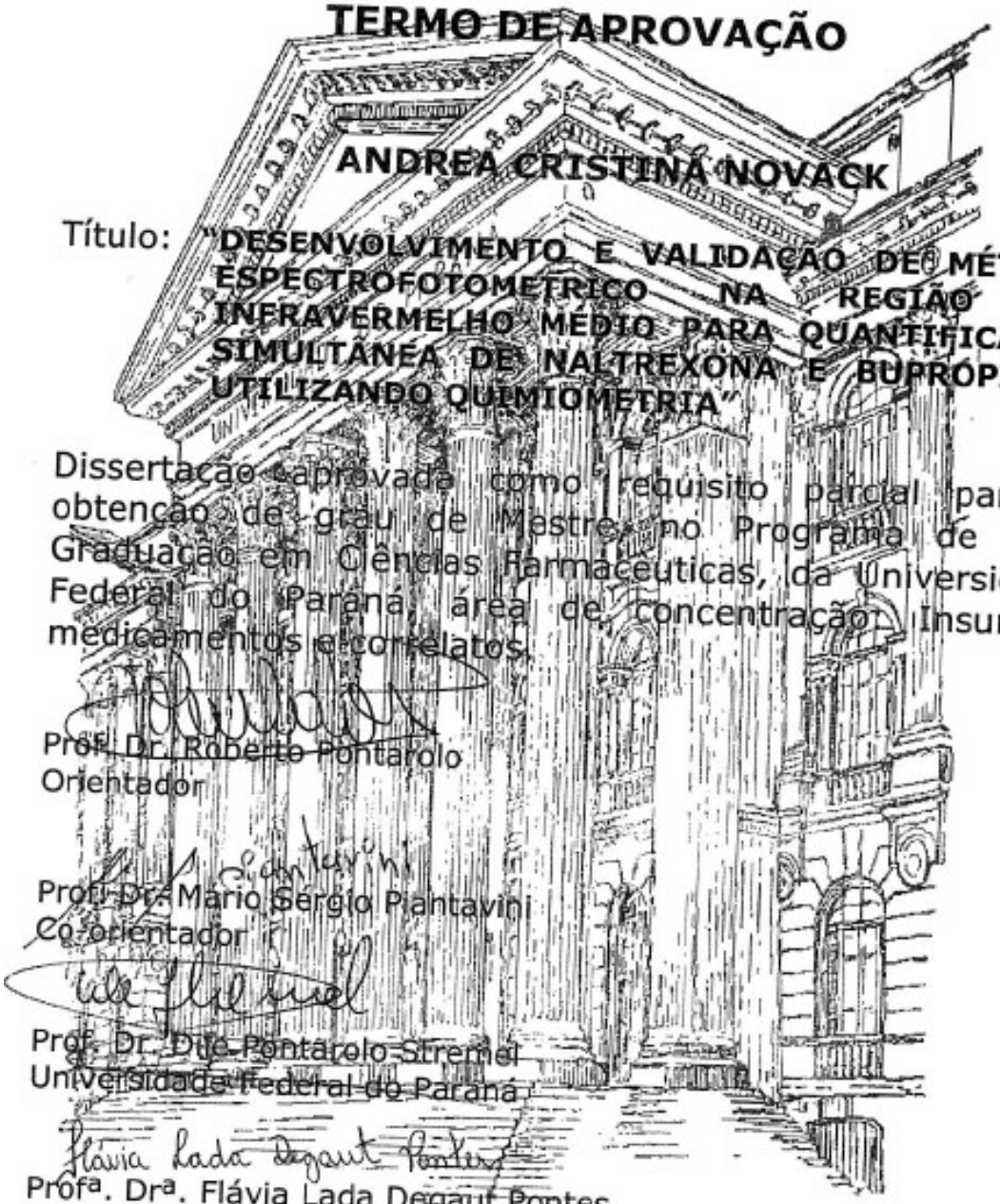
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDREA CRISTINA NOVACK

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO PARA QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE NALTREXONA E BUPROPIONA UTILIZANDO QUIMIOMETRIA

CURITIBA
2016

TERMO DE APROVAÇÃO



ANDREA CRISTINA NOVACK

Título: **"DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO PARA QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE NALTREXONA E BUPROPIONA UTILIZANDO QUIMIOMETRIA"**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.

Prof. Dr. Roberto Pontarolo
Orientador

Prof. Dr. Mário Sérgio Piantavini
Co-orientador

Prof. Dr. Dilé Pontarolo Stremel
Universidade Federal do Paraná

Profª. Drª. Flávia Lada Degaut Pontes
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 20 de outubro de 2016.

ANDREA CRISTINA NOVACK

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO PARA QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE NALTREXONA E BUPROPIONA UTILIZANDO QUIMIOMETRIA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Insumos, Medicamentos e Correlatos, Departamento de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo
Coorientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Piantavini

CURITIBA
2016

Novack, Andrea Cristina
Desenvolvimento e validação de método espectrofotométrico na região do infravermelho médio para quantificação simultânea de naltrexona e bupropiona utilizando quimiometria / Andrea Cristina Novack – Curitiba, 2016.
120 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. Roberto Pontarolo
Coorientador: Professor Dr. Mário Sérgio Piantavini
Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Fármacos. 2. Naltrexona. 3. Bupropiona. I. Pontarolo, Roberto. II. Piantavini, Mário Sérgio. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.1

Dedico este trabalho à minha família e amigos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me conceder saúde, perseverança e fé durante o trajeto.

À minha filha, que a cada aprendizado, a cada sorriso, a cada brincadeira, me motiva a viver, crescer e me desenvolver.

Aos meus pais, que me apoiaram e me ajudaram em todos os momentos, cuidando da minha principal razão para viver e sempre querer me superar... minha filha.

Ao meu companheiro, meu grande amor. Obrigada pelo apoio incondicional em todos os momentos desse desafio. Obrigada pela compreensão, por me ajudar no dia-a-dia a exercer as atividades para nosso crescimento pessoal e estabilidade da nossa família.

À minha grande amiga e cunhada Liana Raquel Abatti Viana, que mesmo passando por um momento tão difícil em sua vida, está nos concedendo um novo lar, com muito amor, transmitindo bondade e alegria, e sempre nos dando exemplo de força e superação.

Ao Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná, por proporcionar que fosse possível a conciliação do Mestrado com meu trabalho.

Ao meu orientador, professor Dr. Roberto Pontarolo, pela oportunidade, paciência, gentileza, orientação profissional e pessoal. Por ter me acolhido e proporcionado novos conhecimentos, e também um novo e maravilhoso ciclo de amizades.

Ao meu coorientador, professor Dr. Mário Piantavini, pelos conhecimentos repassados com sabedoria e segurança.

Ao professor Dr. Carlos Eduardo Rocha Garcia, por ter apoiado minha entrada no Programa de Pós-Graduação, pela amizade e compreensão das minhas escolhas.

À minha amiga Camilla Regina de Souza Madeira, que me ajudou muito em meu trabalho, repassando seu conhecimento, cedendo seu tempo para a execução das tarefas, sempre disposta e dedicada. Com suas palavras sempre me tranquilizou e me concedeu conviver com sua alegria e bondade.

À minha amiga Letícia Bonâncio Cerqueira, que me ajudou com seu conhecimento em validação e na técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, repassando seu conhecimento, também cedendo seu tempo para a execução das tarefas com dedicação incondicional. Sempre disposta a ajudar, sem hora para parar!

Aos meus colegas e parceiros diários, Fernanda, Laiza, Carol, Helena, Suzane, Mário, Fernanda, Mariana, Ari, Letícia, Raquel,

Breno, Flávia, Wilton, Bruna, pela acolhida carinhosa, respeito, amizade, apoio, risadas, "eventos", ajudas durante o trabalho, por outros conhecimentos, entre outros. Mariana e Carol, por me ajudarem em algumas tarefas no início do trabalho.

Ao programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, por proporcionar minha titulação.

À todos que de alguma maneira me auxiliaram nesta conquista.

“Se você quer transformar o mundo, experimente primeiro promover o seu aperfeiçoamento pessoal e realizar inovações no seu próprio interior... Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Não importa quais sejam os obstáculos e as dificuldades. Se estamos possuídos de uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los” (Dalai Lama).

“O mundo é multivariado” (ESBENSEN et al., 2002).

RESUMO

A obesidade é considerada atualmente um grande problema de saúde pública mundial, tanto pelo crescimento progressivo do número de casos, quanto pelo aumento dos fatores de risco para diversas doenças. A oferta de medicações para o tratamento desta enfermidade é cada vez menor, e estes frequentemente falham em alcançar resultados satisfatórios. Neste contexto, combinações de dois ou mais fármacos têm sido utilizadas na prática clínica. Os fármacos Naltrexona (NTX) e Bupropiona (BUP) são um exemplo de associação para o tratamento da obesidade. Formas farmacêuticas contendo fármacos em associação, principalmente quando um dos fármacos se encontra em baixa dosagem, constituem um desafio para o controle de qualidade, pois requerem métodos que sejam seletivos, sensíveis, além de exatos e precisos. O objetivo deste estudo foi desenvolver e validar um método utilizando a espectroscopia no infravermelho médio (IVM), associado à quimiometria e calibração multivariada, para quantificar simultaneamente os fármacos NTX (8,0 mg) e BUP (90,0 mg), em associação, na forma farmacêutica cápsula. No desenvolvimento do método foi utilizado planejamento experimental. Os modelos foram desenvolvidos através dos espectros de IVM (DRIFT), 4000-400 cm^{-1}, com seleção de variáveis por PLS em intervalos (iPLS através do software Matlab 12.1), cuja faixa de trabalho selecionada foi de 1885,8-1585,4 cm^{-1} utilizada para otimizar o modelo. O melhor modelo foi obtido em PLS2, e os dados foram pré-processados utilizando primeira derivada e alisamento Savitzky-Golay seguido por dados centrados na média. O modelo foi construído utilizando 4 variáveis latentes, proporcionando RMSEP de 1,8 mg/g para a NTX e 6,42 mg/g para a BUP. O método foi validado de acordo com os regulamentos nacionais (ANVISA) e recomendações internacionais (ASTM E1655-05). Na validação foram estimadas figuras de mérito aplicáveis ao modelo multivariado, tais como exatidão, precisão, linearidade, sensibilidade analítica, seletividade, *bias* e desvio previsão residual (DPR). Os resultados das quantificações dos fármacos obtidos com o método desenvolvido e validado foram comparados com os resultados obtidos com método cromatográfico que foi também desenvolvido e validado para esta finalidade.. Formulações farmacêuticas comerciais foram também avaliadas, pelos métodos desenvolvidos na região do IVM e os resultados foram estatisticamente iguais aos obtidos pelo método cromatográfico, no nível de confiança de 95%. As vantagens do método IVM é que é um método simples, não utiliza solvente orgânico, tem baixo custo, além de ser cerca de dez vezes mais rápido que o cromatográfico.

Palavras-chave: Obesidade, Naltrexona, Bupropiona, Infravermelho, Quimiometria.

ABSTRACT

Obesity is actually consider a global major public health problem, due to the progressive increase in the number of cases and risk factors for many diseases. The supply of medications for the treatment of this disease is becoming smaller, and they often fail to achieve satisfactory results. In this context, combinations of two or more drugs have been use in clinical practice. Naltrexone (NTX) and Bupropion (BUP) is an association example for the treatment of obesity. Dosage forms containing drugs in combination, particularly when there is a low dose drug, is a challenge for the quality control, since require selective, sensitive, accurate and precise methods. The aim of this study was develop and validate a method using spectroscopy in the medium infrared (IVM) associated with multivariate calibration and chemometrics to measure simultaneously NTX drug (8.0 mg) and BUP (90.0 mg) in association in the pharmaceutical capsule form. It was used experimental design in the developing of the method. The models were developed using the IVM spectrum (DRIFT), 4000-400 cm^{-1}, with selection of variables in PLS intervals (iPLS by Matlab software 12.1), the selected working range was from 1885,8 to 1585,4 cm^{-1}, used to optimize the model. The best model was obtain with PLS2, and with date preprocessed by first derivative and Savitzky–Golay smoothing followed by mean centering. The model was built using four latent variables, providing RMSEP 1.8 mg/g for naltrexone and 6.42 mg/g for bupropion. The method was validate in accordance with national regulations (ANVISA) and international recommendations (ASTM E1655-05). The results of measurements of drug achieved with the method developed and validated were compare with the results obtained with chromatographic method was also developed and validated for this purpose. Were estimated figures of merit applicable to the multivariate model, such as accuracy, precision, linearity, analytical sensitivity, selectivity, bias and residual prediction deviation (RPD). Then commercial pharmaceutical formulations were evaluate, and the methods developed in MID region provided statistically similar results to the validated chromatographic method at 95% confidence level. The MID method is simple, using no organic solvent; it is cheaper and about ten times faster than chromatographic one.

Keywords: Obesity, Naltrexone, Bupropion, Infrared, Chemometrics.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - FÓRMULA ESTRUTURAL DA BUPROPIONA 32
FIGURA 2 - FÓRMULA ESTRUTURAL DA NALTREXONA 33
FIGURA 3 - RADIAÇÃO ELETROMAGNÉTICA 35
FIGURA 4 - AS REGIÕES DO ESPECTRO ELETROMAGNÉTICO 36
FIGURA 5 - TIPOS DE VIBRAÇÕES MOLECULARES* 38
FIGURA 6 – REFLECTÂNCIA DIFUSA EM UMA AMOSTRA DE SUPERFÍCIE IRREGULAR 40
FIGURA 7 – MATRIZES 41
FIGURA 8 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL 44
FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO PLANEJAMENTO DO TIPO COMPOSTO CENTRAL DAS AMOSTRAS DE NALTREXONA E BUPROPIONA 58
FIGURA 10 – ESPECTRO IV DA MISTURA DE EXCIPIENTES COM E SEM OS COMPONENTES MINORITÁRIOS 70
FIGURA 11 – ESPECTROS DOS FÁRMACOS E DOS EXCIPIENTES 71
FIGURA 12 – ESPECTROS IV DOS FÁRMACOS 72
FIGURA 13 – ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO DAS AMOSTRAS DOS CONJUNTOS DE CALIBRAÇÃO (58 AMOSTRAS) E VALIDAÇÃO (21 AMOSTRAS) DA ASSOCIAÇÃO NTX E BUP 73
FIGURA 14 – REGIÃO DO ESPECTRO IVM DA MISTURA, SELECIONADA PELO PLS2-IPLS 213 CM^{-1} 74
FIGURA 15 – ESPECTROS DOS FÁRMACOS E DA MISTURA NA REGIÃO SELECIONADA PELO ALGORÍTMO IPLS 213CM^{-1} 75
FIGURA 16 – INFLUÊNCIA DA VARIÁVEL NA PROJEÇÃO (*VARIABLE INFLUENCE ON PROJECTION)* – NTX 76
FIGURA 17 – INFLUÊNCIA DA VARIÁVEL NA PROJEÇÃO (*VARIABLE INFLUENCE ON PROJECTION)* – BUP 76
FIGURA 18 – ESCOLHA DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES PARA O MODELO IVM-PLS2 78
FIGURA 19 – AVALIAÇÃO DE OUTLIERS NA QUANTIFICAÇÃO DE NTX NO MODELO IVM-PLS2 79
FIGURA 20 - AVALIAÇÃO DE OUTLIERS NA QUANTIFICAÇÃO DE BUP NO MODELO IVM-PLS2 79
FIGURA 21 – AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE PELA DISTRIBUIÇÃO DOS RESÍDUOS NO MODELO IVM-PLS2 NTX 81
FIGURA 22 – AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE PELA DISTRIBUIÇÃO DOS RESÍDUOS NO MODELO IVM-PLS2 BUP 81
FIGURA 23 – COMPARAÇÃO DOS CROMATOGRAMAS DA MATRIZ NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DOS ANALITOS 86
FIGURA 24 - GRÁFICOS DE LINEARIDADE DA NALTREXONA 88
FIGURA 25 – GRÁFICO DE LINEARIDADE DA BUPROPIONA 88
FIGURA 26 – CROMATOGRAMA DOS COMPOSTOS NTX E BUP EM CONDIÇÕES NORMAIS DO MÉTODO 90
FIGURA 27 - CROMATOGRAMA AMOSTRA COMERCIAL DA ASSOCIAÇÃO NTX E BUP 95
FIGURA 28 – CROMATOGRAMA DOS COMPOSTOS NTX E BUP EM CONDIÇÕES NORMAIS 111
FIGURA 29 – CROMATOGRAMA OBTIDO EM PH 6,3 111
FIGURA 30 – CROMATOGRAMA OBTIDO EM PH 6,7 112

FIGURA 31 - CROMATOGRAMA OBTIDO EM TEMPERATURA 39ºC 112
FIGURA 32 - CROMATOGRAMA OBTIDO EM TEMPERATURA 41ºC 113
FIGURA 33 - CROMATOGRAMA OBTIDO EM VOLUME DE INJEÇÃO 9,8 µL 113
FIGURA 34 - CROMATOGRAMA OBTIDO EM VOLUME DE INJEÇÃO 10,2 µL 114
FIGURA 35 - CROMATOGRAMA OBTIDO EM FLUXO 0,9ML/MIN 114
FIGURA 36 - CROMATOGRAMA OBTIDO EM FLUXO 1,1ML/MIN 115
FIGURA 37 - CROMATOGRAMA OBTIDO EM FASE MÓVEL 78:22 V/V ÁGUA : ACN 115
FIGURA 38 - CROMATOGRAMA OBTIDO EM FASE MÓVEL 82:18 V/V ÁGUA : ACN 116
FIGURA 39 - CROMATOGRAMA OBTIDO EM COLUNAS DE LOTES DIFERENTES 116

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – CLASSIFICAÇÃO DE PESO PELO IMC 28
QUADRO 2 – COMBINAÇÃO DAS MEDIDAS DE CIRCUNFERÊNCIA ABDOMINAL E IMC PARA AVALIAR OBESIDADE E RISCO PARA DIABETES 2 E DOENÇA CARDIOVASCULAR 28

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE NTX E BUP 34
TABELA 2 – COMPARATIVO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS UTILIZADAS PELOS MÉTODOS ENCONTRADOS NA LITERATURA CIENTÍFICA 34
TABELA 3 – REGIÕES ESPECTRAIS DO INFRAVERMELHO 37
TABELA 4- COMPOSIÇÃO DAS MISTURAS PARA A AVALIAÇÃO DA ROBUSTEZ 61
TABELA 5 – GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO FASE MÓVEL 63
TABELA 6- QUANTIDADES PESADAS DE CADA INGREDIENTE PARA O PREPARO DAS AMOSTRAS PARA A ANÁLISE DE EXATIDÃO 65
TABELA 7 – VARIAÇÕES PARA O TESTE DE ROBUSTEZ 66
TABELA 8 – ERROS OBSERVADOS PARA OS FÁRMACOS EM ESTUDO NO MODELO IVM-PLS2 DESENVOLVIDO 77
TABELA 9 – PRECISÃO 80
TABELA 10 – EXATIDÃO 83
TABELA 11 – TESTE DE ROBUSTEZ 84
TABELA 12 - PARÂMETROS ESTIMADOS PARA DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO IVM-PLS2 85
TABELA 13 – RESULTADOS OBTIDOS NO TESTE DE LINEARIDADE 87
TABELA 14 – RESULTADOS DO ENSAIO DE PRECISÃO 89
TABELA 15- RESULTADOS DO TESTE DE EXATIDÃO 89
TABELA 16 – VALORES DE CONCENTRAÇÃO OBTIDOS DOS FÁRMACOS NTX E BUP COM VARIAÇÃO DO PH 91
TABELA 17 – VALORES DE CONCENTRAÇÃO OBTIDOS DOS FÁRMACOS NTX E BUP COM VARIAÇÃO DE TEMPERATURA 91
TABELA 18 – VALORES DE CONCENTRAÇÃO OBTIDOS DOS FÁRMACOS NTX E BUP COM VARIAÇÃO DE VOLUME DE INJEÇÃO 92
TABELA 19 - VALORES DE CONCENTRAÇÃO OBTIDOS DOS FÁRMACOS NTX E BUP COM VARIAÇÃO DA PROPORÇÃO DOS COMPONENTES DA FASE MÓVEL 93
TABELA 20 - VALORES DE CONCENTRAÇÃO OBTIDOS DOS FÁRMACOS NTX E BUP COM DIFERENTES LOTES DE COLUNA 93
TABELA 21 – VALORES OBTIDOS PARA NTX E BUP NAS AMOSTRAS COMERCIAIS ATRAVÉS DO MÉTODO EM HPLC VALIDADO E MÉTODO DESENVOLVIDO EM IV-M 94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABESO	Associação Brasileira para o Estudos da Obesidade e da Síndrome Metabólica
Alfa-MSH	*α - Melanocyte stimulating hormone* (Hormônio estimulante α-melanócito)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASTM	*American Society for Testing and Materials* (Sociedade Americana para testes e materiais)
BCS	*Biopharmaceutical Classification System* (Sistema de Classificação Biofarmacêutica)
BMI	*Body mass index* (Índice de Massa Corporal)
BUP	Bupropiona
CC	Circunferência da cintura
CCD	*Central composite design* (Planejamento Composto Central)
CEBRID	Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas
CHMP	*Committee for Medicinal Products for Human Use* (Comitê para Produtos Medicinais de Uso Humano)
CMD	Concentração Média Determinada
COR	*Contrave Obesity Research* (Pesquisa de Obesidade Contrave)
CV	Coeficiente de Variação
DAD	*Detector Diode Array* (Detector de Arranjos de Diodos)
DCCR	Delineamento do Composto Central Rotacional
DM	Diabetes Mellitus
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
DRIFTS	*Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy* (Espectroscopia por reflectância difusa no Infravermelho com transformada de Fourier)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMA	*European Medicine Agency* (Agência Européia de Medicina)

EUA	Estados Unidos da América
FDA	*Food and Drug Administration* (Administração de Alimentos e Medicamentos)
FT	*Fourier Transform* (Transformada de Fourier)
FTIR	*Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (Espectrometria no IV com Transformada de Fourier)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICH	*International Conference on Harmonization* (Conferência Internacional de Harmonização)
IMC	Índice de Massa Corporal
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
Ipls	Regressão de mínimos quadrados parciais por intervalo (*interval partial least squares regression*)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
IVM	Infravermelho médio
IVP	Infravermelho próximo
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MC3R	Receptor 3 da Melanocortina
MC4R	Receptor 4 da Melanocortina
MIR	*Mid infrared* (Infravermelho médio)
MSC	Correção multiplicativa do espelhamento da Luz (*Multiplicative Scatter Correction*)
NAS	*Net Analyte Signal* (Sinal Analítico Líquido)
NB	Associação de Naltrexona e Bupropiona
NIR	*Near infrared* (Infravermelho próximo)
NTX	Naltrexone
OCT2	Organic Cation Transporter-2 – (Transportador orgânico de cátions 2
PC	Componente Principal (*Principal Component*)
PLS	Mínimos Quadrados Parciais (*Partial Least Squares*)
POMC	Pró-opiomelanocortina

R	Coeficiente de Correlação
RMSEC	Raiz quadrada do erro médio de calibração (*Root Mean* Standard Error of Calibration)
RMSECV	Raiz quadrada do erro médio de calibração por validação cruzada (*Root Mean Standard Error of Calibrationwith Cross Validation)*
RMSEP	Raiz quadrada do erro médio de predição (*Root Mean Standard Error of Prediction)*
RPD	*Residual Prediction Deviation* (Desvio Padrão de Previsão)
SBEM	Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia
SDV	*Standard Deviation of Validation* (Desvio Padrão de Validação)
SEL	Seletividade
sem	Sensibilidade
SNC	Sistema Nervoso Central
UV	Espectroscopia na região do ultravioleta
UV-Vis	Espectroscopia na região do ultravioleta e visível
VIP	*Variable influence on projection* (Influência das variáveis na projeção)
VL	Variável Latente
v/v	Volume/Volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO....22
2 OBJETIVOS....25
2.1 Objetivo Geral....25
2.2 Objetivos específicos....25
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA....27
3.1 Obesidade....27
3.2 Terapêutica....29
3.3 Os fármacos Bupropiona e Naltrexona....32
3.4 Métodos para a quantificação simultânea da associação de NTX e BUP....33
3.5 Métodos Espectroscópicos....35
3.5.1 Espectroscopia no infravermelho....36
3.6 Calibração Multivariada....40
3.6.1 Matrizes....41
3.6.2 PLS e iPLS....42
3.6.3 Planejamento experimental....43
3.6.4 Pré-processamento....44
3.6.5 Validação cruzada....46
3.6.6 Seleção do número de variáveis latentes....46
3.6.7 Detecção de amostras anômalas....47
3.7 Validação de métodos analíticos....47
3.7.1 Figuras de mérito da validação de método multivariada....49
4 MATERIAL E MÉTODOS....56
4.1 Equipamentos....56
4.2 Material e Reagentes....56
4.3 Softwares....57
4.4 Desenvolvimento dos métodos multivariados....57
4.4.1 Planejamento experimental....57
4.4.2 Preparo das amostras para a obtenção do modelo multivariado no infravermelho médio (IVM)....59
4.4.3 Obtenção de modelos multivariados no infravermelho médio (IVM)....59
4.5 Validação dos modelos desenvolvidos por IV....60

4.5.1 Seletividade, Sensibilidade e Sensibilidade analítica 60
4.5.2 Linearidade 60
4.5.3 Precisão 60
4.5.4 Limite de Detecção e Limite de Quantificação 61
4.5.5 Exatidão 61
4.5.6 Robustez 61
4.5.7 Bias 61
4.5.8 Desvio Padrão de Previsão (Residual Prediction Deviation - RPD) 61
4.6 Desenvolvimento de método univariado por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) 62
4.6.1 Condições cromatográficas 62
4.6.2 Preparo da solução estoque e de trabalho 63
4.7 Validação do método CLAE 63
4.7.1 Seletividade 63
4.7.2 Curva de calibração – Linearidade e Intervalo 64
4.7.3 Precisão 64
4.7.4 Exatidão 65
4.7.5 Robustez 66
4.8 ANÁLISE DE AMOSTRAS COMERCIAIS 66
4.8.1 Preparo das amostras 66
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 69
5.1 Amostras para o desenvolvimento e validação dos métodos 69
5.2 Modelos desenvolvidos por Calibração Multivariada 70
5.2.1 Espectros das matérias-primas 70
5.2.2 Absorção dos Fármacos no IV 71
5.2.3 Obtenção de modelos multivariados no infravermelho médio (IVM) 73
5.3 Validação do modelo multivariado 80
5.3.1 Precisão 80
5.3.2 Linearidade 80
5.3.3 Seletividade, Sensibilidade e Sensibilidade analítica 82
5.3.4 Exatidão 82
5.3.5 Robustez 83
5.3.6 Bias 84
5.3.7 Desvio Padrão de Previsão (*Residual Prediction Deviation*- RPD) 84

5.3.8 Limite de Quantificação (LQ) e Limite de Detecção (LD).....84
5.4 Validação do método em CLAE-DAD 86
5.4.1 Seletividade 86
5.4.2 Curva de calibração – Linearidade e Intervalo.....87
5.4.3 Precisão.....88
5.4.4 Exatidão.....89
5.4.5 Robustez.....90
5.5 Quantificação dos fármacos em amostras reais 93
6 CONCLUSÃO 97
7 REFERÊNCIAS 99

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença que leva a um grande número de outras doenças crônicas e reduz a expectativa de vida. A prevalência da obesidade em todo o mundo mais do que duplicou em 34 anos (1980 e 2014). Em 2013, aproximadamente 13% da população mundial adulta estava obesa, e 39% dos adultos estavam acima do peso. O problema alcança 1/3 da população norte-americana e européia. Neste mesmo ano no Brasil foi estimado que 56,9% da população, que equivale a aproximadamente 82 milhões de pessoas, apresentavam excesso de peso. O sobrepeso e a obesidade estão ligados a um maior número de mortes no mundo do que a desnutrição (HALPERN et al., 2010; IBGE, 2013; WHO, 2014).

A oferta de medicações disponíveis para o tratamento desta doença é cada vez menor, e estes frequentemente falham em alcançar resultados satisfatórios. Medicamentos inibidores de apetite que contenham sibutramina na composição e anorexígenos anfetamínicos (anfepramona, femproporex e mazindol) em geral trazem riscos à saúde. Sibutramina pode levar ao desenvolvimento de problemas cardiovasculares. Os anorexígenos podem provocar problemas cardiopulmonares e no sistema nervoso central, além de causar dependência química. Outro medicamento utilizado na redução de peso é o orlistat que é pouco efetivo na redução de peso quando usado como único fármaco no tratamento. (HALPERN et al., 2010; HALPERN, 2012; SBEM, 2015a). Neste contexto, combinações de dois ou mais fármacos têm sido utilizadas na prática clínica, embora o risco de interações medicamentosas e o custo do tratamento possam ser maiores. Com as associações pode-se também obter efeitos aditivos ou sinérgicos na redução do peso, considerando que podem envolver mecanismos distintos (HALPERN, 2012).

Estudos recentes têm mostrado que a combinação dos fármacos Naltrexona (NTX) e Bupropiona (BUP) é efetiva na perda de peso em adultos. Em 2014 o FDA (Food and Drug Administration) aprovou esta associação para o tratamento da obesidade (SRIKALYANI et al., 2013; US-FDA, 2014). No Brasil, o produto industrializado em dose fixa não existe, porém esta combinação é eventualmente comercializada como produto manipulado, mediante prescrição. (HALPERN, 2012).

Para atingir o objetivo do tratamento, os medicamentos devem ser eficazes e seguros, e atender aos requisitos de qualidade, como apresentar o teor de fármaco

conforme a especialidade. O teor de fármaco em um medicamento pode ser determinado com auxílio de métodos analíticos quantitativos desenvolvidos e validados para esta finalidade, tendo por base as propriedades físicas ou químicas dos fármacos. É desejável que estes métodos sejam rápidos, de baixo custo, com menor geração de resíduos e com mínimo preparo da amostra (DOU et al., 2007; PASQUINI, 2003; ROSSIGNOLI et al., 2008; SILVA et al., 2009). Os métodos espectroscópicos, tanto por radiação ultravioleta (UV) quanto por radiação infravermelho (IV) e cromatográficos estão entre os mais utilizados.

A espectroscopia no IV associada à ferramenta matemática a calibração multivariada permite a análise de amostras complexas como medicamentos contendo fármacos em associação. Com esta ferramenta é possível utilizar mais de um comprimento de onda na análise, sendo comum o uso de algumas regiões do espectro, ou até mesmo o espectro inteiro, o que confere uma maior seletividade ao método (FERREIRA et al., 1999).

Este trabalho se justifica pelo fato de não haver ainda método farmacopéico para a quantificação simultânea dos fármacos (BUP e NTX) em formas farmacêuticas de produtos industrializados ou manipulados. A maioria dos métodos encontrados na literatura utiliza o método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O método por espectroscopia por IV é uma opção mais rápida, fácil e de menor custo comparado ao método de CLAE. Métodos cromatográficos normalmente requerem preparo de amostra, pré-tratamentos complexos como a remoção de interferentes e/ou extração dos analitos, que às vezes consomem grandes quantidades de solventes orgânicos. Outro fator que muitas vezes inviabiliza a utilização destes métodos CLAE no controle de qualidade em farmácias de manipulação é o alto custo de manutenção do equipamento.

Neste trabalho, é proposto um método alternativo para a quantificação dos fármacos Naltrexona e Bupropiona em associação, através da Espectroscopia por IV.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e validar um método para a quantificação simultânea dos fármacos Naltrexona e Bupropiona, em associação, na forma farmacêutica cápsula, utilizando a espectroscopia na região do infravermelho médio e calibração multivariada em PLS.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver um método utilizando a espectroscopia na região do infravermelho médio, empregando calibração multivariada;
- Desenvolver um método por CLAE para a quantificação da associação dos fármacos em estudo, para posterior utilização na validação do método IVM.
- Validar os métodos desenvolvidos, baseando-se nas normas nacionais e internacionais vigentes;
- Quantificar os fármacos NTX e BUP, em medicamento manipulado, utilizando os métodos por infravermelho e por cromatografia, comparando os resultados.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Obesidade

A obesidade, classificada como doença pela Organização Mundial da Saúde (OMS) desde 1948, tem aumentado drasticamente nas últimas quatro décadas. Esta doença é definida como o excesso de gordura corporal, determinada através de um Índice de Massa Corporal (IMC) maior ou igual a 30 kg/m^2. Ela resulta de um desequilíbrio energético em que um indivíduo consome mais calorias do que gasta durante um período prolongado. Existem diversas causas para a obesidade, como fatores genéticos, ambientais e comportamentais, por exemplo, estilo de vida sedentário e consumo alto de alimentos ricos em açúcares e gorduras (US-FDA, 2010; PATHAM et al., 2013; GUZMAN et al., 2014; BOUCHONVILLE et al., 2014).

