mc Graw Hill, 1997.

EKLÖV, T.; MARTENSSON, P.; LUNDSTRÖM, I. Selection of variables for interpreting multivariate gas sensor data. **Analytica Chimica Acta**, v. 381, p. 221-232, 1999.

ELFHAG, K. et al. Sibutramine treatment in obesity: initial eating behaviour in relation to weight loss results and changes in mood. **Pharmacological Research**, v. 51, p. 159-163, 2005.

EMEA. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Note for Guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence, **Committee for proprietary medicinal products**. London, 26 jul, 2001.

ESCANDAR, G.M. A review of multivariate calibration methods applied to biomedical analysis. **Microchemical Journal**, v. 82, p. 29-42, 2006.

FANG, Q.K. et al. First preparation of enantiomerically pure sibutramine and its major metabolite, and determination of their absolute configuration by single crystal X-ray analysis. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 10, p. 4477-4480, 1999.

FERRÃO, M.F. Técnicas de reflexão no infravermelho aplicadas na análise de alimentos. **Tecno-lógica**, v. 5, p. 724-731, 2001.

FERREIRA, M.M.C. et al. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, p. 724-731, 1999.

FORINA, M.; CASOLINO, M.C.; MARTINEZ, C.P. Multivariate calibration: applications to pharmaceutical analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 18, p. 21-33, 1998.

FREITAS, M.P. et al. Prediction of drug dissolution profiles from tablets using NIR diffuse reflectance spectroscopy: a rapid and nondestructive method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, p. 17-21, 2005.

GOODMAN L.S.; GILMAN A. As bases farmacológicas da terapêutica. 11 th ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, p. 160, 1436 p.,2006

GOTTO, A.; **Diseasedex – General medicine**. London: Pharmaceutical Press. Greenwood Village, Colorado, 2006.

HALFORD, J.C.G. et al. Behavioral satiety sequence for the diagnosis of drug action on food intake. **Pharmacology Biochemistry and Behaviour,** v. 61, p. 159-168, 1998.

HALFORD, J.C.G. Pharmacotherapy for obesity. **Appetite**, v. 46, p. 6-10, 2006.

HALPERN, A. et al. Evaluation of efficacy, reliability and tolerability of sibutramine in obese patients with an echocardiographic study. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo**, v. 57, p. 98-102, 2002.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO); Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH); Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology- Q2(R1), nov. 2005.

JEFFERY, J.E. et al. Synthesis of sibutramine, a novel cyclobutylalkylamine useful in the treatment of obesity, and its major human metabolites. **J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1**, v. 21, p. 2583-2589, 1996.

KACHRIMANIS, K.; BRAUN, D.E.; GRIESSER, U.J. Quantitative analysis of paracetamol polymorphs in powder mixtures by FT-Raman spectroscopy and PLS regression. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,** v. 43, p. 407-412, 2007.

KAROUI, R. BAERDEMAEKER, J.D. A review of the analytical methods coupled with chemometric tools for the determination of the quality ad identity of dairy products. **Food Chemistry**, v. 102, p. 621-640, 2007.

KHAN, K,A, The Concept of dissolution efficiency, **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 27, p. 48-49, 1975.

KIPOROUS, K.; et al. Quantitative analysis of less soluble form IV in commercial carbamazepine (form III) by diffuse reflectance fourier transform spectroscopy (DRIFTS) and lazy learning algorithm. **Analytica Chimica Acta**, v. 550, p. 191-198, 2005.

KLOCK, M.D.; JAKOBSDOTTIR, S.; DRENT, M.L. The role of leptin and ghrelin in the regulation of intake and body weight in humans: a review. **The International Association for the study of obesity**, v. 8, p. 21-34, 2006.

KONZEN, P.H.A. et al. Otimização de métodos de controle de qualidade de fármacos usando algoritmo genético e busca tabu. **Pesquisa Operacional**, v. 23, p. 189-207, 2003.

KURMAN, L.G., **Química Orgánica Fundamentos teórico-prácticos para el laboratorio**. 5ª ed. Buenos Aires: eudeba, 1995.

LABORATÓRIO ASSOCIADO DE SENSORES E MATERIAIS E INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS. **Infravermelho.** Disponível em:<http:// www.las.inpe.br/~cesar/infrared/espectro.htm>. Acesso em 23 de março de 2007.

LEAN, M.E. Management of obesity and overweight. **Medicine**, v. 34, p. 515-520, 2006.

LEGNEROVÁ, Z. et al. Sensitive fluorimetric method base don sequential injection analysis technique used for dissolution studies and quality control of prazosin hydrochloride in tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 34, p.115-121, 2004.

LEITE, F. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. 4 ed. Campinas-SP: Editora Átomo, 2002.

LU, B.Z. et al. Control of diastereoselectivity by solvent effects in the addition of Grignard reagents to enantiopure t-Butylsulfinimine: Syntheses of the stereoisomers of the hydroxyl derivatives of sibutramine. **Organic Letters**, v. 7, p. 2599-2602, 2005.

LUYAPAERT, J. et al. An evaluation of direct orthogonal signal correction and other preprocessing methods for the classification of clinical study lots of a

dermatological cream. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,** v. 30, p. 453-466, 2002

LUYAPAERT, J. et al. The effect of preprocessing methods in reducing interfering variability from near-infrared measurements of creams. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, p. 495-503, 2004.

MARINHO, S.P. et al. Obesidade em adultos de segmentos pauperizados da sociedade. **Revista de Nutrição**, v. 16, p. 195-201, 2003.

