

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRENDA AQUINO

ESTUDO DE DEGRADAÇÃO DE EMPAGLIFLOZINA POR CLAE E
QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE EMPAGLIFLOZINA E METFORMINA
POR INFRAVERMELHO COM CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

CURITIBA

2018

BRENDA AQUINO

ESTUDO DE DEGRADAÇÃO DE EMPAGLIFLOZINA POR CLAE E
QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE EMPAGLIFLOZINA E METFORMINA
POR INFRAVERMELHO COM CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

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

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo

CURITIBA

2018

Aquino, Brenda

Estudo de degradação de empagliflozina por CLAE e quantificação simultânea de empagliflozina e metformina por infravermelho com calibração multivariada / Brenda Aquino – Curitiba, 2018.

126 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

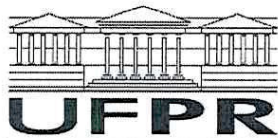
Orientador: Professor Dr. Roberto Pontarolo

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Metformina. 2. Empagliflozina. 3. Espectroscopia. I. Pontarolo, Roberto. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 615.1901



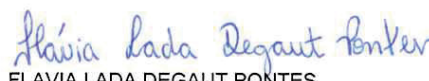
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **BRENDA AQUINO** intitulada: **ESTUDO DE DEGRADAÇÃO DE EMPAGLIFLOZINA POR CLAE E QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE EMPAGLIFLOZINA E METFORMINA POR INFRAVERMELHO COM CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa. A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 29 de Março de 2018.


ROBERTO PONTAROLO
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


FLAVIA LADA DEGAUT PONTES
Avaliador Externo (UFPR)


MARIO SERGIO RIAVAVINI
Avaliador Externo (UNIANDRAGE)

Dedico este trabalho com muito amor, primeiramente aos meus pais, que me deram a vida, me proporcionaram o privilégio de chegar até aqui e não me deixaram fraquejar, mesmo diante de tantas dificuldades. Dedico também à minha afilhada Larissa, que possa ver meu exemplo de superação, tornando-se assim uma mulher forte e determinada.

AGRADECIMENTOS

Neste momento, gratidão não chega a ser suficiente para expressar meu carinho por todos que me acompanharam ao longo dessa caminhada. Dizer muito obrigada do fundo do coração é pouco!

Pai e Mãe, vocês me educaram, me trouxeram pela mão até aqui. Eu não teria conseguido sem as broncas e brigas, os incentivos, as caronas, as marmitas, os ombros e ouvidos para os meus desabafos, os colos para chorar a frustração do que deu errado e os abraços apertados para comemorar cada pequeno passo alcançado, sem as palavras de encorajamento, sem os beijos de bom dia e boa noite, que marcaram religiosamente a passagem desses dois anos. Sei que vocês compreendem minha ausência e se orgulham da minha dedicação, mas eu não expressei o suficiente nesse tempo todo, então registro aqui o quanto eu amo vocês e sou grata por tudo o que vocês me proporcionam desde sempre.

Bianca e Bruno, tenho muito orgulho de ter vocês como minha família. Nossas diferenças me fizeram aprender muito sobre quem eu sou e onde eu quero chegar. Agradeço infinitamente a vocês pelo auxílio e incentivo para ingressar na pós-graduação, pela confiança no meu potencial, pelos puxões de orelha – não é fácil ser a caçula –, pelas experiências novas que vocês me ajudaram a ter e principalmente pelo amor incondicional. Amo muito vocês, meus chatos!

Aos meus familiares, eu amo cada um de vocês. Agradeço a confiança, o carinho, os abraços e os sorrisos de sempre!

Léo e Zanzi, eu não posso deixar de agradecer aqui meus melhores amigos. Vocês são os irmãos de outras mães que eu escolhi para mim. Crescemos e evoluímos juntos. Todo o cuidado, atenção, carinho, amor (e muita paciência) que vocês demonstraram até hoje, eu prometo que eu vou devolver! Encontrei minhas forças nas palavras de incentivo de vocês! Seguraram minha mão no momento mais difícil da minha vida. Continuarei com vocês sempre,

independentemente da situação. A vocês serei eternamente grata! Não tenho nem como medir meu amor por vocês! Vocês têm minha eterna lealdade.

Amigos que a escola, a faculdade e a vida trouxeram, amigos de perto e de longe, de agora e de sempre: vocês aliviaram cada miligrama do peso que eu carreguei até aqui! Suas risadas, momentos de descontração, almoços, jantares e cafés, chopes, passeios, cada minuto que vocês passaram ao meu lado, cada conselho e cada beijo e abraço fizeram da minha caminhada muito mais leve. Agradeço por me encorajarem e apoiarem nas minhas maiores loucuras. Amo vocês, de coração!

Amigos da Fundação Pontarolo: sou muito grata pelo auxílio no planejamento e na execução das atividades acadêmicas, pela atenção e disposição para me ensinar tudo o que aprendi nesse percurso. Agradeço pelas festinhas, comemorações, aniversários, reuniões, cafés e barzinhos. Vocês são muito queridos!

Amigos do CEB, dedico um agradecimento especial a vocês, que acompanharam de perto meus dramas. Obrigada por não me permitirem desistir nunca, mesmo que não tenham sido poucas as vezes em que eu chegava ao final de um longo dia de análises para dizer com um olhar nervoso “adivinha, o método não reproduziu” ou então “o frasco abriu, perdi o experimento”. A dedicação e paciência de cada um que acompanhou de perto meu desenvolvimento desde o início me permitiu concluir hoje esta etapa tão importante.

Agradeço especialmente aos meus colegas que auxiliaram no desenvolvimento prático do projeto desde o primeiro dia: Raquel, Breno, André, Wilton, Bruna, Mariana, Letícia, Reginaldo, Michel, Flávia e Mário. Eu não teria condições de planejar os experimentos sozinha, aprender a utilizar todos os equipamentos do laboratório, não teria conseguido preparar minhas infindáveis amostras e soluções, não teria tempo para obter os dados que foram compartilhados sem o auxílio de vocês. Sem vocês, nem 10, 20 anos bastariam para aprender tudo. Muito obrigada por permitirem a conclusão deste projeto e se tornarem amigos tão especiais! Desejo muito sucesso e felicidade! Que encontrem amigos tão bons quanto vocês são para mim. Vou sentir muita falta

dos nossos lanchinhos, pessoal! Além de excelentes farmacêuticos, vocês cozinham muito bem!

Gostaria de agradecer aos meus colegas do Mestrado pela convivência e empatia, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas por permitir meu desenvolvimento pessoal, aos colegas Flávia e Mário, por aceitar com gentileza a responsabilidade de avaliar meu trabalho e à CAPES pelo auxílio financeiro.

Por fim, ao Professor Roberto, reservo um agradecimento ainda mais especial. Mais do que prestar orientação nos assuntos referentes ao mestrado, recebi MUITA compreensão e confiança. Confiança no meu potencial, na minha força de vontade, na minha capacidade inventiva, de vencer as adversidades. Compreensão com as frustrações e problemas pessoais que enfrentei. O senhor sempre demonstrou muita humanidade e cuidado nas palavras que me dirigiu nesse período. Se consegui ter coragem de concluir hoje esse desafio, que não foi pequeno, foi por ter um orientador tão gentil. Espero conseguir retribuir toda a confiança depositada em mim. Agradeço a oportunidade de receber sua orientação e poder me orgulhar muito disso.

“O vento não quebra um galho que se dobra.”

Provérbio indiano

RESUMO

A metformina (MET), que pertence à classe das biguanidas, e a empagliflozina (EPZ), que é um inibidor do cotransportador de glicose e sódio tipo 2 (SGLT2), são empregados no tratamento do diabetes mellitus tipo 2. Em 2015, a publicação da RDC/Anvisa nº 53 tornou obrigatória para o registro de medicamentos a apresentação de um perfil de degradação, que representa o conjunto de produtos que podem ser observados em um fármaco exposto a determinadas condições. Devido a associação destes dois fármacos, é fundamental o desenvolvimento de metodologias de quantificação simultânea, visando assegurar o controle de qualidade destes medicamentos e também possibilitando a redução de custo de análise. O trabalho teve por objetivo realizar o estudo de degradação da EPZ e desenvolver e validar um método de quantificação desta associação por espectroscopia no infravermelho associada à calibração multivariada. Uma amostra de EPZ a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi avaliada frente à diferentes condições de hidrólise (0,1 – 5N HCl/NaOH), oxidação (2 – 30% H_2O_2), temperatura (80°C) e fotólise. Para monitoramento no estudo de degradação foi utilizado um método por CLAE-DAD. Para o desenvolvimento do método por IV, foram preparadas 83 amostras compreendendo a variação de 80 – 120% do valor nominal de uma dose comercial (500/12,5 mg – MET/EPZ). Os dados espectrais totais obtidos foram divididos em intervalos e foram processados para a construção de diversos modelos. Os pré-processamentos utilizados foram MSC, 1ª derivada de Savitzky-Golay e centrar os dados na média. A validação cruzada empregada foi *leave-one-out*. A constatação de inexistência de amostras anômalas, correspondência da região espectral selecionada com estruturas das moléculas e menores erros de calibração, validação e previsão foram os critérios utilizados na definição do tipo de pré-processamento, número de VL e intervalo espectral para cada analito. Nas condições de degradação testadas, EPZ apresentou-se estável. Dois modelos desenvolvidos foram selecionados e validados: a) IVP-siPLS1 MET: pré-processamentos: dados centrados na média, 3 VL e intervalo espectral de $9400 - 8200$ e $6400 - 5800 \text{ cm}^{-1}$; b) IVP-iPLS1 EPZ: pré-processamentos: MSC e dados centrados na média, 4 VL e faixa espectral de $6300 - 5500 \text{ cm}^{-1}$. O método desenvolvido foi validado de acordo com orientações nacionais (ANVISA) e internacionais, demonstrando o potencial para a futura aceitação por agências reguladoras.

Palavras-chave: Metformina, Empagliflozina, Produtos de degradação, Espectroscopia de infravermelho, Calibração multivariada.

ABSTRACT

Metformin (MET), which belongs to the class of biguanides, and empagliflozin (EPZ), which is a glucose and sodium cotransporter type 2 inhibitor (SGLT2), are used in the treatment of type 2 diabetes mellitus. The publication of RDC / Anvisa nº 53 in 2015 made it mandatory for the registration of medicines the presentation of a degradation profile, which represents the set of products that can be observed in a drug exposed to certain conditions. Due to the association of these two drugs, the development of simultaneous quantification methodologies is essential, in order to ensure the quality control of these drugs and also to reduce the cost of analysis. This work aimed to study the degradation of EPZ and to develop and validate a method for the quantification of this association by infrared spectroscopy associated with multivariate calibration. A sample of EPZ at 100 g.mL^{-1} was evaluated against the conditions of hydrolysis (0,1 – 5N HCl/NaOH), oxidation (2 – 30% H_2O_2), temperature (80 °C) and photolysis. A method by HPLC-DAD was used for the monitoring of the degradation study. For the development of the IR method, 83 samples were prepared comprising the variation of 80 – 120% of the nominal value of a commercial dosage form (500/12,5 mg – MET/EPZ). The total spectral data obtained were divided into intervals and processed to build several models. The pre-processings used were MSC, Savitzky-Golay 1st derivate and mean centering. The cross-validation used was leave-one-out. The non-existence of anomalous samples, correspondence of the selected spectral region with molecular structures, and lower calibration, validation and prediction errors were the criteria used to define the type of preprocessing, LV number and spectral range for each analyte. At the degradation conditions tested, EPZ was stable. Two models were selected and validated: a) NIR-siPLS1 MET: pre-processing: mean centering, 3 LV and spectral range of 9400 – 8200 and 6400 – 5800 cm^{-1} ; b) NIR-iPLS1 EPZ: pre-processing: MSC and mean centering, 4 LV and spectral range of 6300 – 5500 cm^{-1} . The developed method was validated according to national (ANVISA) and international guidelines, demonstrating the potential for future acceptance by regulatory agencies.

Key-words: Metformin, Empagliflozin, Degradation products, Infrared Spectroscopy, Multivariate Calibration.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - FÓRMULA ESTRUTURAL DA MET	29
FIGURA 2 - FÓRMULA ESTRUTURAL DA EPZ.....	32
FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO GEOMÉTRICA DO VETOR NAS	55
FIGURA 4 - GRÁFICO DA DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	66
FIGURA 5 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO UV DA EPZ	80
FIGURA 6 - CROMATOGRAMA REFERENTE AO TEMPO ZERO DO ENSAIO DE TERMODEGRADAÇÃO.....	81
FIGURA 7 - CROMATOGRAMA REFERENTE AO TEMPO FINAL (7 DIAS) DO ENSAIO DE TERMODEGRADAÇÃO	82
FIGURA 8 - CROMATOGRAMA REFERENTE AO TEMPO ZERO DO ENSAIO DE FOTODEGRADAÇÃO.....	83
FIGURA 9 - CROMATOGRAMA REFERENTE AO TEMPO FINAL (14 DIAS) DO ENSAIO DE FOTODEGRADAÇÃO	83
FIGURA 10 - CROMATOGRAMA REFERENTE AO TEMPO ZERO DO ENSAIO DE HIDRÓLISE NEUTRA	84
FIGURA 11 - CROMATOGRAMA REFERENTE AO TEMPO FINAL (72 H; 80 °C) DO ENSAIO DE HIDRÓLISE NEUTRA.....	85
FIGURA 12 - CROMATOGRAMA REFERENTE AO TEMPO ZERO (2 N) DO ENSAIO DE HIDRÓLISE ÁCIDA.....	86
FIGURA 13 - CROMATOGRAMA REFERENTE AO TEMPO FINAL (2 N; 72 H; 80 °C) DO ENSAIO DE HIDRÓLISE ÁCIDA	86
FIGURA 14 - CROMATOGRAMA REFERENTE AO TEMPO 23 H (5 N; 60 °C) DO ENSAIO DE HIDRÓLISE ÁCIDA	87
FIGURA 15 - CROMATOGRAMA REFERENTE AO BRANCO DO TEMPO 24 H (5 N; 60 °C) DO ENSAIO DE HIDRÓLISE ÁCIDA.....	88
FIGURA 16 - CROMATOGRAMA REFERENTE AO TEMPO ZERO (H ₂ O ₂ 30%) DO ENSAIO DE OXIDAÇÃO	89
FIGURA 17 - CROMATOGRAMA REFERENTE AO TEMPO FINAL (72 H; H ₂ O ₂ 30%) DO ENSAIO DE OXIDAÇÃO	89

FIGURA 18 - CROMATOGRAMA REFERENTE AO BRANCO DO TEMPO FINAL (72 H; H ₂ O ₂ 30%) DO ENSAIO DE OXIDAÇÃO.....	90
FIGURA 19 - ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO PRÓXIMO DAS AMOSTRAS DOS CONJUNTOS DE CALIBRAÇÃO (57 AMOSTRAS) E VALIDAÇÃO (26 AMOSTRAS) DA ASSOCIAÇÃO MET E EPZ	91
FIGURA 20 - ESPECTROS DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO PRÓXIMO DOS PADRÕES DE MET E EPZ	92
FIGURA 21 - INTERVALOS SELECIONADOS PARA OS MODELOS siPLS PARA MET	93
FIGURA 22 - INTERVALOS SELECIONADOS PARA OS MODELOS iPLS PARA EPZ.....	94
FIGURA 23 - GRÁFICO DE RMSECV VERSUS VL DE MET	95
FIGURA 24 - GRÁFICO DE PORCENTAGEM DE EXPLICAÇÃO DO BLOCO Y VERSUS VL DE MET	95
FIGURA 25 - GRÁFICO DE RMSECV VERSUS VL DE EPZ.....	96
FIGURA 26 - GRÁFICO DE PORCENTAGEM DE EXPLICAÇÃO DO BLOCO Y VERSUS VL DE EPZ	96
FIGURA 27 - ANÁLISE DE OUTLIERS PARA MET	97
FIGURA 28 - ANÁLISE DE OUTLIERS PARA EPZ	97
FIGURA 29 - REPRESENTAÇÃO DA DISPERSÃO DOS ERROS DE PREDIÇÃO PARA MET	99
FIGURA 30 - REPRESENTAÇÃO DA DISPERSÃO DOS ERROS DE PREDIÇÃO PARA EPZ.....	100
FIGURA 31 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA LINEARIDADE DE MET	100
FIGURA 32 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA LINEARIDADE DE EPZ.....	100
FIGURA 33 - REPRESENTAÇÃO DO GRADIENTE UTILIZADO NO MÉTODO CLAE-EM/EM.....	105
FIGURA 34 - CROMATOGRAMA OBTIDO DE AMOSTRA DE MET E EPZ..	106
FIGURA 35 - CROMATOGRAMA REFERENTE À TRANSIÇÃO DE QUANTIFICAÇÃO DE MET	107
FIGURA 36 - CROMATOGRAMA REFERENTE À TRANSIÇÃO DE QUANTIFICAÇÃO DE EPZ.....	107

FIGURA 37 - SOBREPOSIÇÃO DOS CROMATOGRAMAS REFERENTES À TRANSIÇÃO DE QUANTIFICAÇÃO NO BRANCO E NA AMOSTRA DE MET	109
FIGURA 38 - SOBREPOSIÇÃO DOS CROMATOGRAMAS REFERENTES À TRANSIÇÃO DE QUANTIFICAÇÃO NO BRANCO E NA AMOSTRA DE EPZ.....	109
FIGURA 39 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA LINEARIDADE DE MET	110
FIGURA 40 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA LINEARIDADE DE EPZ.....	111
FIGURA 41 - GRÁFICO DE RESÍDUOS DOS PONTOS DA CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA MET	112
FIGURA 42 - GRÁFICO DE RESÍDUOS DOS PONTOS DA CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA EPZ	112
FIGURA 43 - CROMATOGRAMA REFERENTE À TRANSIÇÃO DE QUANTIFICAÇÃO DE MET NO BRANCO	115
FIGURA 44 - CROMATOGRAMA REFERENTE À TRANSIÇÃO DE QUANTIFICAÇÃO DE EPZ NO BRANCO	116

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DADOS REFERENTES AO PREPARO DAS AMOSTRAS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	67
TABELA 2 - ENSAIO DE PRECISÃO PARA MET	98
TABELA 3 - ENSAIO DE PRECISÃO PARA EPZ	99
TABELA 4 - AVALIAÇÃO DO <i>BIAS</i> DOS MODELOS DE MET E EPZ.....	102
TABELA 5 - PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO DOS MODELOS MULTIVARIADOS DE QUANTIFICAÇÃO DESENVOLVIDOS.....	102
TABELA 6 - AVALIAÇÃO DA PRECISÃO.....	114
TABELA 7 - AVALIAÇÃO DA EXATIDÃO	115
TABELA 8 - COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA DOS MÉTODOS IV E CLAE-EM/EM	118

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA MET	29
QUADRO 2 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA EPZ	32
QUADRO 3 - MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO PARA MET E EPZ	39
QUADRO 4 - INSUMOS FARMACÊUTICOS UTILIZADOS	61
QUADRO 5 - CONDIÇÕES DE DEGRADAÇÃO TESTADAS	64
QUADRO 6 - NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO EMPREGADOS NA CONSTRUÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO	77
QUADRO 7 - CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS NO ENSAIO DE EXATIDÃO	79
QUADRO 8 - PARÂMETROS ESTABELECIDOS PARA A FONTE DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS	104
QUADRO 9 - PARÂMETROS ESTABELECIDOS PARA O MÉTODO CLAE- EM/EM	105

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADA	– <i>American Diabetes Association</i>
ANN	– <i>Artificial Neural Network</i>
Anvisa	– Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	– Ionização Química à Pressão Atmosférica
ASTM	– <i>American Society for Testing and Materials</i>
CAD	– Gás de Colisão
CCD	– Cromatografia de camada delgada
CE	– Energia de Colisão
CEP	– Potencial de Entrada na Cella de Colisão
CLAE	– Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-EM/EM	– Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial
CME	– Concentração média experimental
CUR	– Gás de Interface
CV	– Coeficiente de Variação
CXP	– Potencial de Saída da Cella de Colisão
DAD	– Detector de Arranjo de Diodos
DM	– Diabetes Mellitus
DP	– Potencial de Desagrupamento
DPR	– Desvio Padrão Relativo
EM/EM	– Espectrometria de massas sequencial
EMA	– Agência Europeia de Medicamentos
EP	– Potencial de Entrada
EPZ	– Empagliflozina
ESI	– Ionização por <i>electrospray</i>
FDA	– <i>Food and Drug Administration</i>
FIA	– <i>Flow Injection Analysis</i>
FTIR	– <i>Fourier-transform Infrared spectroscopy</i>

GLP-1	– <i>Glucagon-like peptide</i> do tipo 1
GLUT4	– <i>Glucose Transporter</i> tipo 4
GS1	– Gás de Nebulização
GS2	– Gás Auxiliar
HPLC	– <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ICH	– The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
IFA	– Insumo Farmacêutico Ativo
INMETRO	– Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
iPLS	– <i>Interval Partial Least Squares</i>
IS	– Voltagem do Capilar
IUPAC	– União Internacional de Química Pura e Aplicada
IV	– Espectroscopia de Infravermelho
IVP	– Infravermelho Próximo
LC	– Cromatografia Líquida
LDL	– <i>Low Density Lipoprotein</i>
LSQ	– Limite Superior de Quantificação
MET	– Metformina
MLR	– <i>Multiple Linear Regression</i>
MRM	– <i>Multiple Reaction Monitoring</i>
MSC	– <i>Multiplicative Scattering Correction</i>
NAS	– <i>Net Analytical Signal</i>
OMS	– Organização Mundial da Saúde
PCR	– <i>Principal Component Regression</i>
PLS	– <i>Partial Least Squares</i>
PTFE	– Politetrafluoretileno
PVDF	– Fluoreto de Polivinilideno
RDC	– Resolução da Diretoria Colegiada
RMSEC	– <i>Root Mean Squared Error of Calibration</i>
RMSECV	– <i>Root Mean Squared Error of Cross Validation</i>

RMSEP	– <i>Root Mean Squared Error of Prediction</i>
RPD	– Desvio Padrão de Previsão
SBD	– Sociedade Brasileira de Diabetes
SDV	– Desvio Padrão dos Erros de Validação
SEL	– Seletividade
SEN	– Sensibilidade
SGLT	– Cotransportador de sódio e glicose
siPLS	– <i>Synergy Intervals Partial Least Squares</i>
SNV	– <i>Standard Normal Variate</i>
TOF	– Tempo de voo
USP	– <i>United States Pharmacopeia</i>
UV	– Ultravioleta
VL	– Variável Latente

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	OBJETIVOS	23
2.1	OBJETIVO GERAL	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3	REVISÃO DE LITERATURA	24
3.1	DIABETES MELLITUS	24
3.1.1	Fisiopatologia, progressão e complicações	24
3.1.2	Tratamento não farmacológico	26
3.1.3	Tratamento farmacológico.....	27
3.1.3.1	Metformina	28
3.1.3.2	Inibidores SGLT2	30
3.1.3.3	Empagliflozina	31
3.2	CONTROLE DE QUALIDADE EM MEDICAMENTOS.....	33
3.3	LEGISLAÇÃO APLICADA À PRODUÇÃO DE MEDICAMENTOS.....	34
3.4	ESTABILIDADE DE MEDICAMENTOS	35
3.5	PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO EM MEDICAMENTOS.....	36
3.6	MÉTODOS DISPONÍVEIS NA LITERATURA PARA O CONTROLE DE QUALIDADE DE MET E EPZ.....	39
3.7	TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA ANÁLISE DE MEDICAMENTOS	40
3.7.1	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	40
3.7.2	Detector de arranjo de diodos (DAD)	41
3.7.3	Espectrometria de massas (EM)	41
3.7.3	Espectroscopia no infravermelho	43
3.7.4	Quimiometria.....	45
3.8	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS	50
3.8.1	Validação de métodos analíticos univariados	51

3.8.2	Validação de métodos multivariados	54
3.8.2.1	Seletividade.....	55
3.8.2.2	Linearidade	56
3.8.2.3	Sensibilidade.....	56
3.8.2.4	Precisão	57
3.8.2.5	Exatidão	58
3.8.2.6	Robustez.....	58
3.8.2.7	Teste para erro sistemático (<i>bias</i> - viés).....	59
3.8.2.8	Desvio residual de predição	60
4	MATERIAL E MÉTODOS	61
4.1	REAGENTES E SOLVENTES	61
4.1.1	Padrões analíticos e insumos farmacêuticos.....	61
4.2	CONSUMÍVEIS E EQUIPAMENTOS	61
4.3	SOFTWARES	62
4.4	PREPARO DE SOLUÇÃO ESTOQUE	62
4.5.	ESTUDO DE DEGRADAÇÃO DA EPZ	63
4.5.1	Preparo das soluções de degradação	63
4.5.2	Preparo das soluções.....	64
4.5.3	Método CLAE-DAD para produtos de degradação	64
4.6	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO IV	65
4.6.1	Seleção dos excipientes.....	65
4.6.2	Seleção das amostras.....	65
4.6.3	Desenvolvimento do modelo multivariado de calibração	71
4.6.4	Validação dos modelos desenvolvidos.....	72
4.6.4.1	Seletividade, sensibilidade e sensibilidade analítica	72
4.6.4.2	Linearidade	72
4.6.4.3	Precisão	72

4.6.4.4	Exatidão	73
4.6.4.5	Robustez	73
4.6.4.6	<i>Bias</i>	73
4.6.4.7	Desvio padrão de previsão (<i>residual prediction deviation</i> – RPD)	73
4.7	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO CLAE-EM/EM ..	74
4.7.1	Checagem de sinal dos analitos por infusão direta no espectrômetro de massas	74
4.7.2	Análise por <i>Multiple Reaction Monitoring</i> (MRM)	74
4.7.3	Análise por injeção em fluxo – FIA	74
4.7.4	Preparo da fase móvel	75
4.7.5	Otimização do preparo de amostra	75
4.7.6	Validação do método	76
4.7.6.1	Seletividade	76
4.7.6.2	Curva de calibração e intervalo	77
4.7.6.3	Efeito matriz	77
4.7.6.4	Precisão	78
4.7.6.5	Exatidão	78
4.7.6.6	Teste de efeito residual (<i>carryover</i>)	79
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
5.1	ESTUDO DE DEGRADAÇÃO	80
5.1.1	Tempo Zero	80
5.1.2	Termodegradação	81
5.1.3	Fotodegradação	82
5.1.4	Hidrólise neutra	84
5.1.5	Hidrólise ácida e básica	85
5.1.6	Oxidação	88
5.1.7	Conclusões do estudo	90

5.2	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO IV	91
5.2.1	Desenvolvimento do método	91
5.2.2	Validação dos modelos	98
5.2.2.1	Precisão	98
5.2.2.2	Linearidade	99
5.2.2.3	Seletividade, sensibilidade e sensibilidade analítica	101
5.2.2.4	Exatidão	101
5.2.2.5	Robustez	101
5.2.2.6	<i>Bias</i>	102
5.2.2.7	Desvio padrão de previsão (<i>residual prediction deviation</i> - RPD)	102
5.2.3	Comparação do método IV-PLS com técnica cromatográfica	103
5.3	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO CLAE-EM/EM	104
5.3.1	Otimização dos parâmetros do espectrômetro e do cromatógrafo líquido	104
5.3.2	Validação do método	108
5.3.2.1	Seletividade	108
5.3.2.2	Linearidade, intervalo de trabalho e efeito matriz	110
5.3.2.3	Precisão	113
5.3.2.4	Exatidão	114
5.3.2.5	Teste do efeito residual (<i>carryover</i>)	115
5.4	QUANTIFICAÇÃO DOS FÁRMACOS EM AMOSTRAS REAIS	116
6	CONCLUSÃO	119
	REFERÊNCIAS	121

1 INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) é um distúrbio metabólico com múltiplas etiologias. É caracterizado por hiperglicemia crônica e distúrbios no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios, resultantes de defeito na secreção e/ou ação da insulina (SBD, 2015). A classificação do DM é realizada com base na sua causa, destacando-se o tipo 1 (DM1), relacionada a não produção pancreática de insulina endógena, e tipo 2 (DM2), em que há o aumento da glicemia devido à combinação de predisposição genética, dieta não saudável, inatividade física e aumento de peso com uma distribuição central. Esta patologia está associada com o desenvolvimento a longo prazo de danos específicos em órgãos, devido ao comprometimento microvascular (RYDEN et al., 2007).

Visando à redução dos níveis glicêmicos, recomenda-se inicialmente o tratamento farmacológico com a metformina (MET). Este fármaco pertence à classe das biguanidas e é utilizado por reduzir a produção hepática de glicose, e conseqüentemente, aumentar a sensibilidade do fígado à insulina e também a captação de glicose nos tecidos periféricos (NATHAN et al., 2009). O medicamento referência é comercializado sob o nome de Glifage®, da Merck S/A. Entretanto, quando não há a normalização dos níveis glicêmicos, as diretrizes terapêuticas recomendam a associação com representantes de outras classes terapêuticas, como a empagliflozina (EPZ) (ADA, 2015; SBD, 2015).

A EPZ é um inibidor do cotransportador de glicose e sódio tipo 2 (SGLT2), sendo este cotransportador responsável pela reabsorção de glicose do filtrado glomerular nos rins (GREMLER et al., 2012). Desta forma, o efeito resultante da inibição de SGLT2 é a redução da absorção renal e diminuição do limiar renal para a glicose, culminando no aumento da excreção de glicose e redução da hiperglicemia. Além disso, auxilia na perda de peso e redução da pressão sanguínea (SARASHINA et al., 2013). Este medicamento é comercializado sob o nome de Jardiance®, da Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc.

Em 2015, a publicação da RDC/Anvisa nº 53 tornou obrigatória no momento da concessão ou renovação do registro de um medicamento a apresentação de um perfil de degradação dos fármacos obtido através de

estudos de estabilidade. Este perfil representa o conjunto de produtos que podem ser observados em um fármaco ou no próprio medicamento quando exposto a determinadas condições. A geração de produtos através da exposição do fármaco ou medicamento a condições de estresse compõe um estudo de degradação forçada (BRASIL, 2015).