Em 2008, com 33,33% de obesos, os Estados Unidos da América tiveram um custo médico anual foi US$ 147 bilhões. As previsões de tendência linear de crescimento da obesidade sugerem que a população obesa será de 51% em 2030. Isto deve provocar um aumento de 16 a 18% nos gastos com saúde e terá início a primeira redução na expectativa de vida da história moderna (BILLES et al., 2014; CAIXAS, 2014).

Muitos indivíduos não conseguem manter o peso apenas com exercícios e com alimentação adequada, e as tentativas de mudanças no estilo de vida culminam em fracassos recorrentes, particularmente nos casos mais graves onde o índice de massa corporal atinge valores superiores a 40 kg/m^2. Modificações no padrão alimentar e estabelecimento de atividade física regular podem ser práticas impossíveis de serem implementadas a longo prazo (GREENWAY et al., 2010; SBEM, 2015b).

O IMC é o indicador epidemiológico para o diagnóstico do sobrepeso e da obesidade. A Organização Mundial da Saúde (OMS) realiza a classificação de peso segundo a relação entre o IMC e doenças crônicas ou mortalidade, baseando-se em padrões internacionais desenvolvidos para pessoas adultas descendentes de europeus (ver Quadro 1). A combinação do IMC com a medida da circunferência abdominal – método antropométrico que reflete de forma indireta o conteúdo de

gordura visceral - é mais efetivo na determinação de riscos de comorbidades que cada uma das avaliações isoladas, conforme descrito no Quadro 2 (ABESO, 2010).

QUADRO 1 - CLASSIFICAÇÃO DE PESO PELO IMC

Classificação	IMC (kg/m²)	Risco de Comorbidades
Baixo peso	< 18,5	Baixo
Peso normal	18,5 – 24,9	Médio
Sobrepeso	≥25	----
Pré-obeso	25-29,9	Aumentado
Obeso I	30,0-34,9	Moderado
Obeso II	35,0-39,9	Grave
Obeso III	≥40	Muito grave

Fonte: ABESO (2010).

QUADRO 2 – COMBINAÇÃO DAS MEDIDAS DE CIRCUNFERÊNCIA ABDOMINAL E IMC PARA AVALIAR OBESIDADE E RISCO PARA DIABETES 2 E DOENÇA CARDIOVASCULAR

Risco de Complicações Metabólicas		Circunferência abdominal (cm)			
Classificação	IMC (kg/m²) Mulher e homem	Mulher		Homem	
		80 - 88	88+	94-102	102+
Baixo peso	< 18,5	----	-----	----	-----
Peso normal	18,5 – 24,9	---	Aumentado	---	Aumentado
Sobrepeso	≥25	Aumentado	Alto	Aumentado	Alto
Obesidade	≥30	Alto	Muito alto	Alto	Muito alto

Fonte: Adaptado de ABESO (2010).

A intervenção medicamentosa é indicada quando houver falha do tratamento não farmacológico em pacientes com IMC igual ou superior a 30 kg/m²; com IMC igual ou superior a 25 kg/m² na presença de comorbidades ou circunferência abdominal maior ou igual a 102cm (homens) e 88cm (mulheres) (SBEM, 2006; ABESO, 2010).

O controle do peso corporal e melhora das comorbidades através da utilização de medicamentos está longe de atingir os níveis alcançados pelos procedimentos cirúrgicos bariátricos. Esta cirurgia reduz o tamanho do estômago, aumentando a sensação de saciedade com uma ingesta menor de alimentos. Isto tem demonstrado eficácia na perda de peso, melhoria na pressão arterial, controle da glicemia e perfil lipídico. Melhorias e inovações nas técnicas cirúrgicas têm reduzido a invasão, risco cirúrgico, e os tempos de recuperação. No entanto, a cirurgia bariátrica ainda tem sérios riscos de complicações cirúrgicas e metabólicas,

e continua a ser uma opção cara, tornando-a menos do que ideal para a maioria da população obesos (CAIXAS, 2014; EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2015).

3.2 Terapêutica

O tratamento medicamentoso não cura a obesidade, mas pode controlar a doença e diminuir as comorbidades (ABESO, 2010). O medicamento antiobesidade ideal deve produzir perda de peso sustentada, com efeitos secundários mínimos. As drogas antiobesidade descobertas têm falhado neste propósito, pois seus mecanismos de ação para regular o balanço energético alteram de forma substancial outras funções fisiológicas e são influenciados por fatores sociais, hedônicos e psicológicos que limitam a eficácia das intervenções farmacológicas (CAIXAS, 2014).

A venda dos medicamentos anorexígenos anfetamínicos anfepramona, femproporex e mazindol foi proibida no Brasil pela RDC 52/2011 - ANVISA. O Senado Federal aprovou o PDS 52/2014, que anula esta resolução, por considerar a ausência de tratamentos medicamentosos alternativos e que isto pode levar ao aumento do número de cirurgias bariátricas. Em 2016, foi aprovado o projeto de lei da Câmara dos Deputados nº61/2015, autorizando a produção, a comercialização e o consumo, sob prescrição médica, dos anorexígenos: sibutramina, anfepramona, femproporex e mazindol. Em junho de 2016, a ANVISA através da RDC nº87, de 28 de junho de 2016, atualizou a lista de Substâncias Entorpecentes, Psicotrópicas, Precursoras e Outras sob Controle Especial, da Portaria SVS/MS nº 344, de 12 de maio de 1998, e voltou a autorizar as substâncias anteriormente proibidas, incluídas na lista B2 (anorexígenos). No entanto, o órgão aumentou os mecanismos de controle, nos quais devem ser respeitados limites de quantidade, a receita deve ficar retida na farmácia e o médico deve assinar um termo de responsabilidade. Além disso, o paciente também deve assinar um documento afirmando que conhece os riscos que essas substâncias podem causar (US-FDA, 2010; CEBRID, 2012; ANVISA, 2016; CÂMARA DOS DEPUTADOS, 2016; GARCIA, 2016).

Os países europeus não utilizam os medicamentos anfepramona, femproporex e mazindol como anorexígenos desde 1999. Desde janeiro de 2010, a

Europa não possui mais a Sibutramina em seu mercado. Os EUA cancelaram seu registro em outubro de 2010 (US-FDA, 2010; CEBRID, 2012).

Atualmente, o Orlistat, um inibidor de lipase intestinal, é o único fármaco anti-obesidade de longo prazo aprovado pela Agência Europeia de Medicamentos e pelo FDA. Os análogos anfetamínicos, por exemplo Fentermina e Anfepramona, são aprovados nos EUA como agentes antiobesidade para tratamento a curto prazo. O Lorcaserin (Belviq® Arena Pharmaceuticals, Zofingen, Suíça), um agonista do receptor 5-HT2C, também foi aprovado pela FDA em 2012 depois de ser reformulado (ABESO, 2010; CAIXAS, A. C. *et al.*, 2014).

Os principais efeitos colaterais desses medicamentos, com exceção do orlistat, são secura na boca, insônia, cefaleia, obstipação intestinal, irritabilidade, euforia, taquicardia, náuseas, tonturas, depressão e complicações cardiovasculares e cardiopulmonares. As anfetaminas podem causar alterações de humor, o que compromete o convívio social, e podem causar dependência química.

Combinações entre medicamentos tem sido muito utilizadas pela possibilidade de se obter efeitos aditivos ou sinérgicos na redução do peso, embora o risco de interações medicamentosas e o custo do tratamento sejam maiores (BOUCHARD; BRAY, 2014). Mais recentemente foi introduzida a associação de Naltrexona e Bupropiona para o tratamento da obesidade, como uma terapia alternativa.

O fármaco Naltrexona (NTX) é um antagonista opióide puro, utilizado para atenuar ou bloquear os efeitos subjetivos dos opióides administrados intravenosamente, como parte do tratamento do alcoolismo e como antagonista no tratamento da dependência de opióides administrados exogenamente (SAÚDE, 2012; SRIKALYANI et al., 2013).

O fármaco Bupropiona (BUP), é um típico antidepressivo utilizado no auxílio à cessação do tabagismo, atua como inibidor da recaptação de norepinefrina e dopamina, bem como antagonista dos receptores nicotínicos α_3 β_4 (WADDEN et al., 2011; SRIKALYANI et al., 2013).

A associação proposta de NTX e BUP vem sendo estudada para o tratamento da obesidade em longo prazo. Estudos realizados em animais indicam que esta associação tem efeito em duas áreas distintas do cérebro envolvidas na regulação do balanço energético: sistema hipotalâmico de melanocortina e sistema mesolímbico de recompensa. A BUP é um inibidor da recaptação de dopamina e

noradrenalina e aumenta a concentração desses dois neurotransmissores no sistema nervoso central. Essa maior concentração no núcleo arqueado aumenta a sinalização de neurônios produtores de POMC (pró-opiomelanocortina). O POMC liberado após essa sinalização é rapidamente clivado em alfa-MSH e beta-endorfinas. O alfa-MSH é uma substância reconhecidamente anorexígena, que aumenta o gasto energético agindo nos receptores 3 e 4 de melanocortina (MC3R e MC4R). No entanto, a beta-endorfina produzida é um opióide endógeno, que inibe diretamente a via da POMC, numa retroalimentação de alça curta. A NTX é um inibidor opióide, e na associação desses dois medicamentos, inibe a ação das beta-endorfinas (HALPERN et al., 2010; HALPERN, 2012; KAKKAR, ASHISH KUMAR; DAHIYA, 2015).

Estudos em ratos demonstraram que a ingestão de alimentos de sabor agradável, por exemplo, leva ao aumento dos níveis de β-endorfina no hipotálamo, ou seja, a ação opióide desta substância tem papel na expressão de palatabilidade dos alimentos. Consequentemente, a NTX inibe esta sensação. Alguns relatos em humanos na década de 1980 sugerem que a NTX, apesar de não afetar diretamente a fome, diminui os sentimentos de prazer associados ao ato de comer, que culmina na redução da ingestão de alimentos (HALPERN et al., 2010).

No mercado existe apenas um produto industrializado desta associação que tem o nome fantasia de Contrave® (Orexigen Therapeutics). Este produto foi aprovado pelo FDA em 2014. No Brasil, esta associação é comercializada como produto magistral. (US-FDA, 2010, 2015; ORNELLAS; CHAVEZ, 2011; HALPERN, 2012; TAKEDA PHARMACEUTICALS AMERICA, 2014; KAKKAR, ASHISH KUMAR; DAHIYA, 2015).

O programa de desenvolvimento clínico do Contrave® foi realizado no âmbito dos requisitos estabelecidos pelo Guia FDA de 2007. A avaliação de segurança clínica da associação foi realizada através de um total de 24 estudos, composto por 15 estudos Fase 1, cinco estudos Fase 2, e quatro estudos de fase 3. O resultado dos estudos pode ser observado na tabela do ANEXO 1. (US-FDA, 2010; EMA, 2015; KAKKAR, ASHISH KUMAR; DAHIYA, 2015).

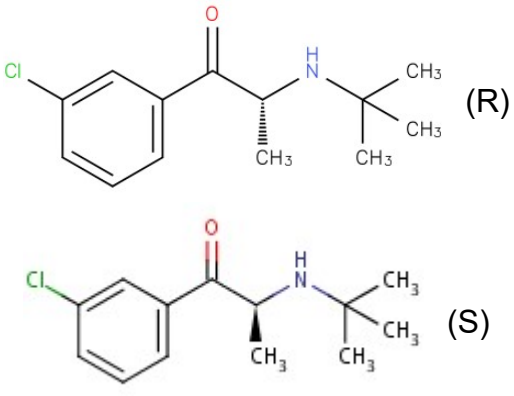
Através dos estudos clínicos, conclui-se que os efeitos colaterais são aceitáveis (ansiedade e insônia; efeitos colaterais já atribuídos a BUP como efeito pressor e crises de epilepsia). Histórico de convulsões deve ser uma contraindicação. (US-FDA, 2010; EMA, 2015).

O tratamento com Contrave® inicia-se com uma dose diária de 1 comprimido na primeira semana, e é acrescido de 1 comprimido por semana, até atingir o máximo de 4 comprimidos por dia – dose de manutenção.

3.3 Os fármacos Bupropiona e Naltrexona

A Bupropiona (BUP) possui o nome químico (IUPAC) de (RS)-2-(tert-butilamino)-1-(3-clorofenil)-propan-1-ona, fórmula molecular $C_{13}H_{18}NClO$ e massa molar 239,74 g/mol. A fórmula estrutural dos isômeros da BUP está representada na Figura 1. O cloridrato de Bupropiona (massa molar 276,21 g/mol) apresenta-se na forma de pó branco, cristalino, e altamente solúvel em água. Possui um sabor amargo e produz sensação de anestesia local na mucosa oral. O seu pK_a é de 7,9. Por ser um sólido ligeiramente higroscópico, é sensível à degradação. Sua solubilidade na temperatura ambiente, em água é de 312 mg/mL, em álcool 193 mg/mL e em HCl 0,1N é de 333 mg/mL (CANADIAN INSTITUTES OF HEALTH RESEARCH; GLAXOSMITHKLINE, 2004; THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, 2009; ABDULAZIZ et al., 2010; YENICELI; DOGRUKOL-AK, 2010; NCBI, 2016).

FIGURA 1 - FÓRMULA ESTRUTURAL DA BUPROPIONA

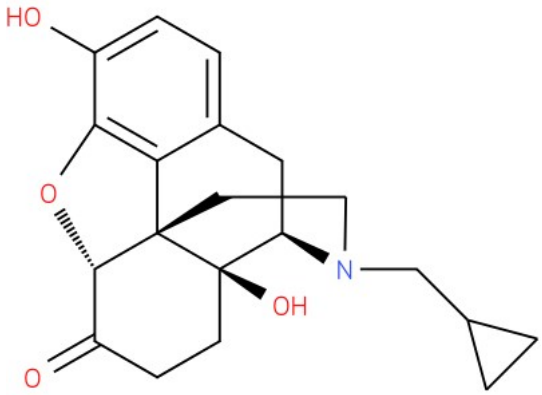


Fonte: EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY LABORATORY (2016).

A Naltrexona (NTX) possui nome químico (IUPAC) de 17-(cyclopropylmethyl)-4,5-α-epoxy-3,14-dihydroxymorphinan-6-one hydrochloride (IUPAC). Sua fórmula molecular é $C_{20}H_{23}NO_4$ e sua massa molar 341,401 g/mol. Sua fórmula estrutural

está representada pela Figura 2. É encontrada na forma de hidrocloridrato, apresentando nesta forma massa molar de 377,86 g/mol. É caracterizada por cristais solúveis em água 100mg/mL, a 25ºC, e com pK_{a1} em 8,38 (protonação do nitrogênio) e pK_{a2} em 9,93 (hidrogênio fenólico) (THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, 2009; NCBI, 2016).

FIGURA 2 - FÓRMULA ESTRUTURAL DA NALTREXONA



Fonte: EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY LABORATORY (2016).

A apresentação comercial da associação (Contrave®), comprimido de liberação controlada, contém 8 mg de cloridrato de NTX e 90 mg de cloridrato de BUP. Os excipientes utilizados, segundo a bula do medicamento, são cloreto de cisteína, celulose microcristalina, hidroxipropilcelulose, estearato de magnésio, lactose anidra, lactose monohidratada, crospovidone, hipromelose, EDTA, dióxido de silício coloidal, álcool polivinílico, dióxido de titânio, macrogol e talco (TAKEDA PHARMACEUTICALS AMERICA, 2014; EMA, 2015).

3.4 Métodos para a quantificação simultânea da associação de NTX e BUP

Não há ainda nas principais farmacopeias métodos que quantifique simultaneamente os fármacos NTX e BUP, em formas farmacêuticas. Muitos destes compêndios trazem monografias apenas para os fármacos isolados. Através de uma revisão bibliográfica nas principais bases de dados (PUBMED, SCOPUS, WEB OF SCIENCE, e busca manual) foram encontrados apenas cinco métodos analíticos que

podem ser aplicados para a quantificação simultânea destes fármacos. Quatro deles são por CLAE e um por Espectrofotometria no UV (tabela 1). O método espectrofotométrico utiliza derivada para a separação dos sinais de resposta dos fármacos.

TABELA 1 – MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE NTX E BUP

Técnicas analíticas	**Autores, Ano**
UV	PATEL, P. G.; MASTER, 2014
CLAE	CH. NAVEEN KUMAR, N. KANNAPPANB, 2015
CLAE	HARITHA et al., 2015
CLAE	PHANI. R. S.; CHAITANYA, D. AND PRASANTHI, 2015
CLAE	SRIKALYANI et al., 2013

Fonte: O autor (2015).

Os métodos cromatográficos encontrados na literatura foram comparados, tabela 2. Observa-se que apresentam condições cromatográficas muito semelhantes. Destaca-se o tempo para cada análise, que leva em torno de 10 a 15 minutos, não contando o tempo do preparo da amostra. Além disto, todos utilizam solventes orgânicos para a preparação da fase móvel.

TABELA 2 – COMPARATIVO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS UTILIZADAS PELOS MÉTODOS ENCONTRADOS NA LITERATURA CIENTÍFICA

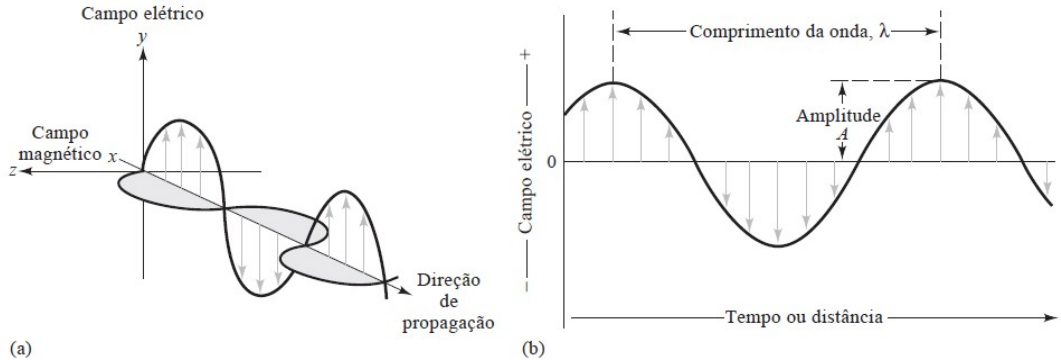
	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS			
Autores	KUMAR, N.,*et al.,* 2015	HARITHA, A. *et al.,* 2015	PHANI, R. S. *et al.*, 2015	SRIKALYANI, V. *et al.,* 2013
Coluna	Waters symmetry C18 (150x4.6 mm; ID; 3,5 µm)	Phenomenex C18 (250x4.6 mm; ID: 5 µm)	Chromosil C18 (250mm x 4.6 mm ID; 0,45 µm)	Phenomenex C18 (250x4.6 mm; ID: 5 µm)
Fase Móvel	Tampão fosfato: Acetonitrila (30:70 *v/v*), sonicado por 15 min. e filtrada (0,45 µm)	Tampão fosfato (pH3,0): acetonitrila (60:40 *v/v*) soni-nicada por 5min. filtrada (0,22µ) sob vácuo	Metanol:acetonitrila: água (60:20:20 *v/v*), sonicado por 15 min. e filtrada (0,45 µm)	(A) Sol aquosa de trietilamina 0,05% e (B) Acetonitrila A:B (45:55 *v/v*), sonicado por 3 min. e filtrada (0,45 µm)
pH	4,5	3,0	4,8	6,5
Fluxo (mL/min)	0,5 (Modo isocrático)	1,0 (Modo isocrático)	1,0 (Modo isocrático)	1,2 (Modo isocrático)
Tempo de corrida (min)	10	14	10	15
Temperatura da coluna (^{0}C)	Temperatura ambiente	Temperatura ambiente	Temperatura ambiente	Temperatura ambiente
Volume de injeção (µL)	20	20	20	20
Detecção (UV) nm	228	224	254	215
Tempo de Retenção (min)	NTX 2,53 BUP 5,34	NTX 2,50 BUP 7,50	NTX 3,40 BUP 7,50	NTX 3,47 BUP 12,34

Fonte: o autor (2016).

3.5 Métodos Espectroscópicos

A espectroscopia é a ciência que estuda as interações da radiação eletromagnética com a matéria. A radiação eletromagnética é uma forma de energia que consiste de campos elétricos e magnéticos oscilantes, perpendicularmente orientados, com propriedades características como comprimento de onda, amplitude frequência, velocidade, e energia (Figura 3) (SKOOG, 2006).

FIGURA 3 - RADIAÇÃO ELETROMAGNÉTICA



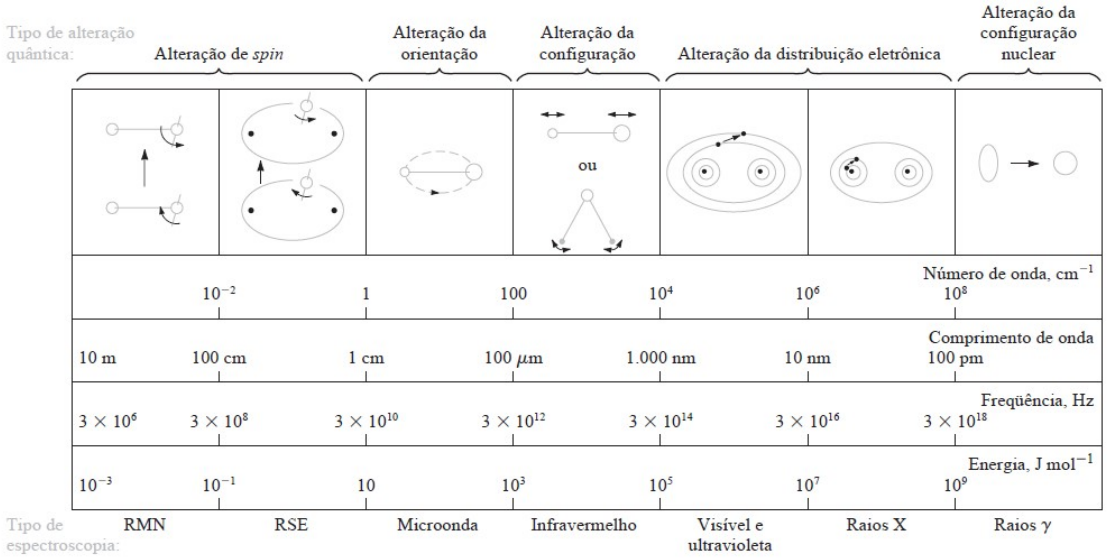
FONTE: SKOOG (2006).
(A) CAMPO ELETROMAGNÉTICO. O CAMPO ELÉTRICO OSCILA EM UM PLANO PERPENDICULAR AO CAMPO MAGNÉTICO. (B) SOMENTE AS OSCILAÇÕES DO CAMPO ELÉTRICO SÃO MOSTRADAS. A AMPLITUDE DA ONDA É O COMPRIMENTO DO VETOR DE CAMPO ELÉTRICO NO PONTO MÁXIMO DA ONDA, ENQUANTO O COMPRIMENTO DA ONDA É A DISTÂNCIA ENTRE DOIS MÁXIMOS SUCESSIVOS.

O espectro eletromagnético é o intervalo completo de todas as possíveis frequências da radiação eletromagnética e se estende desde as ondas de baixa frequência como as ondas de rádio, até as de maior frequência como as da radiação gama. As interações eletromagnéticas interagem com a matéria de diferentes formas ao longo do espectro. Os tipos de interações podem ser tão diferentes que se pode referir a elas como diferentes tipos de radiações. Ao mesmo tempo há uma continuidade entre as diferentes radiações. Por este motivo, dividimos o espectro baseado em suas diferentes interações com a matéria (Figura 4) (SKOOG, 2006).

As substâncias absorvem a radiação eletromagnética em determinados comprimentos de onda/frequências, e esta técnica é bastante utilizada para a determinação e quantificação de fármacos, pois oferece resultados satisfatórios,

com baixos custos, redução no trabalho do preparo das amostras e menor geração de resíduos (HARRIS, 2001; PASQUINI, 2003).

FIGURA 4 - AS REGIÕES DO ESPECTRO ELETROMAGNÉTICO



FONTE: SKOOG (2006).

3.5.1 Espectroscopia no infravermelho

A radiação infravermelha é comumente definida como a radiação eletromagnética entre as micro-ondas e o UV-Visível, com frequências entre 14.300 e 20 cm^{-1} (0,7 e 500 μm), e compreende a faixa de 780 a 100.000nm. A interação da radiação infravermelha com uma molécula é possível quando o campo eletromagnético oscila na mesma frequência do momento dipolar dessa molécula, ou seja, ao absorver a radiação de infravermelho a molécula converte esta energia em vibração, gerando um espectro vibracional que costuma aparecer como bandas. Assim, a formação do espectro na região do infravermelho será resultado da frequência de absorção, que depende da massa dos átomos, do arranjo geométrico dos átomos e da força de ligação entre eles (SCHRADER, 1994; PUTZIG, 1996; SILVERSTEIN, 2005; SKOOG, 2006).

A intensidade das bandas de absorção depende da magnitude da carga na oscilação do momento dipolo da ligação durante a transição e também é diretamente proporcional ao número de ligações para aquela absorção particular (FURNISS,

1989). Os átomos ou grupo de átomos dos compostos orgânicos vibram com maior rapidez e com maior amplitude em torno das ligações covalentes que os unem. Estas vibrações são quantizadas e através da informação espectral (frequências e intensidades absorvidas) pode-se caracterizar o material e identificar a presença e quantidade de um composto particular numa mistura, através da presença ou ausência de grupos funcionais e estrutura das moléculas. Com exceção de moléculas diatômicas homonucleares, todas as outras absorvem radiação infravermelha (PUTZIG, 1996; SKOOG, 2006; SOLOMONS, 2011).

O espectro do IV é dividido em infravermelho próximo (IVP), infravermelho médio (IVM) e infravermelho distante (IVD). A Tabela 3 apresenta os limites aproximados para cada região. Para a química orgânica, o intervalo compreendido entre 4000 e 660 cm^{-1} possui maior importância e possui maior número de pesquisas e aplicações, principalmente pela técnica de espalhamento da luz – DRIFT (*Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform* - Reflectância Difusa no Infravermelho com Transformada de Fourier), tendo em vista que esta região apresenta uma grande quantidade de informação que pode ser utilizada para a caracterização funcional de compostos orgânicos (SILVERSTEIN, 2005; SKOOG, 2006).

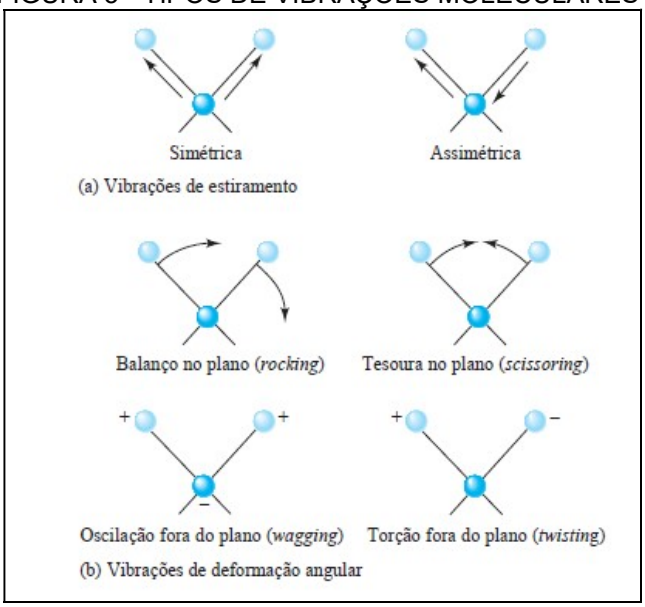
TABELA 3 – REGIÕES ESPECTRAIS DO INFRAVERMELHO

REGIÃO	**INTERVALO EM NÚMERO DE ONDAS (cm^{-1})**	**INTERVALO EM COMPRIMENTO DE ONDAS (nm)**
Próximo (IVP)	12.800-4.000	780-2.500
Médio (IVM)	4.000-200	2.500-5.000
Distante (IVD)	200-10	5.000-100.000

FONTE: SKOOG (2006).

Os principais tipos de vibrações moleculares são o estiramento axial e a deformação angular. A deformação axial ou estiramento é um movimento rítmico ao longo do eixo de ligação em que a distância entre os átomos aumenta ou diminui. Já a deformação angular é um movimento em que ocorrem variações nos ângulos das ligações químicas, podendo ser simétricas no plano (tesoura), assimétricas no plano (balança), simétricas fora do plano (torção) e assimétricas fora do plano (abano) (Figura 5) (FURNISS, 1989; SKOOG, 2006).

FIGURA 5 - TIPOS DE VIBRAÇÕES MOLECULARES*



FONTE:SKOOG (2006).

*O sinal positivo significa a movimentação do plano da página em direção ao leitor. O sinal negativo significa a movimentação na direção oposta.

A utilização da espectroscopia no infravermelho no modo reflectância tem sido uma alternativa confiável para o controle de qualidade dos ingredientes farmacêuticos ativos (API), fornecendo métodos de custo relativamente baixo, que demandam uma intervenção humana menor, ou seja, uma manipulação menor da amostra, e podem ser automatizados, sendo apropriados para o controle de qualidade moderno. É uma técnica analítica rápida, de baixo custo, com possibilidade de não ser destrutiva e ecológica, pois não são utilizados solventes e reagentes (PASQUINI, 2003; STUART, 2004; LIMA et al., 2009; FERREIRA et al., 2013). Entretanto, a interpretação completa de um espectro pode ser complexa, pois a maioria dos compostos orgânicos tem um número muito grande de modos normais de vibração. Deve-se realizar a identificação mínima de grupos funcionais característicos da molécula. Essa complexidade nos permite concluir que existe a chance de dois espectros praticamente superponíveis fazerem parte de uma mesma substância (PIANTAVINI et al., 2014).

Os métodos de espectrofotometria na região IV e UV podem ser alternativas analíticas baratas e ecológicas (tecnologia verde). Para a quantificação de mais de um componente, podem ser associados à modelagem por calibração multivariada e inferência estatística, devido à complexidade da correlação entre a concentração real e o sinal analítico. Cada método possui vantagens e limitações que são

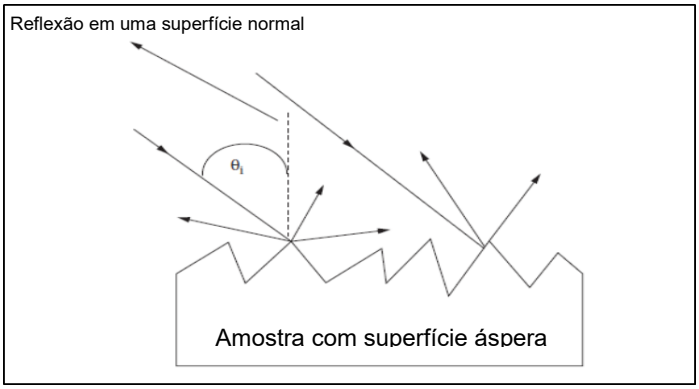
inerentes aos próprios instrumentos, que devem ser avaliadas no momento da sua escolha (PIANTAVINI, 2014).

Nas últimas décadas, espectrômetros de infravermelho com transformada de Fourier substituíram os aparelhos de dispersão tradicionais, utilizados desde os anos 40 para obter espectros de infravermelho. Os FTIR (Espectrômetro infravermelho por Transformada de Fourier) são mais rápidos e proporcionam um espectro de melhor qualidade (STUART, 2004). O FTIR coleta simultaneamente os dados em todas as frequências do espectro e isto só é possível devido ao interferômetro de Michelson que converte a radiação multifrequência, constante com o tempo, em um interferograma que é dado não em função da frequência, mas do tempo. Posteriormente, através do tratamento matemático de transformação de Fourier, o interferograma é convertido em um espectro (HESSE, M.; MEIER, H.; ZEEH, 2008).

Os métodos de obtenção dos espectros na região do IV podem ser de transmissão ou reflectância. Os métodos de transmissão baseiam-se na absorção da radiação em números de ondas específicos enquanto passam pela amostra, que pode ser líquida, gasosa ou sólida. Os métodos de reflectância podem ser por meio de reflexão interna, como a reflectância total atenuada (ATR) ou por reflexão externa que pode ser especular ou difusa (STUART, 2004). A reflectância difusa (DRIFT - *Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform*) consiste na reflexão da radiação incidente sobre as partículas da superfície da amostra de forma difusa, ou seja, em múltiplas direções uma vez que a superfície da amostra é irregular. Após o espalhamento, a radiação é coletada por espelhos que a direcionam ao detector (Figura 06) (PARISOTTO et al., 2009).