MARKOPOLOU, C.K.; MALLIOU, E.T.; KOUNDOURELLIS, J.E. Application of two chemometrics methods for the determination of imipramine, amitriptyline and perphenazine in content uniformity and drug dissolution studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p. 249-258, 2005.

MARQUES-LOPES, I. et al. Aspectos genéticos da obesidade. **Revista de Nutrição**, v. 17, p. 327-338, 2004.

McMURRY, J. **Organic Chemistry**. 5 th ed. Pacific Groove: Brooks Cole, 1999.

MERCK & COMPANY INCORPORATED. **The Merck Index**. 13th ed. New Jersey: Merck & Company Incorporated, 2001.

NI, Y.; QI, Z.; KOKOT, S. Simultaneous ultraviolet spectrophotometric determination of sulfonamides by multivariate calibration approaches. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 82, p. 241-247, 2006.

OBACH, E.S. **Avaliação dos perfis de liberação *in vitro* e da toxicidade gastrointestinal *in vivo* de indometacina a partir de nebulizados de nanocápsulas,** Porto Alegre: UFRGS, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Dissertação de mestrado, 2002.

PADWAL, R.S.; MANJUBAR, S.R. Drug treatment for obesity: orlistat, sibutramine and rimonabant. **Lancet**, v. 369, p. 71-77, 2007.

PARK, J.Y.; et al. Relative bioavailability and pharmacokinetics of a new sibutramine formulation in healthy male subjects: a randomized, open-label, two-period, comparative crossover study. **Clinical Therapeutics**, v. 26, p. 2092-2101, 2004.

PASQUINI, C. Near-infrared spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. **J. Braz. Chem. Soc**., v. 14, n°.2, p. 198-219, 2003.

PINHEIRO, A.R.O; FREITAS, S.F.T; CORSO, A.C.T. Uma abordagem epidemiológica da obesidade. **Rev. Nutr., Campinas,** v. 17, p. 523-533, 2004.

RADHAKRISHNA, T. et al. LC method for the determination of assay and purity of sibutramine hydrochloride an its enatiomers by chiral chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 22, p. 627-639, 2000.

RIBANI, M.; et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova,** v. 27 no.5, p. 771-780, 2004.

ROWE, R.C.; SHESKEY P.J.; WELLER P.J. **Handbook of pharmaceutical excipients**. London: Pharmaceutical Press, American pharmaceutical association, 2001. CD-ROM

RUFINO, J. L. Desenvolvimento de metodologias analíticas para controle de qualidade de fármacos, utilizando-se técnicas espectroscópicas (NIR E MID) e processos de calibração multivariada (PLS). Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2004.

SABUNCU, T. et al. Sibutramine has a positive effect on clinical and metabolic parameters in obese patients with polycystic ovary syndrome. **Fertility and Sterility**, v. 80, p. 1199-1204, 2003.

SANTA MARIA, L.C. et al. Comparative adsorptive removal of biperidene and sibutramine chlorhydrates from methanolic solutions by using active coal, clay and polymeric resins. **Materials letters**, in press, 2006.

SAUER-LEAL, E. **Desenvolvimento de metodologias multivariadas para análise de queijos por espectroscopia DRIFT**. Curitiba: UFPR, Programa de Pós Graduação em Química, Tese de doutorado, 2007.

SENA, M.M.; POPPI, R.J. N-way PLS applied to simultaneous spectrophotometric determination of acetylsalicylic acid, paracetamol and caffeine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 34, p. 27-34, 2004.

SHAH, P. J. et al. In vitro dissolution profile comparison – Statisctics and Analysis of the similarity factor, f2. **Pharmacological Research**, v. 15, n. 6, p.889-896, 1998.

SHARP, J. **Quality in the manufacture of medicines and other healthcare products.** London: Pharmaceutical Press, 2000.

SHECHTER, M. et al. Short-term sibutramine therapy is associated with weight loss and improved endothelial function in obese patients with coronary artery disease. **American J. Cardiology**, v. 97, p. 1650-1653, 2006.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios da análise instrumental**. 5ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SWEETMAN, S. **Martindale: The complete drug reference**. London: Pharmaceutical Press. Greenwood Village, Colorado, 2006. CD-ROM

THOMAS, E.V. A primer on multivariate calibration. **Analytical Chemistry**, v. 66 n° 15, p. 795 A-804 A, 1994.

USP – The United States Pharmacopoeia, 29ª ed Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2006.

VASQUES, F.; MARTINS, F.C.; AZEVEDO, A.P. Aspectos psiquiátricos do tratamento da obesidade. **Rev. Psiq. Clin.**, v. 31, p. 195-198, 2004.

VOGEL, A.I. **Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry**. 5 th ed. London: Longman & Scientific Technical, 1989.

WANNMACHER, L. Obesidade: evidências e fantasias. **Uso racional dos medicamentos: temas selecionados**. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde/ Organização Mundial da Saúde, v.1, n° 3, fev de 2004.

WATSON, D.G. **Pharmaceutical analysis A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists.** London: Churchill Livingstone, 2000.

WETZEL, D.L. Near-Infrared reflectance analysis sleeper among spectroscopic techniques. **Anaytical Chemistry**, v. 55, p. 1165A-1176A, 1983.

WOLD, S.; SJÖSTROM, M.; ERIKSSON, L. PLS- regression: a basic tool of chemometrics. **Chemometrics and intelligent laboratory systems**, v. 58, p. 109-130, 2001.

XAVIER, F.; SUNYER, P.; The relation of adipose tissue to cardiometabolic risk. **Clinical Cornerstone**, v. 8, p. 14-23, 2006.