Com relação aos antidiabéticos mencionados (MET e EPZ), foram encontrados estudos na literatura que descrevem somente a caracterização dos produtos de degradação de um deles, a MET. Considerando que a caracterização destes compostos é de fundamental importância para a segurança dos pacientes, devido à possibilidade de exposição crônica a compostos possivelmente tóxicos e, que o conhecimento acerca do comportamento de estabilidade da substância permite a execução de medidas de controle de qualidade sobre o produto, torna-se imprescindível a realização de estudos de degradação forçada para o outro fármaco, a EPZ.

Além disso, devido à possibilidade e associação destes dois fármacos no tratamento de DM2, é fundamental o desenvolvimento de metodologias analíticas de quantificação simultânea da MET e EPZ, visando assegurar o controle de qualidade destes medicamentos, tanto em termos de segurança quanto eficácia, e também possibilitando a redução de custo e de análise. Dentre as técnicas analíticas destaca-se a espectroscopia no infravermelho (IV) associada a calibração multivariada por ser uma técnica que se destaca pelo seu baixo custo, manipulação reduzida da amostra em comparação à outras técnicas e menor impacto ambiental (PASQUINI, 2003; LIMA et al., 2009; FERREIRA; BRAGA; SENA, 2012).

Levando em consideração o apresentado, o presente trabalho visa obter o perfil de degradação da EPZ e desenvolver um método analítico para quantificar simultaneamente MET e EPZ através da técnica de infravermelho aliado à calibração multivariada.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter o perfil de degradação da EPZ. Desenvolver e validar um método de quantificação da associação de MET e EPZ por espectroscopia no infravermelho associada à calibração multivariada.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Submeter as amostras de EPZ aos ensaios de estresse;
- Analisar se há degradação nestas amostras por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) e verificar a porcentagem de degradação obtida;
- Desenvolver um método indicativo de estabilidade para a EPZ;
- Identificar os produtos de degradação da EPZ;
- Desenvolver um método para quantificação simultânea de EPZ e MET empregando espectroscopia de infravermelho aliado à calibração multivariada;
- Validar o método desenvolvido de acordo com as normas vigentes;
- Aplicar o método em produtos comerciais contendo a associação farmacêutica dos antidiabéticos orais;
- Comparar os resultados obtidos pelo método por IV com outro método validado.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 DIABETES MELLITUS

3.1.1 Fisiopatologia, progressão e complicações

Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), DM não se caracteriza como uma única doença, mas um grupo de distúrbios metabólicos, apresentando em comum a hiperglicemia, que resulta de defeitos fisiológicos tanto na ação quanto na secreção de insulina. A Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Associação Americana de Diabetes (*American Diabetes Association* – ADA) classificam a doença em quatro tipos principais: tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2), gestacional e outros tipos específicos. Dentre esses, o DM2 é a forma mais comum da doença, estando presente de 90% a 95% dos casos. Ele é caracterizado por defeitos tanto na ação quanto na secreção da insulina no corpo (ADA, 2015; SBD, 2015). Em geral, ambos os defeitos estão presentes no paciente quando a hiperglicemia se manifesta, porém, não é descartada a possibilidade de predomínio de apenas um destes defeitos (DEVINENI et al., 2016).

O DM ocorre devido à interação entre diversos fatores genéticos e ambientais, que acabam por resultar em um distúrbio heterogêneo e progressivo, gerando variados graus de resistência à insulina e também a disfunção das células β -pancreáticas (HATTERSLEY; THORENS, 2015). Além disso, o excesso de peso e a obesidade, reflexos da tendência global a um estilo de vida sedentário, são os maiores contribuintes para o desenvolvimento de resistência à insulina e também da tolerância à glicose enfraquecida. Existem hoje no Brasil mais de 12 milhões de diabéticos e a estimativa é de que até 2045 o número de pacientes com DM no mundo todo será em torno de 630 milhões (IDF, 2017).

A partir do momento em que as células β -pancreáticas se tornam incapazes de secretar quantidades suficientes de insulina, necessárias para vencer a resistência, a tolerância enfraquecida à glicose acaba por evoluir para

DM2. Também contribuem para este quadro, outros defeitos em hormônios, como a secreção reduzida de incretinas, hiperexcreção do glucagon e concentrações elevadas de outros hormônios contrarregulatórios (TAHRANI et al., 2011).

Estudos demonstram que alterações comuns na função das células β geralmente incluem um período de secreção anormal compensatória de insulina prévia ao desenvolvimento da doença. Devido ao declínio na função pancreática, pode ocorrer uma falha na eficácia de medicamentos antidiabéticos, com estudos indicando a manutenção de uma resposta satisfatória à monoterapia a longo prazo em apenas 25% dos pacientes (ARAÚJO; BRITTO; CRUZ, 2000).

A redução da função das células β parece envolver algumas complicações como hiperglicemia crônica (glicotoxicidade), exposição crônica a ácidos graxos não esterificados (lipotoxicidade), estresse oxidativo, e inflamação. Ainda, sabe-se que pacientes com DM2 geralmente apresentam também disfunção nas células α -pancreáticas, desencadeando o aumento da secreção de glucagon na presença de hiperglicemia e provavelmente, a redução da secreção prandial de *glucagon-like peptide* do tipo 1 (GLP1), hormônio responsável por reduzir a excreção de glucagon e promover a secreção de insulina na presença de glicose (BARNETT, 2011; LEE et al., 2008; TAHRANI et al., 2011).

As complicações decorrentes da evolução do DM causam sofrimento considerável ao paciente e também estão associadas a elevados custos econômicos. Conforme a doença progride, complicações resultantes da hiperglicemia, como retinopatia com potencial perda de visão, neuropatia periférica, com possibilidade de amputação, nefropatia e outras doenças macrovasculares são observadas, sendo esta última complicação considerada uma das principais causas de morte em países desenvolvidos. A maioria dessas complicações vinculadas ao DM pode ser prevenida ou adiada, desde que seja oferecida assistência farmacêutica (BARNETT, 2011; OBERMEIER et al., 2010).

3.1.2 Tratamento não farmacológico

Observa-se frequentemente alterações metabólicas antes do desenvolvimento do DM2, incluindo a tolerância a glicose enfraquecida, dislipidemia e resistência à insulina. Embora nem todos os pacientes que apresentam tais anormalidades metabólicas terminem por desenvolver DM, o risco desse quadro progredir para a doença é considerado elevado. Estudos clínicos demonstraram que estratégias efetivas de intervenção no estilo de vida além de tratamentos farmacológicos podem prevenir ou ao menos retardar a progressão da doença em indivíduos de alto risco (RYDEN et al., 2007).

Mudanças no estilo de vida incluem alimentação e atividades físicas e podem retardar ou prevenir o DM2. Eles fazem parte do autocuidado do paciente e tem como objetivo o bom estado nutricional, saúde fisiológica e qualidade de vida para o paciente, além de evitar complicações e comorbidades associadas (ADA, 2015; SBD, 2015).

A terapia nutricional deve selecionar concentrações adequadas de macronutrientes e micronutrientes a serem prescritos ao paciente, a fim de estabelecer uma nutrição equilibrada. As estratégias nutricionais sugeridas pela SBD e ADA são: redução calórica e de gorduras, ingestão de 14 gramas fibras para cada 1000 kcal consumidas, a partir de grãos integrais e demais vegetais, e limitação do consumo de bebidas adoçadas (ADA, 2015; SBD, 2015).

Adicionalmente, diversas evidências epidemiológicas e de estudos clínicos sustentam que um tipo específico de comportamento alimentar – a dieta mediterrânea – apresenta papel protetor na prevenção do DM. Isto se dá principalmente por este tipo de alimentação ser majoritariamente baseado em vegetais – a saber, o alto consumo de alimentos de origem vegetal como frutas, legumes, grãos integrais, sementes, azeite de oliva, consumo moderado de peixes, produtos lácteos, vinho, e por fim, baixo consumo de carne vermelha e processada e de alimentos com alto teor de açúcares adicionados. Esta característica corrobora com o papel protetor da dieta mediterrânea por proporcionar melhor controle glicêmico e de sensibilidade a insulina em

comparação as dietas usuais, como aquelas de baixa ingestão de carboidratos ou a dieta vegetariana restrita (SALAS-SALVADO et al., 2016).

Também exercícios físicos podem ser considerados como um importante aliado no tratamento do DM, ocupando posição de destaque, pois atuam sobre o controle glicêmico e sobre outros fatores de comorbidade, como a hipertensão e a dislipidemia. Desta forma, favorece a redução do risco cardiovascular e eleva a qualidade de vida. A falta de exercícios físicos é considerada como um fator de risco para diversas doenças importantes, incluindo o DM. Ainda, a atividade física promove maior capilarização das fibras musculares e melhora na função mitocondrial, que resulta no aumento da sensibilidade dos tecidos à insulina (ÇOLAK et al., 2016). Sabe-se também que exercícios físicos aumentam a capacidade de captação da glicose sanguínea para os músculos por mecanismos que envolvem o GLUT4 (*glucose transporter* tipo 4), uma proteína transportadora da glicose que é ativada na contração muscular (ARSHAD et al., 2016).

3.1.3 Tratamento farmacológico

O uso de medicamentos antidiabéticos está indicado no DM2, quando mesmo com a dieta e o aumento da atividade física, o indivíduo não for capaz de obter um bom controle glicêmico, ou seja, glicemias de jejum e pós-prandial e hemoglobina glicada próximos da normalidade. Os valores de referência estabelecidos pela SBD são: $< 100 \text{ mg.dL}^{-1}$, $< 160 \text{ mg.dL}^{-1}$ e $< 7,0\%$, respectivamente, para os três parâmetros citados anteriormente (SBD, 2015).

A SBD classifica os antidiabéticos em quatro categorias: 1) Os que aumentam a secreção de insulina (hipoglicemiantes); 2) Os que não aumentam (anti-hiperglicemiantes); 3) Os que aumentam a secreção de insulina de forma dependente de glicose, além de promover a supressão do glucagon e 4) Os que promovem glicosúria (sem relação com a secreção de insulina) (SBD, 2015).

Como exemplos de hipoglicemiantes, são citadas as sulfonilureias e as meglitinidas ou glinidas. Como representantes dos anti-hiperglicemiantes

figuram os inibidores da α -glucosidase, biguanidas e tiazolidinedionas. À terceira categoria pertencem as gliptinas e os miméticos de GLP1 (*glucagon-like peptide* tipo 1). Já os agentes que promovem a glicosúria são representados pelos inibidores de SGLT2 (*sodium glucose transporter* tipo 2) (TAHRANI et al., 2011).

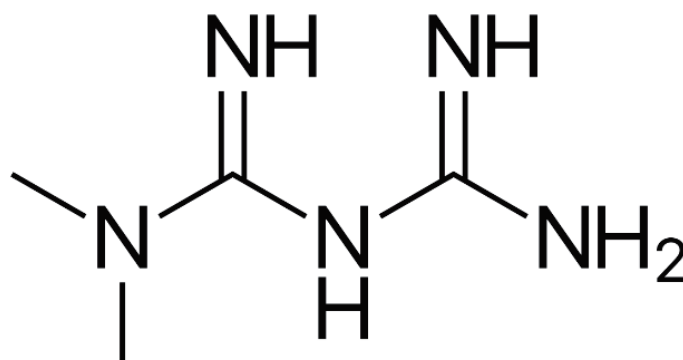
Também a insulina faz parte do arsenal terapêutico do DM. Consiste no hormônio anabólico mais conhecido e é imprescindível para a manutenção de níveis fisiológicos normais da glicose e do crescimento e diferenciação celular. O aumento dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos após a alimentação gera como resposta a secreção deste hormônio pelas células β das ilhotas pancreáticas. A insulina atua sobre a homeostase da glicose de diversas maneiras, reduzindo a gliconeogênese e a glicogenólise no fígado e aumentando a captação de glicose nos tecidos periféricos, principalmente muscular e adiposo (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002).

3.1.3.1 Metformina

A MET é um antidiabético de uso oral pertencente a classe das biguanidas. É o único representante desta classe de medicamentos que se encontra disponível comercialmente e, aliado a uma modificação de estilo de vida, é o medicamento de primeiro escolha para o tratamento do DM2. A ação de MET se dá pela diminuição da produção hepática de glicose, o que aumenta a sensibilidade do fígado à insulina e também a captação de glicose nos tecidos periféricos, sem atuar diretamente nas células β -pancreáticas. MET reduz a hemoglobina glicada, sem os riscos de hipoglicemia e contribui para a redução ou manutenção do peso dos pacientes que a utilizam. Ainda, favorece a redução dos níveis do colesterol LDL (do inglês *low density lipoprotein*, lipoproteína de baixa densidade) e de triglicerídios (SBD, 2015). Em 2017, estavam registrados no Brasil 66 medicamentos contendo o cloridrato de metformina, seja de forma isolada ou como associação com outros antidiabéticos orais.

A (FIGURA 1) a seguir mostra a fórmula estrutural do composto e o (QUADRO 1) apresenta algumas características físico-químicas de MET.

FIGURA 1 - FÓRMULA ESTRUTURAL DA MET



Fonte: O autor, 2018.

QUADRO 1 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA MET

Nome IUPAC	3-(diaminometilideno)-1,1-dimetilguanidina
Fórmula molecular	C ₄ H ₁₁ N ₅
Massa molar	129,167 g.mol ⁻¹
Solubilidade em água	1,38 mg.mL ⁻¹
pKa	12,33

Fonte: PubChem. <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>>

A MET pertence a classe 3 do sistema de classificação biofarmacêutica, ou seja, apresenta alta solubilidade (na forma do sal cloridrato) e baixa permeabilidade. Dessa forma, MET necessita de transportadores para compensar a baixa permeabilidade. A substância apresenta alto volume de distribuição, o que indica que ocorre absorção tecidual significativa. Estes achados sugerem que transportadores desempenham um papel importante tanto na absorção como também na distribuição e eliminação de MET pela urina, na sua forma inalterada (LIANG, 2017).

3.1.3.2 Inibidores SGLT2

Apesar da grande quantidade de terapias disponíveis, a manutenção do controle glicêmico em pacientes com DM2 ainda pode ser considerada desafiadora. Somado a isso, os antidiabéticos disponíveis vêm sendo associados a eventos adversos significativos como aumento de peso, hipoglicemia e efeitos gastrointestinais. Por esta razão, é necessário desenvolver tratamentos eficazes e bem tolerados com novos mecanismos de ação independente da insulina, em particular para utilização como terapia combinada com os demais medicamentos já existentes (SARASHINA et al., 2013).

Algumas novas substâncias terapêuticas reduzem os níveis de glicose sanguínea através da modulação de alvos que afetam o metabolismo da glicose (glucoquinase, glicogênio fosforilase) ou então através da regulação da homeostase da glicose (proteína quinase AMP ativada). Neste contexto, um novo mecanismo pelo qual os níveis de glicose no sangue podem ser reduzidos é com base na eliminação da glicose circulante pela inibição de cotransportadores de glicose e sódio (SGLT) (OBERMEIER et al., 2010).

Os inibidores do SGLT2 representam uma das classes de agentes terapêuticos em desenvolvimento para o tratamento de DM2. Sabe-se que o rim desempenha um papel fundamental na homeostase glicêmica, uma vez que são os glomérulos que filtram a glicose do sangue (GREMPER et al., 2012). Em indivíduos saudáveis a glicose é quase completamente reabsorvida nos túbulos proximais através dos SGLT2, expressos de forma majoritária no segmento S1 do túbulo proximal renal, sendo responsáveis por 90% da reabsorção renal de glicose em indivíduos saudáveis. Uma vez que os níveis de glicêmicos atingem o limiar de reabsorção renal (definido como a capacidade de transporte de reabsorção máxima dos túbulos, em média $375 \text{ mg} \cdot \text{min}^{-1}$), o excesso de glicose é excretado por meio da urina. A inibição do SGLT2 demonstrou bloquear a capacidade do corpo de reabsorver glicose por via renal, o que conduz à eliminação de glicose na urina, levando a uma redução nos níveis de glicemia (SARASHINA et al., 2013).

A glicose remanescente (que não é absorvida pelos SGLT2) é reabsorvida pelo outro transportador da mesma família, o SGLT1, que tem uma afinidade semelhante para a glicose, porém está localizada no segmento S3 do túbulo proximal. Diferentemente do SGLT2, este transportador também é encontrado em outros órgãos, como intestino, coração, fígado e pulmões. Este transportador tem como função principal a absorção de glicose e galactose no intestino delgado, o que justifica a importância da seletividade dos inibidores de SGLT para SGLT2. Indivíduos com mutações no gene SGLT1 apresentam uma patologia caracterizada por desidratação grave e diarreia. A inibição da reabsorção da glicose no intestino (no caso da inibição de SGLT1) pode resultar em má absorção destes açúcares, levando a um quadro clínico análogo aquele observado em portadores da mutação (GREMPER et al., 2012).

A eliminação de glicose na urina tanto diminui o nível de glicose no sangue como também resulta em perda de peso, provavelmente em decorrência da eliminação de calorias. Os principais eventos adversos destes medicamentos resultam da glicosúria aumentada, como o aumento da incidência de infecções do trato geniturinário (especialmente candidíase) e poliúria e um aumento do risco de desidratação (HATTERSLEY; THORENS, 2015).

Ainda, estudos indicam que, em indivíduos com a função renal normal, inibidores de SGLT2 representam uma nova classe de terapias hipoglicemiantes que induzem simultaneamente o controle glicêmico e da pressão sanguínea. Apesar de o mecanismo relacionado à redução da pressão sanguínea não ter sido ainda elucidado, acredita-se que a diurese osmótica decorrente da glicosúria contribui para a redução da pressão sanguínea (STERNLICHT; BAKRIS, 2016).

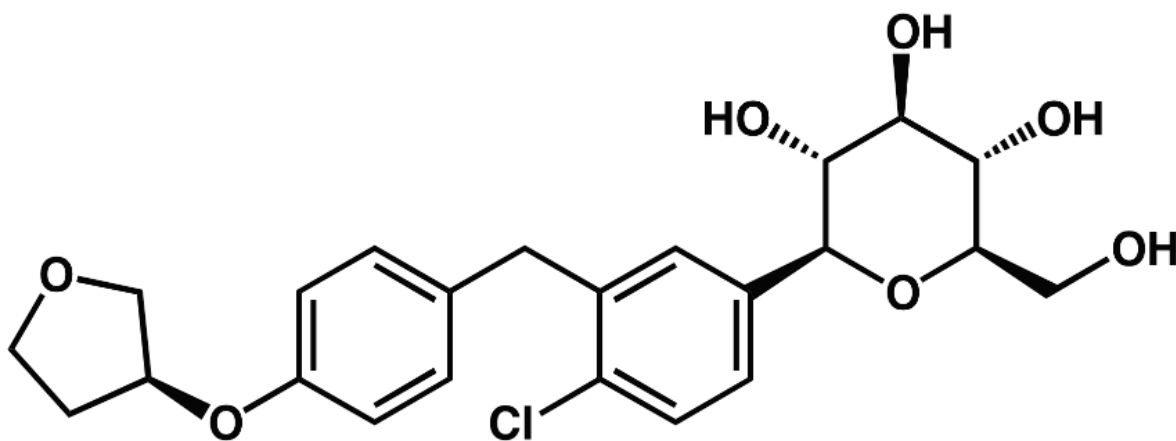
3.1.3.3 Empagliflozina

A EPZ é um inibidor do SGLT2, responsável pela reabsorção de glicose do filtrado glomerular nos rins. Como resultante desta inibição é observada a redução da absorção renal e diminuição do limiar renal para a glucose, o que resulta no aumento da excreção de glicose. Além disso, contribui para a

hiperglicemia reduzida, auxilia a perda de peso e reduz a pressão sanguínea. Aprovado inicialmente pela agência americana responsável por alimentos e medicamentos (*Food and Drug Administration – FDA*) e posteriormente pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) em julho de 2014, este medicamento é importado e comercializado nacionalmente sob o nome de Jardiance® (BRASIL, 2014a; FDA, 2014).

A (FIGURA 2) apresenta a fórmula estrutural dessa substância e algumas de suas características físico-químicas estão expostas no (QUADRO 2) a seguir.

FIGURA 2 - FÓRMULA ESTRUTURAL DA EPZ



Fonte: O autor, 2018.

QUADRO 2 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA EPZ

Nome IUPAC	(2S,3R,4R,5S,6R)2[4chloro3[[4[(3S)oxolan3yl]oxyphenyl]methyl]phenyl]6(hydroxymethyl)oxane3,4,5triol
Fórmula Molecular	C ₂₃ H ₂₇ ClO ₇
Massa Molar	450,144531 g.mol ⁻¹
Solubilidade em água	0,111 mg.mL ⁻¹
pKa (ácido mais forte)	12,57
pKa (básico mais forte)	-3

Fonte: PubChem. <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>>

Apesar do fato de todos os inibidores SGLT serem estruturalmente parecidos, os compostos diferem em seus respectivos perfis de seletividade. EPZ demonstrou ter a maior seletividade para SGLT2 sobre SGLT1 dentre diversos outros medicamentos da mesma classe (GREMPER et al., 2012).

No que diz respeito à farmacocinética, a EPZ é rapidamente absorvida, atingindo concentração máxima entre 75 min (dose de 1 mg) e 150 min (dose de 100 mg). EPZ apresenta-se como modelo bicompartimental, o que indica fase de distribuição rápida e fase de eliminação mais lenta. Segundo metodologia utilizada por Sarashina et al. (2013), EPZ permanece detectável 72 h após a administração de doses de 25 e 100 mg, mas apresenta concentração abaixo do limite de quantificação para doses menores (5 e 10 mg), no mesmo período. Doses ainda menores (1 mg) apresentam comportamento similar, porém por período de tempo mais curto (48 h). A meia vida da EPZ varia entre próximo de 8 a 12 h. A depuração total da EPZ no plasma independe da dose e varia de 140 a 172 mL.min⁻¹ (SARASHINA et al., 2013).

Segundo a Agência Europeia de Medicamentos (EMA), assim como a MET, este medicamento também pertence à classe III do sistema de classificação biofarmacêutica (EMA, 2014).

3.2 CONTROLE DE QUALIDADE EM MEDICAMENTOS

Em 1976 foi publicada a lei nº 6.360 que submete os medicamentos, insumos farmacêuticos, drogas, correlatos, cosméticos, produtos de higiene, saneantes e outros ao sistema de vigilância sanitária. Esta lei foi a primeira a inserir os conceitos de medicamento de referência e de controle de qualidade que são empregados neste trabalho. No momento, vigora o disposto na lei nº 9.787/1999, segundo a qual, medicamento de referência é aquele produto inovador registrado e comercializado no País, que apresenta eficácia, segurança e qualidade comprovadas junto ao órgão federal competente, no momento do registro (BRASIL, 1976; 1999b).

O outro conceito, controle de qualidade, refere-se ao conjunto de medidas destinadas a verificar a qualidade de cada lote de medicamentos e demais produtos de que a lei nº 6.360 de 1976 trata, para que satisfaçam às normas de atividade, pureza, eficácia e inocuidade exigidas pelo órgão sanitário. Desde 1999, ano da criação da Anvisa através da lei nº 9.782, as atividades relacionadas ao controle de qualidade de medicamentos têm sido regulamentadas por essa agência através da publicação de resoluções. Cabe à Anvisa as ações de regulamentação, fiscalização e controle dos produtos e serviços que envolvam risco a saúde pública (BRASIL, 1976; 1999a).

3.3 LEGISLAÇÃO APLICADA À PRODUÇÃO DE MEDICAMENTOS

Dentre as principais regulamentações emitidas pela Anvisa para o setor farmacêutico, destacam-se as seguintes resoluções: RDC/Anvisa nº 60/2014, que dispõe sobre o registro de medicamentos e a RDC/Anvisa nº 17/2010, que trata de boas práticas de fabricação destes produtos (BRASIL, 2010; 2014b).

O objetivo da RDC/Anvisa nº 60/2014 é estabelecer os critérios e a documentação mínima considerada necessária para que seja concedido o registro de medicamentos (ou sua renovação), com princípios ativos sintéticos e semissintéticos, classificados como novos, genéricos e similares. Estes critérios são determinados com o intuito de garantir a qualidade, segurança e eficácia destes medicamentos para o consumidor.

Neste contexto, cabe ressaltar o artigo 284 da RDC/Anvisa nº 17/2010, que deixa clara a função do setor de controle de qualidade em uma indústria: estabelecer, validar e implementar todos os procedimentos de controle de qualidade, além de avaliar, manter e armazenar os padrões de referência, garantir a rotulagem correta dos reagentes, padrões e outros materiais de sua utilização, garantir que a estabilidade dos ingredientes ativos e medicamentos seja monitorada, participar da investigação de reclamações relativas à qualidade do produto e participar do monitoramento ambiental (BRASIL, 2010).

Ainda, o artigo 302 propõe que deve ser feita avaliação da qualidade e da estabilidade dos produtos terminados e, quando necessário, das matérias primas, dos produtos intermediários e a granel. No que diz respeito a estabilidade, o artigo 305 traz que essa deve ser determinada antes da comercialização e deve ser repetida após quaisquer mudanças significativas nos processos de produção, equipamentos, materiais de embalagem e outras que possam influir na estabilidade do produto (BRASIL, 2010).

A publicação da RDC/Anvisa nº 53, em 2015, reitera a necessidade de avaliação da estabilidade no procedimento de concessão ou renovação de registro de medicamentos considerados inovadores, como no caso da EPZ (BRASIL, 2015).

3.4 ESTABILIDADE DE MEDICAMENTOS

A definição do período de estabilidade consiste no tempo durante o qual um produto farmacêutico, seja um medicamento, matéria prima ou mesmo o fármaco isolado, mantém as mesmas condições e características que possuía quando da época de sua fabricação, isto é, características dentro dos limites especificados e durante todo o período definido de estocagem e uso (BRASIL, 2005; SILVA et al., 2009a).

O perfil de impurezas oriundas dos fármacos ou medicamentos e sua estabilidade dependem de diversos fatores ligados ao processo de fabricação, como por exemplo, da rota sintética utilizada em seu processo de produção, da origem e composição, da pureza dos materiais de partida e dos reagentes utilizados no processo, métodos de purificação e também, das condições de armazenamento a que o produto será submetido após sua produção, como luz, umidade e temperatura e da composição e propriedades do material de embalagem (GOROG, 2008).

A realização de estudos de estabilidade no Brasil segue, conforme preconizado na RE nº 1/2005 da Anvisa, três distintas modalidades de estudo de estabilidade. O primeiro estudo é a 'Estabilidade Acelerada', projetado para

promover uma degradação química e/ou mudanças físicas de um produto farmacêutico em condições forçadas de armazenamento, de forma rápida. O segundo é de 'Longa Duração', que avalia características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas dos produtos farmacêuticos durante e/ou depois do prazo de validade predeterminado. Este tem como finalidade estabelecer ou confirmar o prazo de validade e as condições de armazenamento mais adequadas (BRASIL, 2005). O último estudo é o de 'Acompanhamento', durante o qual é verificado se o produto farmacêutico mantém resultados coerentes com o estudo de longa duração para suas características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas. Para estes estudos são preconizadas análises de doseamento, quantificação de produtos de degradação, dissolução e pH. Este estudo é mantido durante todo o período em que o medicamento estiver sendo comercializado no país (BRASIL, 2005).

O acompanhamento da estabilidade dos produtos farmacêuticos é uma das maneiras mais eficientes para avaliar, prevenir e prever problemas associados à qualidade destes produtos durante seu prazo de validade. A segurança e a eficácia dos medicamentos também podem ser avaliadas, por meio do acompanhamento da formação de produtos de degradação, que podem levar à perda da atividade terapêutica ou, de forma mais prejudicial, à toxicidade (SILVA et al., 2009a).

A Anvisa recomenda a utilização de métodos indicadores de estabilidade que sejam seletivos aos fármacos e seus produtos de degradação, no monitoramento dos resultados prévios, advindos de estudos de estabilidade de produtos farmacêuticos (BRASIL, 2003; 2005).

3.5 PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO EM MEDICAMENTOS

Impurezas contidas em medicamentos precisam ser monitoradas mesmo que apresentem a possibilidade de não afetar o conteúdo descrito no rótulo do produto farmacêutico. Da mesma maneira, um fármaco pode ser considerado comprometido mesmo que as impurezas presentes possam apresentar

propriedades farmacológicas superiores. A indústria farmacêutica classifica as impurezas em diversas categorias. Um dos termos empregados na descrição de impurezas consideradas orgânicas é produto de degradação. Muitos destes compostos provenientes do processo de degradação podem apresentar potencial genotóxico e a monitorização e o controle destas impurezas têm evoluído continuamente em conjunto com avanços legislativos no setor industrial (AHUJA, 2007; DOW et al., 2013).

O perfil de degradação é definido na legislação brasileira como o conjunto de produtos de degradação observados no insumo farmacêutico ativo (IFA) ou no medicamento acabado, quando este é exposto a determinadas condições. A realização do estudo de degradação forçada é o que permite a geração de produtos de degradação nestas substâncias através da exposição a condições estressantes (BRASIL, 2015).

As condições adversas preconizadas são luz, temperatura, calor, umidade, hidrólise ácida e básica e também oxidação. Além do mais, este estudo favorece o desenvolvimento de novos métodos indicativos de estabilidade com especificidade e seletividade adequada, além de fornecer informações sobre possíveis rotas de degradação dos produtos. Espera-se que os testes de estresse produzam todos os prováveis degradantes (BRASIL, 2015). Considerando esta lógica, os produtos de degradação reais observados no estudo de estabilidade de longa duração de um medicamento deveriam estar inseridos no conjunto de produtos de degradação produzidos pelos testes de estresse do(s) IFA(s) (DOW et al., 2013).

O perfil de impurezas em IFA depende de diversos fatores, como a rota sintética utilizada em seu processo de produção, a origem e pureza dos materiais de partida e dos reagentes utilizados no processo, métodos de purificação e também as condições de armazenamento a que o produto será submetido após sua produção (GOROG, 2008).