Uma das técnicas mais utilizadas em medidas quantitativas no infravermelho, especialmente em aplicações com amostras sólidas (particuladas ou fragmentadas, pouco ou não reflexivas, na forma de pó), baseia-se em medidas de reflectância. Embora o modo de aquisição seja diferente e os espectros não sejam idênticos, são semelhantes na aparência e carregam a mesma informação, podendo ser usados tanto para análises qualitativas como quantitativas (SKOOG, D.A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, 2002).

FIGURA 6 – REFLECTÂNCIA DIFUSA EM UMA AMOSTRA DE SUPERFÍCIE IRREGULAR



FONTE: SMITH (2011).

Θ_1: ÂNGULO ENTRE A RADIAÇÃO INCIDENTE E A REFLEXÃO DE UMA AMOSTRA COM SUPERFÍCIE REGULAR

A sobreposição dos espectros entre analitos e excipientes muitas vezes faz com que a determinação direta seja quase impossível. A calibração convencional como a espectrofotometria derivativa é uma forma de solucionar esta questão, como também o uso combinado de métodos de calibração multivariada, por exemplo, o dos mínimos quadrados parciais – PLS - que têm sido amplamente utilizado na quantificação de misturas (HAALAND; THOMAS, 1988; KHAJEHSHARIFI et al., 2014).

3.6 Calibração Multivariada

A quimiometria é a parte da química que utiliza métodos matemáticos e estatísticos para definir ou selecionar as condições ótimas de medidas e experimentos, bem como extrair o máximo de informações a partir da análise de dados químicos. Pode ser dividida em subáreas, entre elas o planejamento de experimentos, o reconhecimento de padrões e a calibração multivariada. No planejamento experimental buscam-se quais as variáveis que mais afetam um determinado processo, bem como a interação entre elas (BRUNS, 2001; TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

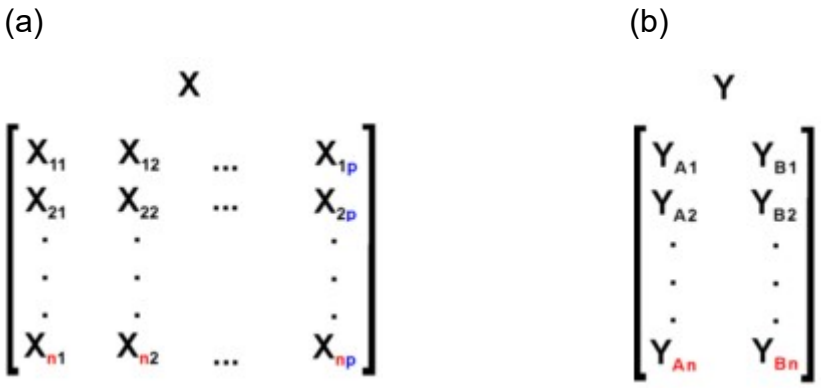
Com a calibração multivariada é possível utilizar uma quantidade maior de variáveis para detectar não somente um, mas vários analitos de interesse simultaneamente. A sobreposição de bandas, problema característico da calibração univariada, demandava a separação prévia física ou química do analito. Atualmente é possível uma separação dos sinais analíticos dos interferentes utilizando técnicas

de calibração multivariada, sem um preparo de amostra muito laborioso, que em geral leva a contaminações ou perdas de amostra. O propósito da calibração multivariada é estabelecer uma relação entre variáveis dependentes e independentes, ou seja, correlacionar quantidades mensuráveis (como absorbância em diferentes comprimentos de onda) com propriedades do sistema, como a concentração de um analito de interesse na presença de outros analitos. O processo consiste basicamente de duas etapas: calibração e validação do método através da determinação da concentração de amostras que não foram utilizadas para a construção do modelo de calibração (PIANTAVINI et al., 2014).

3.6.1 Matrizes

Na construção de um modelo de calibração são necessárias duas matrizes, **X** e **Y**. Os dados são organizados em uma matriz em função do objetivo da análise. O grupo de amostras com a propriedade de interesse, que pode estar em diversas formas físicas, é submetido a um determinado instrumento que gere um vetor resposta. Este é organizado no formato de uma matriz (matriz **X**). Essa resposta é submetida a tratamentos matemáticos a fim de encontrar uma relação entre as amostras, no caso do PCA (análise de componentes principais), ou entre as amostras e suas respectivas concentrações (matriz **Y**), sejam de analitos em especial ou parâmetros físico-químicos, como pode ser verificado na Figura 7 (PIANTAVINI, 2014).

FIGURA 7 – MATRIZES



FONTE: FERREIRA et al., 1999; PIANTAVINI, 2014
(a) Matriz de variáveis independentes, gerada por dados espectrofotométricos
(b) Matriz de variáveis dependentes

Os dados são arranjados nas matrizes **X** e **Y**: na matriz **X** (Figura 7a) são inseridos os objetos (amostras, moléculas, indivíduos, etc.) nas linhas, e as variáveis nas colunas (intensidade de absorção, sinal elétrico, tempo de retenção, propriedades físicas, etc.). No caso de dados espectrofotométricos, a matriz **X** apresenta uma amostra em cada linha, e em cada coluna, as respostas instrumentais medidas (valores de absorbância) para cada comprimento de onda. A matriz **Y (**Figura 7b) conterá os dados referentes às concentrações dos analitos de interesse, correspondentes às amostras dispostas na matriz **X** (SENA et al., 2007; PIANTAVINI, 2014).

3.6.2 PLS e iPLS

O método de mínimos quadrados parciais (PLS - *Partial Least Squares*) refere-se à ferramenta estatística que tem sido aplicada com sucesso para as análises quantitativas no ultravioleta, infravermelho, dados cromatográficos e eletroquímicos (HAALAND; THOMAS, 1988). Está sendo amplamente utilizado em quimiometria para a calibração multivariada, na construção de modelos de regressão baseados em uma decomposição dos dados originais em variáveis latentes (TAN et al., 2012). O objetivo da regressão PLS é prever **Y** a partir de **X** e descrever sua estrutura comum (BEATON et al., 2014).

Quando um modelo PLS é montado, utilizando na matriz Y dois ou mais componentes, ou seja, quando se busca a quantificação de dois ou mais componentes, esse método é chamado PLS2. Da mesma forma, quando a matriz Y é composta por apenas um componente de interesse, esse modelo é chamado PLS1 (FERREIRA et al., 2009). Utilizando os mesmos dados experimentais e montando diferentes modelos, verificam-se diferenças na previsão das concentrações estimadas para os analitos em estudo, quando se utiliza PLS1 e PLS2, o que demonstra a influência da concentração nesse tipo de modelo. Em alguns casos, a estimativa da concentração no PLS2 é pior do que aquela estimada por PLS1. Entretanto, PLS2 fornece informações úteis, como a faixa espectral que pode ser mais significativa e quais concentrações podem ser determinadas com maior grau de confiança. Dessa forma, utilizar PLS2 para montar um modelo multivariado inicial pode ser uma boa estratégia para, posteriormente, montar

modelos utilizando PLS1 que forneçam melhores resultados de previsão (PASQUINI, 2003).

Para facilitar o processo de seleção da faixa espectral nos casos em que faixas específicas do espectro são melhores que o espectro completo, utiliza-se um algoritmo desenvolvido exatamente para este fim. O princípio do algoritmo iPLS (*interval partial least squares*) é dividir o espectro em regiões menores, equidistantes e desenvolver modelos para cada subintervalo. Depois disso, a raiz quadrada do erro médio de calibração por validação cruzada (RMSECV) dos subintervalos é comparada com os valores de RMSECV do espectro total (LIMA et al., 2009). O propósito do método *i*PLS é otimizar a capacidade preditiva de modelos de regressão PLS, localizando o conjunto de variáveis que podem resultar nos melhores modelos, eliminando informações não relevantes como bandas que não contenham nenhuma informação das espécies ou propriedades a serem analisadas, além de eliminar parte dos ruídos do sistema e para auxiliar na interpretação. A investigação tem o objetivo de fazer um estudo comparativo do desempenho de predição de métodos diferentes para a seleção de variáveis ou intervalos em comparação com os resultados baseados em modelos usando espectros completos. Esta técnica auxilia significativamente na seleção das regiões que estão mais bem correlacionadas com os fármacos, eliminando regiões que apresentam pouca ou duvidosa informação, já que a mistura de excipientes é desconhecida, e desta forma aumenta-se a robustez do modelo. Esse algoritmo seleciona uma faixa do espectro e nos casos em que mais de uma faixa são selecionadas ele recebe o nome de *si*PLS (*synergy interval PLS*) (FRANCESQUETT et al., 2010).

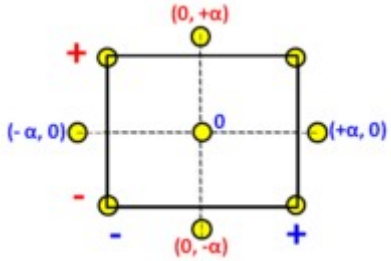
3.6.3 Planejamento experimental

A primeira etapa para a construção de um modelo por quimiometria é a seleção de um conjunto de amostras de calibração e amostras de validação, com significância estatística, para o desenvolvimento do modelo. Para métodos quantitativos, em análise de medicamento, o conjunto de amostras de calibração e de validação deve estar em um intervalo de concentração de ±20% do ponto central (ponto este que corresponde a concentração dos fármacos no medicamento). O

planejamento experimental é uma ferramenta útil para a definição deste conjunto de amostras para a construção do modelo, e o torna mais confiável.

O planejamento experimental do tipo composto central é um delineamento simétrico e de segunda ordem, constituído de três partes: o fatorial 2^k, um ou mais pontos centrais, e a parte axial (ou estrela), sendo k o número de fatores. A distância de um ponto axial até o ponto central é definida como ± “α”. Um planejamento com esta característica 2^k + 2*k + PC (ponto central) é dito Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) (PIANTAVINI, 2014). Com esse planejamento é possível obter um pequeno número de experimentos com o mesmo número de fatores que em um planejamento fatorial completo e, além disso, têm-se as vantagens de rotabilidade e ortogonalidade (pontos axiais) (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

FIGURA 8 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO TIPO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL



FONTE: PIANTAVINI (2014).

3.6.4 Pré-processamento

O pré-processamento de dados tem o objetivo de remover variações indesejáveis (como artefatos instrumentais) e, deste modo, focar na variação química de interesse. A escolha de um método ou da combinação de pré-processamentos depende de diversas propriedades dos dados e do objetivo da análise. O melhor método de pré-processamento será aquele que produzir um modelo robusto em relação à habilidade preditiva (GOODARZI et al., 2015).

Dependendo do estado físico das amostras e da ocorrência de desvios de linha de base, uma correção de *background* e de espalhamento pode ser inicialmente aplicada. Para amenizar problemas de dispersão de luz, muito comuns em varreduras espectrais por reflectância difusa, onde a radiação é incidida diretamente na amostra em pó, os métodos mais utilizados são SNV (*standard*

normal variate) e MSC (*multiplicative scatter correction*). Estes pré-processamentos geram valores de predição semelhantes. A correção multiplicativa de sinal (MSC) é provavelmente a técnica mais amplamente utilizada, em seguida vem o SNV e a derivatização. Artefatos ou imperfeições (por exemplo, efeitos de espalhamento não desejados) serão removidos da matriz de dados antes do modelamento. Esta técnica remove a influência negativa causada por efeitos não químicos, como tamanho de partícula. A MSC faz a correção através da regressão de um espectro medido contra um espectro ideal (que pode ser o médio, mas não necessariamente) e corrige o espectro medido em relação à inclinação e um deslocamento (PIANTAVINI et al., 2014).

A centralização na média significa que o espectro médio é subtraído de todos os espectros. Isto também significa calcular o centroide da matriz de dados, levando-o à origem pela subtração de cada elemento de cada coluna pela sua respectiva média. Para as análises espectroscópicas, calcula-se a média das intensidades para cada comprimento de onda e a intensidade de cada ponto é subtraída do respectivo valor médio (RIBEIRO, 2001).

O alisamento pelo algoritmo Savitzky-Golay é um procedimento que realiza o melhor ajuste através de um polinômio quadrático com pontos sucessivos. Esta técnica determina o ponto central de melhor ajuste para o ajuste polinomial como forçado pelo segmento de dados (ou janela) (WORKMAN JR., 2001). O principal objetivo é aumentar a razão sinal/ruído, suavizando o espectro para eliminar variação aleatória.

Derivadas removem efeitos de linha de base tanto aditivos quanto multiplicativos no espectro, efeitos que podem produzir efeitos indesejáveis e críticos nas medidas de absorbância. A primeira derivada remove somente desvios lineares da linha de base e a segunda derivada remove também desvios não-lineares (WORKMAN JR., 2001). As derivadas são também utilizadas visando eliminar problemas de sobreposição. No entanto, trazem o inconveniente de diminuir a relação sinal/ruído. Esta desvantagem é compensada pelo uso simultâneo do alisamento Savitsky-Golay, que é aplicado para eliminação de ruídos espectrais.

3.6.5 Validação cruzada

A validação cruzada é uma metodologia utilizada para a escolha do número de componentes principais baseada na avaliação da magnitude dos erros de previsão de um dado modelo de calibração. Remove-se uma ou mais amostras do conjunto de calibração e constrói-se o modelo como anteriormente; utiliza-se o novo modelo para prever os dados removidos e calcula-se o erro de predição. O processo é repetido e, para cada sistema em estudo, o número mais adequado será o correspondente ao menor valor erro de previsão (FERREIRA 1999).

A validação cruzada pode ser feita através de diversos métodos, dentre os mais usados destacam-se: *Leave-one-out*, *Random Samples Splits, Venetian Blinds*, *Contiguous Blocks* e subconjuntos aleatórios.

No *Leave-one-out* uma amostra por vez é retirada do conjunto de calibração e é usada como amostra de validação, enquanto as outras são usadas para construir o modelo. As amostras são escolhidas aleatoriamente. Isso é repetido tantas vezes quantas forem o número de amostras, até que todas as amostras tenham sido previstas e a raiz quadrada da soma do quadrado dos resíduos (RMSECV) seja calculado como na equação 1 (PIANTAVINI, 2014).

$$\mathbf{RMSECV} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(\hat{y}_i - y_i)^2}{n}} \qquad (1)$$

Sendo ŷi e yi os valores previstos e de referência para a propriedade de interesse.

Concomitante à validação cruzada é importante, na construção do modelo, selecionar o número de variáveis latentes em função RMSECV e verificar se há amostras anômalas.

3.6.6 Seleção do número de variáveis latentes

Caso seja usado um número menor de variáveis latentes do que o ideal, o modelo pode ter baixa capacidade de previsão e consequentemente não será capaz de reconhecer ligeiras mudanças espectrais. Porém, incluir um número excessivo de

variáveis latentes pode resultar em sobre ajuste dos dados, levando a resultados incorretos. O parâmetro utilizado para essas análises é o gráfico do erro de calibração (RMSEC) e de validação cruzada (RMSECV) em função do número de variáveis latentes. Em geral, escolhe-se o número de VL em função do menor valor de erro médio. Em situações em que são analisados dois fármacos em sistemas pouco complexos, como no UV, é esperado que o número de VL seja igual ao de fármacos. Em sistemas mais complexos, como no IV, em que nem todos os componentes de uma mistura podem ser modelados, o número de VL geralmente é maior que o de fármacos (PIANTAVINI et al., 2014).

3.6.7 Detecção de amostras anômalas

Após elaborar um modelo quimiométrico deve-se verificar se há a presença de amostras anômalas (*outliers*), a fim de garantir sua qualidade (tais como erros de operadores, presença de ruídos aleatórios, alterações nas respostas de equipamentos). A presença de *outliers* pode ser avaliada graficamente por dois critérios: Resíduos de Student x *Leverage* e Resíduos Q x *Hotelling* T2. Para os dados espectrais (**X**), os parâmetros mais utilizados são o *leverage* e os Resíduos Q. Já para os dados de concentração, o parâmetro mais comum para detecção de *outliers* são os resíduos de *Student*, que são resíduos normalizados (BURNS; CIURCZAK, 2007).

3.7 Validação de métodos analíticos

O objetivo da validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida (BRASIL, 2003). Segundo o INMETRO a validação é o fornecimento de evidência objetiva, que comprova que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos (INMETRO, 2003).

Cada método analítico tem sua particularidade e está sujeito a efeitos da matriz e as variações provenientes das características de cada analito. Logo, para que a correta interpretação dos seus resultados seja alcançada, é primordial garantir a qualidade nas análises de modo que esses métodos sejam reprodutíveis e confiáveis (SHAH, 2007). Todavia, otimizações não garantem o desempenho de um

método, sendo necessárias ações que demonstrem sua adequabilidade (IUPAC, 2002). Assim, é essencial que os princípios de validação dos métodos analíticos sejam estabelecidos e aplicados de acordo com a orientação de órgãos regulamentadores (SHAH, 2007).

A definição dos parâmetros de validação, bem como a faixas de aceitação e os procedimentos a serem adotados encontram-se descritos em diversos guias de validação, nacional ou internacional, disponíveis na literatura, como por exemplo, o Guidance for Industry do Food and Drug Administration (UNITED STATES, 2001); o Guia de Validação de Métodos Analíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil - RE nº899/2003 (BRASIL, 2003); o documento do INMETRO, DOQ-CGCRE-008 – Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos e o guia emitido pelo ICH (*International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) – “Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)” (ICH, 2005).

A ANVISA publicou no dia 15 de fevereiro de 2016 a consulta pública referente à validação de métodos analíticos, que irá substituir a RE 899/2003. A referida consulta dispõe sobre a validação de métodos analíticos de ensaios biológicos, microbiológicos, imunológicos, de identificação, quantitativos para a determinação de impurezas, ensaios limite para o controle de impurezas, ensaios quantitativos para a determinação de insumos farmacêuticos em amostras de matérias-primas ou de medicamentos em todas as suas fases de produção, e dá outras providências. A atualização da RE ainda não foi publicada.

Um método analítico validado não significa que ele possa ser aplicado sem restrições para diferentes medicamentos com o mesmo princípio ativo, uma vez que os resultados das análises são influenciados por inúmeros fatores, por exemplo, os componentes da matriz do produto se este é produzido por diferentes laboratórios pode ter diferentes componentes (VALENTINI, S. R.; SOMMER, A. S.; MATIOLI, 2007).

As figuras de mérito mais comuns entre as normas para a validação de métodos quantitativos são: Especificidade e Seletividade; Linearidade e Curva analítica; Intervalo; Precisão (Repetitividade, Precisão Intermediária e Reprodutibilidade); Exatidão e Robustez.

A validação de modelos multivariados ainda é pouco descrita e quase não se tem documentos oficiais para auxiliar na validação. Nos últimos anos, vem sendo

publicados trabalhos que descrevem procedimentos e propostas de como esta validação deve ser realizada. A norma E-1655-05 da ASTM (*American Society for Testing and Materials),* descreve especificamente o desenvolvimento e a validação de modelos de calibração multivariada a partir da espectroscopia no IV (ASTM INTERNATIONAL, 2005).

3.7.1 Figuras de mérito da validação de método multivariada

Na calibração multivariada as figuras de mérito para a validação de métodos estão descritas em normas específicas como a E-1655-05 da ASTM, que estabelecem critérios para validação em calibração multivariada a partir de espectroscopia de infravermelho, e também em trabalhos científicos (ASTM INTERNATIONAL, 2005; VALDERRAMA et al., 2009). Alguns parâmetros como exatidão, precisão e robustez podem ser avaliados de maneira bastante similar à forma como são avaliados nos métodos de calibração univariada. Por outro lado, a estimativa de parâmetros como linearidade, sensibilidade, razão sinal/ruído e seletividade não podem ser avaliados da mesma forma que os métodos tradicionais (VALDERRAMA et al., 2009).

3.7.1.1 Seletividade

A seletividade corresponde ao grau de sobreposição entre o sinal do analito e o sinal dos interferentes presentes na amostra e indica a parte do sinal que foi perdida por essa sobreposição. Ela é determinada para cada amostra e o valor médio é utilizado para caracterizar o método. Para modelos multivariados de calibração, a seletividade pode ser estimada a partir do cálculo do Sinal Analítico Líquido (*Net Analyte Signal*- NAS). O NAS é definido como a fração do sinal analítico ortogonal ao sinal dos demais compostos presentes na amostra (VALDERRAMA et al., 2009).

O método infravermelho e calibração multivariada não necessita de resolução de sinal, não é adequado estabelecer um valor limite para seletividade. Portanto, o resultado obtido não tem o mesmo significado de seletividade empregado nos modelos univariados, ele estima quanto do sinal espectroscópico é perdido por ortogonalidade (VALDERRAMA et al., 2009; FERREIRA et al., 2013).

3.7.1.2 Linearidade

Nas técnicas multivariadas, em especial aquelas que utilizam PLS (*Partial Least Squares*) a linearidade é um cálculo complexo pela decomposição das variáveis pelas variáveis latentes (VALDERRAMA et al., 2009). Qualitativamente é possível avaliar a linearidade através do gráfico de resíduos das amostras do conjunto de calibração e validação, que deve ter um comportamento aleatório (SOUZA et al., 2013). A aleatoriedade dos resíduos também pode ser observada através do gráfico da concentração dos valores de referência *versus* os valores preditos pelo modelo de PLS (FERREIRA et al., 2013).

3.7.1.3 Sensibilidade

A sensibilidade é definida como a capacidade de um método em distinguir, com determinado nível de segurança, duas concentrações próximas. Para a calibração univariada, a sensibilidade é a inclinação da curva de calibração, e no modelo multivariado a sensibilidade é o inverso da inclinação (ICH, 2005).

Na calibração multivariada, a sensibilidade corresponde à fração do sinal analítico responsável pelo acréscimo de uma unidade de concentração à propriedade de interesse (Equação 2) (FERREIRA et al., 2009).

$$SEN = 1/b \quad (2)$$

b - vetor dos coeficientes de regressão estimados pelo PLS

3.7.1.4 Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica (γ), a qual não é abordada em normas ou guias de validação, representa a sensibilidade do método em função da unidade de concentração utilizada, podendo ser definida como a razão entre a sensibilidade e o ruído instrumental (ε) (SENNA *et al*, 2007), podendo ser representada pela equação 3.

$$\gamma = SEN / |\varepsilon| \quad (3)$$

Vetor ε – pode ser estimado por replicatas avaliando os valores do desvio padrão do sinal para cada comprimento de onda.

3.7.1.5 Precisão

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra homogenia, sob condições idênticas de ensaio. Pode ser avaliada em três diferentes níveis: precisão intermediária, repetitividade e reprodutibilidade. Pode ser calculado através do desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), e não são admitidos valores superiores a 5% (BRASIL, 2003; ICH, 2005; ROCA et al., 2007).

Os guias de validação de métodos analíticos da ANVISA e ICH preconizam o mínimo de seis determinações a 100% da concentração do teste ou nove determinações, sendo três amostras para cada faixa de concentração (baixa, média e alta), contemplando a faixa linear do método para os ensaios de precisão (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

3.7.1.6 Limite de detecção

O limite de detecção (LD) é definido como a menor quantidade do analito presente na amostra, que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado, sob condições analíticas determinadas (BRASIL, 2003; INMETRO, 2003; ICH, 2005).

O LD pode ser avaliado de diferentes formas, dependendo do método analítico utilizado. Alguns dos métodos mais frequentes são os baseados na avaliação visual dos instrumentos gráficos obtidos, como espectros, por exemplo, os baseados na relação sinal-ruído, conseguidos somente para procedimentos que mostrem o ruído da linha de base e através de cálculos matemáticos, e os baseados em parâmetros da curva analítica, obtidos também através de cálculos matemáticos (BRASIL, 2003; INMETRO, 2003; ICH, 2005). É calculado pela equação:

$$\mathbf{LD = 3 \times ruído / SEN} \qquad (4)$$

- LD = Limite de detecção
- ruído = estimava do ruído instrumental calculada a partir do branco (aparato sem amostra)
- SEN = sensibilidade calculada para cada analito

3.7.1.7 Limite de quantificação (LQ)

É a menor concentração do analito que pode ser quantitativamente determinada numa amostra, com precisão e exatidão, sob condições experimentais definidas. Como se trata de uma relação entre concentração e sua precisão e exatidão, deve ser observado o fato de que quando o nível de concentração do LQ decresce, sua medida se torna menos precisa. Dessa forma, se uma maior precisão for requerida, uma maior concentração do analito como limite de quantificação deve ser levada em consideração (RIBANI et al., 2004). Para ser avaliado pelo método visual, pelo método sinal-ruído e baseado em parâmetros da curva analítica, calculado pela equação 5 (BRASIL, 2003; INMETRO, 2003; RIBANI et al., 2004; ICH, 2005):

$$\mathbf{LQ = 10 \times ruído / SEN} \qquad (5)$$

- LQ = Limite de Quantificação
- Ruído = estimativa do ruído instrumental calculada a partir do branco (aparato sem amostra)
- SEN = sensibilidade calculada para cada analito

3.7.1.8 Exatidão

A exatidão demonstra o quanto um método analítico permite que os resultados encontrados estejam próximos dos resultados aceitos como valores reais convencionais ou valores de referência (BRASIL, 2003).

Na calibração multivariada a exatidão é expressa através da raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão (*Root Mean Squares Error of Prediction*, RMSEP), que é uma aproximação do erro médio de previsão para as amostras do conjunto de validação. O RMSEP é dado pela equação 6.

$$\mathbf{RMSEP} = \sqrt{\sum\left[(y' - y)^2 / n\right]} \qquad (6)$$

n = número de amostras do conjunto de validação
y'= valores de referência
y= valores previstos pelo modelo.

3.7.1.9 Robustez

A robustez de um método analítico representa sua capacidade de permanecer inalterado diante de pequenas, mas deliberadas variações em seus parâmetros, proporcionando confiabilidade dos resultados (THOMPSON et al., 2002; BRASIL, 2003; INMETRO, 2003; ICH, 2005; MAGNUSSON, 2014; RIBANI et al., 2004).

3.7.1.10 Teste para erro sistemático (Bias)

O erro sistemático é o somatório das componentes do erro que não são aleatórias, que afeta algumas figuras de mérito como exatidão e precisão (VALDERRAMA et al., 2009). A norma E1655-05 da ASTM recomenda a investigação de erros sistemáticos em modelos de calibração multivariada através de um teste t com 95% de confiança, para as amostras de validação. Com o teste é possível avaliar se *bias* presente no modelo é significativo. Para esse teste, primeiro calcula-se o *bias* médio para o conjunto de validação através da equação 7 (ASTM INTERNATIONAL, 2005).

$$\textbf{\textit{Bias}} = \sum_{i=1}^{n\vartheta} \frac{(yi^{ref} - \hat{y}i)}{n\vartheta} \qquad (7)$$

y_i^{ref} = valores de concentração das amostras de referência
$\hat{y}i$ = são os valores de concentração das amostras preditas
$n\upsilon$ = o número de amostras do conjunto de validação.

3.7.1.11 Desvio Padrão de Previsão (Residual Prediction Deviation - RPD)

O desvio residual de previsão (DRP, ou *residual prediction deviation* - RPD) representa quão preciso o modelo de calibração prevê o conjunto de amostras, sendo a forma mais apropriada para avaliar o desempenho do modelo. O DRP é determinado como a variação natural das amostras de calibração e validação em relação aos prováveis erros que ocorrem durante a previsão e que é mais útil para a comparação de modelos de diferentes conjuntos de dados (FERREIRA et al., 2013).

O DRP é calculado para os conjuntos de calibração e validação de acordo com as equações 8 e 9.

$$DRP_{cal} = DP_{cal} / RMSECV \quad (8)$$

$$DRP_{val} = DP_{val} / RMSEP \quad (9)$$

DP_{cal} = desvio padrão do conjunto de amostras de calibração
DP_{val} = desvio padrão do conjunto de amostras de validação.

3.7.1.12 Intervalo

Intervalo é a faixa entre a maior e a menor concentração utilizada para o desenvolvimento do método, incluindo estas, onde se pode quantificar um analito em uma amostra, com exatidão, precisão e linearidade adequados, ou seja, o intervalo onde é possível conseguir resultados confiáveis. A faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser utilizado deve estar contida no intervalo (BRASIL, 2003; INMETRO, 2003; RIBANI et al., 2004).

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Equipamentos

- Balança analítica Mettler TOLEDO, modelo Excellence Plus XP 205, precisão analítica de 0,01 mg (Columbus, EUA);
- Espectrofotômetro na região do infravermelho Bruker com módulos Alpha FT-IR (Ettlingen, Alemanha) (IVM);
- Cromatógrafo a líquido, marca Agilent, 1100 series, equipado com bomba quaternária G1379A, degasser G1316A, forno de coluna elétrico, detector diodo G1315B, software ChemStation (Wilmington, EUA);
- Coluna XBridge C18 250 x 4,6 mm, 5 µm de tamanho de partícula - Waters Corporation (Milford, EUA);
- pH-metro Mettler Toledo, Sever Easy AG 8603 (Schwerzenbain, Suíça);
- Purificador de água Milli-Q-Millipore, A10 Gradiente (Milford, EUA);
- Banho de ultrassom Bransonic 2510 (Danbury, EUA);
- Agitador de amostras Mixer Glas-Col (Terre Haute, EUA);
- Micropipetas calibradas de 200 µL, 1000 µL e 5000 µL;
- Extrator Mixer Glas-Col Large Capacity (Terre Haute, EUA).

4.2 Material e Reagentes

- Acetonitrila grau CLAE (99,9%) marca Tedia (Fairfield, EUA);
- Trietilamina grau CLAE (99,9%) marca Vetec (Rio de Janeiro, Brasil);
- Fosfato de potássio monobásico PA (99%) marca Vetec (Rio de Janeiro, Brasil);
- Ácido fosfórico grau CLAE (85%) marca Vetec (Rio de Janeiro, Brasil);
- Matéria-prima grau farmacêutico: Bupropiona teor 100,27% marca Gemini (Délhi, Índia);
- Matéria-prima grau farmacêutico: Naltrexona teor 98,31%, marca Fagron (Milão, Itália);
- Lactose marca Fagron (Milão, Itália);

- Celulose Microcristalina marca Fagron (Hong Kong, China);
- Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) marca Fagron (Hong Kong, China);
- Produto magistral: cápsulas com valor declarado de 8 mg de NTX e 90 mg de BUP (Curitiba, Brasil);
- Padrão de Cloridrato de Naltrexona pureza 99,0%, fornecedor Cerilliant, lote FN 10301502 (Round Rock, EUA);
- Padrão de Cloridrato de Bupropiona pureza 99,5%, fornecedor Supriya Lifescience LTD / SLL-BPH-0515006; lote 15G17-H14-00389; 250 g (Mumbai, Índia);
- Seringa descartável;
- Filtro de membrana Millipore Millex PVDF 0,22 µm e 0,45 µm de poro (Billerica, EUA).

4.3 Softwares

- Statística 10 da StatSoft Inc. (Tulsa, EUA);
- Excel 2013 da Microsoft® (Redmond, EUA);
- PLS -Toolbox 3.0 (Eigenvector Research, Inc.) operando em ambiente Matlab 7.0.1 da Math Work Inc. (Natick, EUA);
- OPUS (version 6.0) for Windows da Brucker Optics (Billerica, EUA);
- Software ChemStation A.10.02 (Wilmington, EUA).