A realização de estudos de estabilidade se mostra relevante para tornar possível a predição, avaliação e garantia da segurança do medicamento. Os estudos de estresse auxiliam na determinação das potenciais impurezas que podem ser produzidas por reações de degradação. Sendo assim, atividades

analíticas que têm por objetivo a detecção, identificação, elucidação estrutural e quantificação na determinação de impurezas, são fundamentais para as análises farmacêuticas (AHUJA, 2007; GOROG, 2008).

Devido a exigências legais da avaliação de impurezas consideradas “razoavelmente prováveis de ocorrer”, os produtos de degradação identificados durante estudos de degradação forçada são considerados preditores das impurezas de degradação, particularmente no que se relaciona ao produto farmacêutico (DOW et al., 2013).

Estudos de estresse objetivam induzir, de maneira rápida, degradações realistas do fármaco, para ativar todas as rotas de degradação que podem ocorrer durante o período de estocagem dos produtos farmacêuticos. As condições aplicadas nestes estudos contemplam a diversidade das condições ambientais as quais os produtos farmacêuticos são expostos e consequentemente, resultam no mais provável perfil de degradação (DOW et al., 2013).

Além disso, impurezas que apresentem atividade fisiológica e produtos de degradação podem contribuir para a ocorrência de eventos adversos na farmacoterapia. A fim de assegurar a repetibilidade e a segurança de uma terapia farmacológica é necessário evitar ou ao menos minimizar a contribuição destes compostos. Por recomendações regulatórias, aquelas impurezas que possam apresentar potencial mutagênico devem ser monitoradas para que se mantenham a níveis seguros para a utilização dos produtos farmacêuticos (GOROG, 2008; POWLEY, 2015).

As mais variadas formas de impurezas podem ser originadas pela simples variação ou mudanças destes fatores. Como consequência desta vastidão, as farmacopeias, na grande maioria dos casos, não especificam quais são as impurezas avaliadas pelos testes de pureza por cromatografia líquida ou de camada delgada (CLAE/CCD): os compostos são expressos como componente majoritário, ficando negligenciada a diferença em suas respostas. De maneira evidente, isto caracteriza uma fonte de resultados incertos por vezes incorretos, ressaltando a importância de atividades de detecção, identificação/elucidação

estrutural e quantificação de impurezas, em produtos farmacêuticos (GOROG, 2008).

3.6 MÉTODOS DISPONÍVEIS NA LITERATURA PARA O CONTROLE DE QUALIDADE DE MET E EPZ

A literatura apresenta diversas metodologias para fins de controle de qualidade na indústria farmacêutica para estes dois fármacos, EPZ e MET. A maioria das metodologias, elencadas no (QUADRO 3) consistem em métodos cromatográficos, sendo relatados apenas dois métodos que utilizam espectrofotometria de ultravioleta. Destaca-se que não estão descritos métodos que utilizem a técnica de espectroscopia no infravermelho.

QUADRO 3 - MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO PARA MET E EPZ

(continua)

ANALITO	MATRIZ	TÉCNICA	REFERÊNCIA
MET E EPZ	Comprimido	LC-MS/MS	AYOUB; MOWAKA, 2017
MET E EPZ	Comprimido	UV	AYOUB, 2017
MET E EPZ	Comprimido	UV	AYOUB, 2016
MET	IFA e comprimido	LC-UV	ARAYNE; SULTANA; ZUBERI, 2006
MET	Comprimido	LC-UV	AL-RIMAWI, 2009
MET	Comprimido e IFA	UV	MUBEEN; NOOR, 2009
MET	IFA	LC-DAD	MADHUKAR, 2011
MET	Comprimidos	Eletroforese capilar	HAMDAN; JABER; ABUSHOFFA, 2010
MET	Suplementos fitoterápicos	LC-MS/MS	WU et al., 2012
MET E EPZ	IFA	UV	PADMAJA; BABU; VEERABHADRAM, 2016

QUADRO 3 - MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO PARA MET E EPZ

(conclusão)

ANALITO	MATRIZ	TÉCNICA	REFERÊNCIA
MET E EPZ	IFA e comprimido	LC-DAD	PADMAJA; VEERABHADRAM, 2017
MET E EPZ	IFA e mistura	LC-DAD	PRATYUSHA; RAJU, 2016
MET E EPZ	IFA	LC-DAD	GODASU; SREENIVAS, 2016
MET E EPZ	Comprimido	LC-DAD	ALI, KUMAR, 2017
MET E EPZ	IFA	UV	PATIL; CHAURE; KSHIRSAGAR, 2017
MET E EPZ	IFA e comprimidos	LC-UV	BABU et al., 2017
MET E EPZ	IFA e comprimido	LC-DAD	HUSSAIN et al., 2016
MET E EPZ	IFA	LC-UV	PATEL; CHAUDHARY, 2017
EPZ	IFA	LC-DAD	SHYAMALA et al., 2016
EPZ	IFA	UV	PATIL et al., 2017
EPZ	IFA	LC-UV	JAISWAL et al., 2017

Fonte: O autor, 2018. Nota: LC – cromatografia líquida; MS – espectrometria de massas; UV – espectroscopia no ultravioleta; DAD – detector de arranjo de diodos; IFA – insumo farmacêutico ativo.

3.7 TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA ANÁLISE DE MEDICAMENTOS

3.7.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A cromatografia é uma técnica de separação de substâncias presentes em uma mistura. Esta separação ocorre devido a interação dos componentes entre duas fases, uma estacionária e uma móvel. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) difere da cromatografia líquida convencional ao empregar colunas recheadas como fase estacionária e submetendo a fase móvel a altas pressões. Esta técnica permite separar e analisar quantitativamente diversas matrizes em minutos, com alta resolução, eficiência e seletividade (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

O cromatógrafo é composto por uma bomba para eluição da fase móvel, sistema de injeção de amostra, forno para coluna e um detector, que é o componente mais caro e sofisticado do cromatógrafo. Os detectores indicam a concentração ou a massa dos analitos presentes na amostra que estão saindo da coluna. Vários tipos de detectores podem ser usados nesta técnica, destacando-se: detectores por absorvância no UV e no visível, arranjo de diodos, fluorescência, eletroquímicos, condutividade elétrica e espectrômetro de massas (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

3.7.2 Detector de arranjo de diodos (DAD)

Arranjo de diodos é o segundo tipo de detector comum mais usado em cromatografia. Esse consiste em uma série de fotodiodos arranjados lado a lado num cristal de silício de modo que cada comprimento de onda difratado pela grade atinge um ponto deste arranjo, e dessa forma, um detector. O detector permite que a absorvância de uma amostra seja determinada simultaneamente em todos os comprimentos de onda. Esses detectores têm sensibilidades variadas para diferentes comprimentos de onda, então se faz necessário especificar em qual região do espectro trabalhar e a resolução espectral depende do tipo e do número de diodos que compõe o arranjo (DE ANDRADE E CUSTODIO, 1996; RAIMUNDO JR.; PASQUINI, 1996).

3.7.3 Espectrometria de massas (EM)

Na espectrometria de massas mede-se a razão massa/carga (m/z) de um átomo ou molécula ionizada positiva ou negativamente no detector. Cada molécula apresenta intensidade ou abundância característica dos íons e essa resposta instrumental está relacionada com a quantidade de analito presente na amostra analisada.

O espectrômetro de massas é composto por uma fonte de ionização, um analisador de massas e um detector. Para que analitos sejam detectados, é essencial que a amostra seja ionizada, independente da técnica utilizada (GLISH; VACHET, 2003). As principais fontes de ionização utilizadas em conjunto com técnicas cromatográficas são a ionização química à pressão atmosférica (APCI) e a ionização por *electrospray* (ESI), sendo, ambas, formas de ionização a pressão atmosférica (API) (KORFMACHER, 2005). Após formação dos íons, estes são conduzidos a um analisador no espectrômetro de massas.

Assim como as fontes de ionização, esta técnica permite diversos tipos de analisadores de massa, que têm como objetivo separar os íons de acordo com a razão massa carga (m/z) e transmiti-los ao detector. Os analisadores de massa mais comuns podem ser divididos em dois grupos: analisadores de transmissão e de captura. Nos analisadores de captura encontram-se os analisadores *ion trap* (armadilha de íons) e ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier (GLISH; VACHET, 2003). Nos analisadores de transmissão, os íons são conduzidos até o detector através de um campo eletromagnético. Pertencem a esse grupo os analisadores de tempo de voo (TOF), de setor e quadrupolo.

O quadrupolo é o analisador mais amplamente utilizado, sendo acoplado principalmente à cromatografia gasosa e líquida devido a robustez, o menor custo e por ser facilmente automatizado. A separação de massas em um quadrupolo resulta da movimentação dos íons em um campo elétrico dinâmico (rádio frequência) e depende da m/z dos íons (GLISH; VACHET, 2003). O analisador triplo quadrupolo (EM/EM), também conhecido como EM sequencial ou EM *Tandem*, é o mais utilizado para doseamentos analíticos. É constituído por três quadrupolos em sequência, onde o primeiro e o terceiro são utilizados como “filtros” de massas, ou seja, selecionam uma determinada m/z e o segundo quadrupolo serve como câmara de colisão para a fragmentação dos íons. A fragmentação pode ser controlada com a modificação da voltagem e da densidade do gás de colisão empregadas.

O acoplamento da cromatografia com a espectrometria de massas é uma ferramenta analítica que une as principais vantagens de ambas as técnicas: eficiência de separação de compostos e alta seletividade da cromatografia e

especificidade e fornecimento de informações estruturais da espectrometria de massas (LIM; LORD, 2002; CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008), tornando-se uma ferramenta promissora na área farmacêutica (PEREIRA et al., 2005).

3.7.3 Espectroscopia no infravermelho

O espectro da radiação eletromagnética é composto pelas seguintes frequências: as ondas de rádio, as micro-ondas, o infravermelho, a luz visível, os raios ultravioleta, os raios x e os raios gama. A região espectral do infravermelho (12800 a 10 cm^{-1}) corresponde à porção situada entre a região do visível e as micro-ondas, podendo ser dividida em três sub-regiões: infravermelho distante (200 a 10 cm^{-1}), infravermelho médio (4000 a 200 cm^{-1}) e infravermelho próximo (12800 a 4000 cm^{-1}), que recebe esta nomenclatura por apresentar-se mais próximo ao espectro visível da luz.

A radiação infravermelha induz transições em estados vibracionais e rotacionais associados com o estado eletrônico fundamental das moléculas. Os átomos vibram com maior rapidez e com maior amplitude em torno das ligações covalentes que os unem. Estas vibrações são quantizadas e, quando ocorrem, os compostos absorvem energia IV em certas regiões do espectro (SKOOG et al., 2014).

A radiação infravermelha só interage com uma molécula quando o campo eletromagnético oscila na mesma frequência do momento dipolar dessa molécula, ou seja, quando a molécula absorve essa radiação há a conversão da energia em vibração, gerando um espectro vibracional em forma de bandas. Portanto, a formação do espectro depende da massa dos átomos, do seu arranjo geométrico e da força de ligação entre eles.

O espectrômetro IV é capaz de analisar compostos que apresentem principalmente ligações C-H, O-H, N-H, S-H e C=O. É possível desta forma empregar a técnica apresentada no estudo da EPZ e da MET, considerando suas fórmulas estruturais. Um espectrômetro é composto de: uma fonte, um seletor

de comprimento de onda, um recipiente para a amostra, um detector, um transdutor e um processador.

Dois tipos de instrumentos são utilizados na técnica de espectroscopia: os clássicos, que empregam a técnica dispersiva, utilizando um prisma, e os que utilizam Transformada de Fourier (FT). Os espectrômetros de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR, do inglês *Fourier-transform infrared*) costumam ser mais utilizados por proporcionar um espectro de melhor qualidade (aumento da sensibilidade e resolução) e que é adquirido de maneira mais rápida (STUART, 2004).

Dois métodos podem ser utilizados para obtenção dos espectros de infravermelho: transmissão e refletância. Os métodos de transmissão são baseados na absorção da radiação IV em comprimentos de ondas específicos ao passar pela amostra (líquida, gasosa ou sólida). Já os métodos de refletância são subdivididos em dois: reflexão interna como a refletância total atenuada ou reflexão externa, como a especular ou então difusa (STUART, 2004).

Em comparação às técnicas cromatográficas, a espectroscopia de infravermelho apresenta as seguintes vantagens: análises mais rápidas, não destrutivas, não invasivas e de baixo custo e também possibilitam a realização de análises em tempo real tanto em produto acabado quanto na fase de processo. Ainda, a técnica é considerada promissora pela sustentabilidade, pois não emprega solventes orgânicos, nem gera resíduos químicos. Deve ser destacada ainda a menor intervenção do analista nesta técnica, devido à baixa manipulação da amostra no preparo, o que reduz a inserção de erros analíticos inerentes ao manipulador (PASQUINI, 2003; LIMA et al., 2009; FERREIRA; BRAGA; SENA, 2012).

Essa técnica fornece um conjunto complexo de dados espectrais que impedem o desenvolvimento de um método univariado para quantificação, pois em amostras complexas é verificada uma sobreposição intensa de bandas de sinais (insumos ativos e excipientes, no caso de um medicamento), essa sobreposição faz com que a determinação direta seja inviável. Assim, a quimiometria vem sendo cada vez mais utilizada para contornar essa situação, como forma de permitir a utilização da informação espectral (complexa;

multivariada) para a obtenção de resultados de quantificação (PÖLLANEN et al., 2005).

3.7.4 Quimiometria

A Farmacopeia Americana considera a quimiometria como a aplicação de métodos multivariados para a análise de dados químicos, ou seja, a utilização de métodos matemáticos e estatísticos para alcançar dois objetivos: para projetar procedimentos de medida ou experimentos otimizados e para fornecer a quantidade máxima de informações químicas relevantes através da análise do conjunto de dados químicos (USP, 2017).

De forma prática, a quimiometria pode ser subdividida em planejamento de experimentos, reconhecimento de padrões e calibração multivariada. O planejamento experimental visa determinar quais variáveis influenciam um determinado processo, bem como a interação entre estas variáveis. O reconhecimento de padrões serve como base para análises qualitativas de classificação de amostras. Já a calibração multivariada pode ser utilizada com objetivo de quantificação e através dela é possível relacionar variáveis independentes de uma matriz X (a ser composta pelos espectros de IV) com variáveis dependentes de um bloco Y (dados de concentração) para quantificar amostras desconhecidas (TEÓFILO; FERREIRA, 2006)

Em matrizes complexas, pode ocorrer dificuldade ou até mesmo impedimento na determinação de um ou mais compostos devido à presença de interferentes da matriz. Com o uso da calibração multivariada é possível realizar a modelagem desses interferentes junto com o(s) analito(s) de interesse, contornando a necessidade de eliminar os interferentes através de técnicas de separação, ou de preparo de amostra, como a extração por exemplo (SENA, 2004)

A lógica está em substituir a separação física das espécies pela separação quimiométrica dos seus sinais. Isso proporciona maior rapidez e menor custo nas análises, bem como a simplificação ao máximo das etapas de

preparo de amostra, diminuindo a inserção de erros gerados com a manipulação pelo analista (SENA, 2004). Isso faz da calibração multivariada uma ferramenta muito útil para o estudo dos sinais produzidos por um espectro de absorção, com destaque para espectros obtidos no infravermelho (FERREIRA et al., 1999; FEUDALE et al., 2002).

Os métodos mais utilizados em calibração multivariada são: regressão linear múltipla (MLR), regressão em componentes principais (PCR), redes neurais artificiais (ANN) e a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) (SENA et al., 2000; NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2006; SENA et al., 2007). Para métodos instrumentais como a espectroscopia no infravermelho, a USP recomenda o uso do PLS, que é considerado um método de regressão baseada na decomposição dos dados originais em variáveis latentes.

Quando se utiliza a espectroscopia, os dados químicos gerados das medidas instrumentais devem ser organizados em duas matrizes. A primeira é uma matriz X para as variáveis independentes, onde cada linha da matriz representa uma amostra e cada coluna representa um comprimento de onda. Esta matriz é alimentada com os dados de absorbância das amostras. A segunda é uma matriz Y, onde novamente, cada linha representa uma amostra, já cada coluna representa um dado de concentração de cada componente de interesse da mistura (FERREIRA et al., 1999; SENA et al., 2007).

Quando a matriz Y é construída utilizando mais de um dado de concentração para cada amostra, ou seja, quando o objetivo é a quantificação de dois ou mais componentes simultaneamente, o modelo é denominado PLS2. Da mesma forma, quando a matriz Y é composta por apenas um dado de concentração para cada amostra, esse modelo é denominado PLS1 (BRERETON, 2000; SENA et al., 2004).

A matriz X pode ser construída utilizando os dados de absorbância obtidos de todos os comprimentos de onda, ou seja, o espectro total referente a cada amostra. Porém, a capacidade preditiva de modelos de regressão por PLS pode ser otimizada através da seleção de faixas espectrais específicas, em situações onde regiões específicas do espectro fornecem dados mais relevantes do que o próprio espectro total. Para essa finalidade utiliza-se um algoritmo desenvolvido

exatamente para este fim, denominado iPLS (do inglês, *interval partial least squares*, regressão por mínimos quadrados parciais em intervalos). O princípio da técnica é dividir o espectro em porções menores (de igual número de comprimentos de onda por intervalo) e desenvolver modelos para cada intervalo. Após a divisão, é feita uma comparação entre a raiz quadrada do erro médio de calibração por validação cruzada (RMSECV) de cada intervalo com os valores de RMSECV do espectro total (SILVA et al., 2009b). Essa avaliação permite determinar quais comprimentos de onda fornecem os melhores modelos, eliminando quaisquer informações irrelevantes como por exemplo, bandas de absorção que não contenham nenhuma informação dos compostos que estão sendo quantificados ou então sinais referentes aos ruídos do sistema, aumentando assim a robustez do modelo. Nos casos em que mais de uma faixa é selecionada, o modelo de regressão recebe a denominação siPLS (do inglês, *synergy interval partial least squares*) (FRANCESQUETT et al., 2010).

A utilização do algoritmo PLS permite o estabelecimento de um modelo de regressão linear entre os dados das matrizes X e Y. Para a obtenção dos modelos de calibração, essas matrizes são decompostas em uma soma de produtos de dois vetores, denominados *scores* e *loadings*. Os *scores* representam a projeção dos valores das amostras no espaço enquanto os *loadings* são a expressão da ponderação (“peso”) do conjunto das respostas, conhecidos como variáveis latentes (VL) (GABRIELSSON; LINDBERG; LUNDSTEDT, 2002; BARTHUS; MAZO; POPPI, 2007).

Durante o procedimento de modelagem, cada variável latente explicará uma porção dos dados em estudo (essa porção é denominada variabilidade). A inclusão de mais variáveis latentes no modelo aumenta a explicação dessa variabilidade e com isso, corre-se o risco, por exemplo, de um ruído ser explicado por alguma dessas variáveis. Portanto, é necessário escolher criteriosamente o número de variáveis latentes a ser adotado. A escolha deste número pode ser feita com auxílio do software utilizado e deve ser avaliada pelo operador, para evitar que um grande número de variáveis latentes seja escolhido e cause prejuízo nas previsões realizadas pelo modelo. Para essa avaliação, um conjunto de amostras externa pode ser utilizado, a fim de garantir a capacidade preditiva do modelo. A avaliação da diferença entre resultados previstos pelo

modelo e valores de referência das amostras do conjunto de amostras externas é uma maneira de assegurar a otimização do número de variáveis latentes adotadas (PASQUINI, 2003).

Além do conjunto de amostras externas, também é possível utilizar um procedimento denominado validação cruzada, para auxiliar na definição do número de VL a ser adotado (PASQUINI, 2003). O procedimento de validação cruzada mais comum é conhecido como *leave-one-out*, onde uma amostra do conjunto de calibração é retirada de cada vez e usada como amostra de validação, enquanto as remanescentes são usadas na construção de um novo modelo. A cada amostra retirada, o resíduo (“erro”) da previsão é calculado. Assim como para a técnica de iPLS, a soma dos quadrados dos erros de previsão é calculada (RMSECV). Quando o valor dessa soma apresentar o menor valor, este pode ser avaliado como o melhor número de variáveis latentes (FERREIRA et al., 1999; BRERETON, 2000; SENA, 2004; BARTHUS; MAZO; POPPI, 2007).

O número de variáveis latentes é importante para determinar também o número mínimo de amostras a compor os conjuntos de calibração e validação do modelo. A norma E1655-05 da *American Society for Testing and Materials* (ASTM) de 2012 recomenda, para o desenvolvimento de um modelo de calibração por espectroscopia, que o número de amostras para o conjunto de calibração seja igual a 6 vezes o número de variáveis latentes acrescido de um e o número de amostras para o conjunto de validação seja igual a 4 vezes o número de variáveis latentes.

O desenvolvimento do modelo quimiométrico envolve ainda a seleção dos melhores pré-processamentos para os dados químicos da matriz X. Eles podem ser tratados antes de se iniciar a análise por PLS, com o objetivo de minimizar interferências como diferenças de espalhamento na luz, que em geral, se manifestam como variações não lineares na linha de base do espectro. Para métodos espectroscópicos, os pré-processamentos mais utilizados são centrar os dados na média, correção do espalhamento multiplicativo (MSC, *Multiplicative Scatter Correction*), variação normal padrão (SNV, *Standard Normal Variate*) e derivatização e alisamento Savitzky-Golay (RINNAN; VAN DEN BERG; ENGELSEN, 2009).

Centrar os dados na média consiste em calcular a média da resposta de todas as amostras para cada comprimento de onda do espectro e depois, subtrair as médias de todas as intensidades. Assim, as coordenadas são movidas para o centro dos dados, facilitando a percepção de diferenças nas intensidades relativas das variáveis (SOUZA; POPPI, 2012). O conceito do pré-processamento MSC baseia-se na remoção de artefatos de origem física (espalhamento indesejável de luz devido à diferença no tamanho de partículas, superfície granulosa ou opacidade). No SNV, a correção espectral corresponde a razão entre a diferença do espectro original de uma amostra com o valor médio desse espectro pelo desvio padrão de cada espectro (RINNAN; VAN DEN BERG; ENGELSEN, 2009; SOUZA; POPPI, 2012). A derivatização e alisamento pelo algoritmo Savitzky-Golay é um procedimento que tem como principal objetivo aumentar a razão sinal/ruído, suavizando o espectro para eliminar variação aleatória. Ele realiza o melhor ajuste através de um polinômio quadrático com pontos sucessivos e determina o ponto central de melhor ajuste para o ajuste polinomial como forçado pelo segmento de dados (WORKMAN JR; WORKMAN, 2001).

A presença de amostras anômalas num conjunto de dados de calibração pode levar a resultados que indicam que o modelo não é adequado ou que a sua capacidade preditiva é inferior à que seria apresentada, caso as amostras em questão não estivessem presentes. *Outliers* ou amostras anômalas são termos que se referem a amostras muito diferentes em relação a um determinado conjunto de dados de calibração, elas podem ter origem em erros operacionais e instrumentais. A detecção destas amostras é imprescindível na construção de modelos de calibração multivariada, e a detecção e remoção destas assegura uma melhor capacidade preditiva do modelo (FERREIRA et al., 1999; VALDERRAMA, 2005; VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2007).

A detecção de amostras anômalas pode ser feita com o auxílio de um gráfico de resíduos de Student *versus leverage*. O resíduo de Student verifica se a amostra está ou não dentro de uma distribuição normal dos dados, com um nível de confiança de 95%. Este parâmetro é definido com base na unidade de desvio padrão do valor médio e os valores para o resíduo de Student são definidos como $\pm 2,5\%$. Valores acima destes indicam que alguma amostra

possui um valor da concentração significativamente diferente do valor esperado ou apresentado pela técnica de referência, sendo então considerados *outliers* (FERREIRA et al., 1999).

Já *leverage* determina a influência da amostra no modelo multivariado e corresponde geometricamente à distância de uma amostra ao centroide do conjunto de dados. Quando a amostra influencia pouco no conjunto de calibração, ela tem baixo valor de *leverage*, porém, quando uma amostra apresenta um valor de *leverage* acima do valor limite é considerada anômala. O valor limite é calculado como $3VL/n$, no qual VL corresponde ao número de variáveis latentes e n ao número de amostras utilizadas (FERREIRA et al., 1999; VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2007; SILVA et al., 2012). É importante ressaltar que altos valores de *leverage* podem resultar de concentrações extremas ou pela presença de um interferente na amostra. No caso de uma amostra ultrapassar os limites de *leverage* ou resíduos de Student a amostra não deve ser automaticamente eliminada do modelo, somente devendo ser descartada se ultrapassar ambos os parâmetros simultaneamente.

3.8 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS

O processo de controle de qualidade de um insumo farmacêutico ativo ou de uma forma farmacêutica requer a escolha de uma metodologia analítica adequada. Dois parâmetros determinam o desempenho de uma técnica analítica: a qualidade das medidas instrumentais e a confiabilidade estatística dos cálculos empregados no seu processamento. Quando um método fornece dados analíticos que não são confiáveis, estes podem acarretar prejuízos financeiros e também comprometer a segurança da utilização do produto (VALENTINI; SOMMER; MATIOLI, 2007).

Com base no exposto, um método analítico deve passar um processo de avaliação denominado validação, que assegurará que o método gere informações confiáveis e interpretáveis a respeito da amostra analisada. Esta é uma forma de garantir que o método seja aplicável e que sejam estabelecidos

determinados limites para os parâmetros a serem observados durante a aplicação do método (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009).

No Brasil, de maneira geral, laboratórios e indústrias farmacêuticas que se propõem a validar um método analítico seguem as recomendações nacionais determinadas por dois órgãos regulatórios: a ANVISA e o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO). Ainda, a união de agências regulatórias de alguns países europeus mais Japão e Estados Unidos consolidou a Conferência Internacional sobre Harmonização (ICH), que também dispõe de guias de abrangência internacional sobre esta temática.

Os parâmetros analíticos elencados no protocolo de validação devem ser baseados na intenção do uso do método, sendo que os mais relevantes são: exatidão, precisão, especificidade, linearidade, sensibilidade e robustez. É essencial que os equipamentos e utensílios utilizados no processo estejam previamente calibrados e ainda, devem ser definidos os limites para os parâmetros de validação do ensaio analítico (GIL; BATISTA FILHO, 2007).

3.8.1 Validação de métodos analíticos univariados

Publicada em 25 de julho de 2017, a RDC n° 166 da ANVISA dispõe sobre a validação de métodos analíticos. Esta norma apresenta os critérios que devem ser aplicados no procedimento de validação de um método analítico e seu conteúdo está em consonância com demais normas internacionais. Apresenta também, os parâmetros que devem ser avaliados bem como suas definições (BRASIL, 2017).

O primeiro parâmetro a ser considerado é a seletividade. Ela é demonstrada por meio da capacidade que um método tem para identificar ou quantificar uma substância de interesse na presença de quaisquer outros componentes que estejam presentes na amostra, podendo estes serem impurezas, diluentes ou então componentes da matriz da amostra (BRASIL, 2017).

O segundo parâmetro é a linearidade. Ela é demonstrada por meio da capacidade que um método apresenta de fornecer respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito na amostra. Para isso, deve ser verificada uma relação linear em toda a faixa de concentração estabelecida para o método. A avaliação da linearidade considera a apresentação de uma representação gráfica das respostas instrumentais em função da concentração do analito na amostra, mais a apresentação de um gráfico de dispersão dos resíduos, com sua avaliação estatística e ainda a apresentação da equação da reta de regressão de Y em X, estimada pelo método de mínimos quadrados, dos coeficientes de correlação (r) e de determinação (r^2) e a avaliação da significância do coeficiente angular (BRASIL, 2017).

A avaliação estatística da linearidade pode ser realizada a partir do teste t de Student (comparação de médias) e teste F (comparação de variâncias). Ainda, é feito um terceiro teste, de Cochran, que avalia a homocedasticidade dos dados, ou seja, a variância constante dos resíduos. Ambos testes supõem que os dados estão distribuídos de forma normal. Os testes propõem duas hipóteses a serem testadas: hipótese nula ou hipótese alternativa. Esses testes podem ser aplicados também na avaliação de outros parâmetros como precisão e exatidão de métodos (CARDOSO et al., 2010; MORETTIN; BUSSAD, 2010).

O terceiro parâmetro é a avaliação do efeito matriz. Este parâmetro é aplicado a matrizes complexas, como os medicamentos, que contêm em sua formulação excipientes variados. Este parâmetro é determinado através da comparação entre os coeficientes angulares das curvas de calibração construídas com o padrão da substância analisada em solvente e com a amostra fortificada com este padrão. O paralelismo das retas indica a ausência de interferência dos constituintes da matriz na resposta linear do método e este achado deve ser comprovado por meio de avaliação estatística (BRASIL, 2017).

A faixa de trabalho consiste em um parâmetro que deve ser estabelecido a partir da avaliação conjunta da linearidade, com os ensaios de precisão e exatidão e é determinado com base na aplicação pretendida do método. Métodos quantitativos para análise de teor devem considerar uma faixa de trabalho entre 80% a 120% da concentração do analito a ser quantificado (BRASIL, 2017).

Outro parâmetro relevante é a precisão, que avalia a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com diversas amostras preparadas separadamente, seguindo o procedimento determinado no método analítico a ser validado. A precisão deve ser expressa por meio da repetibilidade, da precisão intermediária ou da reprodutibilidade. Este parâmetro deve ser demonstrado a partir da dispersão dos resultados, com base no cálculo do desvio padrão relativo às concentrações obtidas (BRASIL, 2017).

Já a exatidão de um método analítico demonstra o grau de concordância entre os resultados individuais do método utilizado em relação a um valor definido como verdadeiro. Para a avaliação da exatidão de um método empregado na análise de uma amostra de produto acabado, como uma forma farmacêutica, deve-se aplicar o método proposto na análise de uma amostra, na qual a quantidade conhecida do padrão do analito foi adicionada à matriz, que neste caso é o excipiente do medicamento. A exatidão deve ser expressa através do percentual de recuperação do analito com concentração conhecida que foi adicionado à amostra ou por meio da relação entre a concentração determinada experimentalmente e a concentração teórica (BRASIL, 2017).