4.4 Desenvolvimento dos métodos multivariados

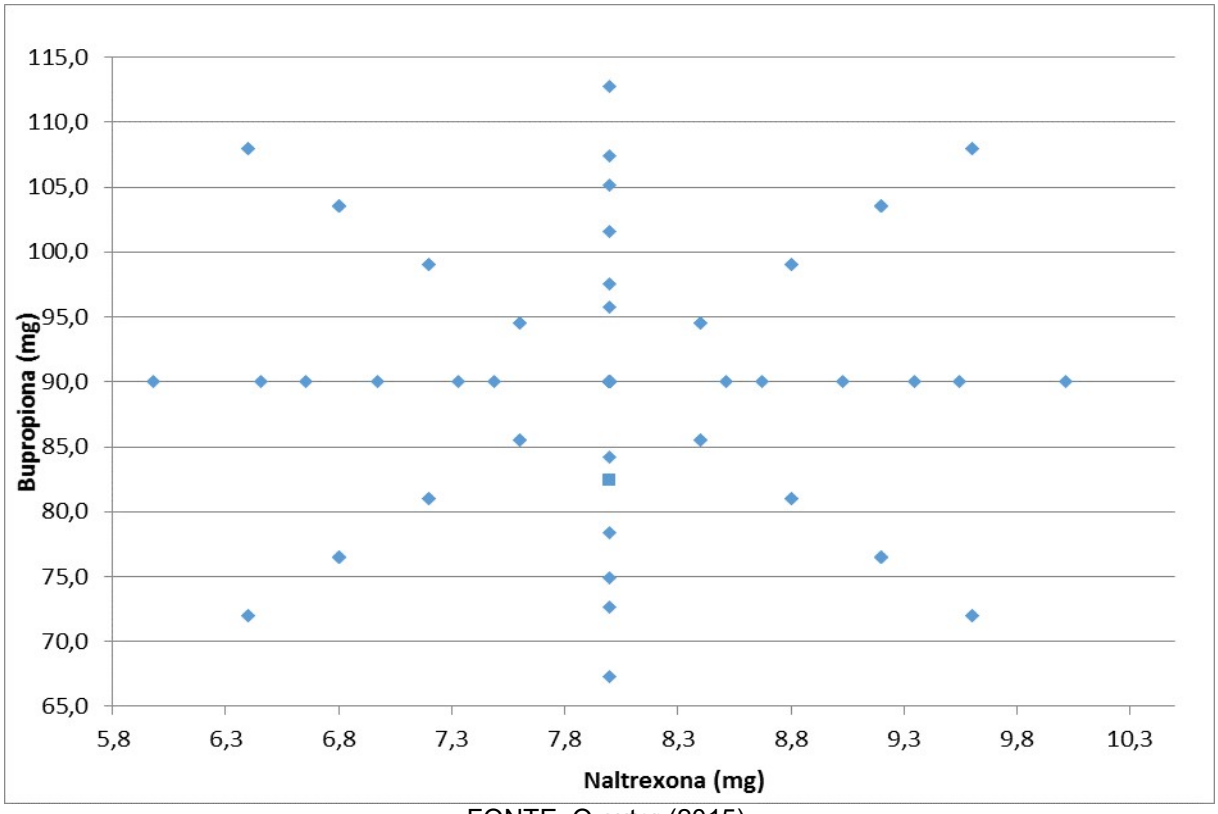
4.4.1 Planejamento experimental

O software *Statistica 10.0* (*StatSoft*, Oklahoma, Estados Unidos) foi utilizado para a seleção do número de amostras. A seleção foi realizada a partir de três fatores: NTX, BUP e mistura dos excipientes (EXC), composta por 65% de lactose, 15% de Celulose Microcristalina e 10% de HPMC. Também foram determinados por este software os valores a serem pesados de cada fator, para a construção do

desenho experimental. O software utilizou a variação da proporção dos fármacos nas amostras dentro do intervalo de mais ou menos 20% em relação ao ponto central (Apêndice 1 e Figura 9). Para definir o ponto central levou-se em consideração a quantidade de NTX (8 mg), BUP (90 mg) e EXC (152,0 mg) presentes na forma farmacêutica cápsula, adquirida em farmácia de manipulação.

Os níveis fora da variação estabelecida correspondem aos pontos axiais de rotabilidade (α=1,6818) e ortogonalidade (α=1,2872). O software gerou um total de 79 amostras, que foram divididas em amostras de validação (21) e amostras de calibração (58), de acordo com a norma ASTM E1655-05 (2012), que recomenda que o número de amostras para a calibração seja de no mínimo 6 x (VL+1) e o número de amostras de validação no mínimo a 4 x (VL) (ASTM, 2012). As amostras de validação selecionadas estão em pontos de maior probabilidade de ocorrência. As quantidades efetivamente pesadas e as concentrações de cada amostra dos conjuntos de calibração e de validação podem ser observadas no **APÊNDICE 1**. Como o gráfico do Planejamento do Composto Central se refere apenas aos fármacos, alguns pontos ficaram sobrepostos, pontos estes que representam amostras em que houve variação apenas do excipiente (±5%).

FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO PLANEJAMENTO DO TIPO COMPOSTO CENTRAL DAS AMOSTRAS DE NALTREXONA E BUPROPIONA



FONTE: O autor (2015).

4.4.2 Preparo das amostras para a obtenção do modelo multivariado no infravermelho médio (IVM)

Após pesagem dos componentes (NTX, BUP e EXC) para cada amostra, estes foram homogeneizados em gral de ágata. A concentração teórica dos fármacos foi expressa em mg de fármaco por g total da mistura, e o valor foi corrigido conforme o teor de cada fármaco (Apêndice 2). Cada uma das 79 amostras foi analisada por espectroscopia no IVM através do módulo de reflectância difusa (*DRIFT*), para a aquisição dos espectros.

4.4.3 Obtenção de modelos multivariados no infravermelho médio (IVM)

Os dados espectrais foram tabulados para inserção no software *Matlab*, sendo os dados de número de onda e os dados de absorbância relacionados na matriz X (composta por 2559 números de onda nas linhas e 58 amostras nas colunas) e os dados de concentração teórica de ambos os analitos na matriz Y (composta por 2559 números de onda nas linhas e 21 amostras nas colunas). Os 2559 números são gerados por 2559 leituras realizadas pelo espectrômetro IV BRUKER ALPHA-R FT-IV na região de 4.000 a 400 cm^{-1}. Os espectros foram adquiridos com auxílio do *software* OPUS (*version* 6.0 - *Brucker Optik*), resolução de 4 cm^{-1} e 32 *scans.* A aquisição foi realizada sob temperatura (25,0±0,2ºC) e umidade (45-55%) controladas.

Os modelos multivariados de calibração foram desenvolvidos utilizando o programa *PLS-Toolbox* 3.0 (*Eigenvector Research, Inc.*) operando em ambiente *Matlab* 7.0.1 (*Math Work Inc.*). Diversos modelos foram construídos através da combinação de diferentes pré-processamentos e da técnica de validação cruzada *leave-one-out*. A escolha dos melhores modelos de calibração multivariada foi realizada com base nos valores de RMSEC, RMSECV, RMSEP e erro percentual médio de predição.

Os modelos foram avaliados analisando-se o espectro completo (PLS), e selecionando regiões importante (iPLS) que continham bandas específicas de cada analito. Deve-se informar ao software qual a faixa mínima em que se deseja dividir o espectro, a fim de separá-lo em porções espectrais que contemplem a maior parte

absoluta do espectro, já que há um intervalo numérico diferente entre os valores dados pelo software (3600 pontos entre 400-4000 cm^{-1} considerando um valor dado pelo instrumento para cada número de onda), e os valores adquiridos pelo espectrômetro (2559 pontos entre 400-4000 cm^{-1}). Os espectros foram divididos pelos números inteiros 8, 10, 12, 14 e 16, gerando intervalos de 319, 255, 213, 182 e 159 cm^{-1}, respectivamente. No software, para obtenção dos modelos por iPLS, foram definidos o número de variáveis latentes (máximo igual a 4) e modo *forward*.

Foi avaliada também a presença de amostras consideradas *outliers,* uma vez que estas podem afetar adversamente a capacidade preditiva do modelo. Isto foi feito analisando os valores dos resíduos de *Student* x *Leverage*.

4.5 Validação dos modelos desenvolvidos por IV

O processo de validação foi realizado considerando as figuras de mérito aplicáveis a modelos de calibração multivariada e pelas recomendações nacionais (BRASIL, 2003; INMETRO, 2010) e internacionais (ICH, 2005; ASTM, 2012).

4.5.1 Seletividade, Sensibilidade e Sensibilidade analítica

Os valores de seletividade (SEL), sensibilidade (SEN) e sensibilidade analítica (γ) foram estimados com base no conceito de NAS.

4.5.2 Linearidade

Através dos dados do conjunto de calibração, os valores de linearidade foram preditos avaliando-se a aleatoriedade do gráfico da concentração dos valores de referência *versus* os valores preditos pelo modelo de PLS.

4.5.3 Precisão

A precisão foi avaliada através do teste t para 18 amostras independentes em dois níveis (repetitividade e precisão intermediária), em função do DPR dos valores de cada ponto.

4.5.4 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os valores de LD e LQ foram obtidos conforme as **Erro! Fonte de referência não encontrada.** (item 3.7.1.6) e **Erro! Fonte de referência não encontrada.** (item 3.7.1.7) respectivamente.

4.5.5 Exatidão

A exatidão foi expressa através do valor de RMSEP (*Root Mean Squares Error of Prediction* - Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático de Previsão).

4.5.6 Robustez

A robustez foi avaliada verificando-se a influência da variação da concentração de cada item presente na mistura de excipientes, sem comprometer os dados da concentração dos fármacos.

Foram realizadas variações dos excipientes que geraram 3 diferentes misturas, conforme tabela 4.

TABELA 4- COMPOSIÇÃO DAS MISTURAS PARA A AVALIAÇÃO DA ROBUSTEZ

MISTURA	LAC* (%)	CEL** (%)	HPMC*** (%)
Padrão	65	20	15
1	60	22,5	17,5
2	70	17,5	12,5
3	75	15	10

* LAC: Lactose
** CEL: Celulose microcristalina
*** HPMC: Hidroxipropilmetilcelulose
FONTE: O autor (2016).

4.5.7 Bias

O valor de *Bias* considerado foi obtido pelo software Matlab, o qual foi calculado de acordo com a **Erro! Fonte de referência não encontrada.** (3.7.1.10).

4.5.8 Desvio Padrão de Previsão (Residual Prediction Deviation - RPD)

Este parâmetro foi calculado conforme as **Erro! Fonte de referência não encontrada.** e **Erro! Fonte de referência não encontrada.** do item 3.7.1.11.

4.6 Desenvolvimento de método univariado por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD)

Foi desenvolvido e validado um método CLAE-DAD para a quantificação simultânea dos fármacos NTX e BUP na forma farmacêutica cápsula. Este método foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a exatidão do método desenvolvido por espectroscopia no infravermelho médio.

4.6.1 Condições cromatográficas

Para o desenvolvimento do método, partiu-se de algumas condições dos métodos já publicados. A coluna escolhida foi uma C18 XBridge®, (250 mm x 4,6 mm, 5 µm de partícula). Para seleção da fase móvel, diferentes combinações de solventes (água, metanol, acetonitrila), foram avaliadas levando sempre em consideração o melhor perfil cromatográfico. Foi utilizada trietilamina como agente modificador de pH. Além disso, diferentes fluxos, temperaturas e modo de eluição também foram considerados na tentativa de aperfeiçoar os métodos existentes na literatura.

Os parâmetros estabelecidos com a otimização do método foram os seguintes:

- Fase móvel: Água com 0,1% trietilamina: Acetonitrila (ACN) e pH 6,5 ajustado com ácido ortofosfórico;
- Modo de eluição: gradiente;
- Coluna: C18 XBridge® (250 mm x 4,6 mm, 5 µm de partícula);
- Temperatura de forno: 40ºC±0,5ºC;
- Fluxo de 1 $mL.min^{-1}$;
- Volume de injeção: 10 µL;
- Modo de eleição: Gradiente, conforme descrito na Tabela 5;
- A detecção foi realizada por DAD no comprimento de onda de 230 nm.

TABELA 5 – GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO FASE MÓVEL

Tempo (min)	FASE A (%)	FASE B (%)
0	80	20
5	70	30
12	20	80
14	80	20
18,5	80	20

FONTE: O autor (2016). Fase A – Água + 0,1% trietilamina, fase B – Acetonitrila (ACN)

4.6.2 Preparo da solução estoque e de trabalho

As soluções estoque de BUP e NTX foram preparadas pesando-se 10 mg de cada um dos fármacos, que foram colocados em balões volumétricos de 10 mL e os volumes completados com ACN, obtendo-se soluções com concentração de 1 $mg.mL^{-1}$.

A solução de trabalho utilizada foi de 16,00 $\mu g.mL^{-1}$ de NTX e 180,00 $\mu g.mL^{-1}$ de BUP, sendo que o diluente foi Água: ACN (80:20 *v/v*).

4.7 Validação do método CLAE

O método foi validado de acordo com critérios descritos na norma da ANVISA, RE nº 899, de 29 de março de 2003. Por ser um método classificado como categoria I os parâmetros a serem validados são: especificidade, linearidade, intervalo, exatidão, robustez e precisão (BRASIL, 2003).

4.7.1 Seletividade

O parâmetro seletividade foi avaliado através do método de comparação de matriz. Neste ensaio fez-se a comparação dos cromatogramas obtidos da matriz contendo os analitos na concentração de 8 $mg.g^{-1}$ de NTX e 90 $mg.g^{-1}$ de BUP, e os obtidos com a matriz isenta dos analitos. A matriz era constituída pela mistura de excipientes na proporção de 65% lactose, 15% celulose microcristalina e 10% de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC).

4.7.2 Curva de calibração – Linearidade e Intervalo

A avaliação da linearidade foi feita a partir de soluções padrões contendo NTX e BUP em cinco níveis de concentração.

A partir da solução mãe na concentração 1 $mg.ml^{-1}$ em ACN, de cada um dos padrões (BUP e NTX), foi primeiramente preparado uma solução estoque de 16 $\mu g.mL^{-1}$ para a NTX e 180 $\mu g.mL^{-1}$ para a BUP, utilizando como diluente a composição da fase inicial do gradiente de eluição – água:ACN ; 80:20 *v/v*). A partir desta solução foram preparadas, por diluição com água:ACN (80:20 *v/v*), cinco soluções padrões de calibração de diferentes níveis de concentração, em triplicata, a seguir especificadas:

- 60% - 4,80 $\mu g.mL^{-1}$ NTX e 54,00 $\mu g.mL^{-1}$de BUP
- 80% - 6,40 $\mu g.mL^{-1}$ NTX e 72,00 $\mu g.mL^{-1}$de BUP
- 100% - 8,00 $\mu g.mL^{-1}$ NTX e 90,00 $\mu g.mL^{-1}$de BUP (ponto central)
- 120% - 9,60 $\mu g.mL^{-1}$ NTX e 108,00 $\mu g.mL^{-1}$de BUP
- 140% - 11,20 $\mu g.mL^{-1}$ NTX e 126,00 $\mu g.mL^{-1}$de BUP

O intervalo compreendido na curva de calibração foi de 60 a 140% da concentração de trabalho (ponto central).

4.7.3 Precisão

A precisão foi avaliada pelo ensaio de repetitividade e precisão intermediária.

Para estes ensaios foram preparadas seis amostras em um único nível de concentração: 8,00 $\mu g.mL^{-1}$ NTX e 90,00 $\mu g.mL^{-1}$de BUP (ponto central), diluídos em Água: ACN (80:20, *v:v*). Para a repetitividade as seis amostras foram preparadas e analisadas no mesmo dia, pelo mesmo analista. Para a precisão intermediária as seis amostras de mesmo nível de concentração foram preparadas e analisadas por analistas diferentes e em dias diferentes. A precisão foi avaliada através do desvio

padrão relativo (DPR) entre as concentrações das replicatas de um mesmo nível de concentração, e deve ter valores inferiores a 5%.

4.7.4 Exatidão

A exatidão foi determinada pelo método da adição de padrão ao placebo. Para este teste foram preparadas amostras em três níveis de concentração em relação à concentração declarada no medicamento manipulado, baixa (80%), média (100%) e alta (120%). As amostras foram preparadas em triplicata resultando em um n de 9 amostras no total (Tabela 6). A partir destas amostras, após homogeneização, foram preparadas soluções de análise. A tomada de amostra foi pesada e extraída. A extração foi realizada transferindo-se uma quantidade da mistura homogênea do pó, equivalente à quantidade de NTX e BUP contida em uma cápsula, a um balão volumétrico de 100 ml com 50 ml de solução de ácido fosfórico 0,1M. Este sistema foi submetido à agitação mecânica no equipamento Mixer Glas-Col por 30 minutos, e em seguida, o volume foi completado para 100 mL com água, em seguida filtrado com filtro de 0,45 µm de poro. Em seguida foi diluído e analisado por CLAE. As diluições foram realizadas com diluente água: ACN (80:20 *v/v*). As concentrações obtidas para as amostras diluídas, na concentração baixa foram de 6,4 $\mu g.mL^{-1}$ da NTX e 72,0 $\mu g.mL^{-1}$ de BUP; na média: 8,0 $\mu g.mL^{-1}$ da NTX e 90,0 $\mu g.mL^{-1}$ de BUP e na alta: 9,6 $\mu g.mL^{-1}$ da NTX e 10,80 $\mu g.mL^{-1}$ de BUP.

TABELA 6- QUANTIDADES PESADAS DE CADA INGREDIENTE PARA O PREPARO DAS AMOSTRAS PARA A ANÁLISE DE EXATIDÃO

Composição	**80% (mg)**	**100% (mg)**	**120% (mg)**
NTX	64	80	96
BUP	720	900	1080
EXCIPIENTES	1716	1520	1324
TOTAL	2500	2500	2500

FONTE: O autor (2016).

A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média obtida experimentalmente e a concentração teórica correspondente. A porcentagem de recuperação foi calculada através da equação: E(%) = Área experimental X 100 / Área teórica. Os resultados foram tratados estatisticamente através do coeficiente de variação e do intervalo de confiança no nível de 95%.

4.7.5 Robustez

Para avaliar a robustez do método em CLAE, foram estabelecidas algumas variações no sistema, envolvendo proporção da fase móvel, pH, temperatura da coluna, volume de injeção e diferentes lotes de coluna, conforme detalhado na tabela 7. As amostras de cada condição foram realizadas em triplicata.

TABELA 7 – VARIAÇÕES PARA O TESTE DE ROBUSTEZ

Condição	pH	Temperatura (ºC)	Volume de injeção (µL)	Proporção Água:ACN fase
Padrão	6,5	40,0	10,0	80:20
1	6,3	40,0	10,0	80:20
2	6,7	40,0	10,0	80:20
3	6,5	38,0	10,0	80:20
4	6,5	41,0	10,0	80:20
5	6,5	40,0	9,8	80:20
6	6,5	40,0	10,2	80:20
7	6,5	40,0	10,0	80:20
8	6,5	40,0	10,0	80:20
9	6,5	40,0	10,0	82:18
10	6,5	40,0	10,0	78:22
11	2 colunas diferentes, de mesma especificação (XBridge C18 5µm 4,6mm) Lote 1: 0115370591 / Lote 2: 0115370461			

FONTE: O autor (2016).

4.8 ANÁLISE DE AMOSTRAS COMERCIAIS

4.8.1 Preparo das amostras

O conteúdo de 20 cápsulas magistrais contendo os fármacos com associação (8 mg de NTX e 90mg de BUP) foi homogeneizado. Dez alíquotas desta mistura foram pesadas, cada uma com o peso equivalente ao conteúdo de uma cápsula, para análise por reflectância difusa (*DRIFT*) em espectrômetro na região do infravermelho médio. Foram obtidos espectros de cada alíquota em triplicata. Com

os dados espectrais obtidos foi determinado o teor dos fármacos nas amostras (NTX e BUP) utilizando os modelos desenvolvidos.

Uma alíquota da mesma amostra analisada no IV foi submetida à extração, para posterior análise por CLAE. A extração foi realizada transferindo-se uma quantidade da mistura homogênea do pó, equivalente à quantidade de NTX e BUP contida em uma cápsula, para um balão volumétrico de 100 mL com 50 mL de solução de ácido fosfórico 0,1M. Este sistema foi submetido à agitação mecânica no equipamento Mixer Glas-Col por 30 minutos, e em seguida, o volume foi completado para 100 mL, em seguida filtrado com filtro de 0,45 µm de poro. A solução extraída estava na concentração teórica de 80 $\mu g.ml^{-1}$ da NTX e 900 $\mu g.ml^{-1}$ de BUP. Foi realizada diluição (1:10 *v/v)* com diluente água:ACN (80:20 *v/v*), para a obtenção de solução na concentração teórica de 8 µg/mL de NTX e 90 µg/mL de BUP. Posteriormente, foram analisadas por CLAE.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Amostras para o desenvolvimento e validação dos métodos

O fato deste trabalho ter sido desenvolvido em um ambiente acadêmico, e sem acesso a formula do Contrave® (produto industrializado) tornou-se necessário um estudo para definir que excipientes seriam considerados nas formulações para o desenvolvimento e validação dos métodos. Analisou-se a bula medicamento Contrave® e fez-se também uma pesquisa em farmácias de manipulação, quanto ao tipo e quantidade de excipientes utilizados, em geral, nos produtos manipulados.

Os excipientes do medicamento industrializado Contrave® são: cloreto de cisteína, celulose microcristalina, hidroxipropilcelulose, estearato de magnésio, lactose anidra, lactose monohidratada, crospovidone, hipromelose, EDTA, dióxido de silício coloidal, álcool polivinílico, dióxido de titânio, macrogol e talco (TAKEDA PHARMACEUTICALS AMERICA, 2014; EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2015).

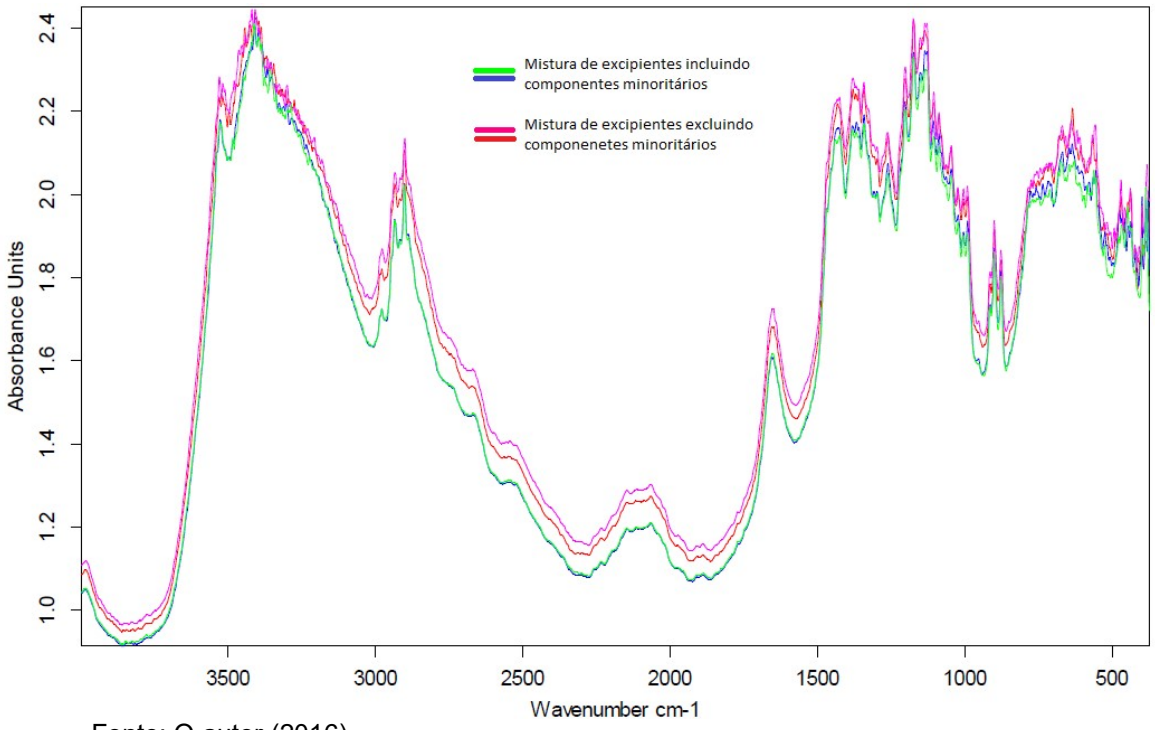
Conforme pesquisa realizada nas farmácias de manipulação de Curitiba a lactose é o excipiente em maior proporção, utilizado como agente de preenchimento e agente ligante, em seguida a celulose microcristalina como agente ligante, diluente e lubrificante, e hidroxipropilmetilcelulose, sinônimo hipromelose (HPMC) como agente de liberação controlada (RAYMOND C R, PAUL J S, 2009). Outros excipientes como EDTA, dióxido de silício e estearato de magnésio também são utilizados, mas em proporções muito baixas, que não influenciariam o espectro da mistura final, conforme observado no gráfico da figura 10.

Considerando as características dos fármacos, do processo farmacotécnico de produção do medicamento e as informações levantadas selecionou-se para compor a formulação apenas os três excipientes de concentração majoritária na formulação, e que poderiam apresentar maior potencial de influência no espectro de IV: Lactose (65%), celulose microcristalina (20%) e hipromelose (15%).

A mistura de excipientes foi preparada pesando-se as quantidades necessárias de cada um dos componentes selecionados nas proporções definidas, homogeneizada em gral, e tamisada para uniformização do pó. Em seguida obtido o espectro na região do IVM utilizando-se o acessório de reflectância difusa. Os modelos multivariados foram desenvolvidos através dos espectros obtidos. O

modelo é construído para cada formulação específica. Qualquer alteração na concentração ou composição dos componentes deve acarretar em uma adaptação do modelo multivariado.

FIGURA 10 – ESPECTRO IV DA MISTURA DE EXCIPIENTES COM E SEM OS COMPONENTES MINORITÁRIOS



Fonte: O autor (2016).

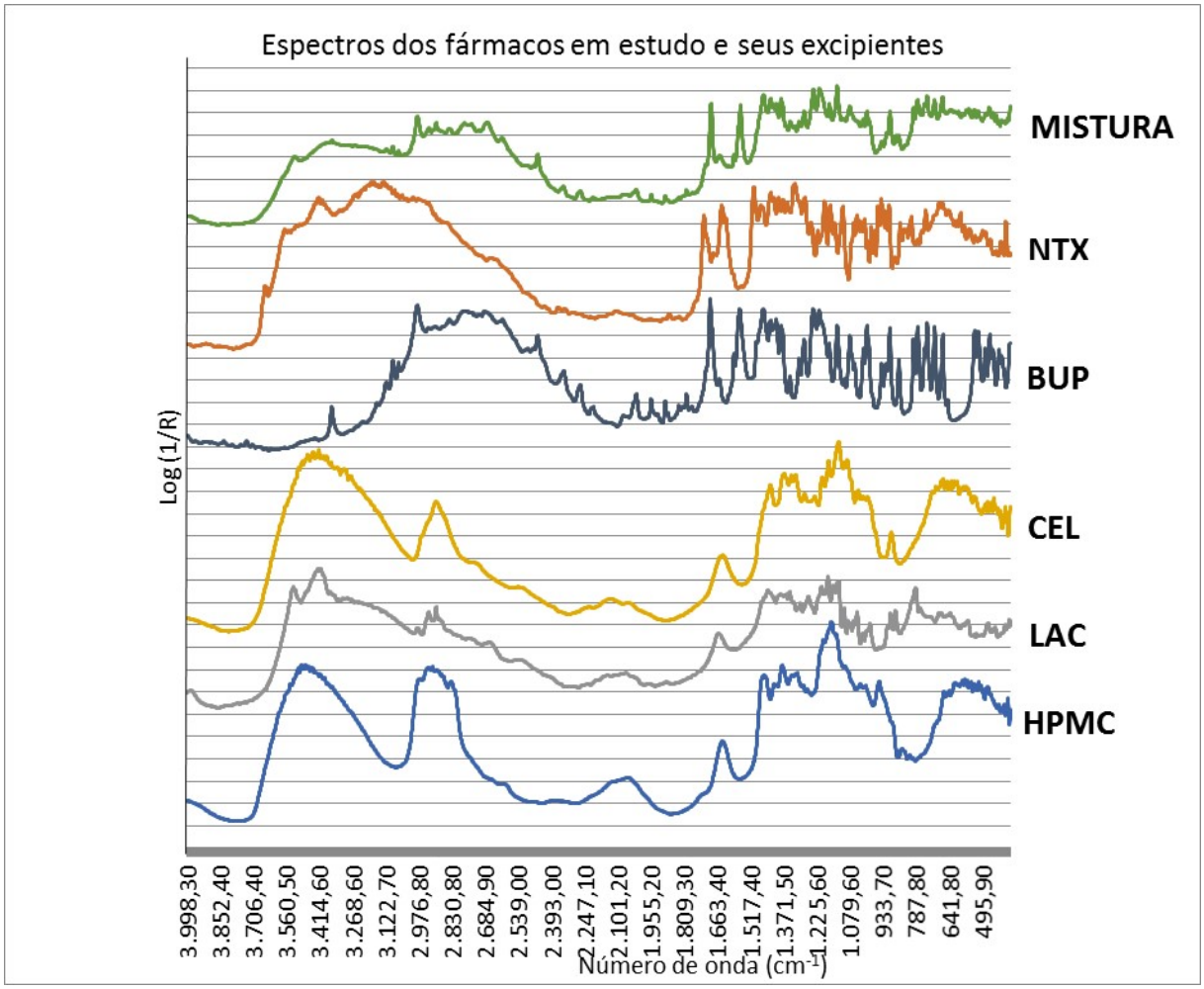
5.2 Modelos desenvolvidos por Calibração Multivariada

5.2.1 Espectros das matérias-primas

O gráfico da figura 11 mostra o espectro IVM dos fármacos isolados (NTX e BUP), da mistura contendo os fármacos e excipientes, e de cada excipiente utilizado separadamente.

Verifica-se que há semelhança entre o espectro da mistura e o espectro de cada um dos fármacos em estudo. Observa-se também que os excipientes contribuem significativamente no espectro da mistura, o que indica que alterações significativas na proporção dos excipientes podem comprometer a capacidade preditiva do modelo.

FIGURA 11 – ESPECTROS DOS FÁRMACOS E DOS EXCIPIENTES



FONTE: O autor (2016).

No preparo das amostras do DCCR, foi combinada a mistura de excipientes (um fator) com os dois fármacos (2 fatores), aleatoriamente, sendo que estes foram variados em ±20%.

Este procedimento visa obter um modelo representativo e robusto, que seja capaz de predizer amostras com composição de excipientes diferentes no intervalo estudado. Além disso, a combinação aleatória entre os modelos experimentais dos analitos e os excipientes tem por objetivo evitar possíveis correlações, o que também contribui para um modelo robusto (XIANG, 2009).

5.2.2 Absorção dos Fármacos no IV

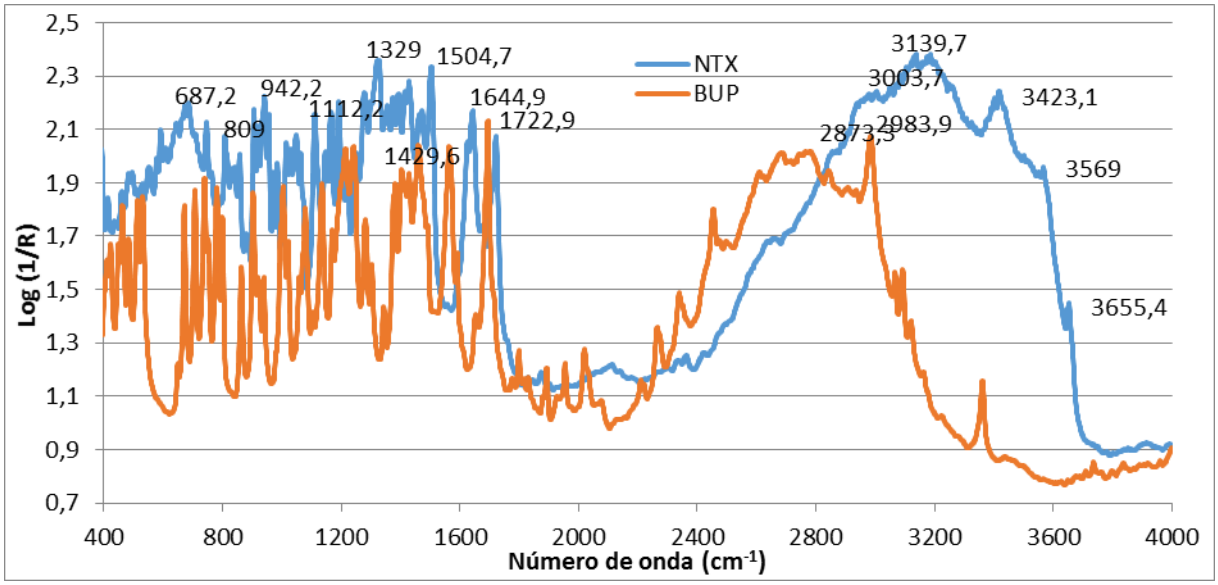
De acordo com a literatura, a NTX possui bandas de absorção no IV relacionadas a ligações entre C-H, caracterizadas pelo estiramento de 2800 a 3200cm^{-1} e deformação 120 a 1500cm^{-1}. Outras vibrações importantes são as de

estiramento da ligação C=C do anel benzênico, entre 1400 e 1600cm^{-1}; pelas deformações provenientes das ligações de CH_2, do tipo tesoura, entre 1450 a 1460cm^{-1}; também estiramento da ligações C=O de 1700 a 1800cm^{-1}; em 2800 a 3100cm^{-1} provenientes de estiramento das ligações entre C-H; e entre 3200 a 3400cm^{-1} provenientes de estiramento de ligações entre O-H. Em 1132cm^{-1} e 1217cm^{-1} existem absorções referentes deformação de ligações do tipo tesoura entre C-H e C-C do ciclopropano (TAVAKOL et al., 2011).

A BUP apresenta bandas de absorção em 1553 cm^{-1} proveniente da ligação de deformação fora do plano N-H da amida; em 1687 cm^{-1} referente a estiramento da ligação C=O da cetona; em 902 cm^{-1} do grupo dialquil amina (R_2NH); em 1235 cm^{-1} referente à ligação C-Cl; em 1457 cm^{-} da ligação de estiramento entre C-C do anel aromático (DEEPIKA; CHELLARAM, 2014).