A determinação do limite de detecção é um parâmetro que pode ser avaliado por meio de método visual, da razão sinal-ruído, baseado na determinação do branco ou em parâmetros da curva de calibração. No caso de métodos instrumentais, o limite de detecção pode ser determinado pela razão sinal-ruído, que deve ser maior ou igual a 2:1. Contudo, métodos de análise de teor não apresentam obrigatoriedade da determinação deste parâmetro. Da mesma forma, a avaliação do limite de quantificação, que é a menor quantidade do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas, também não é exigida para métodos de análise de teor (BRASIL, 2017).

A robustez é o último parâmetro compreendido no procedimento de validação. Este parâmetro informa sobre a característica que um método apresenta em resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas que sejam consideradas relevantes para o método. Para técnicas cromatográficas, é sugerido que sejam avaliadas algumas condições relacionadas ao preparo das amostras, como estabilidade das soluções

analíticas, tempo de extração e compatibilidade de filtros. Também podem ser avaliadas situações como a variação do pH e composição da fase móvel, diferentes lotes ou fabricantes de colunas, temperatura e fluxo da fase entre outras (BRASIL, 2017).

3.8.2 Validação de métodos multivariados

Os parâmetros pelos quais a validação de um processo analítico pode ser atestada são denominadas figuras de mérito (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009). O procedimento de validação de métodos cromatográficos e espectrofotométricos que apresentam dados de natureza univariada já são bem descritos e regulamentados por órgãos reguladores nacionais e internacionais, como a Anvisa, INMETRO, ICH, entre outros. Porém, técnicas de natureza multivariada ainda não são bem aceitas e sua implementação sofre alguma resistência na área farmacêutica principalmente devido à exigência de serem validadas. A validação de modelos multivariados ainda é pouco descrita e documentos oficiais para auxiliar nos processos de validação são escassos.

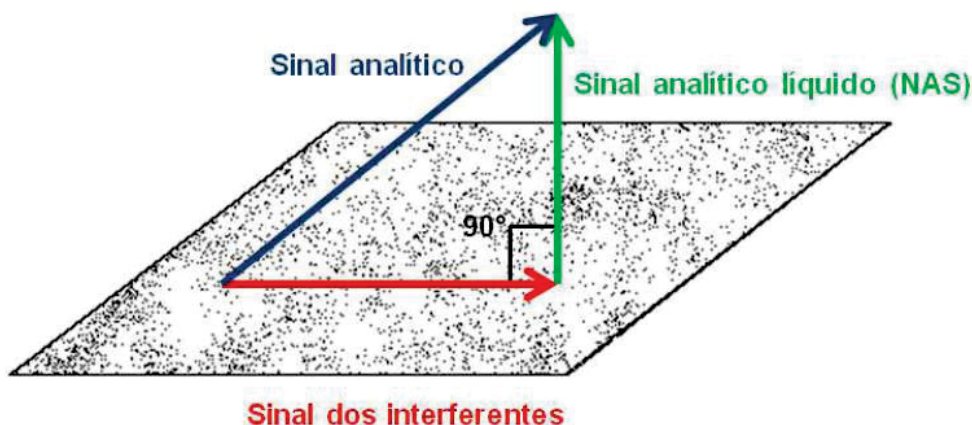
Na validação de métodos de calibração multivariada, alguns parâmetros como exatidão, precisão e robustez podem ser estimados de maneira bastante similar aos métodos univariados. Por outro lado, outros parâmetros como linearidade, sensibilidade, razão sinal/ruído e seletividade não podem ser obtidos de maneira semelhante com a mesma facilidade (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009).

No caso da calibração multivariada a norma mais utilizada como orientação é a E-1655-05 da ASTM, que regula a validação de métodos analíticos baseados em espectroscopia no infravermelho. Essa norma trata de importantes recomendações para o desenvolvimento de análises quantitativas, tais como: preparação das amostras dos conjuntos de calibração e validação interna, parâmetros estatísticos relevantes para avaliação, otimização e recalibração de modelos de calibração quantitativos (ASTM, 2012).

3.8.2.1 Seletividade

Em calibração multivariada, a seletividade (SEL) corresponde ao grau de sobreposição observado entre o sinal referente ao analito e o sinal referente aos interferentes presentes na amostra e indica a parte do sinal que é perdida devido a essa sobreposição (VESSMAN et al., 2001). Para modelos de calibração multivariada, a seletividade pode ser estimada através do cálculo do Sinal Analítico Líquido (NAS, do inglês *Net Analyte Signal*), que é definido como a fração do sinal analítico que é ortogonal ao sinal dos interferentes presentes na amostra, ou seja, representa a parte do sinal analítico que pode ser atribuída exclusivamente ao analito de interesse. A representação geométrica do NAS pode ser observada na (FIGURA 3).

FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO GEOMÉTRICA DO VETOR NAS



Fonte: Adaptado de BRAGA; POPPI, 2004.

Através do módulo do NAS, é possível calcular um valor escalar relacionado unicamente com a concentração e assim construir uma nova representação dos dados multivariados. Com isso, a seletividade é determinada para cada amostra e o valor médio é utilizado para caracterizar o método. Como métodos de infravermelho e calibração multivariada não necessitam de

resolução de sinal, não é pertinente estabelecer um valor limite para seletividade (VALDERRAMA, 2005; FERREIRA; BRAGA; SENA, 2012).

3.8.2.2 Linearidade

De maneira diferente dos modelos univariados, onde é facilmente obtida uma correlação linear entre resposta instrumental e concentração de um analito, há uma complexidade em traçar uma curva de linearidade com dados multivariados, principalmente em modelos PLS, uma vez que as variáveis são decompostas pelas variáveis latentes.

Portanto, para métodos multivariados, a linearidade pode ser avaliada através da verificação do coeficiente de correlação (r) do gráfico dos valores de referência *versus* os valores previstos de concentração. É possível verificar visualmente a linearidade com auxílio do gráfico de resíduos das amostras do conjunto de calibração e validação, que deve ter um comportamento aleatório (BRAGA; POPPI, 2004). A aleatoriedade dos resíduos também deve ser observada no gráfico da concentração dos valores de referência *versus* os valores preditos pelo modelo de PLS (FERREIRA; BRAGA; SENA, 2012).

3.8.2.3 Sensibilidade

Em se tratando de métodos univariados, a sensibilidade é um parâmetro que corresponde à capacidade que um método apresenta de distinguir com segurança duas concentrações próximas (ICH, 2005). É representada pela inclinação da curva de calibração (OLIVIERI et al., 2003).

Em calibração multivariada, a sensibilidade (SEN) é definida como a fração do sinal analítico responsável pelo acréscimo de uma unidade de concentração à propriedade de interesse. Pode ser determinada como o inverso do vetor dos coeficientes de regressão estimados pelo PLS (BRAGA; POPPI, 2004).

A sensibilidade analítica (γ) não é abordada em normas ou protocolos de validação de métodos, contudo ela apresenta a sensibilidade do método em termos da unidade de concentração utilizada. É definida como a razão entre a sensibilidade e o ruído instrumental (SENA et al., 2007). O ruído experimental pode ser estimado a partir de 15 replicatas do branco e contém os valores de desvio padrão de seu sinal (do branco) para cada comprimento de onda. O inverso desse parâmetro (γ^{-1}) permite estabelecer a menor diferença de concentração entre amostras, a qual pode ser distinguida pelo método, considerando o ruído aleatório experimental como a única fonte de erro (FERREIRA; BRAGA; SENA, 2013).

3.8.2.4 Precisão

A precisão mede quanto os resultados obtidos de uma mesma amostra, em uma série de medidas, sobre as mesmas condições de análise, se aproximam entre si (BRASIL, 2017). Assim como para métodos univariados, a precisão é geralmente expressa através do coeficiente de variação (CV%), também conhecido como desvio padrão relativo (DPR) de uma série de medidas.

O desvio padrão relativo pode ser calculado pela (EQUAÇÃO 1) a seguir (BRASIL, 2003):

$$CV = \frac{dp}{CME} \times 100 \quad (1)$$

Em que dp corresponde ao desvio padrão e CME é a concentração média experimental.

O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo da matriz analisada e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5% (BRASIL, 2017).

3.8.2.5 Exatidão

Embora a exatidão tenha a mesma definição tanto para métodos univariados como para multivariados, ou seja, o quanto um método analítico permite que os resultados encontrados estejam próximos dos resultados aceitos como valores reais convencionais ou valores de referência, a exatidão é avaliada de maneiras diferentes nesses dois métodos (BRASIL, 2017).

Na calibração multivariada a exatidão é avaliada com base na raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão - RMSEP (do inglês, *Root Mean Squares Error of Prediction*, RMSEP), sendo este uma aproximação do erro médio de previsão para as amostras do conjunto de validação e é calculado pela (EQUAÇÃO 2):

$$RMSEP = \sqrt{\Sigma[(y' - y)^2 / n]} \quad (2)$$

Na qual n representa o número de amostras do conjunto de validação, y' e y correspondem, respectivamente, aos valores de referência e aos previstos pelo modelo.

3.8.2.6 Robustez

A robustez de um método analítico consiste na resistência às deliberadas e pequenas variações nos parâmetros analíticos, indicando confiabilidade no seu emprego. O objetivo de avaliar este parâmetro é detectar e prevenir variações que possam interferir no resultado final da análise (BRASIL, 2017).

A robustez deve ser avaliada na fase de desenvolvimento de um método e depende do tipo de metodologia em estudo. Essas variações, se constatadas, devem ser inseridas em procedimentos operacionais padrão e devidamente alertadas aos analistas que realizem o ensaio (BRASIL, 2017; ICH, 2005). Idealmente, as variações avaliadas devem contemplar desde as etapas do preparo da amostra até os parâmetros instrumentais empregados durante a

análise, pois erros são passíveis de serem inseridos no resultado experimental durante todo o processo (RIBANI et al., 2004).

3.8.2.7 Teste para erro sistemático (*bias* - viés)

O termo viés (ou *bias*, em inglês) é definido como a diferença entre a média populacional e o seu valor verdadeiro. O erro sistemático corresponde ao somatório das componentes do erro que não são aleatórias, podendo afetar outras figuras de mérito como a precisão e a exatidão (BRAGA; POPPI, 2004). Segundo a norma E1655-05 da ASTM (ASTM, 2012), é recomendada a realização um teste t para avaliar se esse viés incluso no modelo é significativo ou não. Este teste é descrito pela (EQUAÇÃO 3), sendo necessário assim, calcular o desvio padrão dos erros de validação (EQUAÇÃO 4) e o *bias* (EQUAÇÃO 5):

$$t = \frac{[bias]\sqrt{nv}}{SDV} \quad (3)$$

$$SDV = \sqrt{\frac{\sum[(y_i^{ref} - \hat{y}_i) - bias]^2}{nv-1}} \quad (4)$$

$$bias = \sum_{i=1}^{nv} \frac{(y_i^{ref} - \hat{y}_i)}{nv} \quad (5)$$

Nas quais y_i^{ref} são os valores de concentração das amostras de referência, $\hat{y}_i$ são os valores de concentração das amostras preditas e nv o número de amostras do conjunto de validação.

Se o valor de t calculado for menor que o valor de t tabelado, para o valor determinado de graus de liberdade (v - que é igual ao número de amostras do conjunto de validação menos um) com 95% de confiança, significa que o *bias* pode ser considerado desprezível e insignificante (BRAGA; POPPI, 2004).

3.8.2.8 Desvio residual de predição

O desvio residual de predição (RPD, *residual prediction deviation*) representa o quanto o modelo de calibração prevê um conjunto de amostras, sendo a forma mais adequada para avaliar o desempenho de um modelo. É definido como a razão entre a variância natural dos valores de referência nas amostras de calibração e validação em relação aos erros que ocorrem na previsão (FERREIRA; BRAGA; SENA, 2012). O RPD é calculado de duas formas distintas, dependendo do conjunto ao qual se refere (EQUAÇÕES 6 e 7):

$$RPD_{cal} = DP_{cal}/RMSECV \quad (6)$$

$$RPD_{val} = DP_{val}/RMSEP \quad (7)$$

Nas quais DP_{cal} é o desvio padrão da concentração das amostras do conjunto de calibração e DP_{val} é o desvio padrão da concentração das amostras do conjunto de validação (FERREIRA; BRAGA; SENA, 2012).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 REAGENTES E SOLVENTES

4.1.1 Padrões analíticos e insumos farmacêuticos

As características principais referentes aos insumos MET, EPZ e excipiente comercial são apresentados no (QUADRO 4).

QUADRO 4 - INSUMOS FARMACÊUTICOS UTILIZADOS

Identificação	Lote	Teor	Fabricante
Metformina	MET14030319	99%	Gemini
Empagliflozina	160219001	98%	ArkPharm
Celulomax SL® (celulose microcristalina, amido pré-gelatinizado e dióxido de silício coloidal)	CLS002.01.17	-	Embrafarma

Fonte: O autor, 2018.

Para o desenvolvimento deste trabalho, foram utilizados os seguintes reagentes e solventes: ácido fórmico 99% (v/v) (Carlo Erba Reagenti, Rodano, Itália); acetonitrila e metanol grau HPLC (Tédia, Fairfield, USA); formiato de amônio (> 97%) (Acros Orgânicos, New Jersey, EUA); água ultrapura Milli-Q (Millipore, Milford, EUA); ácido clorídrico 36,5% (p/v) (Mallinckrodt, Staines-upon-Thames, Inglaterra); hidróxido de sódio 97% (Dinâmica, Diadema, Brasil); peróxido de hidrogênio 30% (Merck, Darmstadt, Alemanha). Foram utilizados no estudo: padrão de empagliflozina com 99,5% de pureza (MedChemExpress; lote: 07862) e padrão de metformina com 99,7% de pureza (USP; lote: 10H236).

4.2 CONSUMÍVEIS E EQUIPAMENTOS

Além disso, os seguintes consumíveis e equipamentos foram empregados: agitador de amostras Mixer Glas-Col (Terre Haute, EUA); balança

analítica Mettler Toledo, modelo Excellence Plus XP 205, com precisão de 0,01 mg (Columbus, EUA); banho de ultrassom Branson 2510 (Danbury, EUA); cromatógrafo Agilent, modelo 1200 equipado com bomba binária G1312B, degaseificador G1379B (Wilmington, EUA) e injetor automático CTC Waters 2777 Sample Manager (Milford, EUA); espectrômetro de massas triplo quadrupolo da Applied Biosystems, modelo API 3200 (Toronto, Canadá) equipado com bomba de infusão Havard 22 Apparatus (South Natick, EUA) e interface electrospray (ESI); purificador de água Milli-Q- Millipore, A10 Gradiente (Milford, EUA); vortex, Genie 2 (Bohemia, EUA); coluna XBridge C18 (50 x 2,1 mm; 5 µm e 150 x 4.6mm; 5 µm), Waters (Milford, EUA); filtro de membrana Millipore Millex de fluoreto de polivinilideno (PVDF) 0,22 e 0,45 µm de poro (Billerica, EUA); pré-coluna XBridge C18 (10 x 2,1 mm; 5 µm), Waters (Milford, EUA); tubo para centrifugação tipo Falcon, Techno Plastic Products AG (Trasadingen, Suíça); *vial* e tampa, frascos Eppendorf, pipetas de microvolume; espectrômetro na região do infravermelho BRUKER TENSOR 37 FT-IV; câmara com fonte de luz similar ao padrão de emissão D65/ID65, com emissão visível e UV, ISO 10977(1993); cromatógrafo a líquido Agilent, 1100 series, equipado com bomba quaternária G1379A, *degasser* G1316A, forno de coluna elétrico, detector diodo G1315B, software ChemStation (Wilmington, EUA).

4.3 SOFTWARES

Esse trabalho foi desenvolvido com o auxílio das seguintes ferramentas: Excel (Microsoft®); PLS-Toolbox 3.0 (Eigenvector Research, Inc.) operando em ambiente Matlab 7.5.0 (Math Work Inc.); OPUS (version 6.0) for windows software from Bruker Optik; Analyst, versão 1.4 (ABI/Sciex).

4.4 PREPARO DE SOLUÇÃO ESTOQUE

Para o preparo de soluções estoque a 1 mg.mL⁻¹ foram testados como diluente acetonitrila e metanol. A total solubilização e ausência de formação de precipitados indica que a solubilidade no solvente é adequada ao emprego do preparo de soluções de estoque. Assim, as soluções estoque de MET e EPZ

foram preparadas através da pesagem de uma massa equivalente de cada padrão, levando em consideração a sua pureza. As alíquotas foram diluídas em metanol e as soluções foram estocadas em freezer a - 40°C e protegidas da luz. As diluições sequenciais para método CLAE-EM/EM foram preparadas em diluente água/acetonitrila na proporção de 50:50 (v/v).

4.5. ESTUDO DE DEGRADAÇÃO DA EPZ

4.5.1 Preparo das soluções de degradação

Nesse estudo diversas soluções foram empregadas com o intuito de fornecer catalisadores reacionais à molécula da EPZ.

Para a avaliação da condição ácida e básica foram testados ácidos e bases fortes na faixa de 0,1 a 2 N. Com isso, foi preparado uma solução estoque de concentração igual a 5 N de hidróxido de sódio e de ácido clorídrico. Como na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (2010) não consta o procedimento de padronização para soluções tão concentradas (a 5 N), ambas as soluções foram diluídas para concentração teórica de 1 N e então, foram submetidas ao processo de padronização de acordo com os itens “Ácido clorídrico M SV” e “Hidróxido de sódio M SV”. Desta forma, obteve-se a concentração real das soluções diluídas (1 N) e embora não seja o procedimento oficial, o cálculo do valor considerado como real para a concentração das soluções originais (5 N) foi obtido por extrapolação. Ou seja, o resultado foi obtido a partir da multiplicação do valor padronizado de concentração das soluções 1 N pelo fator de diluição 5, assumindo-se que não houve inserção de erros analíticos na etapa de diluição que antecedeu a padronização das soluções 1 N.

Já para a condição oxidante, a solução de agente oxidante variou na faixa de 2 – 30%. Portanto, a solução reagente de peróxido de hidrogênio foi utilizada inalterada quando testado o fármaco frente ao peróxido de hidrogênio (30%), sendo as concentrações de trabalho obtidas a partir da própria diluição com a solução de EPZ.

Foi empregada ainda água ultrapura na avaliação da degradação por hidrólise em pH neutro.

4.5.2 Preparo das soluções

Para o estudo de degradação da EPZ, a solução estoque (1 mg.mL^{-1}) foi submetida à diversos ensaios, a partir da diluição de 1 parte desta com quantidade suficiente de solução de degradação (para alcançar a concentração desejada do teste), e quanto baste de metanol para completar 10 partes da mistura. Logo, a EPZ foi exposta às condições na concentração de $100 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$. O (QUADRO 5) a seguir ilustra todas as condições que foram testadas.

QUADRO 5 - CONDIÇÕES DE DEGRADAÇÃO TESTADAS

Condição	Parâmetros	Temperatura	Duração
Hidrólise neutra (H_2O)	Exposição da solução aquosa	40; 60; 80 °C	72 h
Hidrólise ácida (HCl)	0,1 N; 1 N; 2 N; 5 N de HCl	40; 60; 80 °C	72 h
Hidrólise básica (NaOH)	0,1 N; 1 N; 2 N; 5 N de NaOH	40; 60; 80 °C	72 h
Oxidação (H_2O_2)	2%; 5%; 10%; 20%; 30% de H_2O_2	25°C	72 h
Termodegradação	Exposição da solução metanólica	80 °C	7 dias
Fotodegradação	Exposição da solução metanólica	25°C	14 dias

Fonte: O autor, 2018.

As condições propostas tiveram o objetivo de gerar no mínimo 10% de degradação, contudo, estas condições não devem ser tão severas a ponto de promover a degradação total do fármaco. O estudo de estresse seguiu conforme preconizado nos guias Q3A e Q3B do ICH e RDC/Anvisa nº 53/2015 (BRASIL,2015).

4.5.3 Método CLAE-DAD para produtos de degradação

Inicialmente um método em CLAE-DAD foi desenvolvido com o objetivo de acompanhar o procedimento de degradação forçada de EPZ, para isso foi utilizado um Cromatógrafo Agilent 1100 com detector de arranjo de diodos.

As condições cromatográficas do método – como a coluna, vazão de fluxo, temperatura da coluna, fase móvel, volume de injeção – foram definidas com base nos estudos citados na revisão de literatura (seção 3.8). Com isso, foi selecionada uma coluna XBridge com fase estacionária C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm) e como fase móvel água com 0,1% de ácido fórmico e acetonitrila na proporção 70:30 (v/v) com fluxo de 1 mL.min⁻¹. As amostras foram analisadas com comprimento de onda de 233 nm.

4.6 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO IV

4.6.1 Seleção dos excipientes

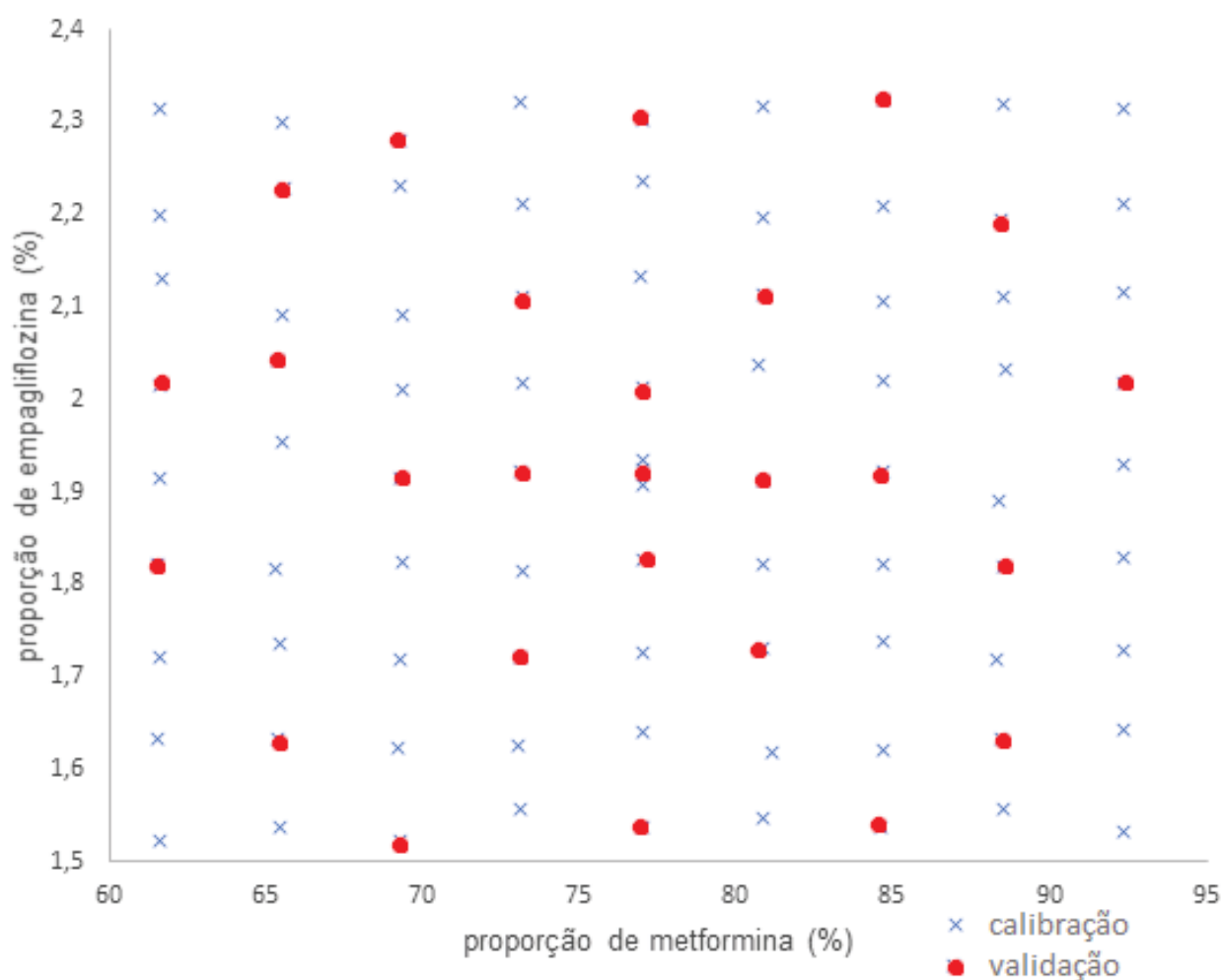
Para a construção de um modelo multivariado de calibração é necessário preparar amostras contendo além dos insumos farmacêuticos ativos (IFA), os excipientes da forma farmacêutica. O fabricante da associação disponível no comércio não disponibiliza a composição centesimal da formulação de excipientes utilizada, então, como ambos os insumos estudados são de classe III, optou-se por utilizar um excipiente comercial específico para essa classe (Celulomax SL[®]), com fins de assegurar as necessidades farmacotécnicas da formulação.

4.6.2 Seleção das amostras

A construção de um modelo adequado também requer um número representativo de amostras tanto no conjunto de calibração como no de validação. Neste trabalho, a quantidade mínima de amostras foi estabelecida com base na norma ASTM E1655-05 (2012). Para ambos os conjuntos, estimou-se que até 5 variáveis latentes seriam necessárias para explicar a variância entre as respostas analíticas das amostras. Esse número foi definido considerando a soma dos constituintes da mistura (MET, EPZ e mais três excipientes). Dessa forma, o número mínimo de amostras no conjunto de calibração deveria ser de 36 amostras e no conjunto de validação deveria ser de 20 amostras.

Foram preparadas ao total 83 amostras, de forma a contemplar o intervalo de $\pm 20\%$ na concentração de cada fármaco em relação ao valor declarado (12,5 mg para EPZ e 500 mg para MET). A variação utilizada foi de 5 em 5%, conforme ilustrado na (FIGURA 4), na qual o valor real de proporção de IFA em cada amostra foi corrigido e está expresso em porcentagem.

FIGURA 4 - GRÁFICO DA DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL



Fonte: O autor, 2018.

A inclusão de mais amostras no modelo também favorece a detecção de variabilidade entre as amostras, mesmo considerando o principal limitante da amostra que é a grande diferença de concentração entre os ativos. Ou seja, dessa forma, permite o uso de maior número de variáveis latentes, caso o modelo apresente esse requisito.

Cada amostra foi preparada individualmente. O valor máximo de massa da amostra (650 mg) foi obtido experimentalmente, considerando o volume necessário para o preparo de uma cápsula 00 contendo a dose de 500 mg e 12,5 mg de MET e EPZ, respectivamente. Com isso, foi pesado a quantidade necessária dos compostos em estudo e do excipiente, de acordo com o estabelecido pelo planejamento experimental. Em seguida, foi realizada homogeneização com o auxílio de gral e pistilo de ágata pelo método de diluição geométrica. A (TABELA 1) apresenta as quantidades pesadas para cada amostra, com valores do somatório total e também valores corrigidos em percentual.

TABELA 1 - DADOS REFERENTES AO PREPARO DAS AMOSTRAS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

(continua)

Amostra	Massa prática (mg)				Proporção (Valor de Y - %)		
	MET	EPZ	Excipiente	Total	MET	EPZ	Excipiente
1	600,05	15,07	34,97	650,09	92,30	2,32	5,38
2	599,76	14,38	35,69	649,83	92,29	2,21	5,49
3	599,93	13,77	36,27	649,97	92,30	2,12	5,58
4	600,02	13,14	36,94	650,10	92,30	2,02	5,68
5	600,14	12,56	37,58	650,28	92,29	1,93	5,78
6	599,78	11,9	38,4	650,08	92,26	1,83	5,91
7	600,13	11,26	38,81	650,20	92,30	1,73	5,97
8	599,54	10,68	39,48	649,70	92,28	1,64	6,08
9	600,48	9,98	40,12	650,58	92,30	1,53	6,17
10	575,38	15,1	59,99	650,47	88,46	2,32	9,22
11	574,54	14,28	61,45	650,27	88,35	2,20	9,45
12	576,64	13,77	61,45	651,86	88,46	2,11	9,43
13	574,97	13,23	61,64	649,84	88,48	2,04	9,49
14	575,19	12,33	63,78	651,30	88,31	1,89	9,79

TABELA 1 - DADOS REFERENTES AO PREPARO DAS AMOSTRAS DO
PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

(continuação)

Amostra	Massa prática (mg)				Proporção (Valor de Y - %)		
	MET	EPZ	Excipiente	Total	MET	EPZ	Excipiente
15	574,94	11,85	63,47	650,26	88,42	1,82	9,76
16	574,41	11,2	65,23	650,84	88,26	1,72	10,02
17	574,35	10,63	64,91	649,89	88,38	1,64	9,99
18	574,88	10,13	65,15	650,16	88,42	1,56	10,02
19	550,4	15,13	85,03	650,56	84,60	2,33	13,07
20	549,62	14,38	85,88	649,88	84,57	2,21	13,21
21	550,78	13,72	86,48	650,98	84,61	2,11	13,28
22	551,28	13,18	86,9	651,36	84,64	2,02	13,34
23	550,68	12,53	87,6	650,81	84,61	1,93	13,46
24	550,54	11,86	88,2	650,60	84,62	1,82	13,56
25	550,17	11,31	88,71	650,19	84,62	1,74	13,64
26	550,03	10,56	89,76	650,35	84,57	1,62	13,80
27	551,85	10,04	90,64	652,53	84,57	1,54	13,89
28	525,43	15,08	109,94	650,45	80,78	2,32	16,90
29	524,48	14,28	110,75	649,51	80,75	2,20	17,05
30	524,69	13,74	111,13	649,56	80,78	2,12	17,11
31	521,01	13,18	111,9	646,09	80,64	2,04	17,32
32	524,86	12,45	112,53	649,84	80,77	1,92	17,32
33	525,57	11,87	113,22	650,66	80,77	1,82	17,40
34	525,27	11,28	114,02	650,57	80,74	1,73	17,53
35	527,18	10,54	114,87	650,11	81,09	1,62	17,67
36	525,11	10,06	114,94	649,83	80,81	1,55	17,69

TABELA 1 - DADOS REFERENTES AO PREPARO DAS AMOSTRAS DO
PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

(continuação)

Amostra	Massa prática (mg)				Proporção (Valor de Y - %)		
	MET	EPZ	Excipiente	Total	MET	EPZ	Excipiente
37	499,79	14,97	135,07	649,83	76,91	2,30	20,79
38	501,27	14,58	135,81	651,66	76,92	2,24	20,84
39	500,03	13,88	136,28	650,19	76,91	2,13	20,96
40	500,4	13,11	136,86	650,37	76,94	2,02	21,04
41	500,1	12,6	137,57	650,27	76,91	1,94	21,16
42	500,1	12,42	137,54	650,06	76,93	1,91	21,16
43	499,92	12,53	137,52	649,97	76,91	1,93	21,16
44	499,88	11,89	138,14	649,91	76,92	1,83	21,26
45	500,01	11,23	138,83	650,07	76,92	1,73	21,36
46	500,85	10,7	139,56	651,11	76,92	1,64	21,43
47	500,29	10,01	140,1	650,40	76,92	1,54	21,54
48	474,91	15,11	160,32	650,34	73,02	2,32	24,65
49	475,02	14,38	160,25	649,65	73,12	2,21	24,67
50	475,25	13,74	161,14	650,13	73,10	2,11	24,79
51	475,69	13,14	161,93	650,76	73,10	2,02	24,88
52	475,06	12,52	162,54	650,12	73,07	1,93	25,00
53	475,32	11,82	163,14	650,28	73,09	1,82	25,09
54	474,95	11,2	163,84	649,99	73,07	1,72	25,21
55	475,04	10,6	165,25	650,89	72,98	1,63	25,39
56	474,87	10,13	164,96	649,96	73,06	1,56	25,38
57	449,82	14,83	185,09	649,74	69,23	2,28	28,49
58	450,88	14,55	186,28	651,71	69,18	2,23	28,58

TABELA 1 - DADOS REFERENTES AO PREPARO DAS AMOSTRAS DO
PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

(continuação)

Amostra	Massa prática (mg)				Proporção (Valor de Y - %)		
	MET	EPZ	Excipiente	Total	MET	EPZ	Excipiente
59	450,47	13,62	186,38	650,47	69,25	2,09	28,65
60	450,32	13,09	186,92	650,33	69,24	2,01	28,74
61	449,77	12,46	187,56	649,79	69,22	1,92	28,86
62	450,82	11,89	188,24	650,95	69,26	1,83	28,92
63	450,19	11,2	189	650,39	69,22	1,72	29,06
64	451,85	10,63	191,26	653,74	69,12	1,63	29,26
65	450,65	9,93	190,46	651,04	69,22	1,53	29,25
66	424,99	14,96	209,79	649,74	65,41	2,30	32,29
67	428,27	14,6	211,18	654,05	65,48	2,23	32,29
68	426,38	13,64	211,31	651,33	65,46	2,09	32,44
69	425,16	13,3	212,32	650,78	65,33	2,04	32,63
70	426,33	12,75	212,56	651,64	65,42	1,96	32,62
71	424,31	11,83	214,36	650,50	65,23	1,82	32,95
72	425,27	11,31	213,76	650,34	65,39	1,74	32,87
73	424,44	10,63	214,8	649,87	65,31	1,64	33,05
74	426,4	10,05	215,95	652,40	65,36	1,54	33,10
75	400,65	15,08	235,14	650,87	61,56	2,32	36,13
76	400,76	14,34	235,86	650,96	61,56	2,20	36,23
77	401,2	13,9	236,45	651,55	61,58	2,13	36,29
78	399,55	13,1	236,91	649,56	61,51	2,02	36,47
79	400,05	12,46	237,66	650,17	61,53	1,92	36,55
80	400,06	11,87	238,69	650,62	61,49	1,82	36,69

TABELA 1 - DADOS REFERENTES AO PREPARO DAS AMOSTRAS DO
PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

(conclusão)

Amostra	Massa prática (mg)				Proporção (Valor de Y - %)		
	MET	EPZ	Excipiente	Total	MET	EPZ	Excipiente
81	399,98	11,21	238,93	650,12	61,52	1,72	36,75
82	399,82	10,63	240,02	650,47	61,47	1,63	36,90
83	400,98	9,94	240,75	651,67	61,53	1,53	36,94

Fonte: O autor, 2018.

Após o preparo das amostras, estas foram transferidas para o aparato do espectrômetro na região do infravermelho próximo para a aquisição dos espectros. Os espectros foram adquiridos região de 10000 a 4000 cm^{-1} , para as análises na região do IVP, com resolução de 4 cm^{-1} e 64 *scans*. A aquisição foi realizada sob temperatura ($20,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$) e umidade (45 – 55%) controlada.

4.6.3 Desenvolvimento do modelo multivariado de calibração

Inicialmente optou-se por construir modelos utilizando os dois dados de concentração simultaneamente (PLS2), depois verificou-se a necessidade de construir dois modelos separadamente para cada quantificação. Dois fatores foram utilizados na construção de diversos modelos: diferentes combinações de pré-processamentos e diferentes porções dos espectros.

Diversos modelos foram inicialmente construídos pelo método PLS com espectro total através da combinação de diferentes pré-processamentos (centrar os dados na média, MSC e primeira derivada Savitzky-Golay) e da técnica de validação cruzada *leave-one-out*.

A seguir, foi utilizada a seleção de variáveis com iPLS e siPLS, considerando-se os intervalos de tamanho 387, 310, 259, 222 e 194 cm^{-1} . Estes valores foram obtidos através da divisão dos números de pontos gerados pelo equipamento (3111 pontos), dentro da faixa avaliada de 10000 – 4000 cm^{-1} , por 8, 10, 12, 14 e 16 faixas respectivamente. Os parâmetros foram definidos com o

número de intervalos automático, número de variáveis latentes máximo igual a 5 e modo *forward*.

Os melhores modelos de calibração multivariada foram selecionados com base nos valores de RMSEC (raiz quadrada do erro médio quadrático de calibração), RMSECV, RMSEP e erro percentual médio de predição.

A presença de amostras anômalas também foi verificada com base na análise do gráfico dos resíduos de Student *versus leverage*.

4.6.4 Validação dos modelos desenvolvidos

O processo de validação foi realizado considerando as figuras de mérito aplicáveis a modelos de calibração multivariada.

4.6.4.1 Seletividade, sensibilidade e sensibilidade analítica

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

4.6.4.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada através da aleatoriedade no gráfico da concentração dos valores de referência *versus* os valores preditos pelo modelo de PLS. O conjunto de dados utilizados para avaliar este parâmetro foi o conjunto de calibração.

4.6.4.3 Precisão

A precisão foi avaliada em dois níveis (repetitividade e precisão intermediária) e em função do desvio padrão relativo (DPR). Foram realizadas 6 análises de determinação para uma mesma amostra, a 100% da concentração do teste, pelo mesmo analista, mesmo equipamento e em um curto espaço de tempo. A precisão intermediária, por sua vez, foi determinada por 6 análises da mesma amostra a 100% da concentração, executadas por um segundo analista,

mantendo o mesmo equipamento em um intervalo de tempo de 2 dias. Teste t foi empregado para comparação das médias obtidas para cada analito.

4.6.4.4 Exatidão

A exatidão foi verificada com base no valor de RMSEP (*Root Mean Squares Error of Prediction* - Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático de Previsão).

4.6.4.5 Robustez

Para os métodos desenvolvidos, a robustez foi avaliada verificando a influência da variação da concentração de componentes majoritários do excipiente, sem comprometer os dados da concentração dos fármacos.

A robustez foi avaliada frente à variação na concentração de +1 e +2% de amido pré-gelatinizado e de +1 e +2% de celulose microcristalina na composição do excipiente. Essas amostras de excipientes acrescidos de amido ou celulose foram usadas no preparo de novas amostras com concentração a 100% do teste de ambos os ativos.

4.6.4.6 *Bias*

O valor de *bias* considerado foi calculado de acordo com as equações da sub-seção 3.8.2.7.

4.6.4.7 Desvio padrão de previsão (*residual prediction deviation* - RPD)

Este parâmetro foi calculado conforme equação da subseção 3.8.2.8.

4.7 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO CLAE-EM/EM

4.7.1 Checagem de sinal dos analitos por infusão direta no espectrômetro de massas

A checagem do sinal dos analitos foi feita através de análise por infusão direta no espectrômetro de massas. Com o objetivo de definir a melhor condição de ionização destes analitos, soluções de trabalho com concentração de 100 ng.mL^{-1} , foram preparadas partir das soluções estoque em diluente acetonitrila:água (1:1, v/v). Foram testadas concentrações de formiato de amônio e ácido fórmico como aditivos. As soluções foram infundidas com auxílio de bomba seringa a um fluxo de $10 \text{ }\mu\text{L.min}^{-1}$ na interface *electrospray*, no modo positivo de ionização. A posição do capilar foi mantida em 10 mm na vertical e 5 mm na horizontal.

4.7.2 Análise por *Multiple Reaction Monitoring* (MRM)

Após definir o aditivo, foi realizado o procedimento *Multiple Reaction Monitoring* (MRM). A concentração de cada analito foi de 100 ng.mL^{-1} , o solvente utilizado foi acetonitrila:água 1:1 (v/v). Os seguintes parâmetros foram otimizados automaticamente para a determinação dos íons fragmentos de cada analito: potencial de desagrupamento (DP), potencial de entrada (EP), potencial de entrada na cela de colisão (CEP), energia de colisão (CE) e potencial de saída da cela de colisão (CXP).

4.7.3 Análise por injeção em fluxo – FIA

O cromatógrafo líquido foi acoplado diretamente (sem o uso de coluna) ao espectrômetro de massas para otimização dos seguintes parâmetros da fonte de ionização: gás de colisão (CAD); gás de interface (CUR); gás de nebulização (GS1); gás auxiliar (GS2); voltagem do capilar (IS); temperatura da fonte. Como fase móvel foi utilizado acetonitrila: água, 50:50 (v/v), vazão de fluxo de

250 $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$ e volume de injeção de 20 μL . A posição do capilar foi mantida em 3 mm na vertical e 5 mm na horizontal e a concentração do analito foi semelhante ao das etapas anteriores.

4.7.4 Preparo da fase móvel

Para compor a fase móvel foram utilizadas duas soluções: solução A (água contendo 0,1% de ácido fórmico (v/v) e formiato de amônio 1 mM) e solução B (mistura de água:acetonitrila (5:95, v/v) contendo os mesmos aditivos da solução A). Essas soluções foram combinadas em diferentes proporções durante o desenvolvimento do método até se obter o gradiente mais adequado para a separação dos analitos.

A otimização cromatográfica foi realizada com o objetivo de separar adequadamente os analitos, de forma a se obter o melhor perfil cromatográfico utilizando a coluna XBridge C18 (50 x 2,1 mm, 5 μm). A fase móvel foi definida após teste de diversas proporções nos modos isocrático e gradiente. O fluxo da fase móvel também foi avaliado, sendo testado na faixa de 0,2 – 0,4 $\text{mL}.\text{min}^{-1}$. A temperatura do forno da coluna foi testada na faixa de 30 – 40 $^{\circ}\text{C}$. Os ensaios foram realizados com solução de trabalho preparada a partir das soluções de estoque dos padrões e foram testados diversos volumes de injeção.

4.7.5 Otimização do preparo de amostra

A técnica de preparo de amostra foi definida considerando a melhor extração dos analitos. Foram empregados metanol e água ultrapura, dois solventes encontrados de maneira recorrente na literatura para a extração destes insumos farmacêuticos ativos, e foi utilizado banho de ultrassom para auxiliar no procedimento de extração. As amostras foram filtradas em filtros PTFE e PVDF e também foi analisada a centrifugação seguida de coleta do sobrenadante para posterior diluição.

Para ilustrar o preparo de amostra, foi preparada uma mistura contendo 500 mg de cloridrato de MET, 12,5 mg de EPZ e 137,5 mg de excipiente, totalizando 650 mg de mistura. Uma alíquota equivalente a 16,25 mg dessa

mistura foi transferida para um balão de 25 mL, ao qual foi acrescentado água/metanol (1:1 v/v). Essa amostra foi submetida a sonicação por 30 min. Posteriormente, a amostra foi filtrada em filtro PVDF de 22 µm de poro e denominada SOLUÇÃO I.

Análise de EPZ: uma alíquota de 250 µL da SOLUÇÃO I foi transferida para um balão de 25 mL. Em seguida, foi completado o volume com água/acetonitrila (1:1, v/v), obtendo a concentração final de 50 ng.mL⁻¹ de EPZ. Essa amostra foi denominada como SOLUÇÃO II.

Análise de MET: uma alíquota de 100 µL da SOLUÇÃO II foi transferida para um balão de 10 mL. Em seguida, foi completado o volume com água/acetonitrila (1:1, v/v), obtendo a concentração final de 50 ng.mL⁻¹ de MET.

4.7.6 Validação do método

O método foi validado de acordo com os critérios estabelecidos na RDC nº 166, de 2017, ANVISA, para a categoria a qual este método se aplica, que dispõe sobre testes quantitativos para a determinação de princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas (BRASIL, 2017) e no guia Q2A do ICH. Os parâmetros avaliados foram: seletividade, linearidade, intervalo, efeito matriz, precisão e exatidão.

4.7.6.1 Seletividade

O parâmetro seletividade foi avaliado através da comparação entre as áreas dos picos referentes à MET e EPZ, tanto na amostra preparada da matriz (excipiente puro) como em uma amostra contendo ambos analitos na matriz. A concentração adotada para a amostra com os analitos foi o ponto mínimo das curvas de calibração destes.

As amostras foram preparadas da seguinte maneira: uma alíquota de 3,4 mg de excipiente comercial foi pesada, acondicionada em um balão volumétrico de 25 mL de capacidade e extraída conforme procedimento da subseção 4.7.5. Às soluções obtidas foram adicionadas quantidades suficientes de

solução dos padrões dos analitos para obtenção de amostras a concentração final de 30 ng.mL⁻¹.

4.7.6.2 Curva de calibração e intervalo

A partir das soluções-estoque foram preparadas três curvas de calibração contemplando 5 níveis de concentração na faixa de 60 a 140% da concentração teórica do teste. Este intervalo foi determinado a partir da proposta de aplicação do método, ou seja, considerando uma pequena margem acima da variação de mais ou menos 20% da concentração esperada para a amostra, visto que se trata de uma quantificação com proposta de aplicação na avaliação da uniformidade de conteúdo. Antes das injeções, todas as soluções foram filtradas através de filtro de seringa de PVDF (0,22 µm de poro). O resultado da curva de calibração foi avaliado verificando-se a linearidade dentro do intervalo, considerando coeficiente de correlação (r) de no mínimo 0,99. Também foi avaliado o perfil de distribuição dos resíduos no gráfico de resíduos da regressão linear. O (QUADRO 6) a seguir mostra as concentrações empregadas na avaliação da linearidade do método.

QUADRO 6 - NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO EMPREGADOS NA CONSTRUÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO

Nível	MET (ng.mL ⁻¹)	EPZ (ng.mL ⁻¹)
1 (60%)	30	30
2 (80%)	40	40
3 (100%)	50	50
4 (120%)	60	60
5 (140%)	70	70

Fonte: O autor, 2018.

4.7.6.3 Efeito matriz

A avaliação do efeito matriz foi feita a partir da construção de três curvas de calibração, contemplando os mesmos níveis empregados no ensaio de

linearidade, utilizando solução de extrato da matriz no lugar de diluente. A avaliação estatística por meio do teste t e o paralelismo das retas indica a ausência de interferência dos constituintes da matriz na resposta linear do método.

4.7.6.4 Precisão

A precisão do método foi determinada em dois níveis: repetitividade (precisão intra-dia) e precisão intermediária (precisão inter-dia). Para a determinação da repetibilidade, foram realizadas 6 análises de determinação para uma mesma amostra, a 100% da concentração do teste (mistura contendo 500 mg de MET e 12,5 mg de EPZ) pelo mesmo analista, mesmo equipamento e em um curto espaço de tempo. A precisão intermediária, por sua vez, foi determinada por 6 análises de uma amostra, executadas por um segundo analista, mantendo o mesmo equipamento em um intervalo de tempo de 2 dias. Todos os preparos de amostras de precisão foram realizados de forma semelhante à amostra de seletividade. Antes das injeções todas as soluções foram filtradas através de filtro PVDF (0,22 µm de poro). A dispersão dos resultados foi avaliada através do DPR e testes F e t foram empregados para comparação das médias obtidas para cada analito em cada ensaio.

4.7.6.5 Exatidão

A exatidão foi avaliada através de 9 determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 concentrações com três réplicas cada, sendo elas: baixa, média e alta. Foram preparadas misturas contendo 80%, 100% e 120% da concentração das matérias primas (400, 500 e 600 mg de MET e 10, 12,5 e 15 mg de EPZ, respectivamente). Essas amostras foram extraídas conforme procedimento adotado para a amostra utilizada no ensaio de seletividade e foram preparadas para injeção. O resultado foi avaliado como porcentagem da concentração recuperada de cada analito, quando comparada com a concentração teórica. O intervalo de $\pm 5\%$ em relação ao valor nominal foi

considerado como critério para avaliação deste parâmetro. As concentrações teóricas estão descritas no (QUADRO 7) a seguir:

QUADRO 7 – CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS NO ENSAIO DE EXATIDÃO

Nível	MET (ng.mL ⁻¹)	EPZ (ng.mL ⁻¹)
Baixo (80%)	40	40
Médio (100%)	50	50
Alto (120%)	60	60

Fonte: O autor, 2018.

4.7.6.6 Teste de efeito residual (*carryover*)

Embora a legislação não preconize o teste de efeito residual para métodos analíticos, a existência de efeito residual foi avaliada através da injeção de uma solução de trabalho dos padrões analíticos na concentração mais alta da curva de calibração de cada analito, seguida pela injeção sequencial de duas amostras em branco (somente a solução diluente). Para a realização desse ensaio a concentração da solução de trabalho dos padrões analíticos utilizada foi 70 ng.mL⁻¹ para MET e EPZ e como diluente uma mistura de acetonitrila:água (1:1, v/v). Os picos presentes nas injeções do branco devem ser comparados com as amostras de concentração correspondente ao limite inferior de quantificação (LIQ), ou seja, o ponto mais baixo da curva de calibração. O critério empregado em métodos bioanalíticos define que para o método ser considerado isento de efeito residual, as áreas dos picos interferentes não devem ser superiores a 20% da área das amostras do limite inferior de quantificação (30 ng.mL⁻¹) e ainda, deve-se levar em consideração a magnitude da razão sinal/ruído demonstrada pela amostra em branco (BRASIL, 2012). Este ensaio auxiliou na determinação da solução de limpeza do injetor automática, que foi utilizada no método.

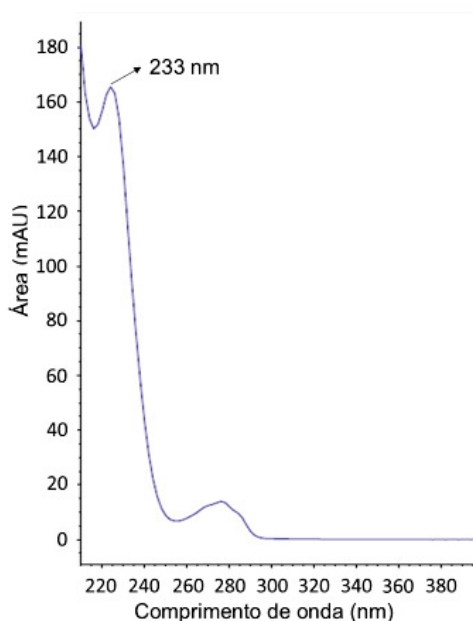
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTUDO DE DEGRADAÇÃO

5.1.1 Tempo Zero

A seleção do comprimento de onda de maior intensidade baseou-se no espectro UV apresentado pelo equipamento. Este espectro é apresentado na (FIGURA 5), em que é possível observar comprimento de onda máximo de 233 nm.

FIGURA 5 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO UV DA EPZ



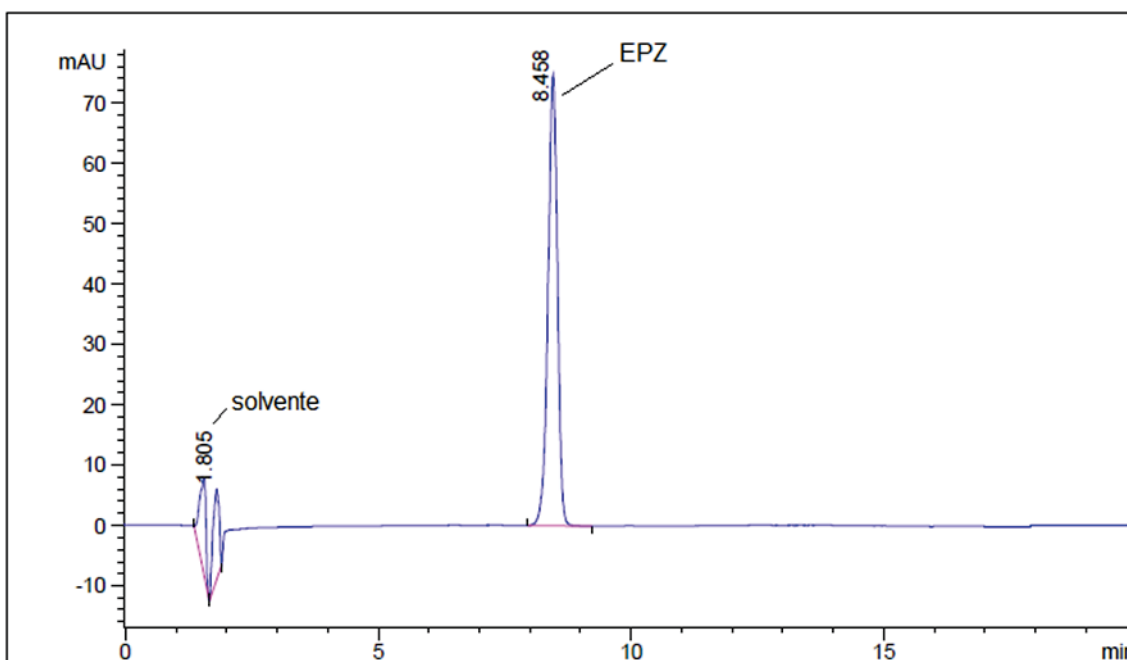
Fonte: O autor, 2018.

Uma amostra da solução de EPZ foi analisada pelo método por CLAE-DAD para a obtenção de um cromatograma referente à condição da amostra antes da exposição às condições de degradação, ou seja, no tempo zero. Esta amostra, denominada controle, foi armazenada em geladeira e ao abrigo da luz, sendo utilizada para comparação durante toda a execução do estudo. Adicionalmente, cada mistura reacional preparada foi também analisada no tempo zero para fins de comparação com as respectivas amostras subsequentes de cada condição de degradação.

5.1.2 Termodegradação

Uma amostra da solução de EPZ a $100 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ foi acondicionada em 7 frascos de vidro, os quais foram colocados em estufa a 80°C , por sete dias. A cada 24 h um frasco foi retirado, diluído 1:1 (v/v) com fase móvel e analisado por CLAE-DAD. No cromatograma (FIGURA 6) observa-se um pico cromatográfico próximo a 8,5 min referente à EPZ. Ao comparar os cromatogramas das (FIGURAS 6 e 7) foi possível concluir que não houve termodegradação após o período de 7 dias na condição testada, uma vez que a alteração na área referente ao pico da EPZ foi inferior à 3%, além de não terem sido observados novos picos nos cromatogramas.

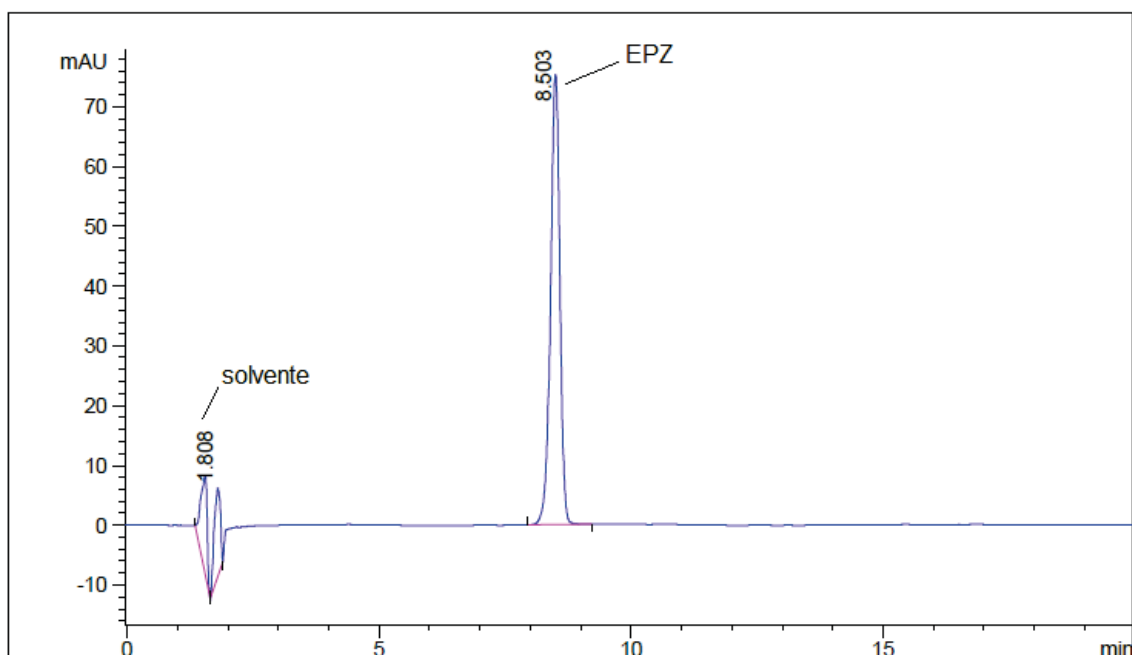
FIGURA 6 - CROMATOGRAMA REFERENTE AO TEMPO ZERO DO ENSAIO DE TERMODEGRADAÇÃO



Nota: Coluna: XBridge C18 (150 x 4,6 mm, 5 μm). Fase móvel: ácido fórmico 0,1%/acetonitrila 70:30 (v/v). Fluxo: $1 \text{ mL}.\text{min}^{-1}$. Detecção: 233 nm. Concentração de EPZ: $50 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. Volume de injeção: 10 μL . Temperatura do forno da coluna: 25°C .

Fonte: O autor, 2018.

FIGURA 7 - CROMATOGRAMA REFERENTE AO TEMPO FINAL (7 DIAS) DO ENSAIO DE TERMODEGRADAÇÃO



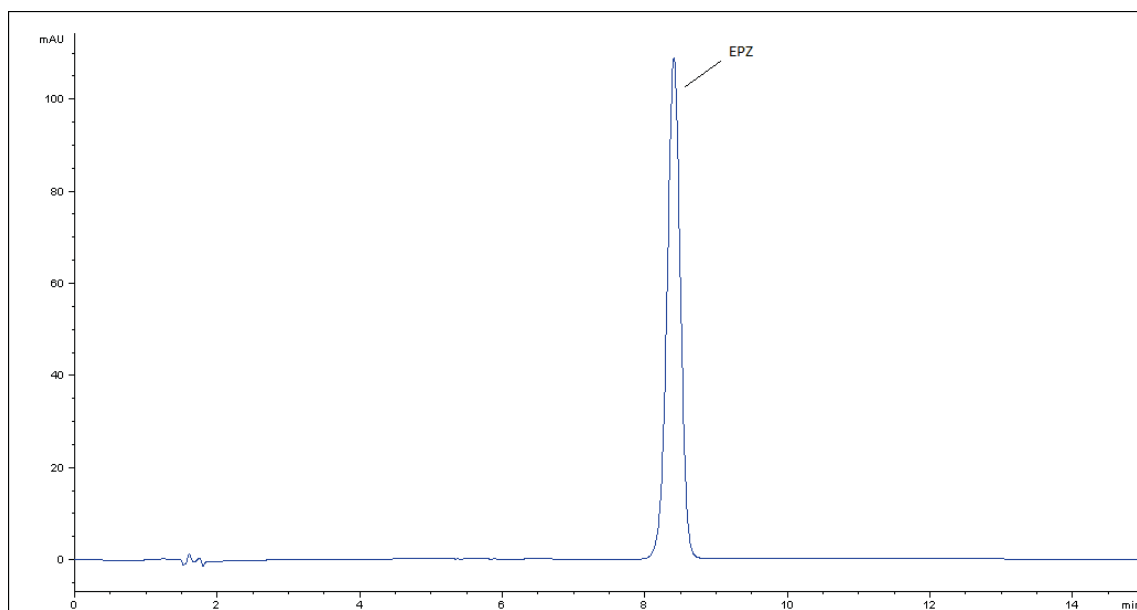
Nota: Coluna: XBridge C18 (150 x 4,6 mm, 5 μ m). Fase móvel: ácido fórmico 0,1%/acetonitrila 70:30 (v/v). Fluxo: 1 mL.min⁻¹. Detecção: 233 nm. Concentração de EPZ: 50 μ g.mL⁻¹. Volume de injeção: 10 μ L. Temperatura do forno da coluna: 25 °C.

Fonte: O autor, 2018.

5.1.3 Fotodegradação

Uma amostra da solução de EPZ a 100 μ g.mL⁻¹ foi acondicionada em 7 frascos de vidro, os quais foram colocados em câmara de luz combinando a emissão na região do visível e também ultravioleta por 14 dias. A cada 48 h um frasco foi retirado, diluído 1:1 (v/v) com fase móvel e analisado por CLAE-DAD. Ao final do décimo quarto dia foi possível concluir que não houve fotodegradação na condição testada, pois conforme evidenciado nas (FIGURAS 8 e 9), a alteração na área referente ao pico da EPZ foi inferior à 3% e não foi observado aparecimento de novos picos nos cromatogramas.