A figura 12 é referente aos espectros obtidos experimentalmente. Através destes dados, pode-se evidenciar que os sinais característicos da NTX e BUP encontrados na literatura coincidem com as bandas de absorção obtidas nos espectros obtidos com os dados experimentais.

FIGURA 12 – ESPECTROS IV DOS FÁRMACOS



Fonte: o autor (2016).

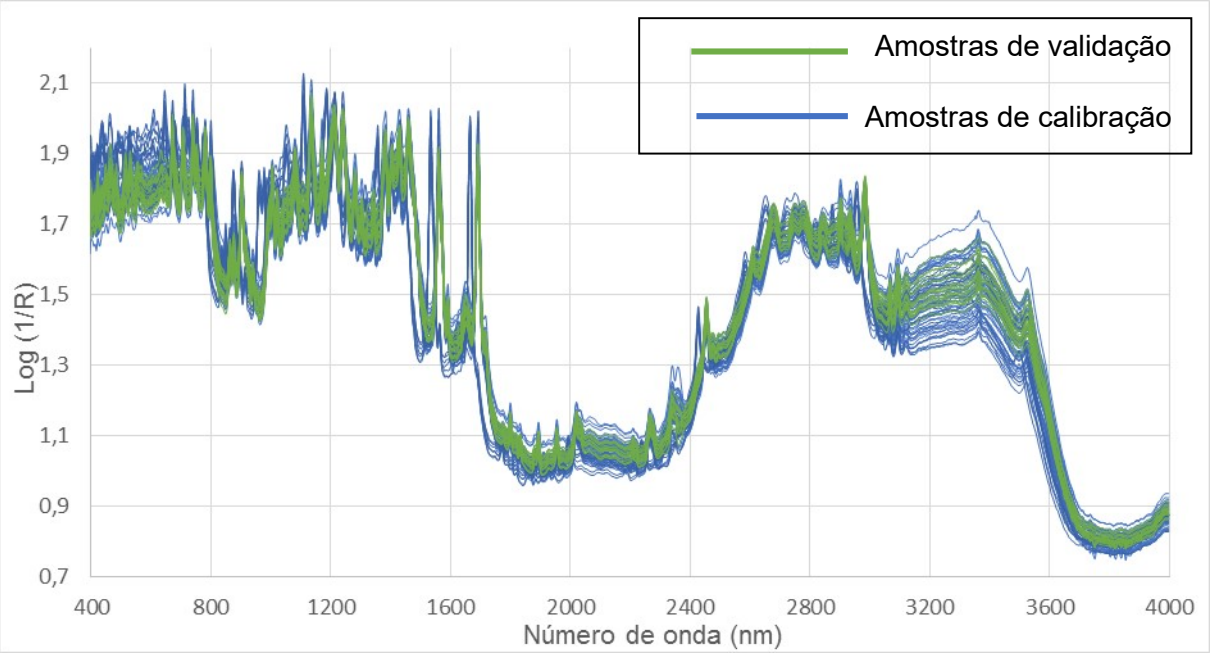
5.2.3 Obtenção de modelos multivariados no infravermelho médio (IVM)

O planejamento experimental, que definiu o número e a composição das amostras para o desenvolvimento do modelo, foi do tipo Planejamento do Composto Central. De acordo com este planejamento, um conjunto de 79 amostras foi definido. As amostras foram divididas em conjunto de calibração (58 amostras) e conjunto de validação (21 amostras).

A Figura 13 mostra os espectros IVM obtidos das 79 amostras obtidas de acordo com o planejamento (Apêndice 2), separados em amostras de validação (verde) e calibração (azul). Observa-se que as amostras de validação abrangem os principais pontos de pesagem, que seriam mais prováveis de ocorrer, os valores de concentração centrais.

Os dados espectrais foram inseridos no software *Matlab*, sendo os dados de número de onda e absorbância relacionados na matriz X (composta por 2559 números de onda nas linhas e 58 amostras nas colunas) e os dados de concentração teórica de ambos os analitos na matriz Y (composta por 2559 números de onda nas linhas e 21 amostras nas colunas).

FIGURA 13 – ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO DAS AMOSTRAS DOS CONJUNTOS DE CALIBRAÇÃO (58 AMOSTRAS) E VALIDAÇÃO (21 AMOSTRAS) DA ASSOCIAÇÃO NTX E BUP



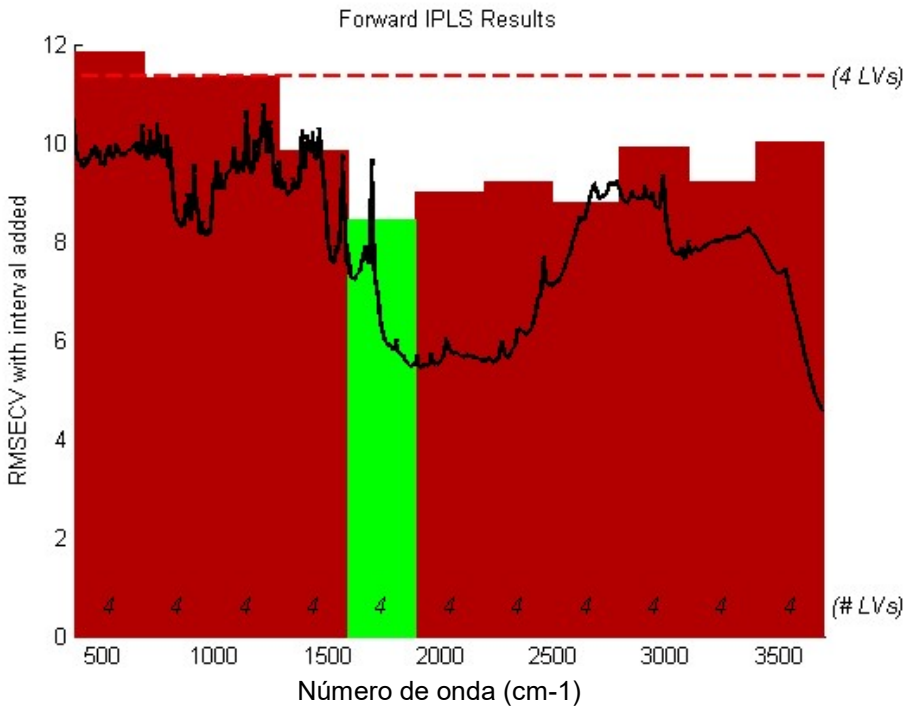
FONTE: O autor (2016).

Modelos PLS preliminares foram testados, através de modelos por PLS 1 (um fármaco de cada vez por modelo) e por PLS 2 (dois ou mais fármacos simultaneamente por modelo). Para a obtenção do modelo, foi realizada a combinação de alguns pré-processamentos dos dados, como por exemplo SNV (*standard normal variate*) ou MSC (*multiplicative scatter correction*), alisamento pelo algoritmo Savitzky-Golay, sempre centrando os dados na média no final (*mean center*).

Os resultados de PLS1 e PLS2 foram comparados, e o PLS2 foi escolhido por apresentar melhores resultados de RMSEC, RMSECV, RMSEP e erro percentual médio de predição, e além de facilitar o processo proporcionando menor tempo de análise de dados por ser mais simples e ter menos etapas (valores observados na tabela 8).

O modelo escolhido foi obtido através do pré-processamento dos dados de ambos os fármacos em primeira derivada e alisamento *Savitzky-Golay*, seguido por dados centrados na média. Foi selecionado o intervalo espectral de 1885,8-1585,4 cm^{-1} (figura 14) que incluem absorções de ambos os fármacos, através do algoritmo iPLS, em que o espectro foi dividido em faixas de 213 cm^{-1}.

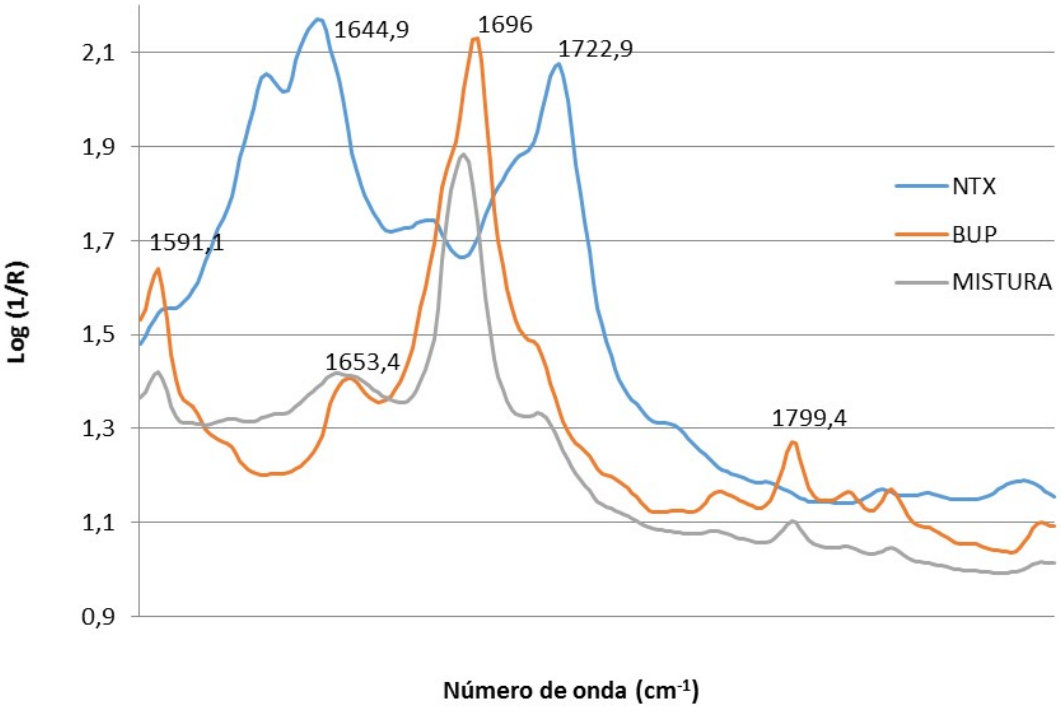
FIGURA 14 – REGIÃO DO ESPECTRO IVM DA MISTURA, SELECIONADA PELO PLS2-IPLS 213 cm^{-1}



FONTE: O autor (2016).

Os espectros da mistura de todos os componentes, e de cada fármaco isolado na faixa selecionada pelo iPLS em 213 cm^{-1} estão representados na figura 15. Verifica-se semelhança entre os espectros da mistura e o espectro do fármaco BUP.

FIGURA 15 – ESPECTROS DOS FÁRMACOS E DA MISTURA NA REGIÃO SELECIONADA PELO ALGORÍTMO IPLS 213cm^{-1}

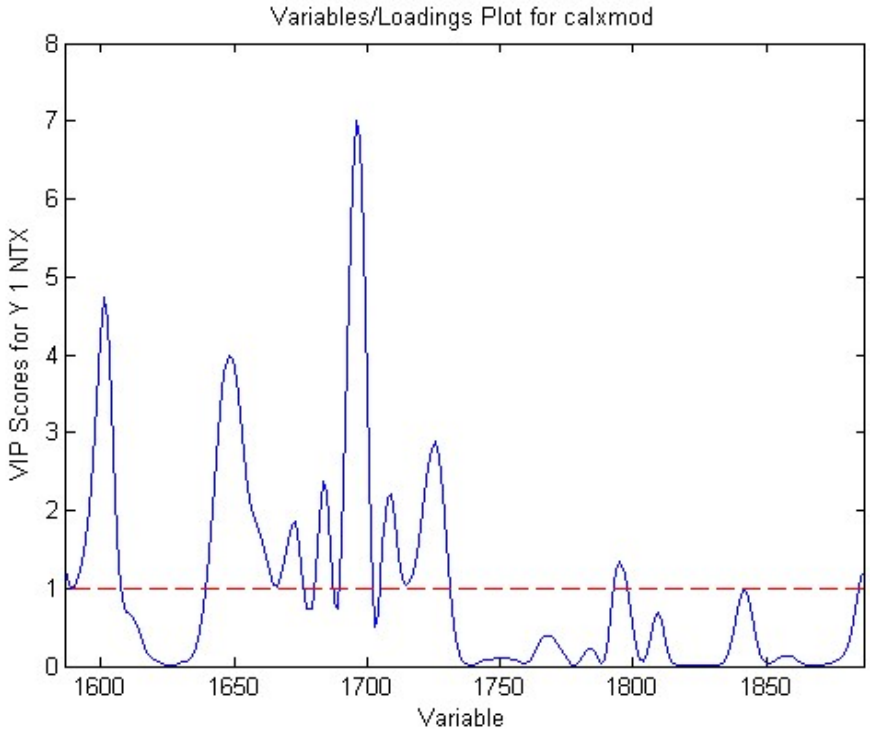


* MISTURA: Mistura dos fármacos e excipientes

FONTE: O autor (2016).

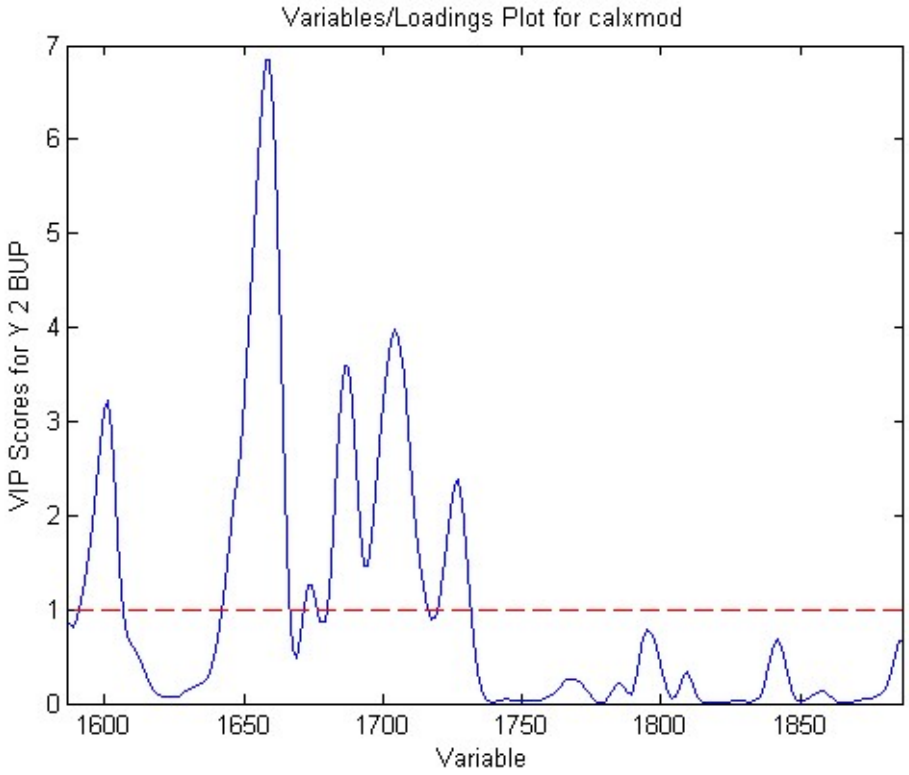
Na faixa selecionada a NTX apresenta picos de absorção referentes ao estiramento da ligação C=C do anel benzênico em 1645 cm^{-1} e estiramento da ligação C=O de cetona em 1705 cm^{-1}. Este pico se une a um pico em 1722 cm^{-1}, que é referente ao estiramento da ligação C=O de ácido carboxílico. Existe absorção em torno de 1600 cm^{-1} que representa também estiramento da ligação C=C do anel aromático (TAVAKOL et al., 2011). Na figura 16 estão representados os VIP *scores* da NTX para este modelo. Este fator demonstra a influência e importância que foi dada para cada número de onda na projeção. Verifica-se a influência dos números de onda 1600 cm^{-1}, 1645 cm^{-1}, 1705 cm^{-1} e 1722 cm^{-1}.

FIGURA 16 – INFLUÊNCIA DA VARIÁVEL NA PROJEÇÃO (*VARIABLE INFLUENCE ON PROJECTION)* – NTX



FONTE: O autor (2016).

FIGURA 17 – INFLUÊNCIA DA VARIÁVEL NA PROJEÇÃO (*VARIABLE INFLUENCE ON PROJECTION)* – BUP



FONTE: O autor (2016).

A BUP apresenta um pico e absorção em 1696cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C=O da cetona, e outro em 1591 cm^{-1} representando a deformação fora do plano da ligação N-H de amida (DEEPIKA; CHELLARAM, 2014). A absorção em 1653 cm^{-1} é referente ao estiramento da ligação C=C do anel benzênico, também presente neste composto. A BUP apresenta pico em torno de 1800 relacionado ao haleto de arila (Cl). Verifica-se através da figura 17 o VIP *score* da BUP para este modelo, e a influência significativa dos números de onda em torno de 1600 cm^{-1}, 1650 cm^{-1}, 1700 cm^{-1} e 1800 cm^{-1}.

O modelo PLS2 explicou 99,66% da variância para o bloco X e 90,20% para o bloco Y. Os valores de erro referentes a calibração (RMSEC), validação cruzada (RMSECV) e predição (RMSEP) podem ser verificados na Tabela 8.

TABELA 8 – ERROS OBSERVADOS PARA OS FÁRMACOS EM ESTUDO NO MODELO IVM-PLS2 DESENVOLVIDO

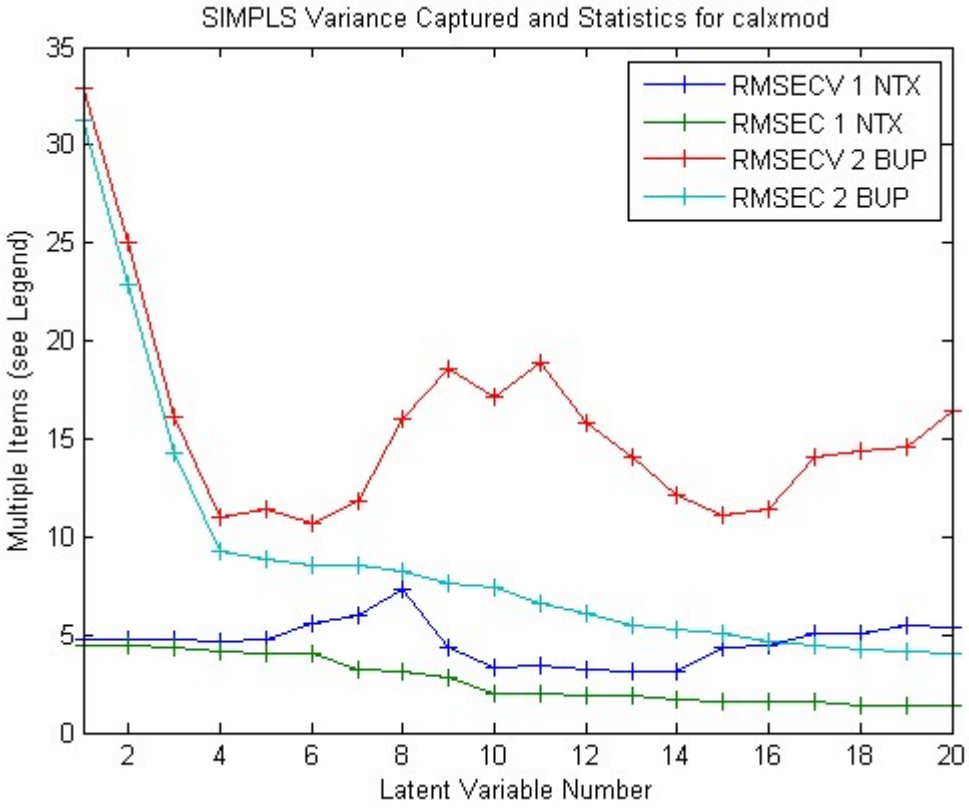
Erros / Fármacos	NTX (mg.g^{-1})	BUP (mg.g^{-1})
RMSEC	4,13	8,99
RMSECV	4,62	10,79
RMSEP	1,83	6,89

FONTE: O autor (2016).

Os valores obtidos são calculados com relação ao valor em miligramas que foi pesado de cada fármaco por grama. Em ambos os casos o valor de RMSEP ficou mais baixo do que o RMSEC. Justifica-se este valor, principalmente pelo fato do valor pesado da NTX ser muito baixo. Um fator que pode ter aumentado um pouco os erros é o fato de ter sido realizada uma variação de 5% dos excipientes durante o planejamento experimental, o que não é usual. Como dito anteriormente, alterações nas concentrações dos componentes da formulação podem interferir no modelo. Entretanto, os valores foram considerados satisfatórios.

O número de VL foi definido com base nos resultados, apresentados no gráfico da figura 18, que representa o RMSECV x VL de cada analito, mas avaliados simultaneamente. Através deste constata-se que acima de 4 VL o modelo não melhora, já que o RMSECV aumenta ligeiramente, e o RMSEC aumenta ou não diminui significativamente. A contribuição para a explicação dos eixos não aumentou significativamente a partir de 4VL. Portanto, selecionou-se 4VL.

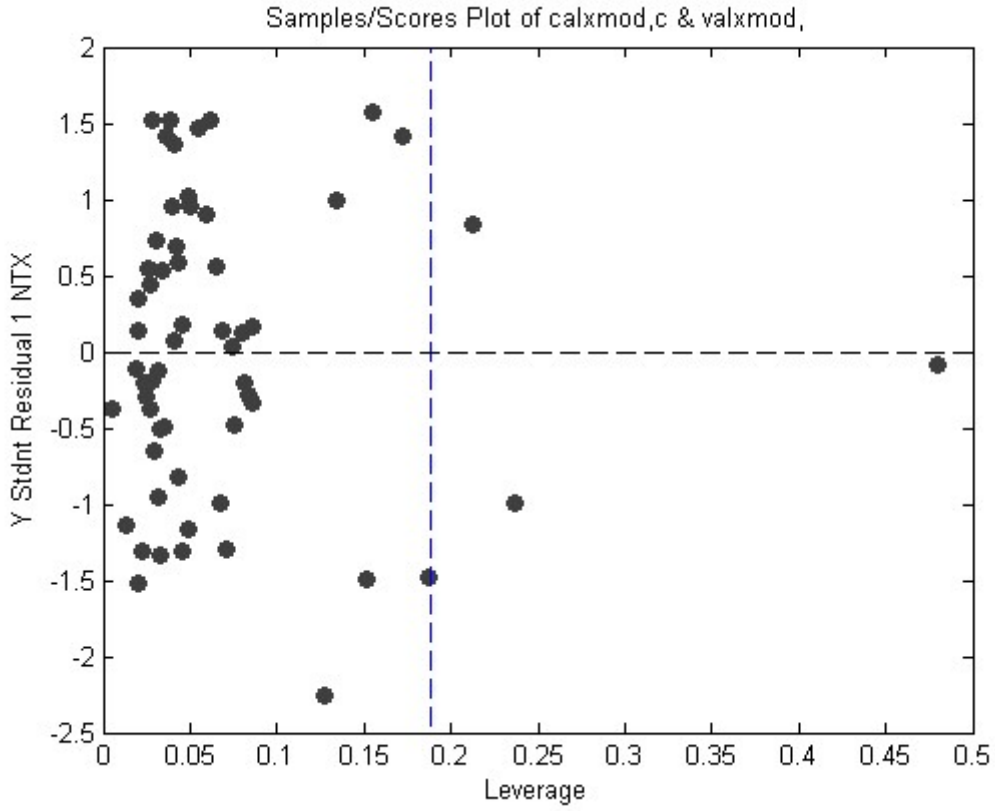
FIGURA 18 – ESCOLHA DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES PARA O MODELO IVM-PLS2



FONTE: O autor (2016).

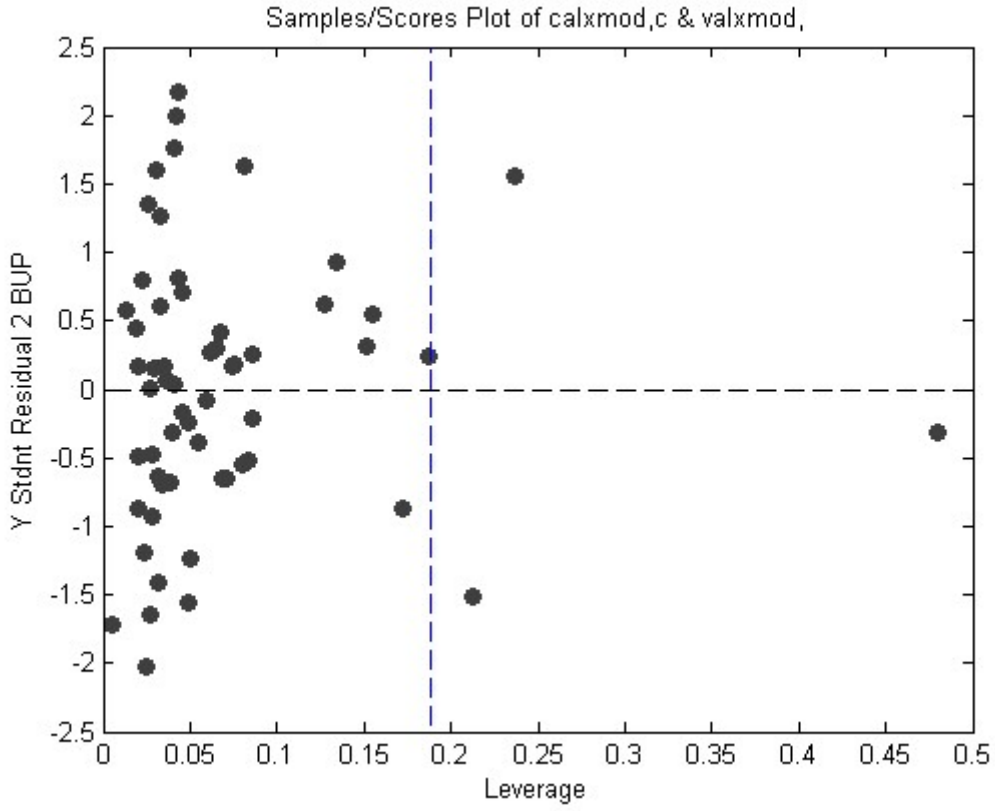
Não foram identificadas amostras anômalas (*outliers)* para os fármacos em associação no modelo selecionado, de acordo com o critério para resíduos de *Student versus Leverage* (gráficos demonstrados nas figuras 19 e 20), pois nenhuma amostra apresentou simultaneamente altos valores destes critérios, ou seja, valores acima de ± 2,5 para resíduos de *Student* e 3x(VL)/n, considerando um limite de confiança de 95%.

FIGURA 19 – AVALIAÇÃO DE OUTLIERS NA QUANTIFICAÇÃO DE NTX NO MODELO IVM-PLS2



FONTE: O autor (2016).

FIGURA 20 - AVALIAÇÃO DE OUTLIERS NA QUANTIFICAÇÃO DE BUP NO MODELO IVM-PLS2



FONTE: O autor (2016).

Apenas uma amostra foi identificada como possível *outlier*, no entanto ela ultrapassa o limite apenas em *Leverage*, mas não ultrapassa simultaneamente em *Student*, o que não a caracteriza como um *outlier*. Esta amostra foi retirada do modelo quimiométrico e como não houve diferença significativa nos parâmetros do modelo, ela foi mantida no modelo original.

5.3 Validação do modelo multivariado

O método desenvolvido neste trabalho enquadra-se, segundo sua finalidade, na categoria I (teste quantitativo para determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas), a qual exige quais figuras de mérito são necessárias para a validação de métodos univariados (ANVISA, 2003).

O processo de validação também foi realizado considerando as figuras de mérito aplicáveis ao modelo multivariado de calibração.

5.3.1 Precisão

Para o método IVM-PLS2, o DPR para o NTX ficou na faixa de 2,9 a 3,5%, enquanto que para precisão intermediária ficou em torno de 3,2%. O DPR para a BUP ficou entre 3,6 e 3,7% (repetibilidade) e em torno de 4,5% para a precisão intermediária. Os valores obtidos demonstram que o método apresenta adequada precisão, já que o valor de DPR não ultrapassou o limite máximo estabelecido (5%) pela RDC 899/2003 (BRASIL, 2003) (tabela 9).

TABELA 9 – PRECISÃO

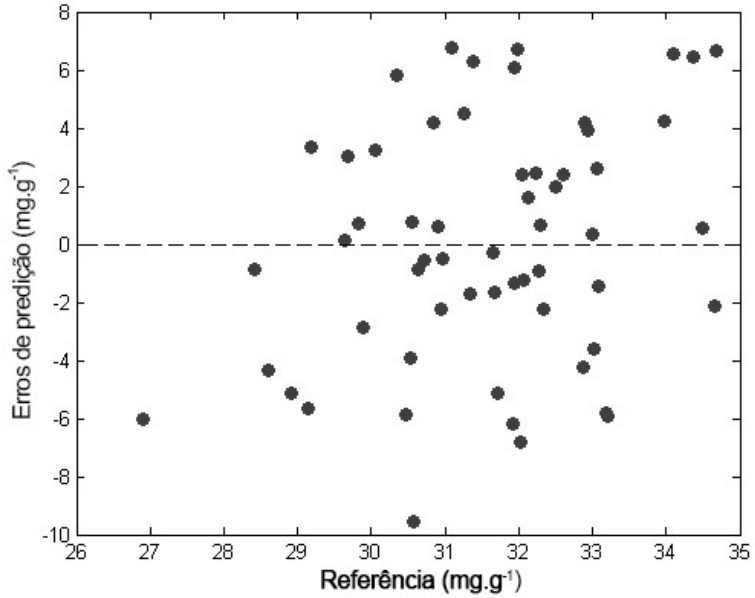
	DPR NTX (%)	**DPR BUP (%)**
Repetibilidade	2,9 – 3,5	3,6 – 3,7
Precisão intermediaria	3,2	4,5

5.3.2 Linearidade

Na calibração multivariada em PLS existe uma dificuldade em determinar a linearidade, já que as variáveis são decompostas pelas variáveis latentes. Não

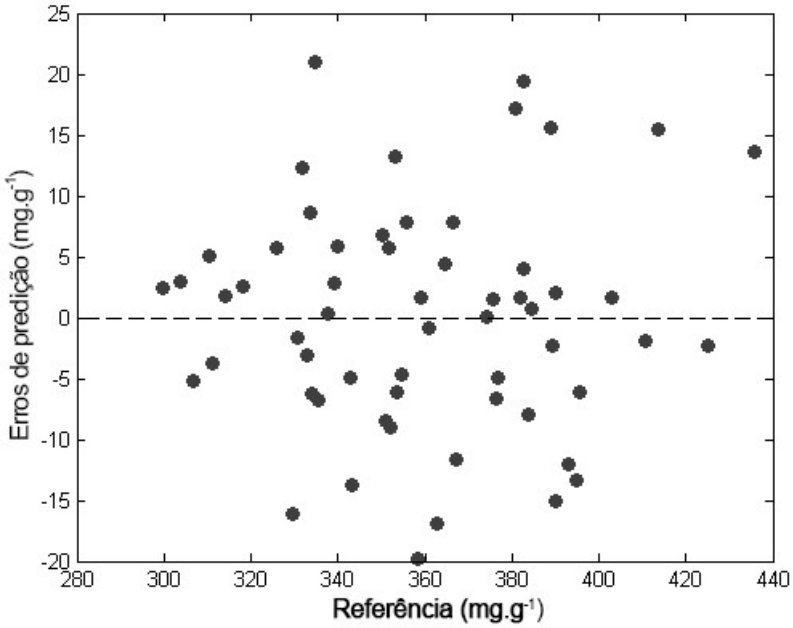
existem curvas de calibração (sinal analítico x concentração) para modelos multivariados (VALDERRAMA et al., 2009).

FIGURA 21 – AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE PELA DISTRIBUIÇÃO DOS RESÍDUOS NO MODELO IVM-PLS2 NTX



FONTE: O autor (2016).

FIGURA 22 – AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE PELA DISTRIBUIÇÃO DOS RESÍDUOS NO MODELO IVM-PLS2 BUP



FONTE: O AUTOR (2016).

Uma forma de avaliar a linearidade é através da verificação do comportamento aleatório da distribuição dos erros para cada um dos analitos, conforme demonstrado nas figuras 21 e 22, onde os valores estão distribuídos tanto para cima do zero quanto para baixo, podendo-se concluir que há linearidade no modelo multivariado desenvolvido.

5.3.3 Seletividade, Sensibilidade e Sensibilidade analítica

Em modelos multivariados, a interpretação do conceito de SEL (seletividade) é diferente dos univariados, e prevê a porcentagem do espectro que foi utilizada para a determinação de cada fármaco dentro de um determinado grupo de amostras de composição semelhante. Para o método IVM-PLS2 desenvolvido foi estimado que 9,74% do sinal analítico foram utilizados para prever NTX e 12,62% para a BUP, o que era esperado já que foi utilizada apenas uma faixa do espectro.