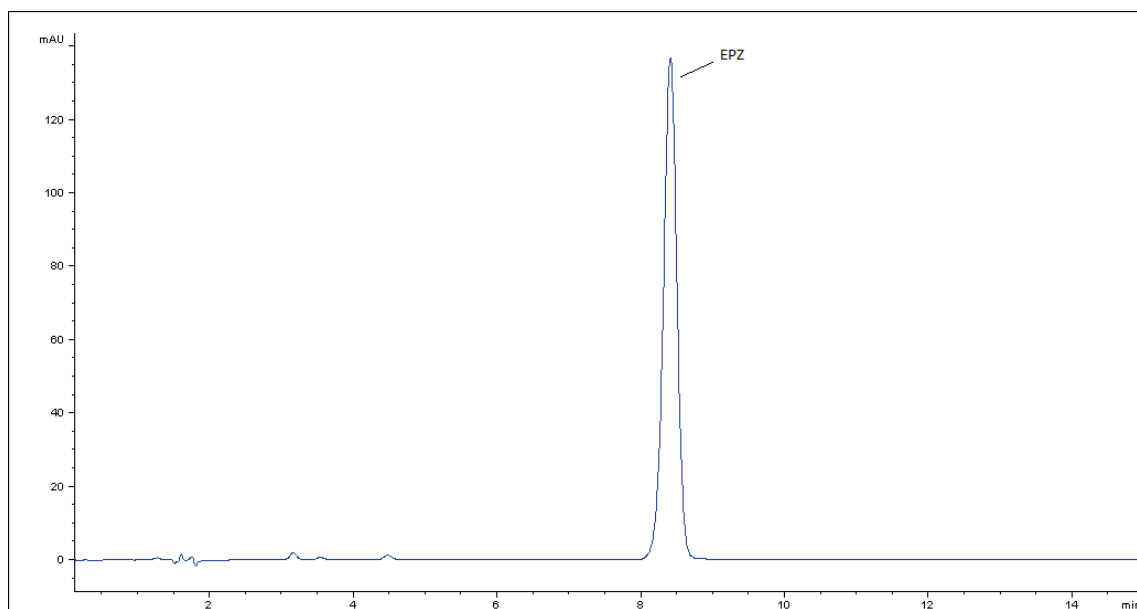
FIGURA 8 - CROMATOGRAMA REFERENTE AO TEMPO ZERO DO ENSAIO DE FOTODEGRADAÇÃO



Nota: Coluna: XBridge C18 (150 x 4,6 mm, 5 μ m). Fase móvel: ácido fórmico 0,1%/acetonitrila 70:30 (v/v). Fluxo: 1 mL.min⁻¹. Detecção: 233 nm. Concentração de EPZ: 50 μ g.mL⁻¹. Volume de injeção: 10 μ L. Temperatura do forno da coluna: 25 °C.

Fonte: O autor, 2018.

FIGURA 9 - CROMATOGRAMA REFERENTE AO TEMPO FINAL (14 DIAS) DO ENSAIO DE FOTODEGRADAÇÃO



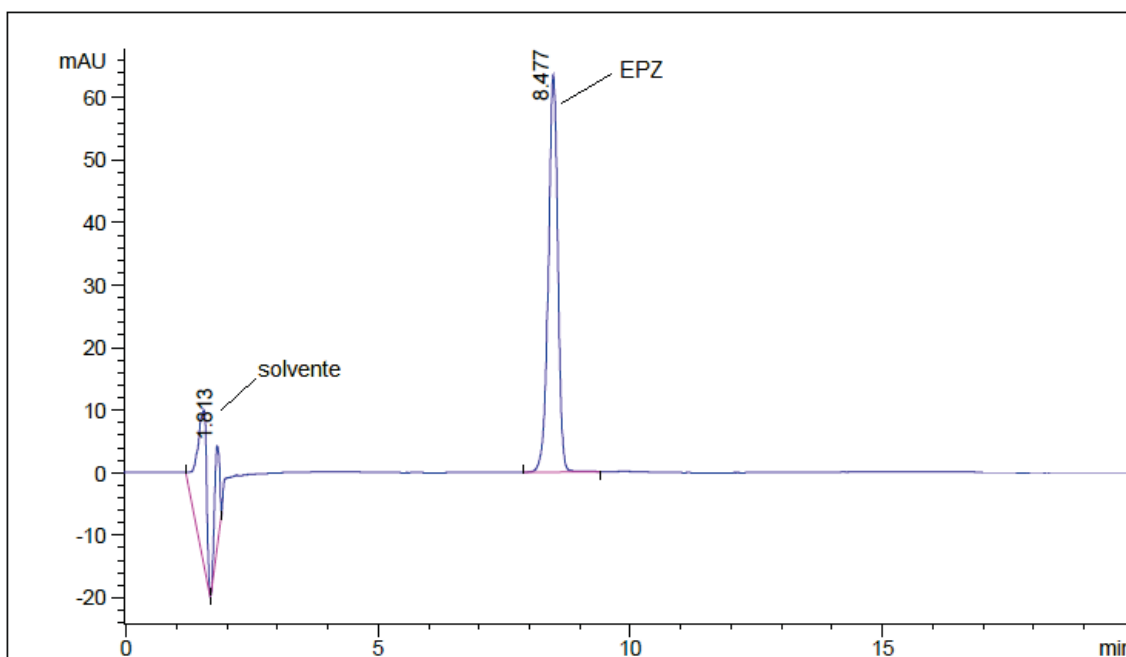
Nota: Coluna: XBridge C18 (150 x 4,6 mm, 5 μ m). Fase móvel: ácido fórmico 0,1%/acetonitrila 70:30 (v/v). Fluxo: 1 mL.min⁻¹. Detecção: 233 nm. Concentração de EPZ: 50 μ g.mL⁻¹. Volume de injeção: 10 μ L. Temperatura do forno da coluna: 25°C.

Fonte: O autor, 2018.

5.1.4 Hidrólise neutra

Uma amostra da solução de EPZ a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi acondicionada com água ultrapura em frasco de vidro e colocada em estufa a 40°C por 72 h. Nos intervalos de 3, 6, 9, 12, 24, 48 e 72 h, uma alíquota foi retirada, diluída 1:1 (v/v) com fase móvel e analisada por CLAE-DAD. O mesmo protocolo foi seguido testando temperaturas de 60 e 80°C . Ao final do ensaio foi possível concluir que não houve degradação por hidrólise neutra na condição testada, pois a alteração na área referente ao pico da EPZ foi inferior à 2% e não foi observado aparecimento de novos sinais (FIGURAS 10 e 11).

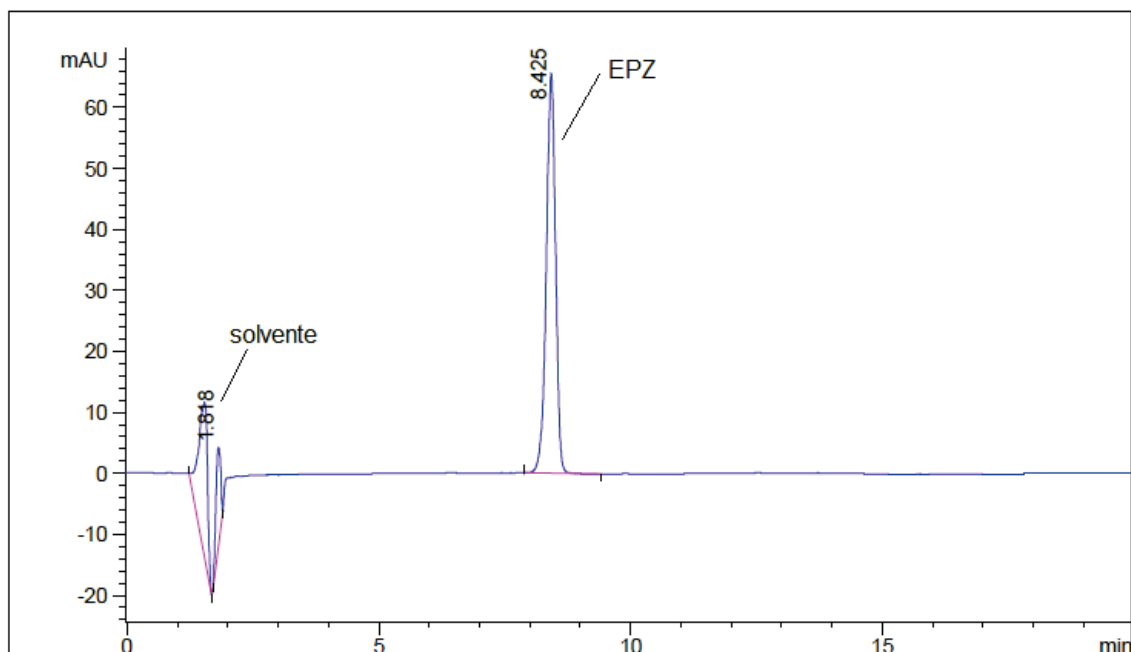
FIGURA 10 - CROMATOGRAMA REFERENTE AO TEMPO ZERO DO ENSAIO DE HIDRÓLISE NEUTRA



Nota: Coluna: XBridge C18 (150 x 4,6 mm, 5 μm). Fase móvel: ácido fórmico 0,1%/acetonitrila 70:30 (v/v). Fluxo: 1 mL.min^{-1} . Detecção: 233 nm. Concentração de EPZ: $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Volume de injeção: 10 μL . Temperatura do forno da coluna: 25°C .

Fonte: O autor, 2018.

FIGURA 11 - CROMATOGRAMA REFERENTE AO TEMPO FINAL (72 H; 80 °C) DO ENSAIO DE HIDRÓLISE NEUTRA



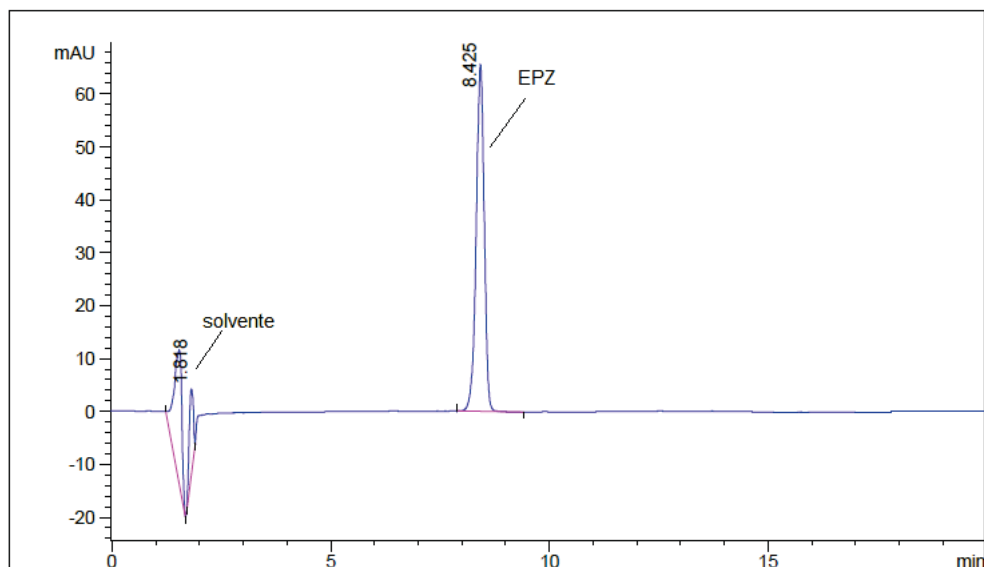
Nota: Coluna: XBridge C18 (150 x 4,6 mm, 5 μ m). Fase móvel: ácido fórmico 0,1%/acetonitrila 70:30 (v/v). Fluxo: 1 mL.min⁻¹. Detecção: 233 nm. Concentração de EPZ: 50 μ g.mL⁻¹. Volume de injeção: 10 μ L. Temperatura do forno da coluna: 25 °C.

Fonte: O autor, 2018.

5.1.5 Hidrólise ácida e básica

Uma amostra da solução de EPZ a 100 μ g.mL⁻¹ foi acondicionada com HCl 0,1 N em frasco de vidro e colocada em estufa a 40 °C por 72 h. Outra amostra da solução de EPZ a 100 μ g.mL⁻¹ foi acondicionada com NaOH 0,1 N em frasco plástico e colocada em estufa a 40 °C por 72 h. Nos intervalos de 3, 6, 9, 12, 24, 48 e 72 h, uma alíquota de cada frasco foi retirada, neutralizada, diluída 1:1 com fase móvel e analisada por CLAE-DAD. O mesmo protocolo foi seguido testando temperaturas de 60 e 80 °C e concentração de 1 N, 2 N e 5 N de cada reagente. Ao final do ensaio foi possível concluir que não houve hidrólise ácida ou básica nas condições testadas até 2 N, pois a alteração na área referente ao pico da EPZ foi inferior à 5% e não foi observado aparecimento de novos picos nos cromatogramas, conforme exemplo nas (FIGURAS 12 e 13), referentes à condição ácida.

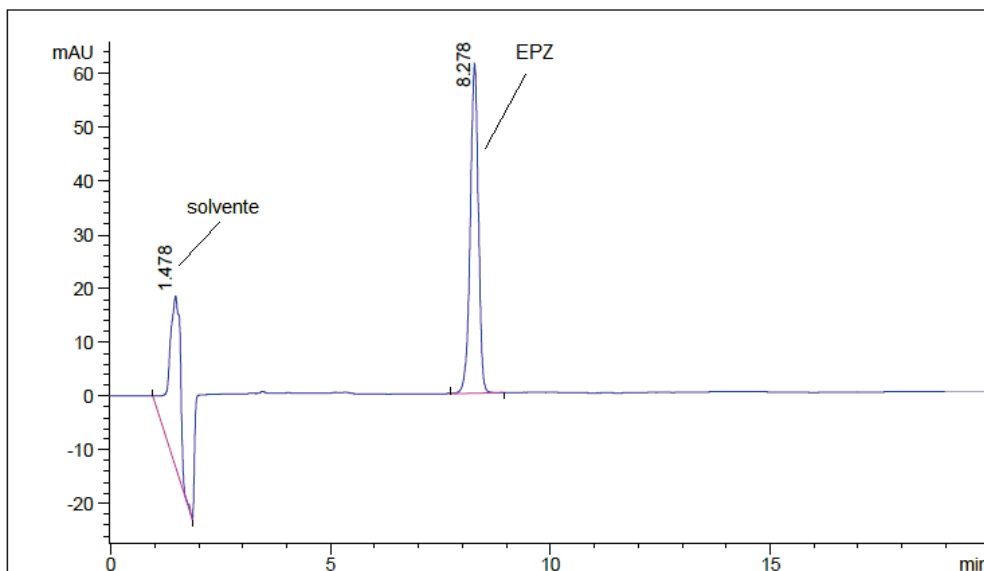
FIGURA 12 - CROMATOGRAMA REFERENTE AO TEMPO ZERO (2 N) DO ENSAIO DE HIDRÓLISE ÁCIDA



Nota: Coluna: XBridge C18 (150 x 4,6 mm, 5 μ m). Fase móvel: ácido fórmico 0,1%/acetonitrila 70:30 (v/v). Fluxo: 1 mL.min⁻¹. Detecção: 233 nm. Concentração de EPZ: 50 μ g.mL⁻¹. Volume de injeção: 10 μ L. Temperatura do forno da coluna: 25 °C.

Fonte: O autor, 2018.

FIGURA 13 - CROMATOGRAMA REFERENTE AO TEMPO FINAL (2 N; 72 H; 80 °C) DO ENSAIO DE HIDRÓLISE ÁCIDA

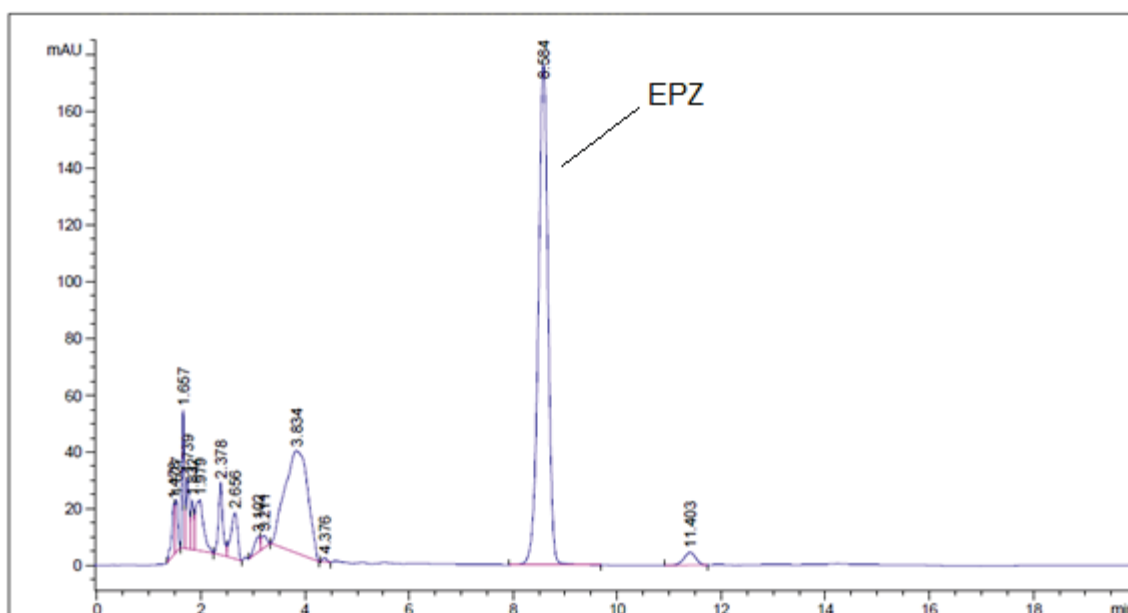


Nota: Coluna: XBridge C18 (150 x 4,6 mm, 5 μ m). Fase móvel: ácido fórmico 0,1%/acetonitrila 70:30 (v/v). Fluxo: 1 mL.min⁻¹. Detecção: 233 nm. Concentração de EPZ: 50 μ g.mL⁻¹. Volume de injeção: 10 μ L. Temperatura do forno da coluna: 25 °C.

Fonte: O autor, 2018.

Quando concentrações mais altas de ácido e base, como 5 N, foram testadas, foi observada a formação de novos picos, porém os achados foram inconclusivos, pois estes não se reproduziram com a repetição dos experimentos e estes picos também estão presentes nas amostras branco (frasco sem solução do IFA), conforme pode ser observado nas (FIGURAS 14 e 15) a seguir. Ainda, mesmo que fossem encontrados produtos de degradação nessas condições, a energia fornecida ao sistema com essa concentração de catalisador e temperatura é bastante superior à energia a qual o IFA e medicamentos são submetidos durante condições normais de armazenamento e durante a totalidade do prazo de validade, portanto quaisquer achados não poderiam ser considerados coerentes.

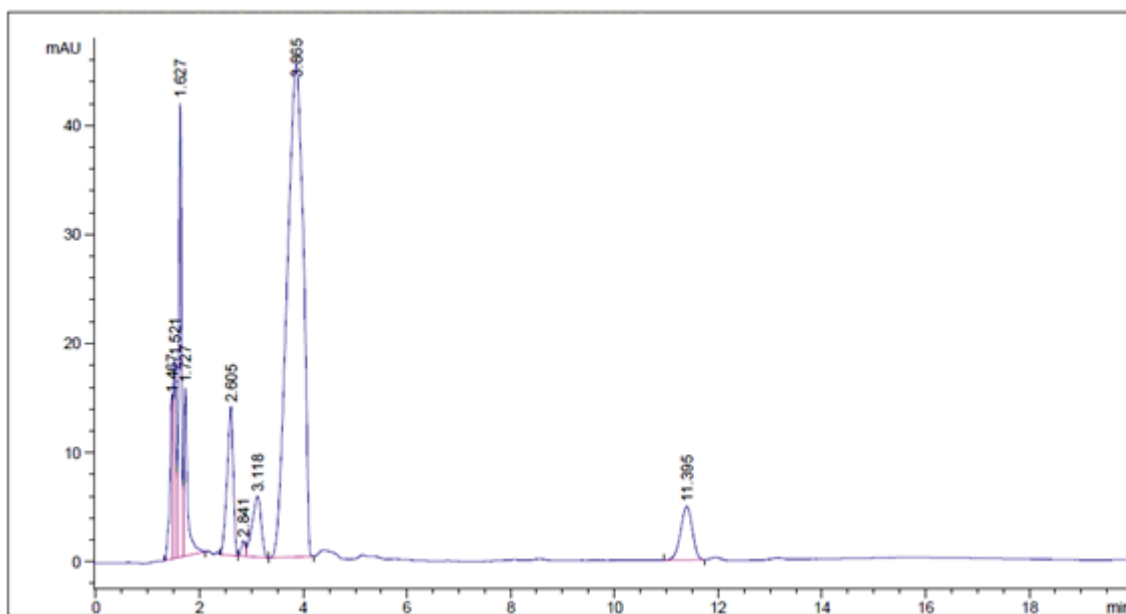
FIGURA 14 - CROMATOGRAMA REFERENTE AO TEMPO 23 H (5 N; 60 °C) DO ENSAIO DE HIDRÓLISE ÁCIDA



Nota: Coluna: XBridge C18 (150 x 4,6 mm, 5 μ m). Fase móvel: ácido fórmico 0,1%/acetonitrila 70:30 (v/v). Fluxo: 1 mL.min⁻¹. Detecção: 233 nm. Concentração de EPZ: 50 μ g.mL⁻¹. Volume de injeção: 10 μ L. Temperatura do forno da coluna: 25 °C.

Fonte: O autor, 2018.

FIGURA 15 - CROMATOGRAMA REFERENTE AO BRANCO DO TEMPO 24 H (5 N; 60 °C)
DO ENSAIO DE HIDRÓLISE ÁCIDA



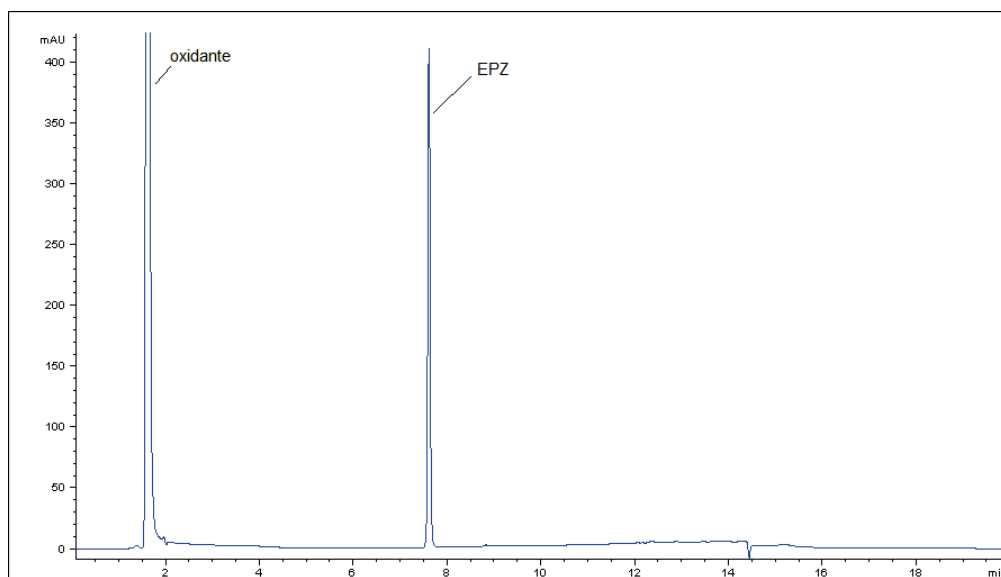
Nota: Coluna: XBridge C18 (150 x 4,6 mm, 5 μ m). Fase móvel: ácido fórmico 0,1%/acetonitrila 70:30 (v/v). Fluxo: 1 mL.min⁻¹. Detecção: 233 nm. Volume de injeção: 10 μ L. Temperatura do forno da coluna: 25 °C.

Fonte: O autor, 2018.

5.1.6 Oxidação

Uma amostra da solução de EPZ a 100 μ g.mL⁻¹ foi acondicionada com peróxido de hidrogênio a 2% em frasco de vidro e armazenado a temperatura de 25 °C por 72 h. Nos intervalos de 3, 6, 9, 12, 24, 48 e 72 h, uma alíquota foi retirada, diluída 1:1 (v/v) com fase móvel e analisada por CLAE-DAD. O mesmo protocolo foi seguido testando concentração de 5, 10, 20 e 30%. Desde o tempo zero, foi possível observar na amostra e no branco o sinal próximo a 1,5 min, referente ao agente oxidante (FIGURA 16). Ao final do ensaio foi possível concluir que não houve oxidação na condição testada, pois, apesar do aparecimento de um sinal próximo a 12,5 min, observado na (FIGURA 17) abaixo, a alteração na área referente ao pico da EPZ foi inferior à 5% e o mesmo sinal foi observado no branco (FIGURA 18).

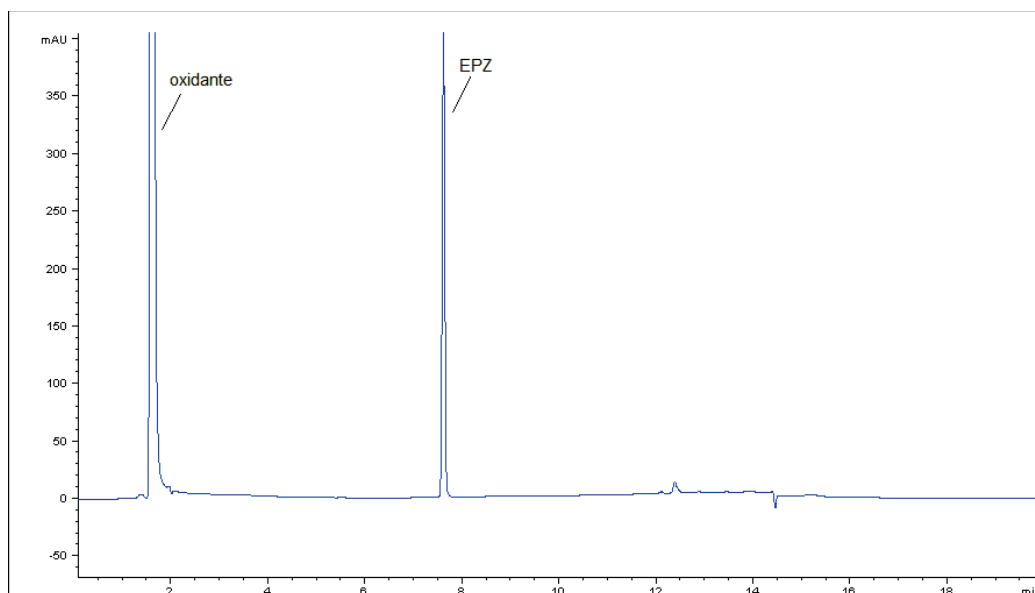
FIGURA 16 - CROMATOGRAMA REFERENTE AO TEMPO ZERO (H_2O_2 30%) DO ENSAIO DE OXIDAÇÃO



Nota: Coluna: XBridge C18 (150 x 4,6 mm, 5 μm). Fase móvel: ácido fórmico 0,1%/acetonitrila 70:30 (v/v). Fluxo: 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Detecção: 233 nm. Concentração de EPZ: 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Volume de injeção: 10 μL . Temperatura do forno da coluna: 25 $^{\circ}\text{C}$.

Fonte: O autor, 2018.

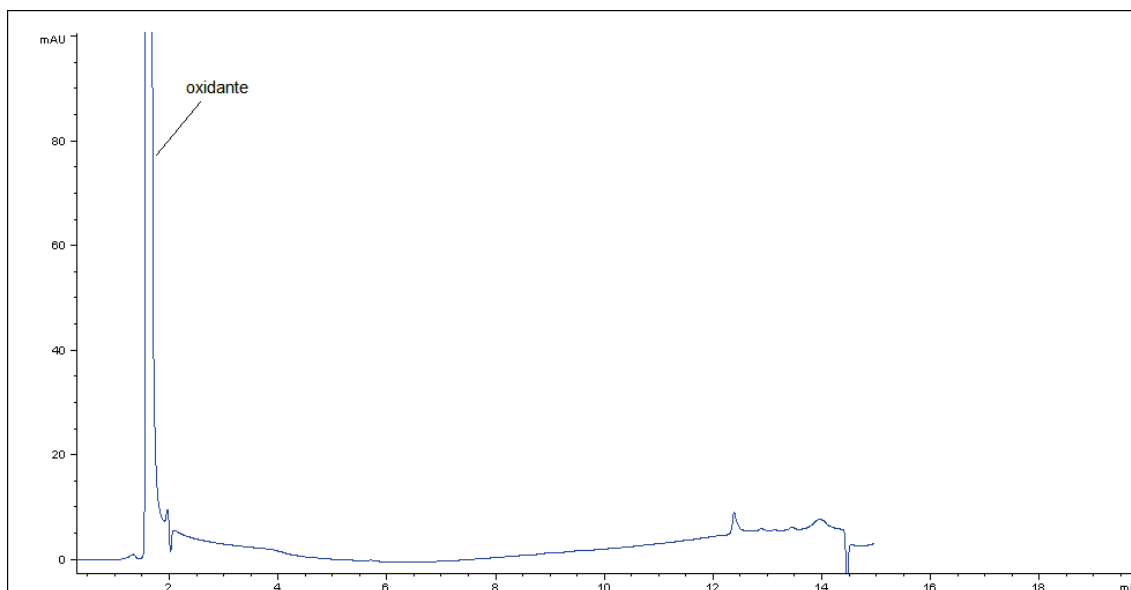
FIGURA 17 - CROMATOGRAMA REFERENTE AO TEMPO FINAL (72 H; H_2O_2 30%) DO ENSAIO DE OXIDAÇÃO



Nota: Coluna: XBridge C18 (150 x 4,6 mm, 5 μm). Fase móvel: ácido fórmico 0,1%/acetonitrila 70:30 (v/v). Fluxo: 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Detecção: 233 nm. Concentração de EPZ: 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Volume de injeção: 10 μL . Temperatura do forno da coluna: 25 $^{\circ}\text{C}$.