O valor puro da sensibilidade (SEN) não é apropriado para a comparação com outros métodos, e seus valores foram divididos pela estimativa do ruído instrumental e a sensibilidade analítica (SA), conforme equação 2. O ruído em todos os modelos também apresentou valores baixos, não comprometendo os resultados obtidos. O valor de ruído para o modelo validado foi de $7{,}2852 \times 10^{-4}$. O inverso de SA de γ indica a mínima diferença de concentração que o método é capaz de discriminar considerando o ruído instrumental aleatório como única fonte de erro (equação 3). O valores encontrados foram $7{,}20 \times 10^{-3}$ $mg.g^{-1}$ para a NTX e $5{,}8 \times 10^{-3}$ $mg.g^{-1}$ para a BUP, considerados satisfatórios para as concentrações de trabalho de cada fármaco.

5.3.4 Exatidão

A exatidão do método para a quantificação dos fármacos em associação foi verificada utilizando-se os valores de RMSEC, RMSECV e RMSEP, os quais foram considerados baixos para todos os modelos, indicando que os métodos são exatos (equação 6). Os valores são apresentados em $mg.g^{-1}$ total do fármaco na tabela 12. Entretanto, os valores acima podem ter sido aumentados um pouco devido à inclusão de uma variação de 5% dos excipientes no planejamento experimental, o que também pode ser considerado um teste de robustez.

Na tabela 10 podemos observar os valores de concentração real de cada fármaco, os valores preditos e a porcentagem de recuperação de cada um deles. Conclui-se que o método é exato, já que os valores recuperados encontram-se no geral em torno de 100%. O valor de p no teste t das concentrações teóricas e práticas para a NTX foi de 0,35 e para a BUP foi de 0,80, demonstrando que os valores são estatisticamente iguais.

TABELA 10 – EXATIDÃO

NTX			BUP		
Concentração Real ($mg.g^{-1}$)	**Concentração Predita ($mg.g^{-1}$)**	**% Recuperação**	**Concentração Real ($mg.g^{-1}$)**	**Concentração Predita ($mg.g^{-1}$)**	**% Recuperação**
31,51	31,32	99,42	361,11	363,72	100,72
32,54	34,01	104,50	340,78	346,30	101,62
30,47	30,81	101,11	384,71	382,67	99,47
34,79	31,94	91,80	359,78	353,59	98,28
28,84	30,50	105,75	361,99	358,62	99,07
31,46	30,78	97,85	360,96	348,88	96,65
31,57	30,94	98,01	360,95	354,25	98,14
30,36	29,97	98,71	380,68	381,49	100,21
34,07	31,24	91,70	359,91	356,28	98,99
32,34	31,83	98,42	345,76	351,79	101,74
29,55	31,06	105,10	361,60	357,04	98,74
30,65	30,89	100,78	376,36	372,16	98,88
33,92	31,12	91,74	360,64	353,87	98,12
34,75	33,01	94,98	326,11	331,36	101,61
28,14	28,90	102,68	396,00	397,33	100,34
32,36	30,57	94,48	371,21	370,62	99,84
33,06	33,75	102,08	362,20	367,79	101,54
30,17	30,94	102,56	329,58	330,18	100,18
35,44	32,45	91,56	389,08	384,08	98,71

FONTE: O autor (2016).

5.3.5 Robustez

A robustez avaliou o aumento de Lactose e a diminuição da Celulose Microcristalina e do HPMC. Aplicou-se o teste t para os valores de concentração encontrados para os dois fármacos nas três misturas, pelo modelo IVM desenvolvido, e não se observou diferença significativa ($p<0,05$), indicando que o método foi robusto em relação à variação na concentração dos excipientes majoritários (tabela 11).

TABELA 11 – TESTE DE ROBUSTEZ

Testes Robustez	NTX		BUP	
	Concentração real ($mg.g^{-1}$)	Concentração predita ($mg.g^{-1}$)	Concentração real ($mg.g^{-1}$)	Concentração predita ($mg.g^{-1}$)
1	31,60	31,12	349,57	356,84
	31,77	32,50	364,62	372,59
	31,70	31,56	368,37	355,38
	p = 0,94		**p = 0,93**	
2	31,60	32,05	349,57	379,78
	31,77	31,82	364,62	382,57
	31,70	32,84	368,37	342,36
	p = 0,16		**p = 0,63**	

5.3.6 Bias

O valor de *bias* calculado para as amostras de validação foi zero ou próximo de zero para o modelo IVM-PLS2 (equação 7) demonstrando a ausência de erros sistemáticos nos modelos.

5.3.7 Desvio Padrão de Previsão (*Residual Prediction Deviation*- RPD)

O RPD mínimo para o método IVM-PLS2 foi estimado para a NTX em 0,46 para a previsão de calibração e 0,66 para a previsão de validação. Para a BUP foi estimado RPD de 2,17 para a previsão na calibração e 2,04 para a validação.

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

Apesar de não ser necessário para este tipo de método, o LQ e o LD também foram estimados (equação 4 e 5), e considerados com valores baixos. O valores estão descritos na tabela 12.

Um resumo dos resultados da validação do método IVM-PLS2 está apresentado na tabela 12.

TABELA 12 - PARÂMETROS ESTIMADOS PARA DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO IVM-PLS2

FIGURAS DE MÉRITO	**PARÂMETROS**	**IVM-PLS2 1885,8-1585,4 cm^{-1}**	
		NTX	**BUP**
Precisão (%)	DPR repetibilidade DPR intermediária	2,9-3,5 3,2	3,6-3,7 4,5
Exatidão ($mg.g^{-1}$)	RMSEC RMSECV RMSEP	4,1 4,6 1,8	9,2 10,9 6,4
Intervalo ($mg.g^{-1}$)		23,1 - 41,8	296,1 – 417,3
Seletividade		0,098	0,1262
Sensibilidade Analítica $(mg.g^{-1})^{-1}$	γ	137,97	173,16
Inverso da Sensibilidade Analítica ($mg.g^{-1}$)	γ^{-1}	$7,20x10^{-3}$	$5,8x10^{-3}$
Ruído instrumental ($mg.g^{-1}$)	E	$7,29\ x10^{-3}$	
RPD	Calibração Validação	0,46 0,66	2,17 2,04
*Bia*s		0	0
Robustez		p>0,05	p>0,05
LD ($mg.g^{-1}$)		0,02	0,02
LQ ($mg.g^{-1}$)		0,07	0,06

FONTE: O autor (2014).

DPR: Desvio Padrão Residual

RMSEC: Raiz quadrada do erro médio de calibração (*Root Mean* Standard Error of Calibration)

RMSECV:Raiz quadrada do erro médio de calibração cruzada (*Root Mean* Standard Error of Calibration)

RMSEP:Raiz quadrada do erro médio de predição (*Root Mean* Standard Error of Predition)

RPD: Desvio Padrão de Previsão (*Residual Prediction Deviation*)

LD: Limite de Detecção

LQ: Limite de Quantificação

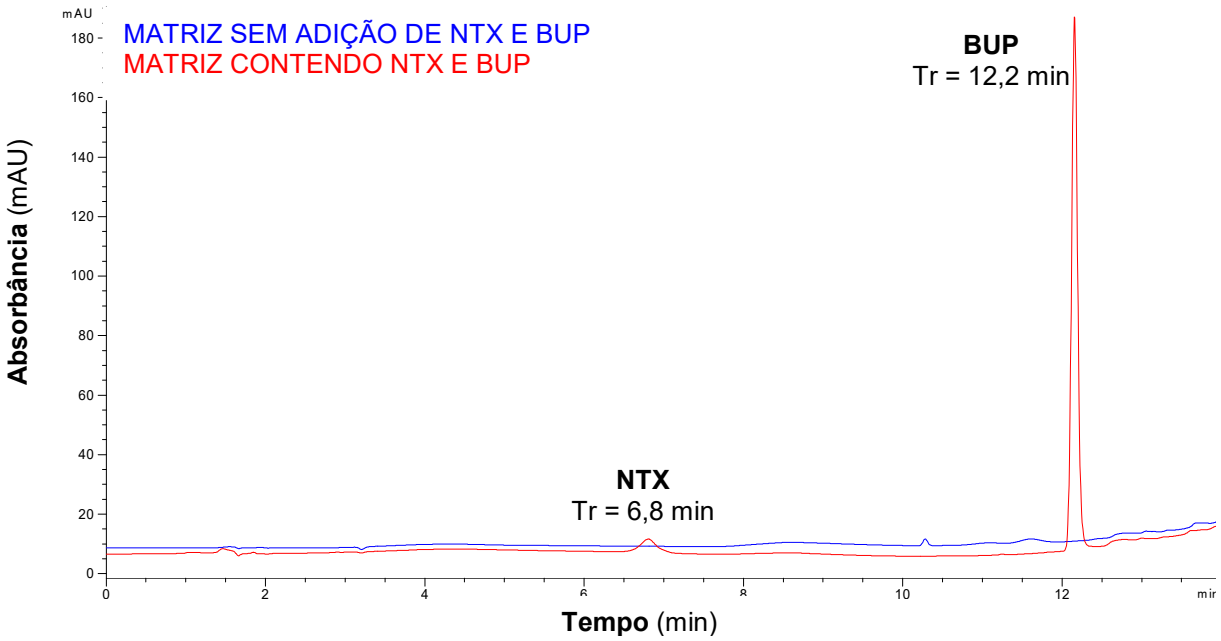
5.4 Validação do método em CLAE-DAD

Pelo fato de não se conseguir reproduzir os métodos encontrados na literatura, tendo em vista que algumas condições cromatográficas descritas não estavam compreensíveis, optou-se pelo desenvolvimento de um novo método. As condições cromatográficas foram selecionadas conforme descrito no item 4.6.1. Após desenvolvido, o método foi validado foi realizada conforme Resolução RE 899 de março de 2003.

5.4.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada através dos resultados da análise por CLAE-DAD da matriz contendo os analitos, e da matriz isenta. Os cromatogramas das matrizes foram sobrepostos e avaliados para verificar se algum componente da matriz interfere na quantificação dos analitos. A figura 23 mostra o resultado desta análise. Pelos cromatogramas pode se observar que nenhum componente da matriz tem absorção significativa nas regiões correspondentes aos tempos de retenção da NTX e BUP, indicando que o método tem seletividade adequada.

FIGURA 23 – COMPARAÇÃO DOS CROMATOGRAMAS DA MATRIZ NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DOS ANALITOS



Nota: Condições de análise: Fase Móvel - água contendo 0,1% trietilamina e acetonitrila; eluição gradiente; fluxo de 1mL.min^{-1}; temperatura do forno 40^{o}C; detecção em 230 nm, volume de injeção 20µL.

FONTE: O autor (2016).

5.4.2 Curva de calibração – Linearidade e Intervalo

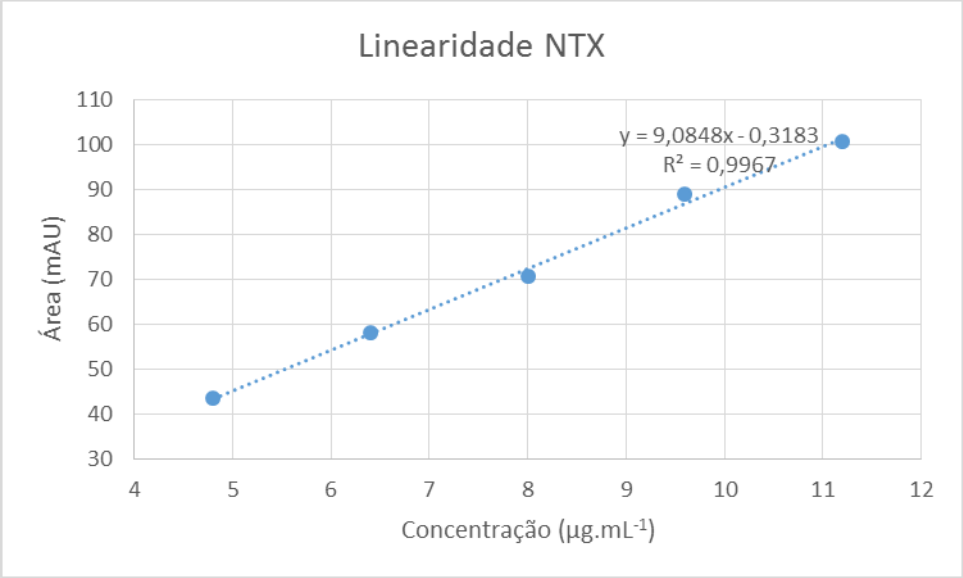
A tabela 13 mostra os resultados da avaliação da linearidade. Foram avaliados 5 pontos de diferentes concentrações. As diferentes concentrações refletem diferentes valores de áreas dos picos cromatográficos. Estes valores, quando plotados em um gráfico, dão origem à uma reta, obtendo-se uma equação da reta e o coeficiente de correlação (R). O coeficiente de variação (CV%) foi determinado a fim de avaliar a dispersão dos dados em cada nível de concentração. Para calcular as incertezas ao longo da curva de calibração, a análise de variância de resíduos foi aplicada em cada curva obtida. Os valores de R^2 obtidos para a curva de calibração foram maiores que 0,99, e podem ser observados nas figuras 24 e 25. O coeficiente de variação foi menor de 5%, o que significa que o método manteve linearidade.

TABELA 13 – RESULTADOS OBTIDOS NO TESTE DE LINEARIDADE

Níveis	NTX (µg/mL)				BUP (µg/mL)			
	Conc. Teórica ($\mu g.mL^{-1}$)	Conc. Real ($\mu g.mL^{-1}$)	Média ± DP	DPR (%)	Conc. Teórica ($\mu g.mL^{-1}$)	Conc. Real ($\mu g.mL^{-1}$)	Média ± DP	DPR (%)
1	4,80	4,79	4,72 ± 0,11	2,28	54,00	53,27	53,45 ± 0,13	0,24
		4,81				53,58		
		4,57				53,49		
2	6,40	6,37	6,30 ± 0,06	0,91	72,00	72,17	72,27 ± 0,17	0,23
		6,23				72,51		
		6,31				72,14		
3	8,00	7,57	7,70 ± 0,18	2,37	90,00	89,61	89,81 ± 0,15	0,16
		7,56				89,85		
		7,95				89,97		
4	9,60	9,74	9,66 ± 0,07	0,73	108,00	108,24	108,10 ± 0,29	0,27
		9,66				107,69		
		9,57				108,37		
5	12,20	10,97	10,93 ± 0,05	0,46	126,00	126,21	126,13 ± 0,06	0,05
		10,86				126,06		
		10,97				126,12		

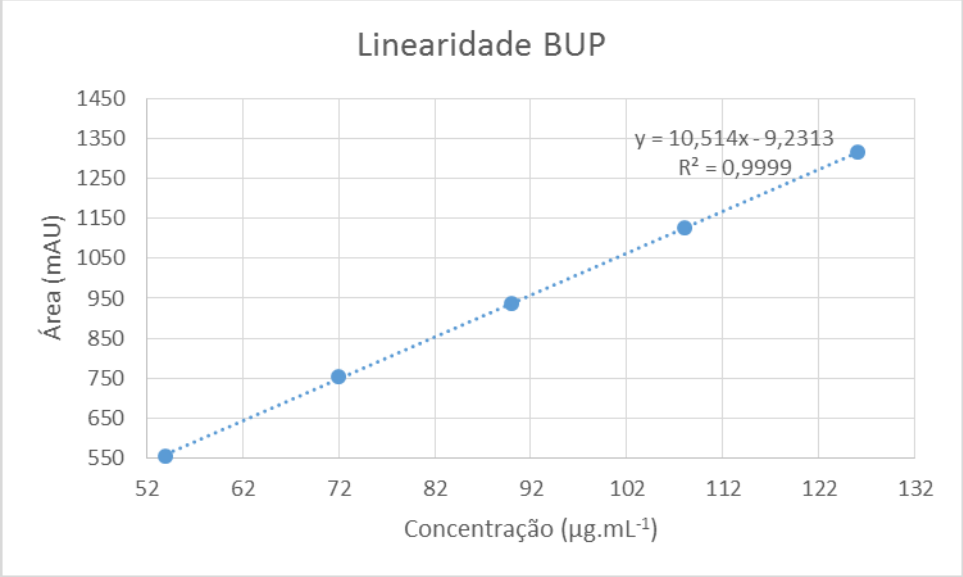
FONTE: O autor (2016).

FIGURA 24 - GRÁFICOS DE LINEARIDADE DA NALTREXONA



FONTE: O autor (2016).

FIGURA 25 – GRÁFICO DE LINEARIDADE DA BUPROPIONA



FONTE: O autor (2016).

5.4.3 Precisão

A precisão do método foi determinada em dois níveis: repetibilidade (precisão intra-dia) e precisão intermediária (inter-dia). Para a determinação da repetibilidade, soluções padrões foram preparadas no mesmo nível de concentração (ponto central), em sextuplicata, e as amostras foram injetadas no cromatógrafo em um intervalo de tempo curto, sendo as áreas de cada analito e suas concentrações

obtidas comparadas. A determinação da precisão intermediaria seguiu os mesmos critérios utilizados no ensaio de repetibilidade. No entanto, o preparo e as injeções das amostras foram em dias diferentes e com um segundo analista. Os resultados se apresentam na tabela 14.

TABELA 14 – RESULTADOS DO ENSAIO DE PRECISÃO

Analitos	Concentração teórica ($\mu g.mL^{-1}$)	Analista 1 (Média ± DP) ($\mu g.mL^{-1}$)	Analista 2 (Média ± DP) ($\mu g.mL^{-1}$)	Média A1 A2 ($\mu g.mL^{-1}$)	DPR (%)	Teste t (p)
NTX	7,86*	7,80 ± 0,07	7,87 ± 0,16	7,83 ± 0,12	1,55	0,25
BUP	90,00	90,40 ± 0,39	89,99 ± 0,38	90,20 ± 0,43	0,47	0,09

FONTE: O autor (2016).

* Valor corrigido com teor do fármaco

Nota: Os valores de p>0,05 indicam que não há diferença estatística significativa.

5.4.4 Exatidão

A exatidão foi realizada através do método da adição do padrão, e determinação da porcentagem recuperada de cada fármaco, calculada através da comparação das concentrações teóricas e experimentais dos analitos. Através dos resultados apresentados na tabela 15, avaliamos que o método pode ser considerado exato, já que os valores para as concentrações práticas estão dentro do intervalo de confiança, e a recuperação dos fármacos foi próximo de 100%.

TABELA 15- RESULTADOS DO TESTE DE EXATIDÃO

Concentração	NTX				BUP			
	Concentração teórica (µg/mL)*	Concentração encontrada (µg/mL)	Intervalo de confiança (µg/mL)	Recuperação (%)	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração encontrada (µg/mL)	Intervalo de confiança (µg/mL)	Recuperação (%)
Baixa	6,29	6,07	5,36 – 6,61	96,43	72	69,6	63,67 – 78,02	96,67
		5,7		90,55	72	68,79		95,54
		6,18		98,27	72	74,15		102,99
Média	7,86	7,97	6,94 – 8,35	101,37	90	89,48	86,28 – 92,85	99,43
		7,52		95,59	90	90,93		101,03
		7,45		94,71	90	88,29		98,1
Alta	9,44	9,86	8,63 – 10,31	104,48	108	105,51	97,84 – 108,31	97,69
		9,27		98,23	108	101,82		94,27
		9,28		98,35	108	101,9		94,35

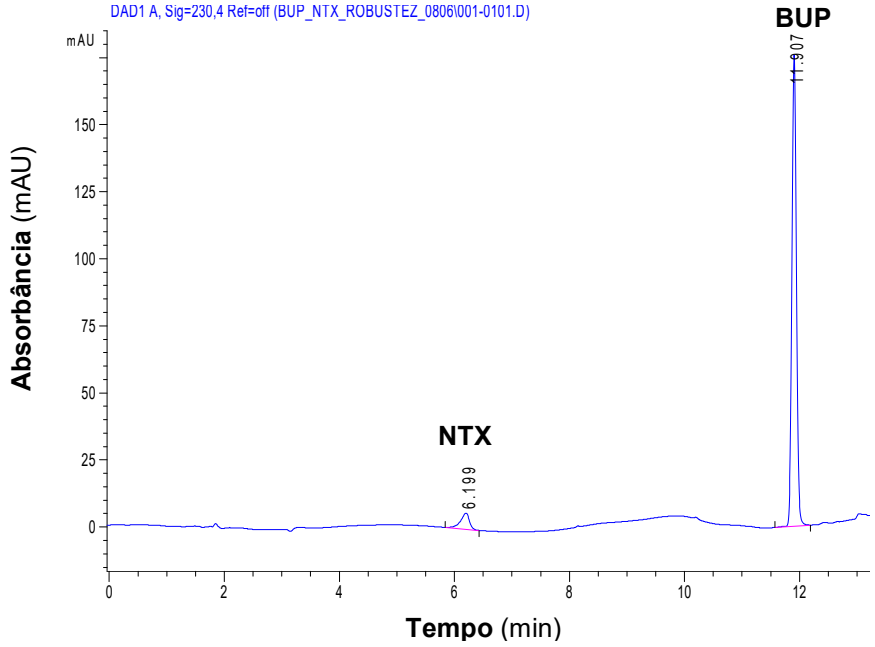
FONTE: O autor (2016).

* Valor corrigido com teor do fármaco.

5.4.5 Robustez

Primeiramente, foram analisadas amostras em condições normais do método, para possibilitar a comparação das demais corridas com um controle (figura 26).

FIGURA 26 – CROMATOGRAMA DOS COMPOSTOS NTX E BUP EM CONDIÇÕES NORMAIS DO MÉTODO



Nota: Condições de análise: Fase Móvel - água contendo 0,1% trietilamina e acetonitrila; eluição gradiente; fluxo de 1mL.min^{-1}; temperatura do forno 40^{o}C; detecção em 230 nm, volume de injeção 20µL.

FONTE: O autor (2016).

Foram analisados os resultados obtidos para a Robustez do método, e não foi observada diferença significativa para as alterações de temperatura do sistema, volume de injeção, proporção dos componentes da fase móvel e lote de coluna, conforme discutido abaixo. Observou-se que o pH é um parâmetro crítico para o método, e deve ser rigorosamente controlado.

5.4.5.1 Alteração de pH do meio

Analisando os valores obtidos para a concentração dos fármacos na variação do pH, constata-se que o pH deve ser rigorosamente controlado, pois influencia tanto no tempo de retenção dos analitos, quanto na concentração obtida (ver tabela 16).

Quanto ao tempo de retenção, observou-se reduzido em pH 6,3, e aumentado em pH 6,7 para os dois fármacos. Os dados da área do componente NTX aumentaram significativamente em pH 6,3, e diminuíram em pH 6,7. Já a BUP teve comportamento inverso, obtendo uma maior área de pico em pH 6,7, e menor área em pH 6,3, relacionando-se os valores com os obtidos em pH 6,5. Apesar de este comportamento ter sido observado, o erro relativo dos valores obtidos em pH 6,7 encontraram-se menores que 5%. Já para o pH 6,3, a variação foi um pouco maior. Para a BUP, o erro relativo ainda ficou menor que 10%. A NTX, que possui massa menor dentro da mistura, sofreu uma maior alteração dos resultados (ver tabela 16).

TABELA 16 – VALORES DE CONCENTRAÇÃO OBTIDOS DOS FÁRMACOS NTX E BUP COM VARIAÇÃO DO pH

Variação	NTX			BUP		
	Concentração teórica* (µg/mL)	**Média Concentração (µg/mL)**	**Erro relativo (%)**	**Concentração teórica (µg/mL)**	**Média Concentração (µg/mL)**	**Erro relativo (%)**
CQM	7,86	8,06	+02,44	90,00	90,87	+0,97
pH 6,3		9,64	+22,52		84,20	-3,56
pH 6,7		7,42	-5,59		95,35	+5,95

* Valor de concentração corrigido com teor do fármaco.
FONTE: O autor (2016).

5.4.5.2 Alteração da Temperatura do sistema

Através dos resultados obtidos nas análises dos compostos em estudo com temperatura menor (38ºC) e maior (41ºC) que o determinado em nosso método (40ºC), não foi observada diferença significativa comparando-se às amostras controle (menor que 5%) (Tabela 17). Apenas foi percebido leve aumento no tempo de retenção na temperatura de 41ºC, e leve diminuição do tempo de retenção na temperatura de 39ºC.

TABELA 17 – VALORES DE CONCENTRAÇÃO OBTIDOS DOS FÁRMACOS NTX E BUP COM VARIAÇÃO DE TEMPERATURA

Variação	**NTX**			**BUP**		
	Concentração teórica (µg/mL)	**Média Concentração (µg/mL)**	**Erro relativo (%)**	**Concentração teórica (µg/mL)**	**Média Concentração (µg/mL)**	**Erro relativo (%)**
CQM	7,86*	8,06	+2,44	90,00	90,87	+0,97
TEMP 39ºC		8,35	+0,23		90,17	+0,19
TEMP 41ºC		7,91	-0,56		90,20	+0,22

* Valor de concentração corrigido com teor do fármaco.
FONTE: O autor (2016).

5.4.5.3 Alteração do volume de injeção

Não foi observada diferença significativa entre os resultados das análises com o método padrão (10µL), e o método com volumes de injeção de 9,8 µL e 10,2 µL (obtidos valores com diferença menor que 5% comparados aos valores das amostras controle, conforme Tabela 18. Percebe-se que existe uma tendência sutil de uma menor área de pico para o menor volume de injeção, e assim, uma maior área de pico para um maior volume de injeção. Não houve variação significativa no tempo de retenção dos fármacos.

TABELA 18 – VALORES DE CONCENTRAÇÃO OBTIDOS DOS FÁRMACOS NTX E BUP COM VARIAÇÃO DE VOLUME DE INJEÇÃO

Variação	NTX			BUP		
	Concentração teórica (µg/mL)	**Média Concentração (µg/mL)**	**Erro relativo (%)**	**Concentração teórica (µg/mL)**	**Média Concentração (µg/mL)**	**Erro relativo (%)**
CQM	7,86*	7,89	+0,27	90,00	90,32	+0,36
Volume injeção 9,8 µL		7,79	-0,92		88,77	-1,36
Volume injeção 10,2 µL		7,97	+1,28		91,98	+2,20

* Valor de concentração corrigido com teor do fármaco.
FONTE: O autor (2016).

5.4.5.4 Alteração da proporção fase móvel

Os resultados obtidos para este teste demonstram robustez do método para uma discreta alteração na proporção dos componentes da fase móvel (Tabela 19). O tempo de retenção variou muito pouco, cerca de 0,1 minuto, sendo que os picos saíram antes com a fase móvel contendo maior proporção de solvente orgânico (ACN) comparadas às outras - 78:22 (água:ACN *v/v)* (vide página 111 e 112).

TABELA 19 - VALORES DE CONCENTRAÇÃO OBTIDOS DOS FÁRMACOS NTX E BUP COM VARIAÇÃO DA PROPORÇÃO DOS COMPONENTES DA FASE MÓVEL

Variação	NTX			BUP		
	Concentração teórica (µg/mL)	Média Concentração (µg/mL)	Erro relativo (%)	Concentração teórica (µg/mL)	Média Concentração (µg/mL)	Erro relativo (%)
CQM	7,86*	7,89	+0,27	90,00	90,32	+ 0,36
FASE MÓVEL 78:22 (água : ACN *v/v*)		7,82	-0,55		89,97	- 0,04
FASE MÓVEL 82:18 (água : ACN *v/v*)		7,89	+0,26		90,18	+ 0,20

* Valor de concentração corrigido com teor do fármaco.
FONTE: O autor (2016).

5.4.5.5 Alteração de lote de coluna

A validação em diferentes lotes de coluna foi satisfatória, pois comparando-se os resultados obtidos nas duas colunas (valores apresentados na tabela 20), não se obteve diferença maior que 5%. Não foi percebida alteração significativa no tempo de retenção.

TABELA 20 - VALORES DE CONCENTRAÇÃO OBTIDOS DOS FÁRMACOS NTX E BUP COM DIFERENTES LOTES DE COLUNA

Variação	NTX			BUP		
	Concentração teórica (µg/mL)	Média Concentração (µg/mL)	Erro relativo (%)	Concentração teórica (µg/mL)	Média Concentração (µg/mL)	Erro relativo (%)
Coluna lote 1	7,86*	8,06	+2,44	90,00	90,87	+0,97
Coluna lote 2		8,20	+4,32		89,89	-0,22

* Valor de concentração corrigido com teor do fármaco.
FONTE: O autor (2016).

5.5 Quantificação dos fármacos em amostras reais

Foram analisadas amostras comerciais adquiridas em farmácia de manipulação, através dos métodos validados de CLAE-DAD e IVM-PLS2. As amostras comerciais foram submetidas ao que foi considerado o melhor modelo IVM-PLS2 para a quantificação da associação de NTX e BUP. Os valores médios de concentração dos fármacos em estudo encontrados dentro da formulação comercializada, e seus respectivos DP são apresentados na tabela 21. Através

destes valores, verifica-se a concordância entre os resultados para a quantificação dos fármacos em associação para os dois métodos avaliados. De acordo com o teste t, não houve diferenças significativas entre as predições dos métodos desenvolvidos para IVM-PLS2 e CLAE, para ambos os analitos, das duas formulações, no nível de confiança de 95%, demonstrando que o método IVM-PLS2 pode ser utilizado na quantificação da associação dos fármacos em estudo. O valor de p no teste t para a NTX foi 0,06, e para BUP foi 0,49.

TABELA 21 – VALORES OBTIDOS PARA NTX E BUP NAS AMOSTRAS COMERCIAIS ATRAVÉS DO MÉTODO EM HPLC VALIDADO E MÉTODO DESENVOLVIDO EM IV-M

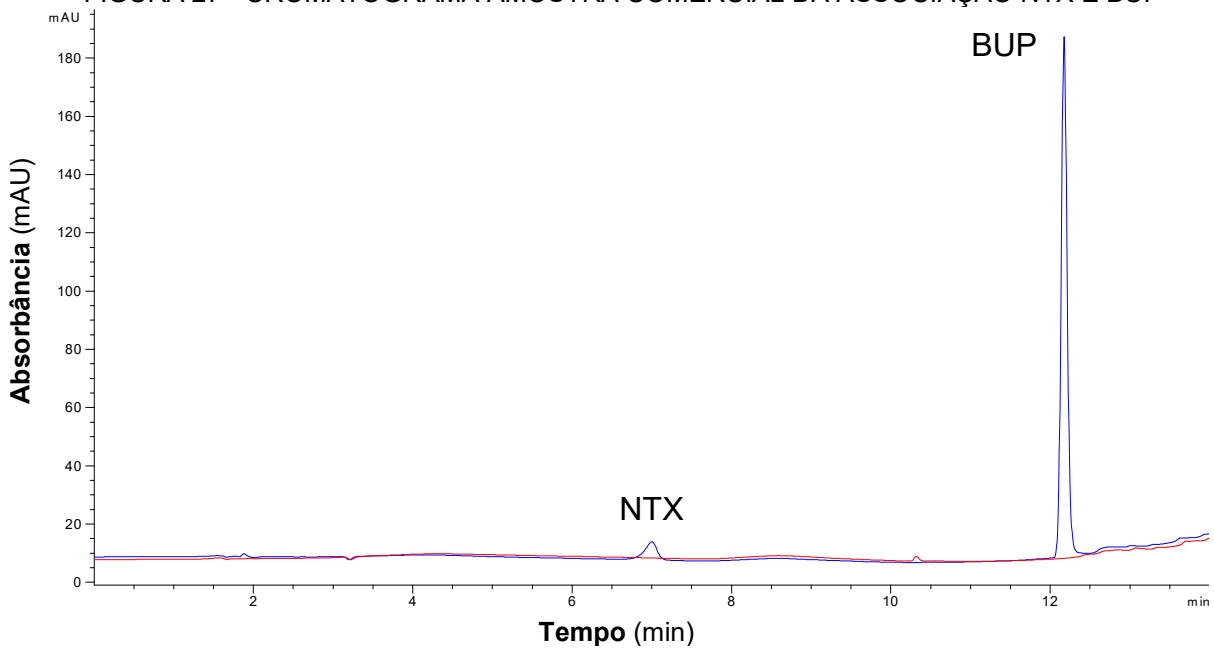
CONCENTRAÇÃO MÉDIA ± DP (mg/cápsula)					
FÁRMACO	**Valores rotulados (mg/cápsula)**	**IVM**	**Teor (%)**	**HPLC**	**Teor (%)**
NTX	8,0	6,38 ± 0,92	79,75	6,87 ± 0,09	85,87
BUP	90,0	90,12 ± 5,50	100,13	89,78 ± 3,03	99,75

FONTE: O autor (2016).

O valor encontrado para a NTX ficou abaixo do preconizado pela USP 32 para o comprimido do fármaco isolado, que estabelece que o teor dos medicamentos esteja entre 90 a 110%, o que ressalta a importância do controle de qualidade de fármacos, inclusive para medicamentos manipulados, processo manual. Para medicamentos em que a dose é baixa, torna-se essencial. Essa baixa dosagem pode influenciar no tratamento do paciente, diminuindo a eficácia da associação.

O cromatograma representativo de uma das amostras, obtido através do método CLAE-DAD pode ser observado através da figura 27 em azul. O sinal em vermelho representa o branco.

FIGURA 27 - CROMATOGRAMA AMOSTRA COMERCIAL DA ASSOCIAÇÃO NTX E BUP



Nota: Condições de análise: Fase Móvel - água contendo 0,1% trietilamina e acetonitrila; eluição gradiente; fluxo de 1mL.min^{-1}; temperatura do forno 40ºC; detecção em 230 nm, volume de injeção 20µL.

FONTE: O autor (2016.)

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho foram obtidas as seguintes conclusões:

O método desenvolvido e validado por espectroscopia no IVM para a determinação dos fármacos NTX e BUP em associação em forma farmacêutica cápsula atendeu aos requisitos de validação analítica multivariada, de acordo com orientações nacionais (ANVISA) e internacionais (ICH E ASTM), demonstrando o potencial para a futura aceitação por agências reguladoras, apresentando-se seletivo, linear, exato (com valores satisfatórios de RMSEC, RMSECV e RMSEP para os fármacos em estudo) e preciso, com valores de DP menores de 5%. A espectroscopia no infravermelho com reflectância difusa mostrou ser um método adequado para determinação dos fármacos em associação NTX e BUP em forma farmacêutica cápsula, sem necessidade de separação prévia dos fármacos e dos excipientes, o que gera interferências espectrais que foram solucionadas por método de calibração multivariada, o PLS.

Foram desenvolvidos diversos modelos, utilizando-se PLS1 e PLS2, testando-se os pré-processamentos MSC, SNV, dados centrados na média, e primeira derivada, sendo que houve melhora significativa no resultado de previsão com o alisamento *Savitzky-Golay*. O modelo desenvolvido a partir do espectro fragmentado (iPLS), com a faixa espectral selecionada 1885,8-1585,4 cm^{-1}, e que utilizou IVM-PLS2, pré-processamento em primeira derivada com alisamento *Savitzky-Golay* e dados centrados na média, 4 variáveis latentes; foi o que deu o melhor resultado.

O método desenvolvido e validado por CLAE-DAD para a determinação dos fármacos NTX e BUP em associação em forma farmacêutica cápsula atendeu aos requisitos de validação analítica de acordo com orientações nacionais (ANVISA), apresentando-se seletivo, linear (com $r^2>0,99$), exato e preciso, com valores de DP menores de 5% e teste T entre as amostras maiores que 0,05.

Os métodos propostos (IVM-DRIFTS e CLAE-DAD) foram capazes de quantificar o teor dos fármacos em estudo, e forneceram resultados estatisticamente equivalentes, com $p>0,05$ no teste t.

O fato de detectarmos quantidade de fármaco NTX inferior ao especificado na formulação, e fora da variação preconizada pela farmacopéia USP para o fármaco

isolado reforça a importância da realização de análises para o Controle de Qualidade de medicamentos em farmácias de manipulação.

No planejamento experimental do método multivariado, foi realizada a variação dos excipientes em 5%, o que não é usual. Isto pode ter aumentado um pouco os valores de RMSEC, RMSECV e RMSEP. No entanto, estes valores encontraram-se satisfatórios.

O método IVM com calibração multivariada apresenta-se como uma alternativa viável para análise da associação NTX e BUP em forma farmacêutica cápsula, com as vantagens de ser rápido, de baixo custo, de não utilizar solventes orgânicos poluentes, não gerar resíduos e serem muito mais rápidos que os métodos por CLAE-DAD. Por serem de fácil acesso, proporcionam uma opção para laboratórios de controle de qualidade de indústrias e farmácias de manipulação, para o controle de processo de fabricação.

7 REFERÊNCIAS

ABDULAZIZ, M. A. S.; BASAVAIAH, K.; VINAY, K. B. ECLÉTICA PHARMACEUTICALS USING MERCURY (II) NITRATE. , v. 35, 2010.

ABESO. Atualização das diretrizes para o tratamento Farmacológico da obesidade e do sobrepeso. **Abeso**, v. 76, p. 4–18, 2010.

ANVISA. RDC n.87 de 28 de junho de 2016. **DOU**, , n. Seção 1, p. 41–46, 2016.

APOVIAN, C. M.; ARONNE, L.; RUBINO, D.; et al. A randomized, phase 3 trial of naltrexone SR/bupropion SR on weight and obesity-related risk factors (COR-II). **Obesity**, v. 21, n. 5, p. 935–943, 2013.

ASTM. Standard Practices for Infrared Multivariate Quantitative Analysis E1655. **ASTM**, 2012.

ASTM INTERNATIONAL. Standard Practices for Infrared Multivariate Quantitative Analysis 1. **Quality Assurance**, 2005.

BEATON, D.; CHIN FATT, C. R.; ABDI, H. An ExPosition of multivariate analysis with the singular value decomposition in R. **Computational Statistics and Data Analysis**, v. 72, p. 176–189, 2014.

BILLES, S. K.; SINNAYAH, P.; COWLEY, M. A. Naltrexone/bupropion for obesity: An investigational combination pharmacotherapy for weight loss. **Pharmacological Research**, v. 84, p. 1–11, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2014.04.004>.

BOUCHARD, C.; BRAY, G. A. **Handbook of Obesity**. 4th ed. 2014.

BOUCHONVILLE, M.; ARMAMENTO-VILLAREAL, R.; SHAH, K.; et al. Weight loss, exercise or both and cardiometabolic risk factors in obese older adults: results of a randomized controlled trial. **International journal of obesity (2005)**, v. 38, n. 3, p. 423–31, 2014. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3835728&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 30/6/2015.

BRASIL. Resolução ANVISA RE nº 899, de 29 de maio de 2003. , 2003.

BRUNS, R. E. **Pesquisa E Desenvolvimento Na**. São Paulo: Associação Brasileira de Editoras Universitárias, 2001.

BURNS, D.; CIURCZAK, E. **Handbook of Near-Infrared Analysis Second Edition, Revised and Expanded edited**. 2007.

CAIXAS, A. C. ET. AL. Naltrexone sustained-release/bupropion sustained-release for the management of obesity: review of the data to date. **Drug design, development and therapy**, v. 8, p. 1419–1427, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2147/DDDT.S55587>. .

CÂMARA DOS DEPUTADOS. Projeto de lei da câmara dos deputados nº 61, de 2015. , 2016. Disponível em: <https://www25.senado.leg.br/web/atividade/materias/-

/materia/122114>. .

CANADIAN INSTITUTES OF HEALTH RESEARCH. Drug Bank. Disponível em: <http://www.drugbank.ca/salts/DBSALT000199>. Acesso em: 16/9/2016.

CEBRID. Sistema de psicofarmacovigilância. , 2012. Disponível em: <www.cebrid.epm.br>. .

CH. NAVEEN KUMAR, N. KANNAPPANB, M. K. C. Stress Degradation studies and Develpoment of Validated Stability Indicating Assay Method by RP-HPLC for Simultaneous Estimation of Naltrexone and Bupropion in the presence of degradation products as per ICH guidelines. **Journal of Scientific Research in Pharmacy**, v. 4, n. 1, p. 19–32, 2015.

DEEPIKA, K.; CHELLARAM, S. Formulation and evaluation of bupropion hydrochloride sustained release tablets using combination of hydrophilic polymers. **The Pharmaceutical and Chemical Journal**, v. 1, n. 3, p. 1–8, 2014.

ESBENSEN, K. H.; GUYOT, D.; HOUMØLLER, L. P. Multivariate Data Analysis – In Practice. **October**, v. 5, n. 91, 2002.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Mysimba, INN-naltrexone/bupropion. , 2015.

EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY LABORATORY. ChEBI - Chemical Entities of Biological Interest. Disponível em: <https://www.ebi.ac.uk/chebi/>. Acesso em: 5/5/2016.

FERREIRA, M. H.; BRAGA, J. W. B.; SENA, M. M. Development and validation of a chemometric method for direct determination of hydrochlorothiazide in pharmaceutical samples by diffuse reflectance near infrared spectroscopy. **Microchemical Journal**, v. 109, p. 158–164, 2013. Elsevier B.V. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2012.03.008>. .

FERREIRA, M. H.; GOMES, F. F.; SENA, M. M. Development and Validation of a Multivariate Calibration Model for Determination of Dipyrone in Oral Solutions by Near Infrared Spectroscopy. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 20, n. 9, p. 1680–1686, 2009.

FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Chemometrics I: multivariate calibration, a tutorial. **Química Nova**, v. 22, p. 724–731, 1999. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40421999000500016&script=sci_arttext>. .

FRANCESQUETT, J. Z.; VIERA, M. S.; LOVATO, R. H.; et al. Modelos De Regressão Multivariada Empregando Seleção De Intervalos Para a Quantificação Do Biodiesel Em Blendas Biodiesel / Diesel. **Tecno-lógica**, v. d, p. 87–92, 2010.

FURNISS, B. S. ET AL. **Practical organic chemistry**. 5th ed. London, 1989.

GARCIA, G. Senado aprova tornar lei liberação de substâncias para emagrecer. **G1**, 2016. Disponível em: <http://g1.globo.com/politica/noticia/2016/04/senado-aprova-

tornar-lei-liberacao-de-substancias-para-emagrecer.html>. .

GLAXOSMITHKLINE. Bupropion hydrochloride Tablets. **FDA prescription insert**, 2004. Disponível em: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/04/briefing/2004-4065b1-20-tab11A-Wellbutrin-Tabs-SLR028.pdf>. .

GOODARZI, M.; SHARMA, S.; RAMON, H.; SAEYS, W. Multivariate calibration of NIR spectroscopic sensors for continuous glucose monitoring. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 2015. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993615000266>. .

GREENWAY, F. L.; FUJIOKA, K.; PLODKOWSKI, R. A.; et al. Effect of naltrexone plus bupropion on weight loss in overweight and obese adults (COR-I): A multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. **The Lancet**, v. 376, n. 9741, p. 595–605, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60888-4>. .

GUZMAN, A. K.; DING, M.; XIE, Y.; MARTIN, K. A. Pharmacogenetics of obesity drug therapy. **Current Molecular Medicine**, 2014. Bentham Science Publishers B.V. Disponível em: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84906906952&partnerID=tZOtx3y1>. .

HAALAND, D. M.; THOMAS, E. V. Partial least-squares methods for spectral analyses. 1. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information. **Analytical Chemistry**, v. 60, n. 11, p. 1193–1202, 1988. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00162a020>. .

HALPERN, B. Combinação de Bupropiona com Naltrexone no Tratamento da Obesidade. **ABESO**, v. 56, 2012.

HALPERN, B.; OLIVEIRA, E. S. L.; FARIA, A. M.; et al. Combinations of drugs in the treatment of obesity. **Pharmaceuticals**, v. 3, n. 8, p. 2398–2415, 2010.

HARITHA, A.; KUMAR, P. B. R.; PRIYA, R. V.; SEKHAR, K. B. C. ANALYTICAL METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION FOR SIMULTANEOUS ESTIMATION OF NALTREXONE HYDROCHLORIDE AND BUPROPION HYDROCHLORIDE IN ORAL DOSAGE FORM (TABLETS) BY RP-HPLC TECHNIQUE ABSTRACT. , v. 6, n. 2, p. 2600–2606, 2015.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 5th ed. Rio de Janeiro, 2001.

HESSE, M.; MEIER, H.; ZEEH, B. **Spectroscopy Methods in Organic Chemistry**. 2nd ed. 2008.

HOLLANDER, P.; GUPTA, A. K.; PLODKOWSKI, R.; et al. Effects of Naltrexone Sustained- Release / Bupropion Sustained Release Combination Therapy on Body Weight and Glycemic Parameters in Overweight. **Emer gin g Tech no logi es and T herape utics**, v. 36, 2013.

IBGE. **PESQUISA NACIONAL DE SAUDE 2013 - CICLOS DE VIDA - INSTITUTO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE**. 2013.

ICH - INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICAL FOR HUMAN USE. Validation of a analytical Procedures : text and methodology Q2(R1). , 2005.
INMETRO. DOQ-CGCRE-008. , 2003.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC). **Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report)**. 2002.

KAKKAR, ASHISH KUMAR; DAHIYA, N. Drug treatment of stroke. Current status and future prospects. **European Journal of Internal Medicine**, v. 35, n. 4, p. 468–476, 2015. European Federation of Internal Medicine. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejim.2015.01.005>. .

KHAJEHSHARIFI, H.; POURBASHEER, E.; TAVALLALI, H.; SARVI, S.; SADEGHI, M. The comparison of partial least squares and principal component regression in simultaneous spectrophotometric determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid in real samples. **Arabian Journal of Chemistry**, 2014. King Saud University. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.02.006>. .

LIMA, K. M. G.; RAIMUNDO, I. M.; SILVA, A. M. S.; PIMENTEL, M. F. Sensores ópticos com detecção no infravermelho próximo e médio. **Quimica Nova**, v. 32, n. 6, p. 1635–1643, 2009.

MAGNUSSON, O. **Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics,**. 2014.
NCBI. PUBCHEM. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/688387#section=Top>. .

ORNELLAS, T.; CHAVEZ, B. Naltrexone SR/Bupropion SR (Contrave): A New Approach to Weight Loss in Obese Adults. **P & T : a peer-reviewed journal for formulary management**, v. 36, n. 5, p. 255–262, 2011.

PARISOTTO, G.; MARQUES, M.; LIMA, A.; MORAES, É. M. DE. Full Paper Desenvolvimento de metodologias no infravermelho aplicadas para a quantificação de cloridrato de metformina em formulações farmacêuticas. , v. 1, n. 1, p. 38–48, 2009.

PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: Fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 198–219, 2003.

PATEL, P. G.; MASTER, S. Development and Validation of First Order derivative UV Spectrophotometric Method for Simultaneous Estimation of Bupropion and Naltrexone in Combination. **Journal of Pharma Research**, v. 26, n. 5, p. 1341–1345, 2014.

PATHAM, B.; MUKHERJEE, D.; SAN JUAN, Z. Contemporary Review of Drugs Used to Treat Obesity. **Cardiovasc Hematol Agents Med Chem**, v. 11, n. 4, p. 272–280,

2013. Disponível em: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=ovfto&NEWS=N&AN=01258350-201311040-00003>. .

PHANI. R. S.; CHAITANYA, D. AND PRASANTHI, B. RP-HPLC AND SPECTROPHOTOMETRIC METHODS FOR THE SIMULTANEOUS ESTIMATION OF BUPROPION HCl AND NALTREXONE HCl. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 6, n. 7, p. 2982–2990, 2015.

PIANTAVINI, M. S. **PLS PARA QUANTIFICAÇÃO DE FEBANTEL , PAMOATO DE PIRANTEL E**, 2014.

PIANTAVINI, M. S.; PONTES, F. L. D.; UBER, C. P.; et al. Chemometric quality inspection control of pyrantel pamoate, febantel and praziquantel in veterinary tablets by mid infrared spectroscopy. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 125, p. 396–403, 2014.

PUTZIG, M. L.; C. L. Infrared Spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 12, p. 93R–160R, 1996. Disponível em: <http://www.kinetics.nsc.ru/chichinin/books/spectroscopy/Stuart04.pdf>. Acesso em: 2/7/2015.

RAYMOND C R, PAUL J S, M. E. Q. Handbook Pharmaceutical Excipients,Sixth Edition. , 2009.

RIBANI, M.; GRESPAN BOTTOLI, C. B.; COLLINS, C. H.; FONTES JARDIM, I. C. S.; COSTA MELO, L. F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quimica Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RIBEIRO, F. A. Aplicação de métodos de análise multivariada no estudo de hidrocarbonetos policiclicos aromáticos. , 2001.
ROCA, L.; SOBRINHO, L. S.; NUNES, C.; JOS, P.; NETO, R. Passo Importante Na Produção De Medicamentos. **Rev. Bras. Farm.**, v. 88, n. 4, p. 177–180, 2007.

SAÚDE, M. DA. Nota Técnica n. 100/2012. , 2012.

SBEM. Projeto Diretrizes - Obesidade : Tratamento. , 2006.

SBEM. Anvisa x Anorexígenos. Disponível em: <http://www.endocrino.org.br/anvisa-x-anorexigenos-sibutramina-emagrecedores-obesidade/>. Acesso em: 8/7/2015a.

SBEM. Cirurgia bariátrica - Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. Disponível em: <http://www.endocrino.org.br/cirurgia-bariatrica/>. Acesso em: 8/7/2015b.

SCHRADER, B. **Infrared and Raman Spectroscopy-Methods and Applications**. Weinheim New York . Base1 Cambridge Tokyo, 1994.

SENA, M. M.; FREITAS, C. B.; SILVA, L. C.; PÉREZ, C. N.; PAULA, Y. O. DE. Determinação espectrofotométrica simultânea de paracetamol e ibuprofeno em

formulações farmacêuticas usando calibração multivariada. **Quimica Nova**, v. 30, n. 1, p. 75–79, 2007.

SHAH, V. P. The History of Bioanalytical Method Validation and Regulation : Evolution of a Guidance Document on Bioanalytical Methods Validation. **The AAPS Journal**, v. 9, n. 1, p. 43–47, 2007.

SILVERSTEIN, M. R. ET AL. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7th ed. New York, 2005.

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

SKOOG, D. A. . W. H. C. **FUNDAMENTOS DE QUIMICA ANALITICA**. 8th ed. Sao Paulo, 2006.

SMITH, B. C. **FUNDAMENTALS OF FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY**. 2nd ed. 2011.

SOLOMONS, T. W. G. **Organic Chemistry**. 10th ed. 2011.

SOUZA, A. M. DE; BREITKREITZ, M. C.; FILGUEIRAS, P. R.; et al. EXPERIMENTO DIDÁTICO DE QUIMIOMETRIA PARA CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA NA DETERMINAÇÃO DE PARACETAMOL EM COMPRIMIDOS COMERCIAIS UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO: UM TUTORIAL, PARTE II. **Quimica Nova**, v. 36, n. 7, p. 1057–1065, 2013.

SRIKALYANI, V.; TEJASWI, M.; SRIVIDYA, P.; NALLURI, B. N. Simultaneous analysis of naltrexone hydrochloride and bupropion hydrochloride in bulk and dosage forms by RP-HPLC-PDA method. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 11, p. 429–435, 2013. Disponível em: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84890946948&partnerID=tZOtx3y1>.

STUART, B. H. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**. 2004.

TAKEDA PHARMACEUTICALS AMERICA, I. Medication Guide - Contrave. , 2014.

TAN, C.; WU, T.; XU, Z.; LI, W.; ZHANG, K. A simple ensemble strategy of uninformative variable elimination and partial least-squares for near-infrared spectroscopic calibration of pharmaceutical products. **Vibrational Spectroscopy**, v. 58, p. 44–49, 2012. Elsevier B.V. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vibspec.2011.09.011>. .

TAVAKOL, H.; ESFANDYARI, M.; TAHERI, S.; HEYDARI, A. Investigation of structure, vibrational and NMR spectra of oxycodone and naltrexone: A combined experimental and theoretical study. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 79, n. 3, p. 574–582, 2011.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para

cálculus de planejamentos experimentais, um tutorial. **Quimica Nova**, v. 29, n. 2, p. 338–350, 2006.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. **The United States Pharmacopoeia - USP 32**. Rockville, United States: Rockville, 2009.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. QUALITY ASSURANCE SCHEMES FOR ANALYTICAL LABORATORIES * HARMONIZED GUIDELINES FOR SINGLE-LABORATORY VALIDATION OF METHODS OF ANALYSIS (IUPAC Technical Report) Harmonized guidelines for single-laboratory (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835–855, 2002.

UNITED STATES - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - US-FDA. Postmarket Drug Safety Information for Patients and Providers - Meridia (sibutramine hydrochloride) Information. Disponível em: <http://www.fda.gov/drugs/drugsafety/postmarketdrugsafetyinformationforpatientsandproviders/ucm191652.htm>. Acesso em: 8/7/2015.

US-FDA - UNITED STATES - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Contrave (Naltrexone SR/Bupropion SR Combination) Advisory Committee Briefing document. , 2010. ADVISORY COMMITTEE BRIEFING DOCUMENT, Orexigen Therapeutics, Inc. 3344 North Torrey Pines Court La Jolla, CA 92037.

US-FDA - UNITED STATES - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Press Announcements - FDA approves weight-management drug Contrave**. Office of the Commissioner, 2014.

US-FDA - UNITED STATES - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Contrave Approval History. , 2015.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. **Quimica Nova**, v. 32, n. 5, p. 1278–1287, 2009.

VALENTINI, S. R.; SOMMER, A. S.; MATIOLI, G. Validação de métodos analíticos. **Arq Mudi**, v. 11, n. 2, p. 26–31, 2007. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/docs/bio/v64_2/barros.pdf>. .

WADDEN, T. A.; FOREYT, J. P.; FOSTER, G. D.; et al. Weight loss with naltrexone SR/bupropion SR combination therapy as an adjunct to behavior modification: the COR-BMOD trial. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 19, n. 1, p. 110–20, 2011. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4459776&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 30/6/2015.

WHO. Obesity and overweight. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. Acesso em: 7/7/2015.

WORKMAN JR., J. Practices for Data Preprocessing for Optical Spectrophotometry. **The Handbook of Organic Compounds**, p. 295–300, 2001. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780127635606500301>. .

XIANG, D. ET AL. In vivo study of a polymeric glucose-sensitive insulin delivery system using a rat model. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 98, n. 3, p. 1155–1166, 2009.

YENICELI, D.; DOGRUKOL-AK, D. Retention Behaviour of Bupropion Hydrochloride in Reversed Phase Ion Pair LC and Validated Analysis of the Drug in Pharmaceuticals. **Chromatographia**, v. 71, n. 1, p. 79–84, 2010.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - Amostras com variações de 5, 10, 15 e 20% fornecidas pelo software StatisticA

Tipo	Amostra	NTX	BUP	Excipientes*	Tipo	Amostra	NTX	BUP	Excipientes*
V	1	8,00	90,00	152,00	C	40	8,00	90,00	161,78
V	2	8,00	82,43	152,00	V	41	8,00	101,58	152,00
V	3	7,60	94,50	144,40	V	42	9,03	90,00	152,00
V	4	8,40	85,50	144,40	C	43	8,00	90,00	164,78
V	5	7,33	90,00	152,00	C	44	6,80	76,50	159,60
V	6	7,60	85,50	144,40	C	45	5,98	90,00	152,00
V	7	8,40	94,50	159,60	C	46	8,00	90,00	152,00
C	8	7,60	85,50	159,60	C	47	8,00	67,30	152,00
C	9	8,40	94,50	144,40	C	48	9,20	103,50	159,60
C	10	7,60	94,50	159,60	C	49	8,00	90,00	139,22
V	11	8,00	97,57	152,00	C	50	9,20	76,50	144,40
C	12	8,00	90,00	164,78	C	51	6,80	103,50	159,60
C	13	8,40	85,50	159,60	C	52	10,02	90,00	152,00
C	14	8,00	90,00	139,22	C	53	6,80	103,50	144,40
V	15	8,67	90,00	152,00	C	54	9,20	76,50	159,60
V	16	8,00	84,21	152,00	C	55	6,80	76,50	144,40
V	17	7,49	90,00	152,00	C	56	8,00	112,70	152,00
V	18	8,00	95,79	152,00	C	57	9,20	103,50	144,40
C	19	8,00	90,00	161,78	C	58	6,80	76,50	159,60
C	20	8,00	90,00	142,22	C	59	6,46	90,00	152,00
V	21	8,51	90,00	152,00	C	60	8,00	72,62	152,00
C	22	8,00	90,00	152,00	C	61	9,20	103,50	159,60
C	23	6,65	90,00	152,00	C	62	9,20	76,50	144,40
C	24	8,00	90,00	139,22	C	63	6,80	103,50	159,60
V	25	8,80	81,00	159,60	C	64	9,54	90,00	152,00
V	26	7,20	81,00	159,60	C	65	6,80	103,50	144,40
C	27	8,00	74,86	152,00	C	66	9,20	76,50	159,60
V	28	7,20	99,00	144,40	C	67	6,80	76,50	144,40
C	29	8,00	90,00	164,78	C	68	8,00	107,38	152,00
V	30	8,80	99,00	159,60	C	69	9,20	103,50	144,40
C	31	7,20	99,00	159,60	C	70	6,40	72,00	144,40
C	32	8,00	105,14	152,00	C	71	6,40	108,00	144,40
C	33	7,20	81,00	144,40	C	72	6,40	108,00	159,60
C	34	9,35	90,00	152,00	C	73	6,40	72,00	159,60
C	35	8,80	81,00	144,40	C	74	9,60	108,00	159,60
C	36	8,80	99,00	144,40	C	75	9,60	72,00	159,60
V	37	6,97	90,00	152,00	C	76	9,60	72,00	144,40
C	38	8,00	90,00	142,22	C	77	9,60	108,00	144,40
V	39	8,00	78,42	152,00	C	78	8,00	90,00	152,00
						79	8,00	90,00	152,00

Validação Calibração

FONTE: O autor (2015).

* EXCIPIENTE 65% LACTOSE, 20% CELULOSE, 15% HPMC

APÊNDICE 2 - TABELA COM QUANTIDADE PESADA DOS FÁRMACOS, DOS EXCIPIENTES E CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO TEÓRICA DOS FÁRMACOS NTX E BUP NA MISTURA

Valor pesado					Concentração teórica ($mg*g^{-1}$)*	
AMOSTRA	NTX (mg)	BUP (mg)	EXC (mg)	Massa Total (mg)	NTX (mg/g)	BUP (mg/g)
1	16,03	180,14	304,03	500,20	31,51	361,11
2	16,05	164,78	304,02	484,85	32,54	340,78
3	15,29	189,29	288,78	493,36	30,47	384,71
4	16,87	171,06	288,81	476,74	34,79	359,78
5	14,63	180,04	304,04	498,71	28,84	361,99
6	15,20	170,98	288,78	474,96	31,46	360,96
7	16,86	189,01	319,19	525,06	31,57	360,95
8	15,23	171,07	319,22	505,52	29,62	339,32
9	16,87	189,69	288,83	495,39	33,48	383,94
10	15,32	189,48	319,23	524,03	28,74	362,56
11	15,93	195,85	304,08	515,86	30,36	380,68
12	16,10	180,08	329,60	525,78	30,10	343,43
13	16,84	171,00	319,21	507,05	32,65	338,16
14	16,08	180,06	278,37	474,51	33,31	380,49
15	17,38	180,00	304,09	501,47	34,07	359,91
16	16,07	168,45	303,99	488,51	32,34	345,76
17	15,00	179,94	304,02	498,96	29,55	361,60
18	15,96	192,13	303,78	511,87	30,65	376,36
19	16,07	179,98	323,65	519,70	30,40	347,25
20	16,20	180,03	284,54	480,77	33,13	375,47
21	17,30	180,36	303,80	501,46	33,92	360,64
22	16,01	180,08	304,01	500,10	31,47	361,06
23	13,38	180,05	304,08	497,51	26,44	362,88
24	16,08	180,04	278,40	474,52	33,31	380,44
25	17,65	162,38	319,25	499,28	34,75	326,11
26	14,51	162,66	319,73	496,90	28,71	328,23
27	16,62	149,67	303,97	470,26	34,74	319,13
28	14,34	197,82	288,74	500,90	28,14	396,00
29	15,89	180,25	329,60	525,74	29,71	343,78
30	17,61	198,06	319,33	535,00	32,36	371,21
31	14,42	198,05	319,19	531,66	26,66	373,52
32	15,85	210,36	304,08	530,29	29,38	397,76
33	14,43	161,96	289,16	465,55	30,47	348,83
34	18,71	180,09	303,98	502,78	36,58	359,16
35	17,63	161,86	288,78	468,27	37,01	346,59
36	17,64	197,75	288,85	504,24	34,39	393,23
37	13,85	180,12	304,67	498,64	27,31	362,20
38	16,09	180,18	284,49	480,76	32,90	375,79
39	16,03	156,68	303,96	476,67	33,06	329,58
40	16,08	180,15	323,58	519,81	30,41	347,50

(continua)

CONTINUAÇÃO APÊNDICE 2 – QUANTIDADE PESADA DOS FÁRMACOS, DOS EXCIPIENTES E CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO TEÓRICA DOS FÁRMACOS NTX E BUP NA MISTURA

Valor pesado					Concentração teórica	
AMOSTRA	**NAL (mg)**	**BUP (mg)**	**EXC (mg)**	**Massa Total (mg)**	**NAL (mg/g)**	**BUP (mg/g)**
41	16,06	203,05	304,17	523,28	30,17	389,08
42	18,12	180,30	304,20	502,62	35,44	359,69
43	16,08	180,06	329,52	525,66	30,07	343,47
44	13,55	153,08	319,20	485,83	27,42	315,94
45	12,05	180,13	304,11	496,29	23,87	363,93
46	16,03	180,09	304,12	500,24	31,50	360,98
47	16,04	134,58	303,95	454,57	34,69	296,86
48	18,49	207,03	319,26	544,78	33,37	385,35
49	16,04	180,00	278,36	474,4	33,24	384,74
50	18,51	153,02	288,76	460,29	39,53	337,10
51	13,57	207,11	319,15	539,83	24,71	389,03
52	20,06	180,08	304,02	504,16	39,12	362,19
53	13,66	207,05	288,80	509,51	26,36	412,06
54	18,47	153,07	319,26	490,8	37,00	316,24
55	13,68	153,14	288,88	455,7	29,51	340,76
56	16,10	225,42	304,08	545,6	29,01	418,94
57	18,47	206,98	288,88	514,33	35,30	408,06
58	13,56	153,07	319,23	485,86	27,44	319,46
59	12,90	180,04	304,00	496,94	25,52	367,37
60	16,05	145,31	304,10	465,46	33,90	316,56
61	18,44	207,00	319,23	544,67	33,28	385,37
62	18,44	153,07	288,87	460,38	39,38	337,14
63	13,66	207,05	319,20	539,91	24,87	388,86
64	19,10	180,02	304,08	503,2	37,32	362,76
65	13,69	207,15	288,87	509,71	26,40	412,10
66	18,40	153,05	319,19	490,64	36,87	316,31
67	13,71	153,05	288,88	455,64	29,58	340,60
68	16,02	214,78	304,00	534,8	29,45	407,23
69	18,44	207,11	288,80	514,35	35,25	408,30
70	12,70	143,80	288,80	445,3	28,04	323,80
71	12,90	216,12	288,83	517,85	24,49	418,47
72	12,91	216,40	319,16	548,47	23,14	395,62
73	12,77	144,26	319,40	476,43	26,35	303,61
74	19,42	215,55	319,84	554,81	34,41	389,56
75	19,38	143,72	319,30	482,4	39,50	298,73
76	19,22	143,88	288,88	451,98	41,81	319,19
77	19,42	216,30	288,88	524,6	36,39	413,43
78	15,92	180,11	304,08	500,11	31,30	361,11
79	16,10	180,10	304,31	500,51	31,62	360,80

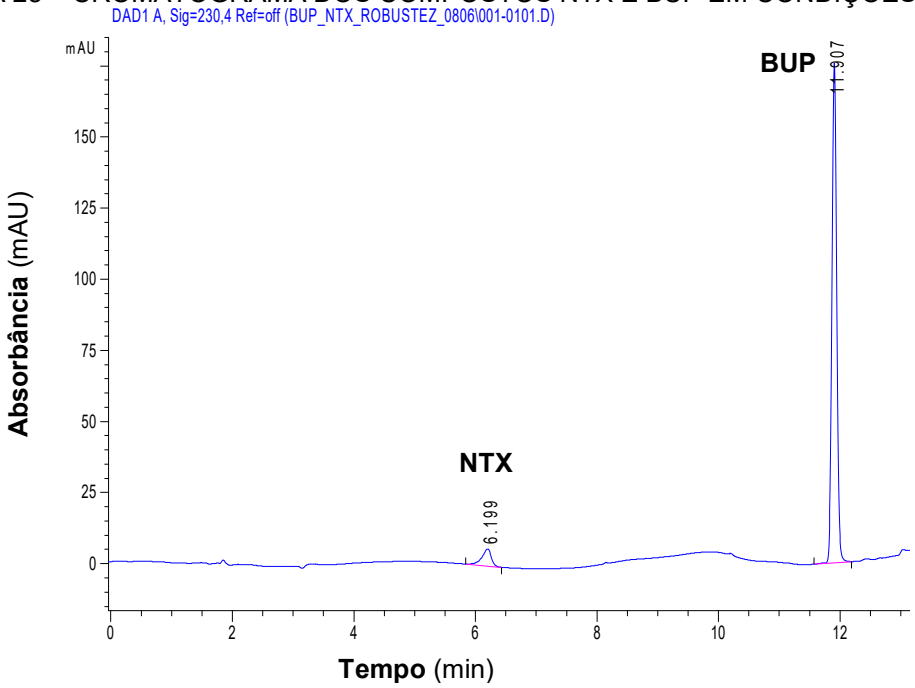
FONTE: O autor (2015).