Fonte: O autor, 2018.

FIGURA 18 - CROMATOGRAMA REFERENTE AO BRANCO DO TEMPO FINAL (72 H; H₂O₂ 30%) DO ENSAIO DE OXIDAÇÃO



Nota: Coluna: XBridge C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm). Fase móvel: ácido fórmico 0,1%/acetonitrila 70:30 (v/v). Fluxo: 1 mL.min⁻¹. Detecção: 233 nm. Volume de injeção: 10 µL. Temperatura do forno da coluna: 25°C.

Fonte: O autor, 2018.

5.1.7 Conclusões do estudo

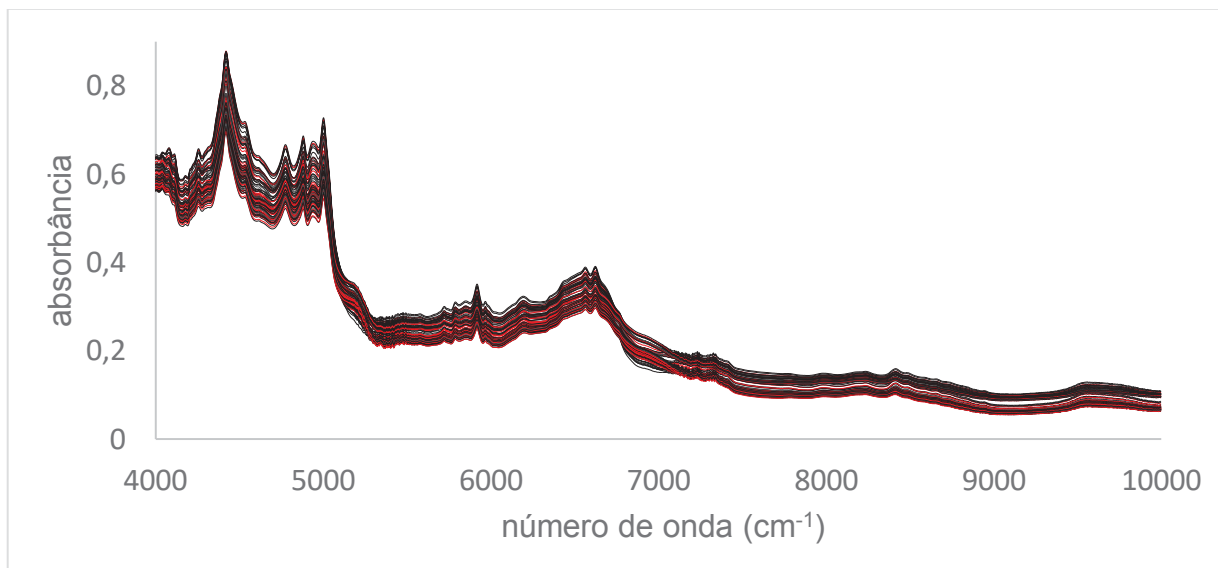
Este estudo foi realizado devido aos dados descritos anteriormente na literatura serem questionáveis com relação a protocolos de degradação inadequados, como o tempo de exposição ou concentração inadequada dos reagentes, ou ainda a interpretação inadequada dos resultados. Os ensaios demonstraram estabilidade desse insumo frente as condições testadas. A condução dos ensaios de degradação forçada de forma mais criteriosa permitiu chegar às mesmas conclusões. Os resultados não configuram a formação de produtos de degradação e não foram atingidos os níveis preconizados pela literatura (mínimo de 10% de decaimento da área do IFA). Sendo assim, não se justificou a validação de um novo método indicativo de estabilidade.

5.2 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO IV

5.2.1 Desenvolvimento do método

Os espectros na região do IVP das 83 amostras preparadas estão representados na (FIGURA 19), onde figuram em preto os espectros do conjunto de calibração e em vermelho os do conjunto de validação. Os dados espectrais foram tabulados para inserção no *software*, sendo os dados de número de onda e absorbância relacionados na matriz X (composta por 3111 números de ondas nas linhas e os valores de absorbância das 57 amostras nas colunas para o conjunto de calibração e 26 amostras nas colunas para o conjunto de validação) e os dados de concentração teórica de ambos os analitos na matriz Y (composta por concentração teórica dos analitos nas linhas e 57 amostras nas colunas para o conjunto de calibração e 26 amostras nas colunas para o conjunto de validação).

FIGURA 19 - ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO PRÓXIMO DAS AMOSTRAS DOS CONJUNTOS DE CALIBRAÇÃO (57 AMOSTRAS) E VALIDAÇÃO (26 AMOSTRAS) DA ASSOCIAÇÃO MET E EPZ



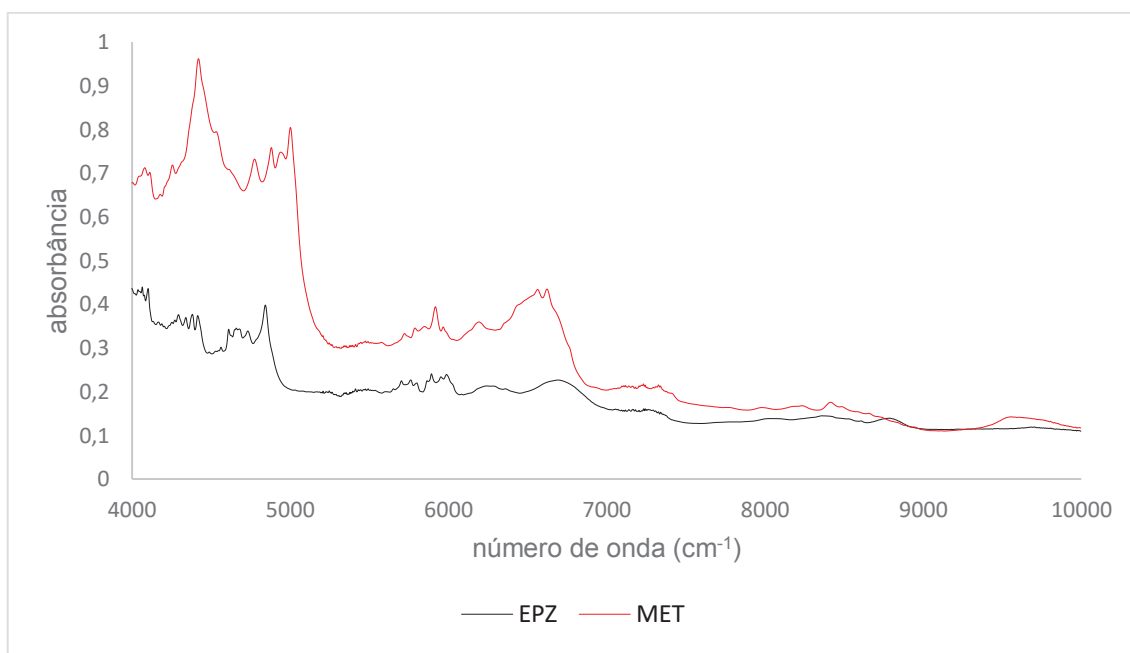
Nota: Os espectros foram adquiridos região de 10000 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 64 scans. A aquisição foi realizada sob temperatura ($20,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$) e umidade (45-55%) controlada. Amostras do conjunto de calibração em preto, validação em vermelho.

Fonte: O autor, 2018.

Diversos modelos PLS preliminares foram testados, indicando diferenças significativas entre os resultados de PLS1 e PLS2. Assim, PLS1 foi escolhido por apresentar melhores resultados de RMSEC, RMSECV, RMSEP e erro percentual médio de predição e também incidência menor de *outliers* para os modelos PLS1 em comparação com modelos PLS2.

As bandas características das amostras podem ser observadas através dos espectros de absorção dos padrões, na região do IVP, conforme (FIGURA 20).

FIGURA 20 - ESPECTROS DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO PRÓXIMO DOS PADRÕES DE MET E EPZ



Nota: Os espectros foram adquiridos região de 10000 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 64 *scans*. A aquisição foi realizada sob temperatura ($20,0 \pm 0,2$ °C) e umidade (45 – 55%) controlada.

Fonte: O autor, 2018.

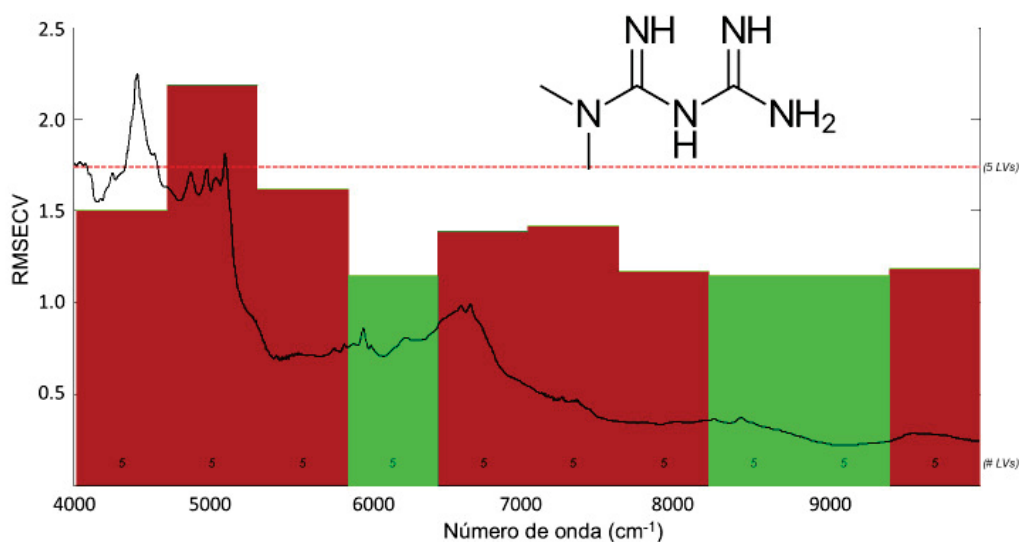
A análise destes espectros permite compreender a observação da dificuldade na utilização de modelos PLS2, devido à grande contribuição de MET na composição dos espectros das amostras (MET corresponde a mais de 60% da massa total, enquanto a proporção de EPZ é próxima a 2%), o que dificulta a percepção da influência de EPZ nos espectros. É relevante salientar que o teor

de MET é 40 vezes maior que o de EPZ nas formulações, o que configura uma dificuldade muito grande em quantificar os fármacos simultaneamente nessas amostras.

Nesse contexto, uma das vantagens da quimiometria foi demonstrada, sendo possível a construção de modelos de predição viáveis mesmo com a dificuldade evidenciada da natureza das amostras de apresentar concentrações tão distantes entre si. Foram construídos dois modelos separadamente utilizando então algoritmo PLS1, com combinações diferentes de pré-processamentos e intervalos espectrais para cada analito.

Para MET, o melhor pré-processamento foi centrar os dados na média para ambas matrizes X e Y. O modelo mais adequado considerou o intervalo espectral dos números de onda de 5800-6400 e 8200-9400 cm^{-1} , que incluem absorções específicas deste fármaco, conforme salientado na (FIGURA 21). As vibrações da molécula de MET referem-se às bandas de absorção, sobretudo dos grupamentos amino e imino (5924 cm^{-1}), e primeiro e segundo sobretudo da ligação do grupo CH_3 (8695 e 6024 cm^{-1}).

FIGURA 21 - INTERVALOS SELECIONADOS PARA OS MODELOS siPLS PARA MET



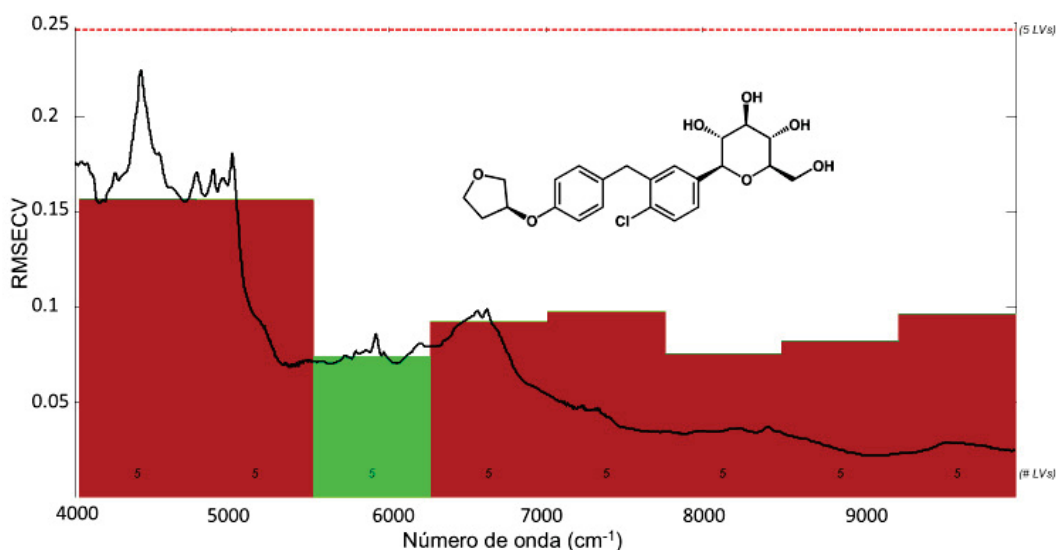
Nota: Os espectros foram adquiridos região de 10000 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 64 scans. A aquisição foi realizada sob temperatura ($20,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$) e umidade (45-55%) controlada.

Fonte: O autor, 2018.

O modelo PLS1 explicou 99,99% da variância para o bloco X e 93,91% para o bloco Y. Os valores de erro referente a calibração (RMSEC), validação cruzada (RMSECV) e predição (RMSEP) foram 2,54 mg%, 2,71 mg% e 2,29 mg%, respectivamente.

Para EPZ, o melhor modelo obtido foi pela combinação de MSC e dados centrado na média para o bloco X e centrar os dados na média para o bloco Y, considerando a faixa espectral de 5500 – 6300 cm^{-1} . A faixa espectral empregada abrange regiões de vibrações características da molécula de EPZ, como 5714 – 5880 cm^{-1} , referentes ao primeiro sobretom dos grupos CH_2 e CH e está demonstrada na (FIGURA 22).

FIGURA 22 - INTERVALOS SELECIONADOS PARA OS MODELOS iPLS PARA EPZ



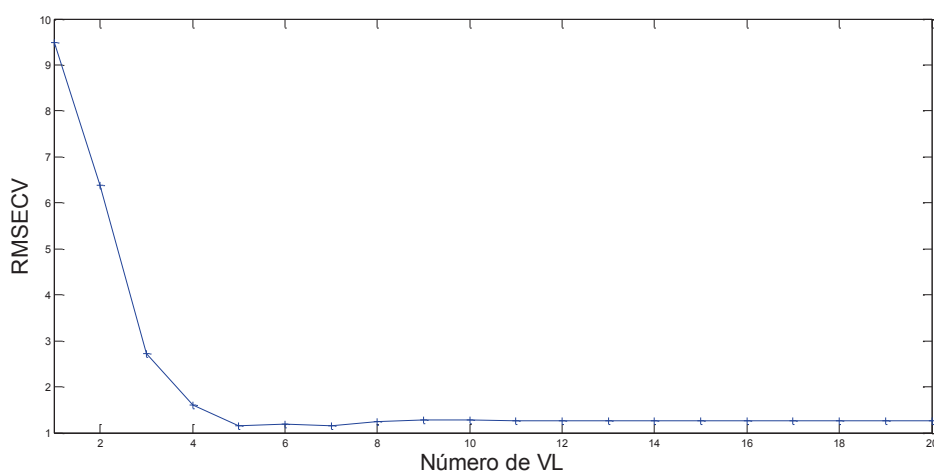
Nota: Os espectros foram adquiridos região de 10000 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 64 scans. A aquisição foi realizada sob temperatura ($20,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$) e umidade (45-55%) controlada.

Fonte: O autor, 2018.

O modelo PLS1 para quantificação de EPZ explicou 99,97% da variância total para o bloco X e 90,63% para o bloco Y. Os valores de erro referente a calibração (RMSEC), validação cruzada (RMSECV) e predição (RMSEP) foram 0,08 mg%, 0,09 mg% e 0,07 mg%, respectivamente.

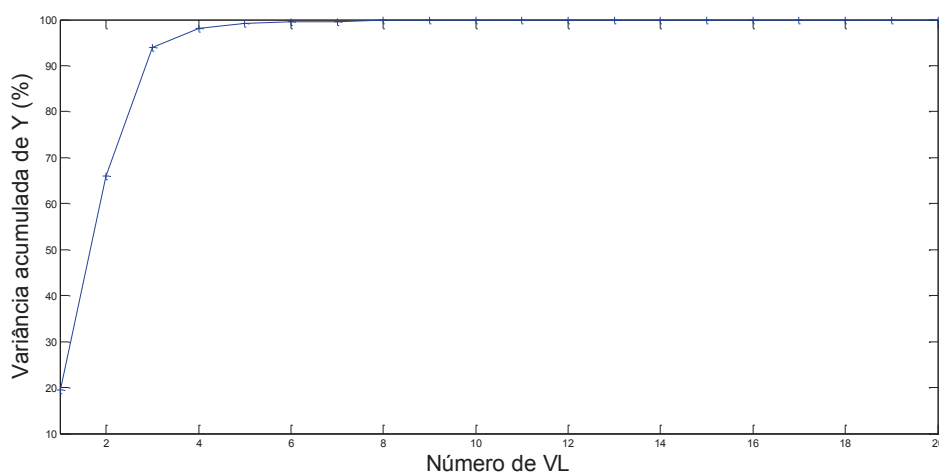
Considerando a determinação do número de VL a ser utilizado, os gráficos de RMSECV x VL (FIGURAS 23 e 25) para cada analito e os gráficos de porcentagem de explicação do bloco Y x VL (FIGURAS 24 e 26), para ambos os modelos foram analisados. Foram selecionados os números de VL igual a 3 para MET e 4 para EPZ, uma vez que, estes números de VL já foram capazes de fornecer mais de 90% de explicação da variância do bloco Y para ambos analitos.

FIGURA 23 - GRÁFICO DE RMSECV *VERSUS* VL DE MET



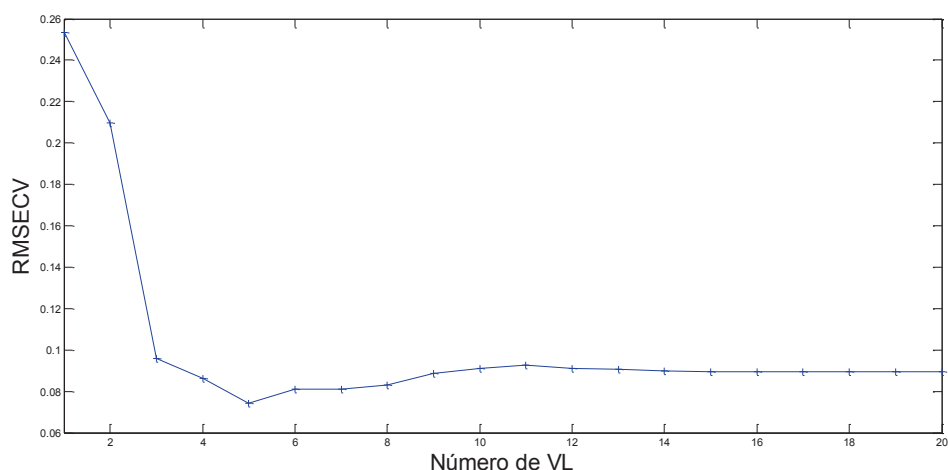
Fonte: O autor, 2018.

FIGURA 24 - GRÁFICO DE PORCENTAGEM DE EXPLICAÇÃO DO BLOCO Y *VERSUS* VL DE MET



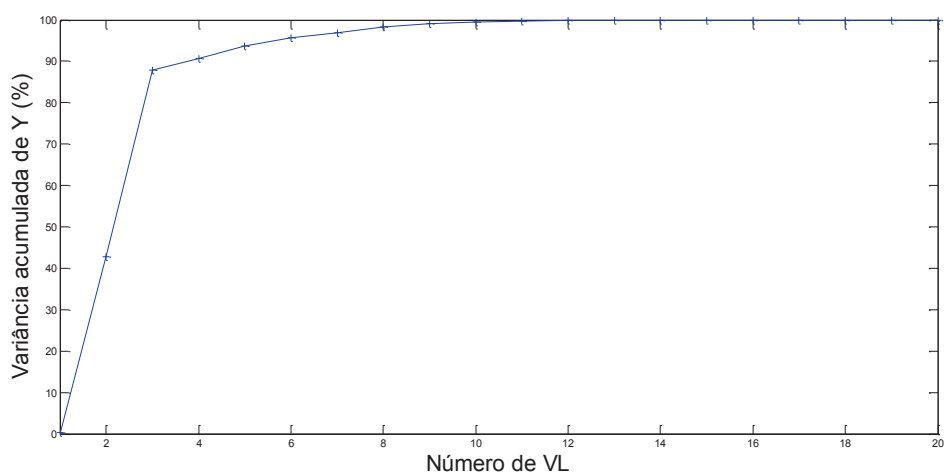
Fonte: O autor, 2018.

FIGURA 25 - GRÁFICO DE RMSECV *VERSUS* VL DE EPZ



Fonte: O autor, 2018.

FIGURA 26 - GRÁFICO DE PORCENTAGEM DE EXPLICAÇÃO DO BLOCO Y *VERSUS* VL DE EPZ

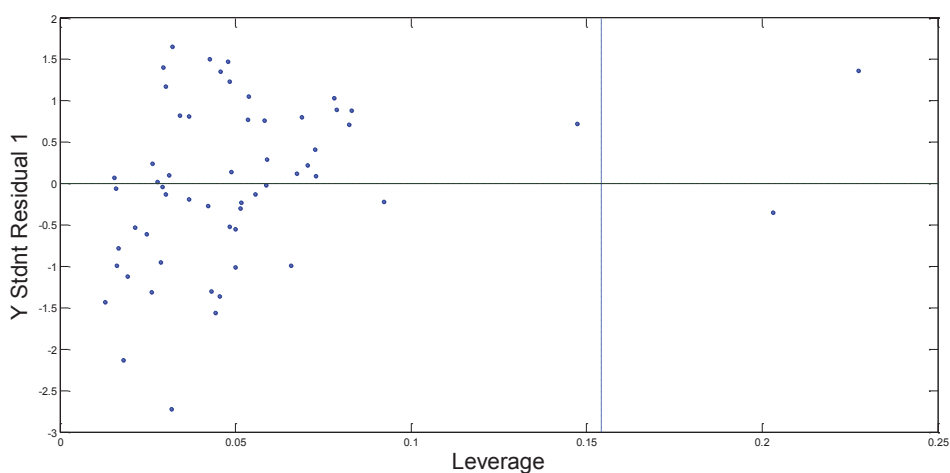


Fonte: O autor, 2018.

Não foi encontrada uma justificativa para utilizar um número maior de VL para ambos os fármacos, pois, mesmo tendo sido observada uma redução no valor de RMSECV com a inclusão de mais VL, o valor do erro predito aumentou nestes cenários, bem como foi observada a classificação de amostras que antes eram normais como anômalas. Em função do número mínimo recomendado de amostras de calibração e validação para modelos quantitativos multivariados no infravermelho, o número de VL foi mantido como 3 e 4 para MET e EPZ, respectivamente.

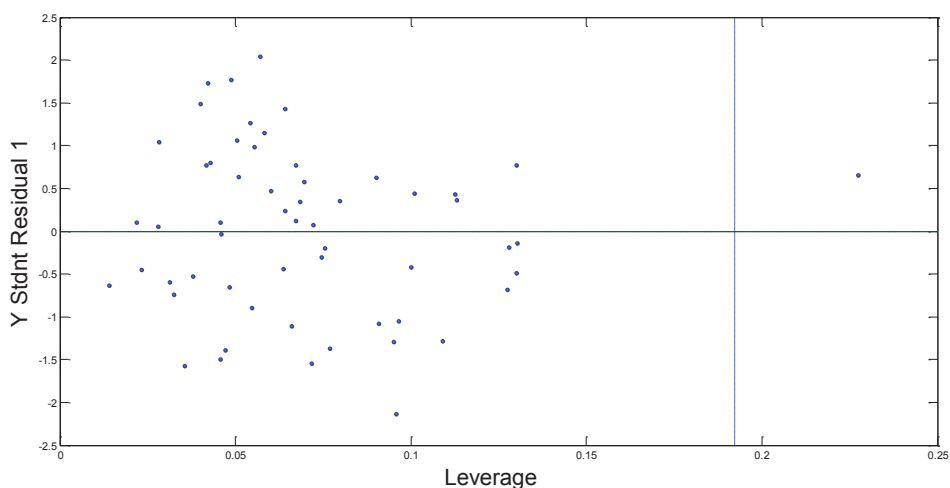
A análise dos *outliers*, considerando o critério para resíduos de Student e *leverage*, nos modelos da associação, demonstrou a ausência de amostras anômalas, uma vez que nenhuma delas apresentou simultaneamente valores acima dos critérios, ou seja, acima de $\pm 2,5$ para resíduos de Student e $3 \times (VL)/n^\circ$ de amostras para *leverage*, considerando um limite de confiança de 95% (FIGURAS 27 e 28).

FIGURA 27 - ANÁLISE DE *OUTLIERS* PARA MET



Fonte: O autor, 2018.

FIGURA 28 - ANÁLISE DE *OUTLIERS* PARA EPZ



Fonte: O autor, 2018.

5.2.2 Validação dos modelos

5.2.2.1 Precisão

Para os métodos de IVP-PLS1, os valores utilizados na avaliação da precisão dos modelos de predição para MET e EPZ estão descritos nas (TABELAS 2 e 3). Logo, em todas as amostras testadas, o valor de DPR foi menor que o limite de 5% escolhido. Isso satisfaz o critério para a repetibilidade e indica que os métodos apresentaram boa precisão intra-dia, sendo estes considerados precisos. Ainda, teste t para amostras independentes foi feito pela comparação entre os dois conjuntos de valores obtidos pelos analistas. Os valores de $t < t_{\text{tabelado}}$, somados aos valores reais de “p” encontrados (0,46 para MET e 0,13 para EPZ), superiores a 0,05, confirmaram a hipótese de não diferença entre as análises.

TABELA 2 - ENSAIO DE PRECISÃO PARA MET

		Dia 1	Dia 2
Valor predito em mg.100mg ⁻¹	Amostra 1	75,10	76,60
	Amostra 2	77,51	76,84
	Amostra 3	77,20	78,36
	Amostra 4	76,88	77,59
	Amostra 5	76,29	77,41
	Amostra 6	77,76	76,26
	Média	76,79	77,18
	DP	0,97	0,76
	DPR	1,27	0,99
	Valor de t	-0,80	
t_{tabelado}		2,57	

Nota: DP – desvio padrão. DPR – desvio padrão relativo. Intervalo de confiança do teste t – 95%.

Fonte: O autor, 2018.

TABELA 3 - ENSAIO DE PRECISÃO PARA EPZ

		Dia 1	Dia 2
Valor predito em mg.100mg ⁻¹	Amostra 1	1,88	1,94
	Amostra 2	1,79	1,97
	Amostra 3	1,88	2,03
	Amostra 4	1,90	1,99
	Amostra 5	1,95	1,89
	Amostra 6	1,95	1,93
	Média	1,89	1,96
DP		0,06	0,05
DPR		3,08	2,52
Valor de t		-1,79	
t_{tabelado}		2,57	

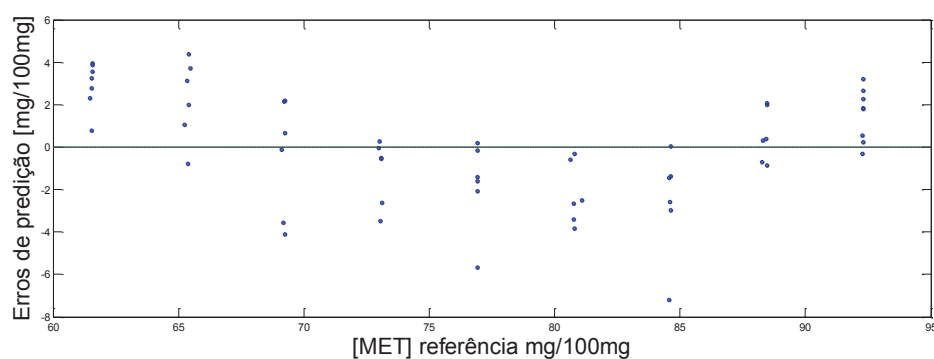
Nota: DP – desvio padrão. DPR – desvio padrão relativo. Intervalo de confiança do teste t – 95%.

Fonte: O autor, 2018.

5.2.2.2 Linearidade

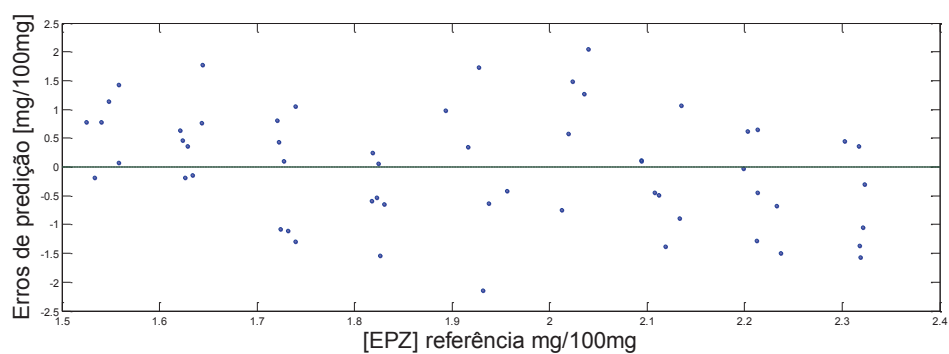
A linearidade foi avaliada através da verificação do comportamento aleatório da distribuição dos erros de predição para cada um dos analitos. Isso pode ser verificado nas (FIGURAS 29 e 30), nas quais os valores estão distribuídos de forma aleatória, podendo-se concluir que há linearidade nos modelos multivariados desenvolvidos.