* (mg fármaco x teor fármaco** x 1000) /mg massa total

**teor NTX = 0,9831 e teor BUP = 1,0027

APÊNDICE 3 – Cromatogramas do Método CLAE-DAD

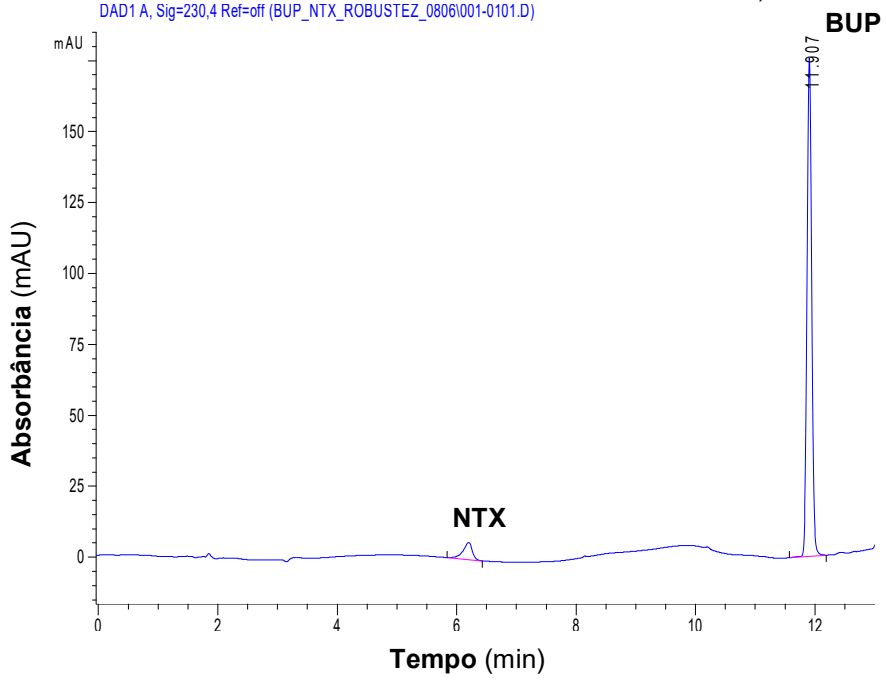
FIGURA 28 – CROMATOGRAMA DOS COMPOSTOS NTX E BUP EM CONDIÇÕES NORMAIS



Nota: Condições de análise: Fase Móvel - água contendo 0,1% trietilamina e acetonitrila; eluição gradiente; fluxo de 1mL.min^{-1}; temperatura do forno 40ºC; detecção em 230 nm, volume de injeção 20µL.

FONTE: O autor (2016).

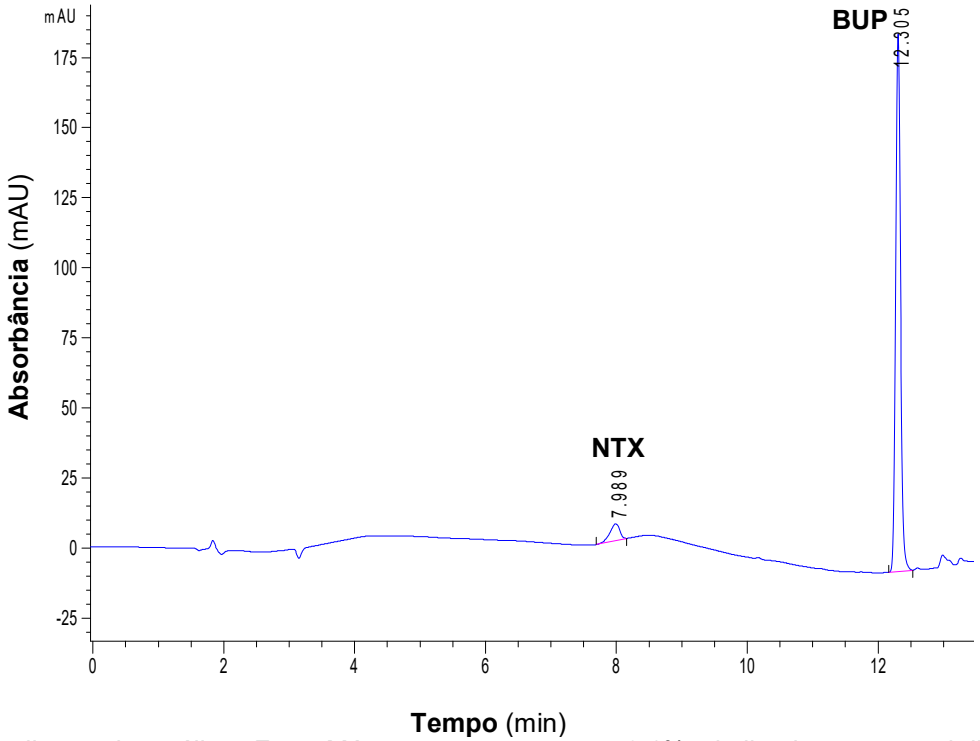
FIGURA 29 – CROMATOGRAMA OBTIDO EM PH 6,3



Nota: Condições de análise: Fase Móvel - água contendo 0,1% trietilamina e acetonitrila; eluição gradiente; fluxo de 1mL.min^{-1}; temperatura do forno 40ºC; detecção em 230 nm, volume de injeção 20µL.

FONTE: O autor (2016).

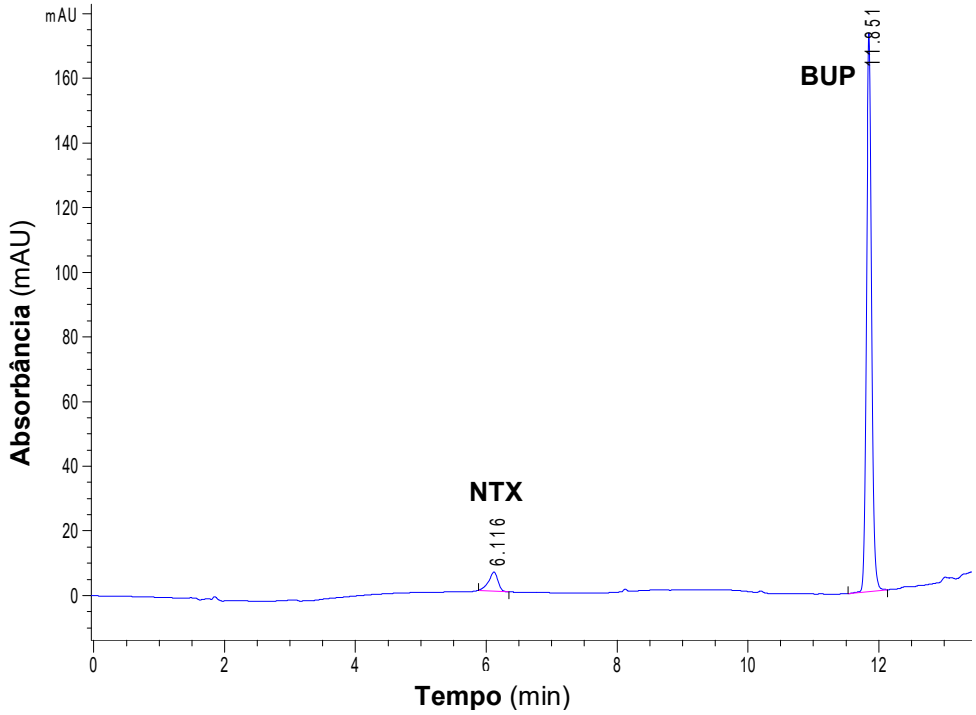
FIGURA 30 – CROMATOGRAMA OBTIDO EM PH 6,7



Nota: Condições de análise: Fase Móvel - água contendo 0,1% trietilamina e acetonitrila; eluição gradiente; fluxo de 1mL.min^{-1}; temperatura do forno 40ºC; detecção em 230 nm, volume de injeção 20µL.

FONTE: O autor (2016).

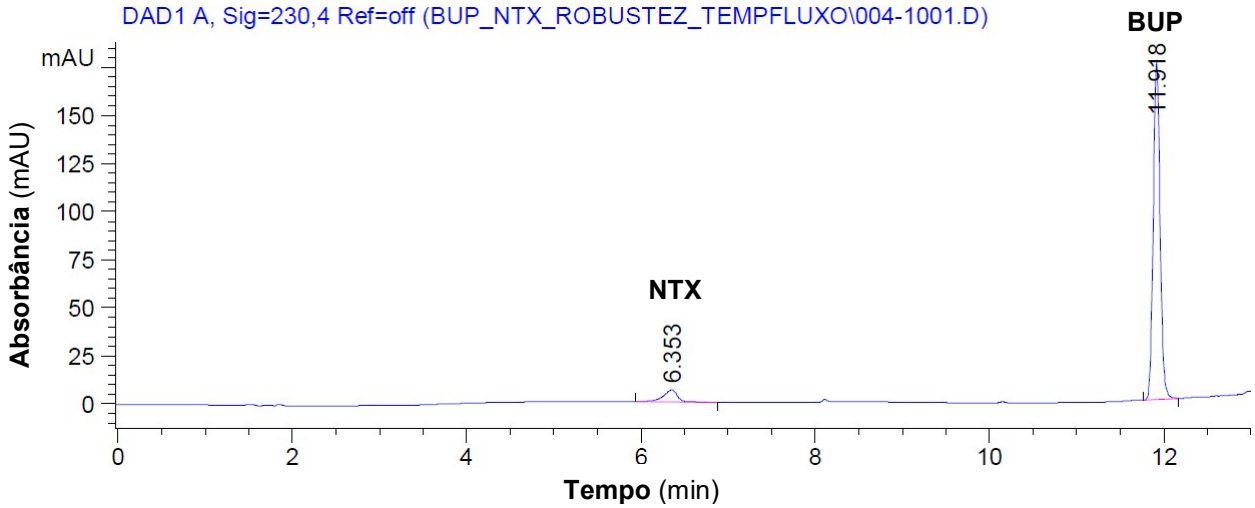
FIGURA 31 - CROMATOGRAMA OBTIDO EM TEMPERATURA 39ºC



Nota: Condições de análise: Fase Móvel - água contendo 0,1% trietilamina e acetonitrila; eluição gradiente; fluxo de 1mL.min^{-1}; temperatura do forno 40ºC; detecção em 230 nm, volume de injeção 20µL.

FONTE: O autor (2016)

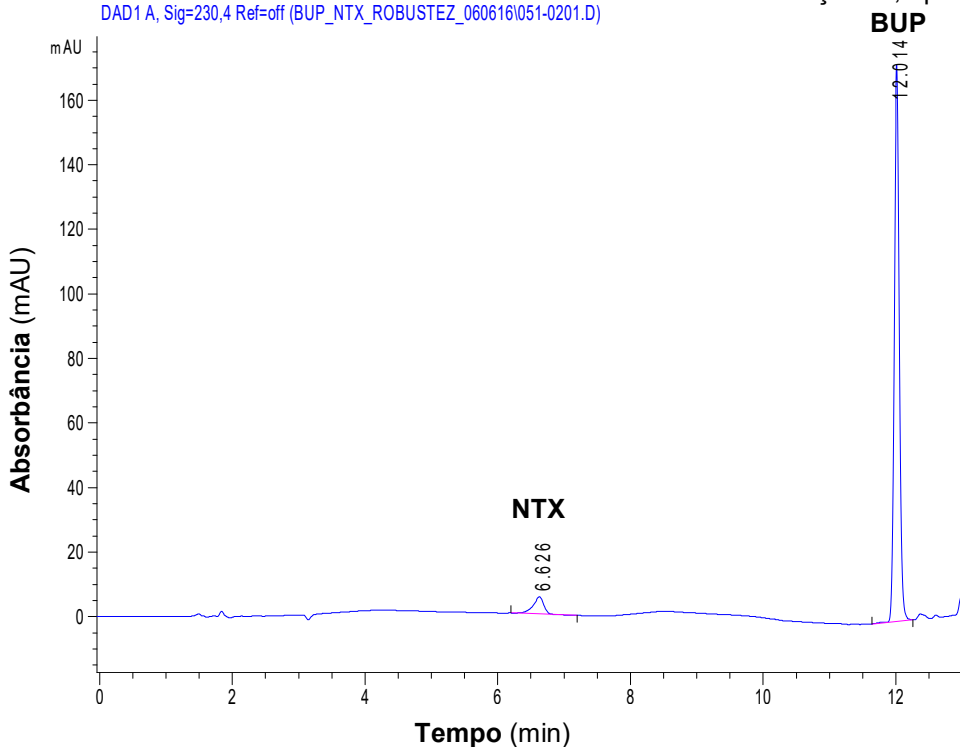
FIGURA 32 - CROMATOGRAMA OBTIDO EM TEMPERATURA 41ºC



Nota: Condições de análise: Fase Móvel - água contendo 0,1% trietilamina e acetonitrila; eluição gradiente; fluxo de 1mL.min^{-1}; temperatura do forno 40ºC; detecção em 230 nm, volume de injeção 20µL.

FONTE: O autor (2016).

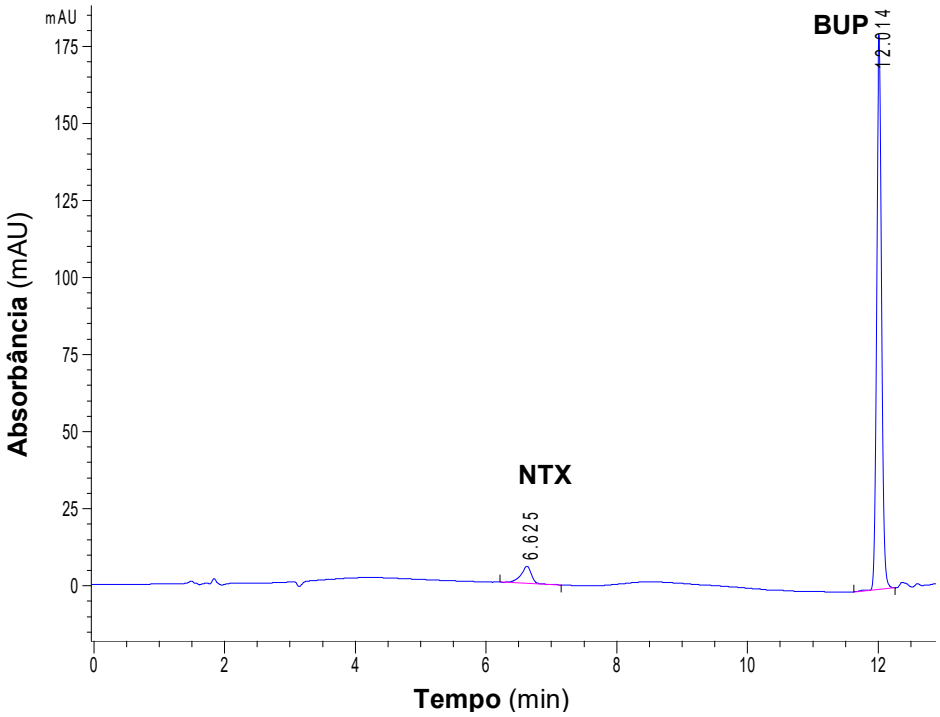
FIGURA 33 - CROMATOGRAMA OBTIDO EM VOLUME DE INJEÇÃO 9,8 µL



Nota: Condições de análise: Fase Móvel - água contendo 0,1% trietilamina e acetonitrila; eluição gradiente; fluxo de 1mL.min^{-1}; temperatura do forno 40ºC; detecção em 230 nm, volume de injeção 20µL.

FONTE: O autor (2016).

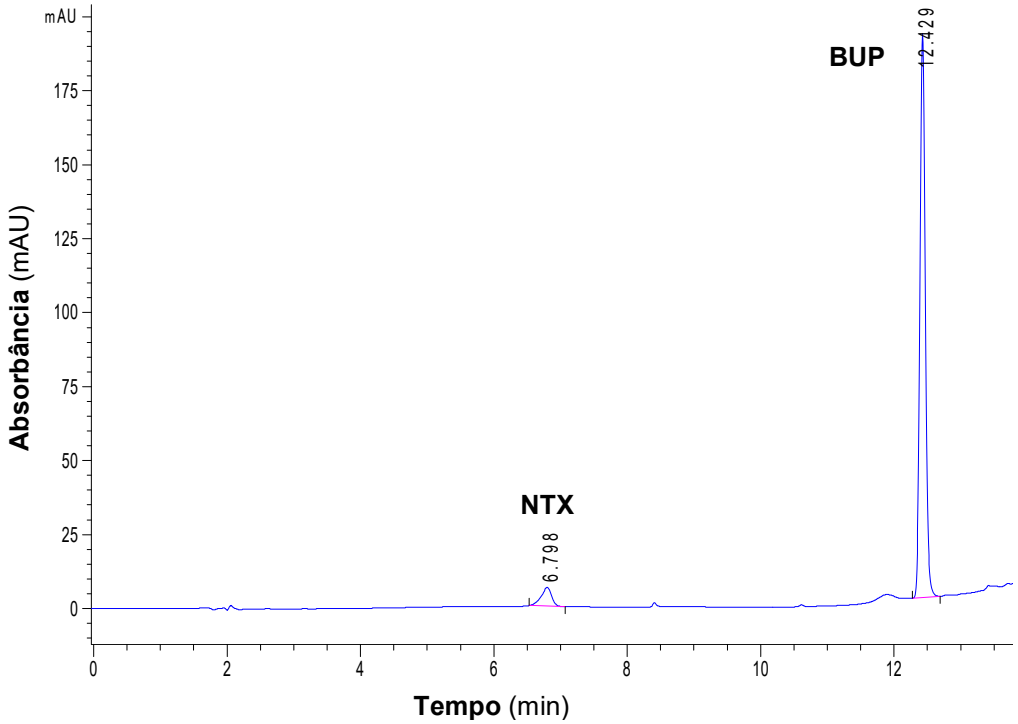
FIGURA 34 - CROMATOGRAMA OBTIDO EM VOLUME DE INJEÇÃO 10,2 µL



Nota: Condições de análise: Fase Móvel - água contendo 0,1% trietilamina e acetonitrila; eluição gradiente; fluxo de 1mL.min^{-1}; temperatura do forno 40ºC; detecção em 230 nm, volume de injeção 20µL.

FONTE: O autor (2016).

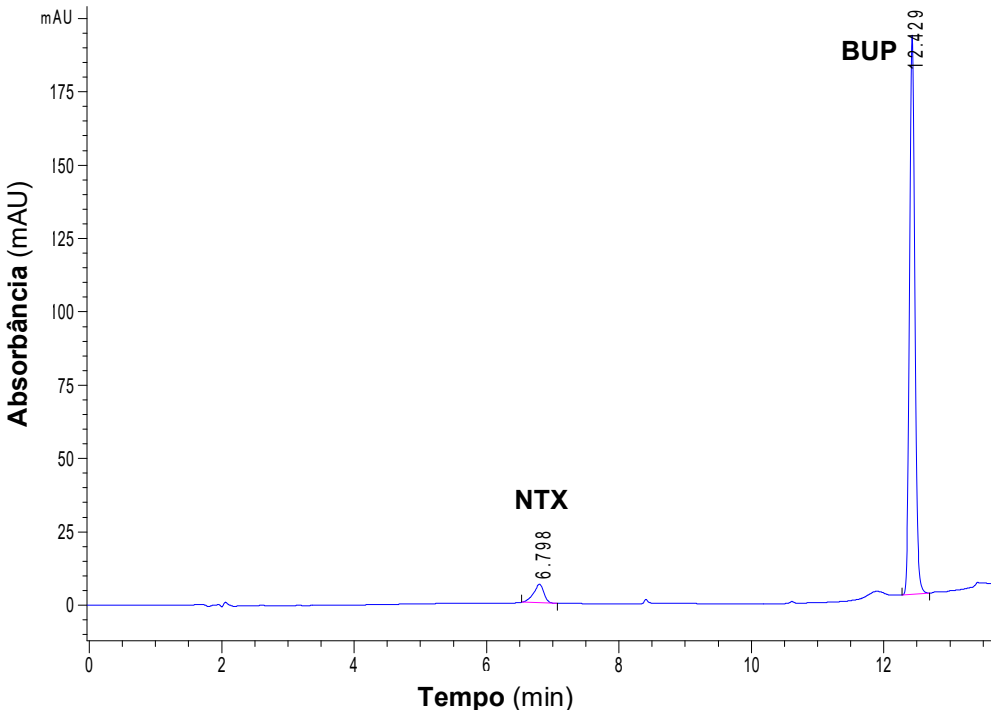
FIGURA 35 - CROMATOGRAMA OBTIDO EM FLUXO 0,9ML/MIN



Nota: Condições de análise: Fase Móvel - água contendo 0,1% trietilamina e acetonitrila; eluição gradiente; fluxo de 1mL.min^{-1}; temperatura do forno 40ºC; detecção em 230 nm, volume de injeção 20µL.

FONTE: o autor (2016).

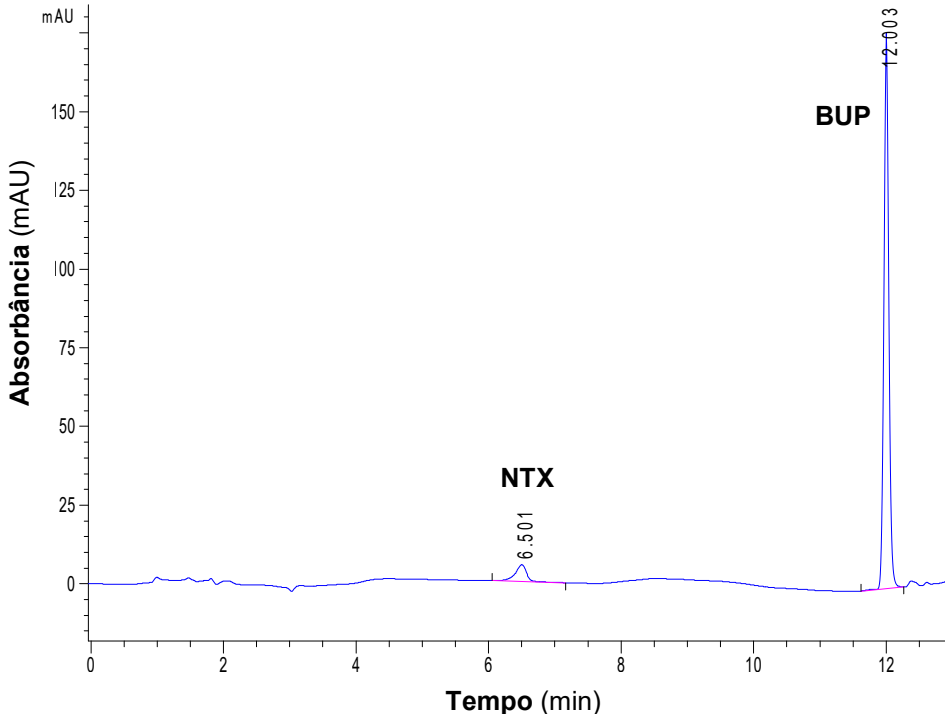
FIGURA 36 - CROMATOGRAMA OBTIDO EM FLUXO 1,1ML/MIN



Nota: Condições de análise: Fase Móvel - água contendo 0,1% trietilamina e acetonitrila; eluição gradiente; fluxo de 1mL.min^{-1}; temperatura do forno 40ºC; detecção em 230 nm, volume de injeção 20µL.

FONTE: o autor (2016).

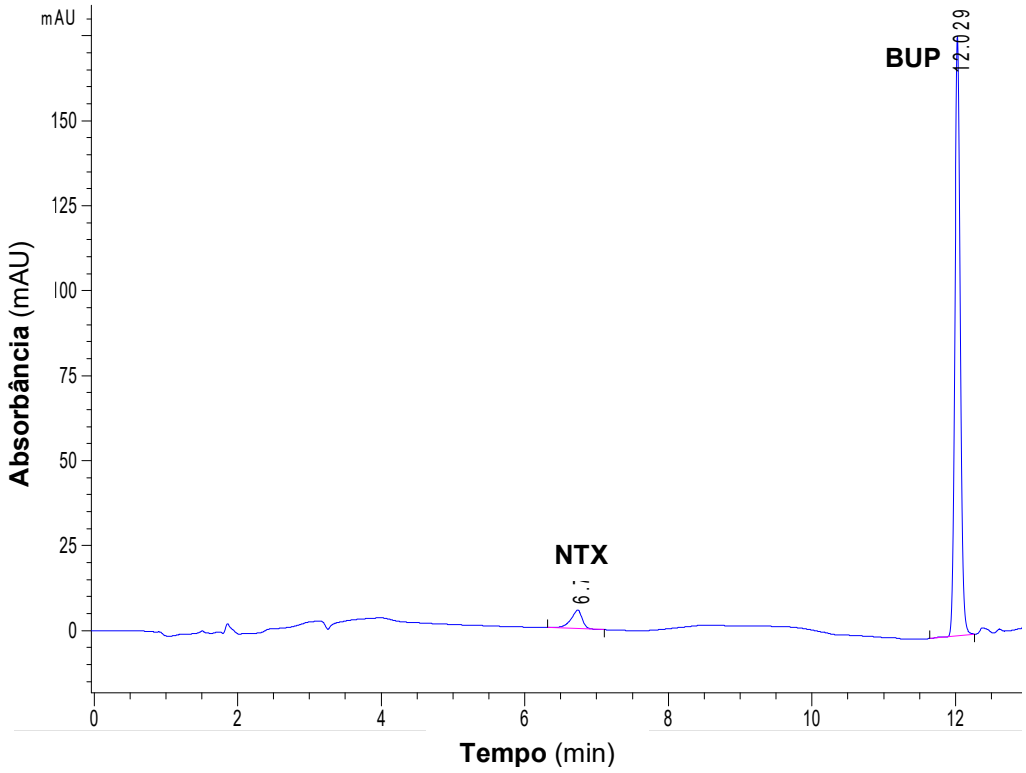
FIGURA 37 - CROMATOGRAMA OBTIDO EM FASE MÓVEL 78:22 V/V ÁGUA : ACN



Nota: Condições de análise: Fase Móvel - água contendo 0,1% trietilamina e acetonitrila; eluição gradiente; fluxo de 1mL.min^{-1}; temperatura do forno 40ºC; detecção em 230 nm, volume de injeção 20µL.

FONTE: O autor (2016).

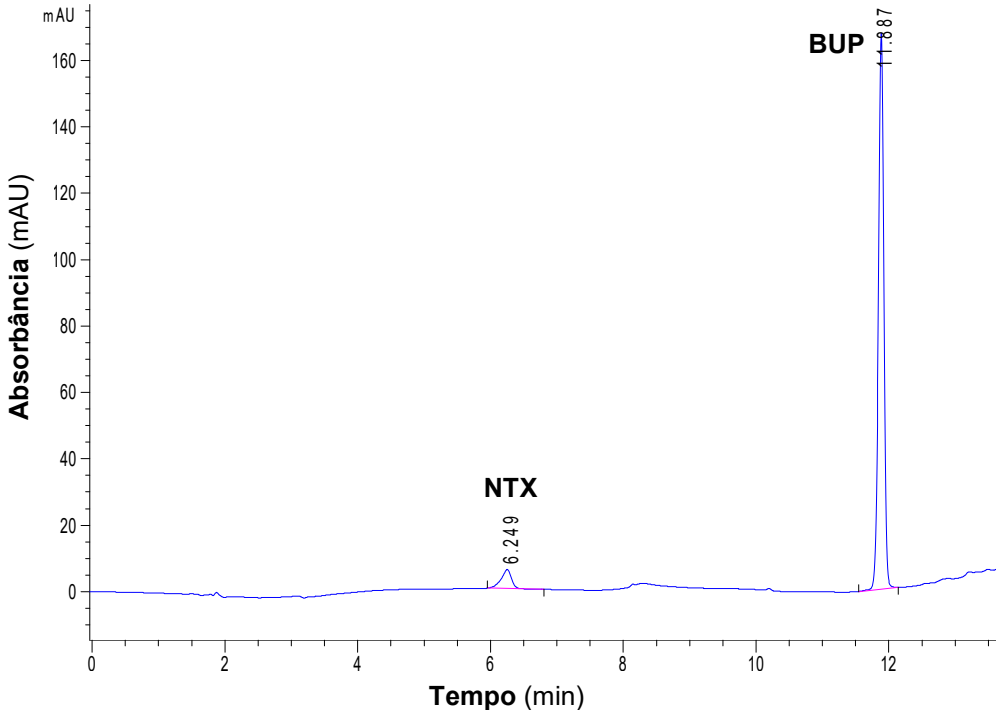
FIGURA 38 - CROMATOGRAMA OBTIDO EM FASE MÓVEL 82:18 V/V ÁGUA : ACN



Nota: Condições de análise: Fase Móvel - água contendo 0,1% trietilamina e acetonitrila; eluição gradiente; fluxo de 1mL.min^{-1}; temperatura do forno 40ºC; detecção em 230 nm, volume de injeção 20µL.

FONTE: O autor (2016).

FIGURA 39 - CROMATOGRAMA OBTIDO EM COLUNAS DE LOTES DIFERENTES



Nota: Condições de análise: Fase Móvel - água contendo 0,1% trietilamina e acetonitrila; eluição gradiente; fluxo de 1mL.min^{-1}; temperatura do forno 40ºC; detecção em 230 nm, volume de injeção 20µL.

FONTE: O autor (2016).

ANEXOS

ANEXO 1

ANEXO 1 – TABELA DOS PRINCIPAIS ENSAIOS CLÍNICOS DE FASE III REALIZADOS PARA O TRATAMENTO COM A ASSOCIAÇÃO DE NTX E BUP

Estudo	Formato	Intervenção	N° pacientes	Eficácia	Segurança	Referência
COR-I*	56 semanas, Multicêntrico, Randomizado, Duplo-cego, Controlado por placebo	Placebo, NTX SR 16 mg/dia and BUP SR 360 mg/dia (NB16), NTX SR 32 mg/day and bupropion 360 mg/dia (NB32)	Placebo: 581 NB16: 578 NB32: 583	Perda de peso média desde o início até 56 semanas foi de 6,1%; 48% perda de peso ≥5%	Náusea, dor de cabeça, constipação, tonturas, vômitos e boca seca	(GREENWAY et al., 2010)
COR-II*		Placebo, NTX SR 32 mg/day and BUP 360 mg/dia (NB32)	Placebo: 495 NB32: 1001	Perda de peso média desde o início até 56 semanas foi de 6,4%; 50,5% perda de peso ≥5%	Náusea; dor de cabeça, e constipação.	(APOVIAN et al., 2013)
COR-BMOD*		Placebo,NTX SR 32 mg/day and BUP 360 mg/dia (NB32) mais aconselhamento e mudança de vida intensos	Placebo: 202 NB32: 591	Perda de peso média desde o início até 56 semanas foi de 9,3%; 66% perda de peso ≥5%	NB 32 foi geralmente bem tolerada; mais relatos de náusea foram registados do que o placebo.	(WADDEN et al., 2011)
COR-DM**		Placebo, NTX SR 32 mg/day and BUP 360 mg/dia (NB32)	Placebo: 170 NB32: 335	Perda de peso média desde o início até 56 semanas foi de 5%; 44,5% perda de peso ≥5%	Náusea (42,3 vs. 7,1%), constipação (17,7 vs. 7,1%), e vômitos (18,3 vs. 3,6%).	(HOLLANDER et al., 2013)

*estudo incluiu pacientes com obesidade simples (sem presença de hipertensão, dislipidemia ou diabetes mellitus tipo 2) com um IMC entre 30 e 45 kg /m^2 ou pacientes com obesidade ou sobrepeso, com IMC entre 27 e 45 kg /m^2e com hipertensão controlada e/ou dislipidemia.

** Estudo incluiu pacientes obesos e com sobrepeso - IMC entre 27 e 45 kg /m^2 com diabetes tipo 2 mellitus com ou sem hipertensão controlada ou dislipidemia.

FONTE: SILA; FURLAN (2015).

ANEXO 2

ANEXO 2 - ENSAIOS NECESSÁRIOS PARA A VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO, SEGUNDO SUA FINALIDADE

Parâmetro	Categoria I	Categoria II Quantitativo	Categoria II Ensaio Limite	Categoria III	Categoria IV
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão (Repetibilidade)	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Precisão (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: Adaptado de BRASIL (2003).

* Pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico

** Se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária à comprovação da precisão intermediária