FIGURA 29 - REPRESENTAÇÃO DA DISPERSÃO DOS ERROS DE PREDIÇÃO PARA MET



Fonte: O autor, 2018.

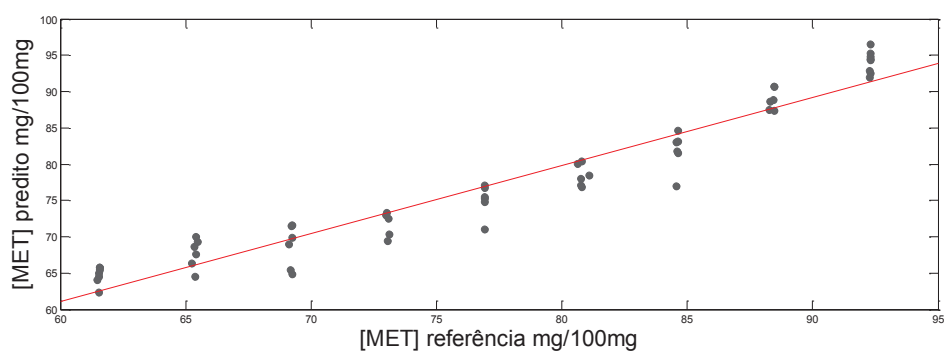
FIGURA 30 - REPRESENTAÇÃO DA DISPERSÃO DOS ERROS DE PREDIÇÃO PARA EPZ



Fonte: O autor, 2018.

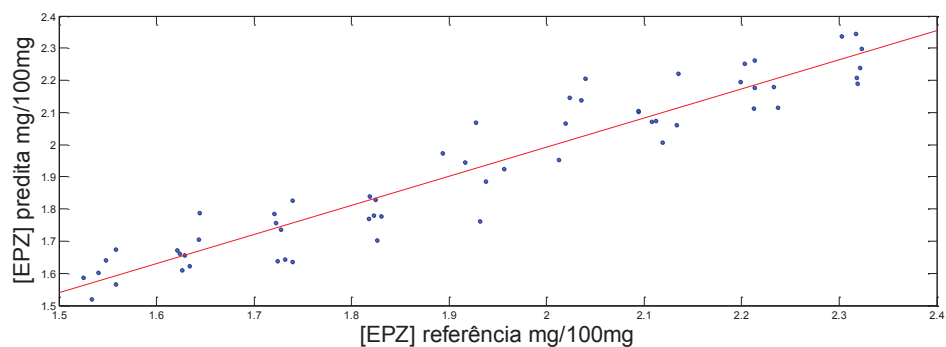
Os valores dos coeficientes de correlação encontrados na regressão foram $r = 0,96437$ para MET e $r = 0,9518$ para EPZ e a representação gráfica da linearidade de ambos modelos pode ser verificada nas (FIGURAS 31 e 32).

FIGURA 31 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA LINEARIDADE DE MET



Fonte: O autor, 2018.

FIGURA 32 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA LINEARIDADE DE EPZ



Fonte: O autor, 2018.

5.2.2.3 Seletividade, sensibilidade e sensibilidade analítica

A interpretação do conceito de SEL para métodos multivariados é diferente dos univariados e não tem interesse prático para fins de controle de qualidade. A determinação da SEL só é útil dentro de um determinado grupo de amostras de composição semelhante. Para os modelos desenvolvidos foram estimados que cerca de 9,44% e 4,50% do sinal analítico foram usados para prever MET e EPZ, respectivamente.

Como o valor puro da sensibilidade (SEN) não é apropriado para a comparação com outros métodos, os seus valores foram divididos pela estimativa do ruído instrumental ($IVP = 3,8 \times 10^{-4}$) e a sensibilidade analítica foi estimada. O ruído em todos os modelos também apresentou valores baixos, não comprometendo os resultados obtidos. O inverso da γ indica a mínima diferença de concentração que o método é capaz de discriminar, considerando o ruído instrumental aleatório como sendo a única fonte de erro. Os valores de γ^{-1} para MET e EPZ estão descritos na (TABELA 5, p. 102).

5.2.2.4 Exatidão

Para avaliar a exatidão do método, para quantificação dos fármacos nas associações, utilizou-se os valores de RMSEP, os quais foram considerados baixos para todos os modelos, indicando que estes são exatos (TABELA 5, p. 102).

5.2.2.5 Robustez

A robustez avaliou o acréscimo de amido e de celulose microcristalina na composição do excipiente utilizado para o preparo de amostras com concentração a 100% do teste. Os erros de predição das amostras estão descritos na (TABELA 5). Foi verificado que não houve diferença significativa nos valores de concentração estimados dos analitos nas duas misturas preparadas, indicando que os métodos foram robustos, em relação à variação na concentração de amido em +1% e +2%, e celulose em +1% e +2%. Como o excipiente já foi adquirido pronto, não foi possível avaliar a robustez

considerando redução da concentração de algum dos componentes do excipiente, apenas seu acréscimo.

5.2.2.6 *Bias*

O valor de *bias* foi estimado para as amostras de validação e a avaliação foi feita através de um teste t, com hipótese nula para $t < t_{\text{tabelado}}$. Considerando os valores de *bias* e o desvio associado, os valores de t obtidos foram inferiores ao valor tabelado para os dois modelos conforme verificado na (TABELA 4) e, assim, demonstrou-se ausência de erros sistemáticos nos modelos.

TABELA 4 - AVALIAÇÃO DO *BIAS* DOS MODELOS DE MET E EPZ

	<i>Bias</i>	Desvio	Teste t	t tabelado
MET	0,7136	8,81	1,02	2,06
EPZ	-0,0127	0,24	-1,01	2,06

Nota: Intervalo de confiança do teste t – 95%.

Fonte: o Autor, 2018.

5.2.2.7 Desvio padrão de previsão (*residual prediction deviation* - RPD)

O RPD mínimo para modelos IVP-PLS1 foi estimado com base nas equações anteriormente apresentadas, obtendo-se os valores para MET de 3,82 e 3,85, e para EPZ, de 2,94 e 3,44, para a previsão na calibração e validação, respectivamente.

A (TABELA 5) na página a seguir agrupa os resultados de validação já mencionados para os modelos PLS1 desenvolvidos neste trabalho.

TABELA 5 - PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO DOS MODELOS MULTIVARIADOS DE QUANTIFICAÇÃO DESENVOLVIDOS

(continua)			
Figura de mérito	Parâmetro	MET	EPZ
Precisão (DPR)	Repetibilidade	1,27%	3,08%
	Intermediária	0,99%	2,52%
Exatidão	RMSEC	2,54	0,08
	RMSECV	2,71	0,09

TABELA 6 - PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO DOS MODELOS MULTIVARIADOS DE QUANTIFICAÇÃO DESENVOLVIDOS

(conclusão)			
Figura de mérito	Parâmetro	MET	EPZ
Exatidão	RMSEP	2,23	0,07
Intervalo^a		61,48-92,30	1,53-2,31
Seletividade		9,44%	4,50%
Sensibilidade analítica (γ)		0,3675	0,0061
γ^{-1}		1ug.100mg ⁻¹	62,1ug.100mg ⁻¹
RPD	Calibração	3,82	2,94
	Validação	3,85	3,44
Bias		0,71	-0,01
Robustez (erro)	+1% amido	2,10%	2,25%
	+2% amido	-0,20%	0,67%
	+1% CMC	4,75%	0,85%
	+2% CMC	3,55%	1,63%

Nota: DPR – desvio padrão relativo. RDP – desvio padrão de previsão. Intervalo de confiança do teste t – 95%. ^aIntervalo expresso em mg.100mg⁻¹.

Fonte: O autor, 2018.

5.2.3 Comparação do método IV-PLS com técnica cromatográfica

A avaliação da qualidade do método analítico desenvolvido por espectroscopia de infravermelho inclui uma etapa de comparação estatística dos resultados para uma mesma amostra, obtidos utilizando tal metodologia e outra técnica cromatográfica já descrita na literatura. Esta etapa busca avaliar a hipótese de não-diferença entre os métodos analíticos, incutindo maior confiabilidade na utilização do novo método desenvolvido.

Conforme elencado no (QUADRO 3, p. 39), diversos métodos estão disponíveis para a determinação simultânea destes dois insumos em amostras de medicamentos. Contudo, a tentativa de reprodução destes se mostrou infrutífera. Por vezes, as condições descritas por estes métodos forneceram cromatogramas muito diferentes dos relatados na literatura. Em outros casos, os artigos trouxeram informações insuficientes para a reprodução metodológica,

impedindo o emprego destes protocolos e demonstrando assim a necessidade do desenvolvimento e validação de um método próprio, a fim de assegurar a possibilidade de comparação estatística dos resultados de determinação de teor por duas técnicas.

5.3 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO CLAE-EM/EM

5.3.1 Otimização dos parâmetros do espectrômetro e do cromatógrafo líquido

Os parâmetros foram estabelecidos por Dias (2018) e estão elencados no (QUADRO 8) a seguir.

QUADRO 8 - PARÂMETROS ESTABELECIDOS PARA A FONTE DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS

Parâmetros da fonte	Modo de ionização positivo
Gás de interface (CUR)	15 psi
Gás de colisão (CAD)	6 psi
Voltagem do capilar (IS)	5000 V
Gás de nebulização (GS1)	40 psi
Gás auxiliar (GS2)	40 psi
Temperatura da fonte (T)	450 °C

Fonte: O autor, 2018.

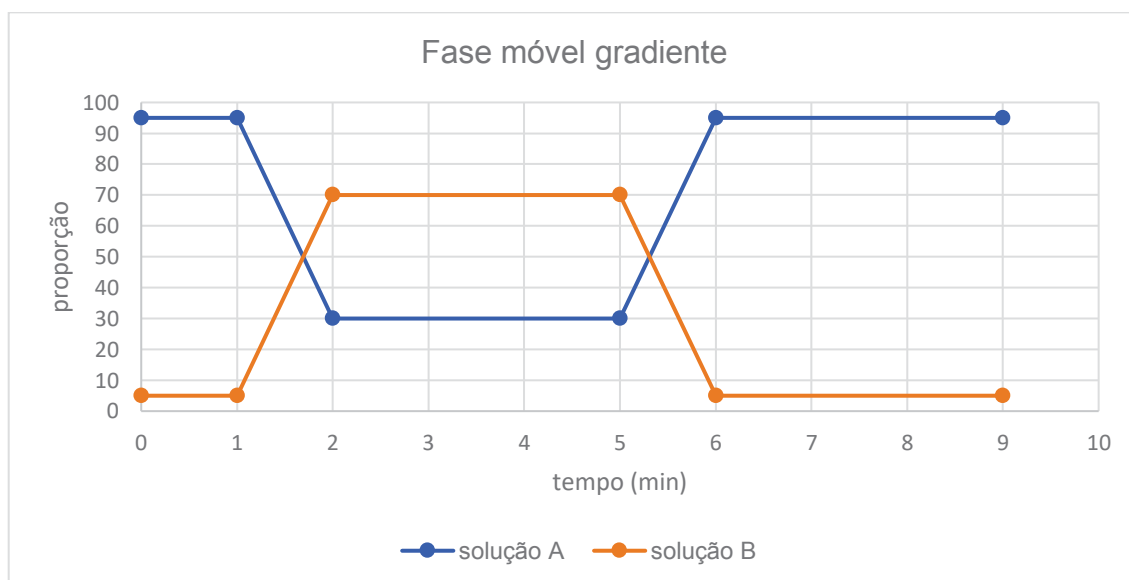
Para ambos os analitos, a melhor separação cromatográfica foi obtida utilizando os parâmetros elencados no (QUADRO 9) e o gradiente de fase móvel ilustrado na (FIGURA 33) na página a seguir:

QUADRO 9 - PARÂMETROS ESTABELECIDOS PARA O MÉTODO CLAE-EM/EM

Coluna	XBridge C18 (50 x 2,1 mm; 5 µm)
Constituição da fase móvel	Gradiente formado por fase A (água deionizada contendo 0,1% de ácido fórmico (v/v) e 0,1mM de formiato de amônio) e fase B (5% de água deionizada contendo 0,1% de ácido fórmico (v/v) e 0,1mM de formiato de amônio) e 95% de acetonitrila)
Fluxo	0,200 µL.min ⁻¹
Volume de injeção	20 µL
Temperatura da coluna	35 °C
Solução de limpeza do injetor automático	Água deionizada e metanol, ambos com 0,1% de ácido fórmico
Fonte de ionização	ESI, modo positivo de ionização
Aquisição dos dados	MRM com <i>dwel time</i> de 350ms

Fonte: O autor, 2018.

FIGURA 33 - REPRESENTAÇÃO DO GRADIENTE UTILIZADO NO MÉTODO CLAE-EM/EM

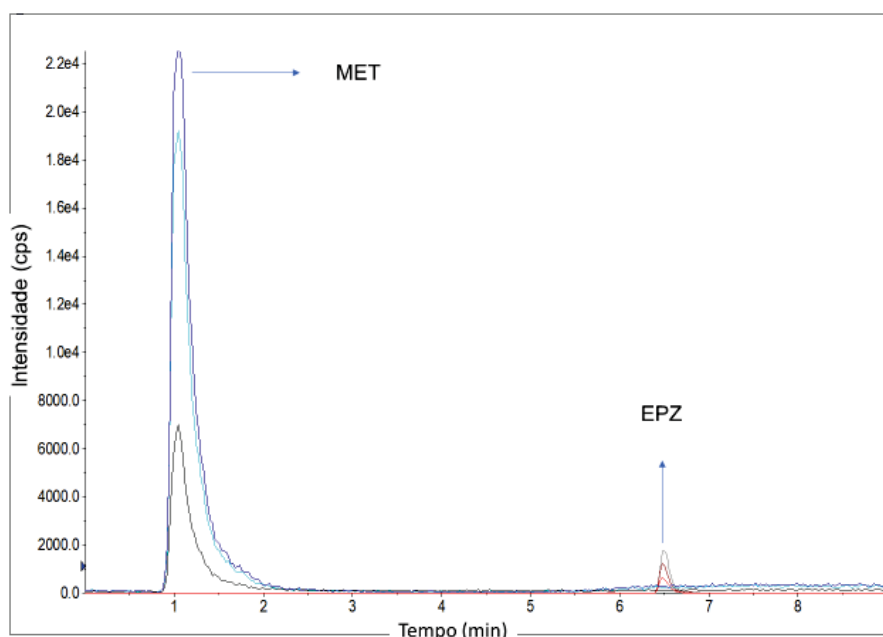


Nota: solução A: água contendo 0,1% de ácido fórmico (v/v) e formiato de amônio 1 mM;
Solução B: mistura de água:acetonitrila (5:95, v/v) contendo os mesmos aditivos da solução A.

Fonte: O autor, 2018.

O emprego destes parâmetros forneceu cromatogramas onde MET apresentou tempo de retenção próximo a 1 min e EPZ próximo a 6,5 min, como ilustrado a seguir, na (FIGURA 34). Seis transições foram monitoradas e são apresentadas no cromatograma a seguir: m/z 130,1 $\rightarrow$ 71,1 (íon de quantificação), 130,1 $\rightarrow$ 60,1 (íon de qualificação), 130,1 $\rightarrow$ 85,2 (íon de qualificação) para MET e m/z 468,0 $\rightarrow$ 451,1 (íon de quantificação), 468,0 $\rightarrow$ 71,0 (íon de qualificação), 468,0 $\rightarrow$ 354,9 (íon de qualificação) para EPZ.

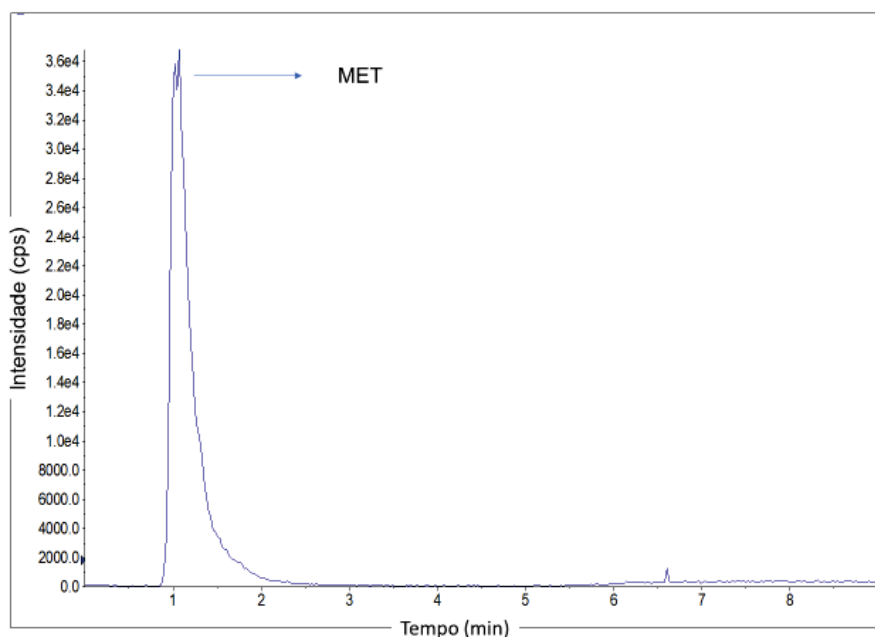
FIGURA 34 - CROMATOGRAMA OBTIDO DE AMOSTRA DE MET E EPZ



Nota: Analitos em solução, MET e EPZ a 50 ng mL⁻¹. Diluente: água/acetonitrila 50:50 (v/v). Coluna: XBridge C18 (2,1 X 50 mm, 5 µm), Fase móvel gradiente: A: água, B: acetonitrila:água (95:5, v/v) e ambos com formiato de amônio 1 mM e ácido fórmico 0,1 %. Fluxo: 0,2 mL.min⁻¹. Temperatura do forno da coluna: 35°C. Volume de injeção: 20 µL. Detector: EM/EM. Fonte: O autor (2018).

A partir da extração dos íons de quantificação (ou seja, apenas a apresentação da cromatografia referente ao monitoramento do íon de quantificação na imagem) é possível observar um cromatograma sem interferentes para ambos analitos, conforme observado na (FIGURA 35), referente ao sinal de MET e (FIGURA 36), referente ao sinal de EPZ.

FIGURA 35 - CROMATOGRAMA REFERENTE À TRANSIÇÃO DE QUANTIFICAÇÃO DE MET

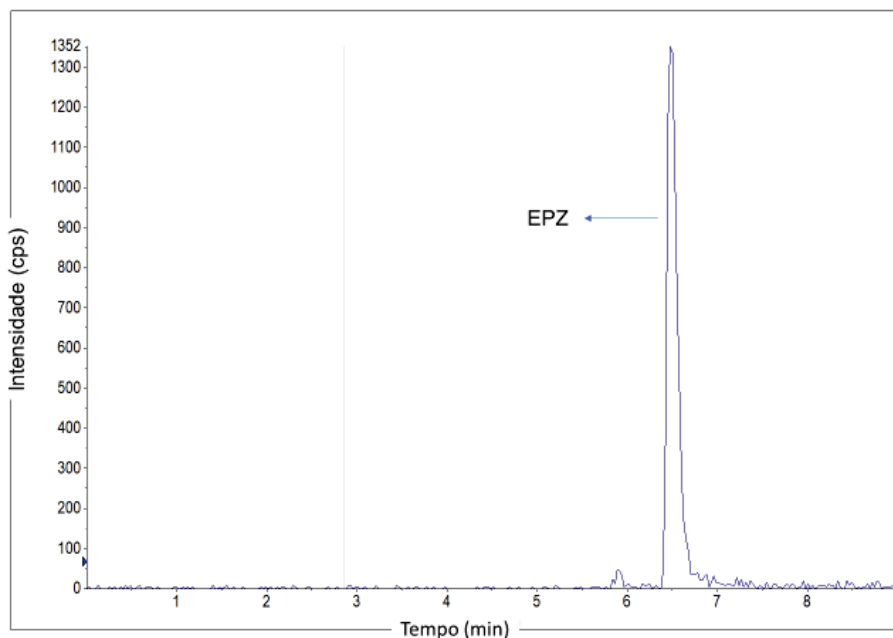


Nota: Analito em solução, MET a 50 ng ml^{-1} . Diluente: água/acetonitrila 50:50 (v/v). Coluna: XBridge C18 (2,1 X 50 mm, $5 \mu\text{m}$), Fase móvel gradiente: A: água, B: acetonitrila:água (95:5, v/v) e ambos com formiato de amônio 1 mM e ácido fórmico 0,1 %. Fluxo: $0,2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

Temperatura do forno da coluna: 35°C . Volume de injeção: $20 \mu\text{L}$. Detector: EM/EM.

Fonte: O autor (2018).

FIGURA 36 - CROMATOGRAMA REFERENTE À TRANSIÇÃO DE QUANTIFICAÇÃO DE EPZ



Nota: Analito em solução, EPZ a 50 ng ml^{-1} . Diluente: água/acetonitrila 50:50 (v/v). Coluna: XBridge C18 (2,1 X 50 mm, $5 \mu\text{m}$), Fase móvel gradiente: A: água, B: acetonitrila:água (95:5, v/v) e ambos com formiato de amônio 1 mM e ácido fórmico 0,1 %. Fluxo: $0,2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

Temperatura do forno da coluna: 35°C . Volume de injeção: $20 \mu\text{L}$. Detector: EM/EM.

Fonte: O autor (2018).

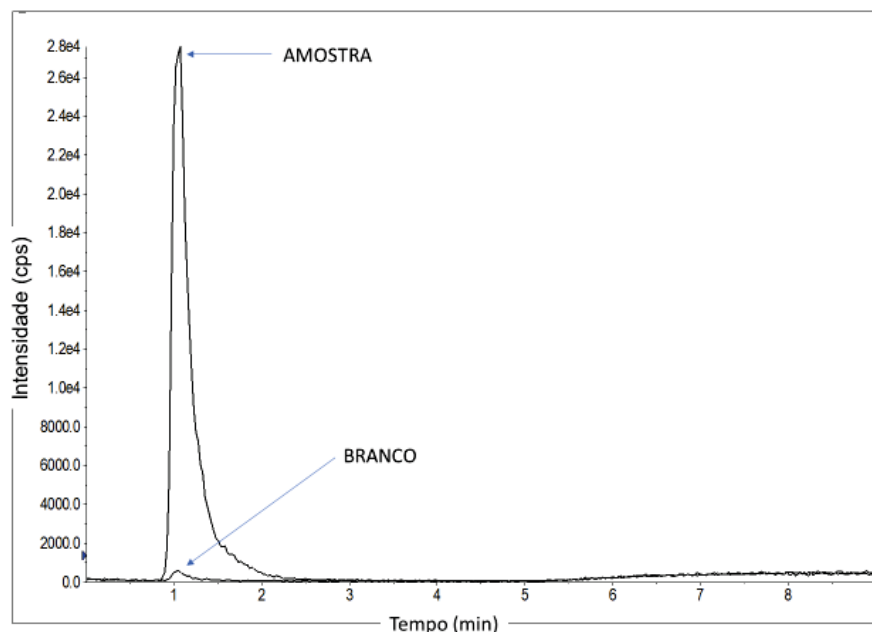
5.3.2 Validação do método

Considerando a diferença de concentração entre os analitos na formulação e a concentração final escolhida para a amostra de injeção de MET, tornou-se inviável quantificar a EPZ simultaneamente em uma única diluição, pois a concentração de EPZ seria muito baixa. Esta observação foi contornada utilizando-se uma diluição anterior da amostra extraída para o preparo da amostra de injeção para quantificar EPZ. Sendo assim, foi necessário validar separadamente o método para cada analito, uma vez que para a análise de MET, toda a fase eluída da coluna pôde ser enviada à fonte de ionização. Já no caso da análise de EPZ, foi necessário enviar parte da fase eluída (de zero até 2 min do tempo de eluição) para a válvula de descarte, pois a concentração de MET presente nesta amostra saturaria o detector, prejudicando o funcionamento do equipamento.

5.3.2.1 Seletividade

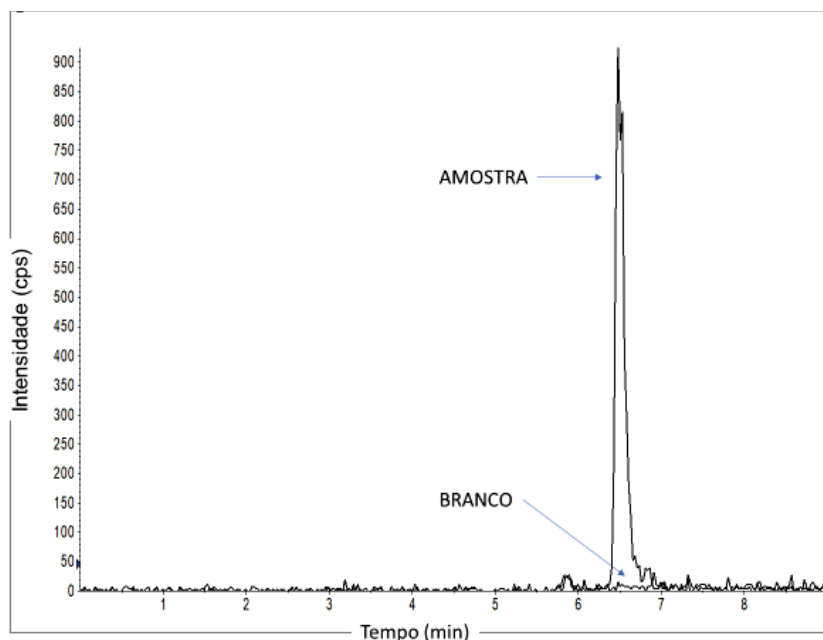
Como mostrado na (FIGURA 37), o método foi considerado seletivo, visto que a razão sinal/ruído para o sinal referente à MET na amostra da matriz foi inferior à 1, portanto não foi considerada significativa nesta amostra. Como apresentado na (FIGURA 38), picos interferentes presentes na matriz não foram encontrados no tempo de retenção de EPZ. Desta forma, a seletividade do método foi demonstrada.

FIGURA 37 - SOBREPOSIÇÃO DOS CROMATOGRAMAS REFERENTES À TRANSIÇÃO DE QUANTIFICAÇÃO NO BRANCO E NA AMOSTRA DE MET



Nota: Analito em solução, MET a 30 ng ml^{-1} . Diluente: água/acetonitrila 50:50 (v/v). Coluna: XBridge C18 (2,1 X 50 mm, $5 \mu\text{m}$), Fase móvel gradiente: A: água, B: acetonitrila:água (95:5, v/v) e ambos com formiato de amônio 1 mM e ácido fórmico 0,1 %. Fluxo: $0,2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Temperatura do forno da coluna: 35°C . Volume de injeção: $20 \mu\text{L}$. Detector: EM/EM.
Fonte: O autor (2018).

FIGURA 38 - SOBREPOSIÇÃO DOS CROMATOGRAMAS REFERENTES À TRANSIÇÃO DE QUANTIFICAÇÃO NO BRANCO E NA AMOSTRA DE EPZ

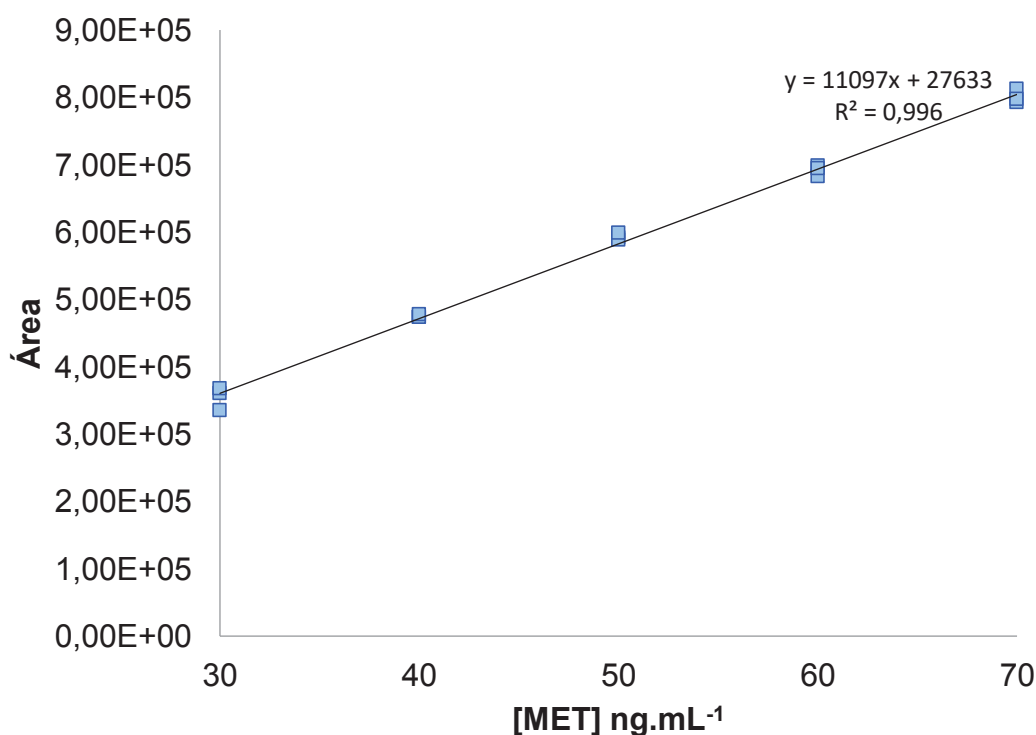


Nota: Analito em solução, EPZ a 30 ng ml^{-1} . Diluente: água/acetonitrila 50:50 (v/v). Coluna: XBridge C18 (2,1 X 50 mm, $5 \mu\text{m}$), Fase móvel gradiente: A: água, B: acetonitrila:água (95:5, v/v) e ambos com formiato de amônio 1 mM e ácido fórmico 0,1 %. Fluxo: $0,2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Temperatura do forno da coluna: 35°C . Volume de injeção: $20 \mu\text{L}$. Detector: EM/EM.
Fonte: O autor (2018).

5.3.2.2 Linearidade, intervalo de trabalho e efeito matriz

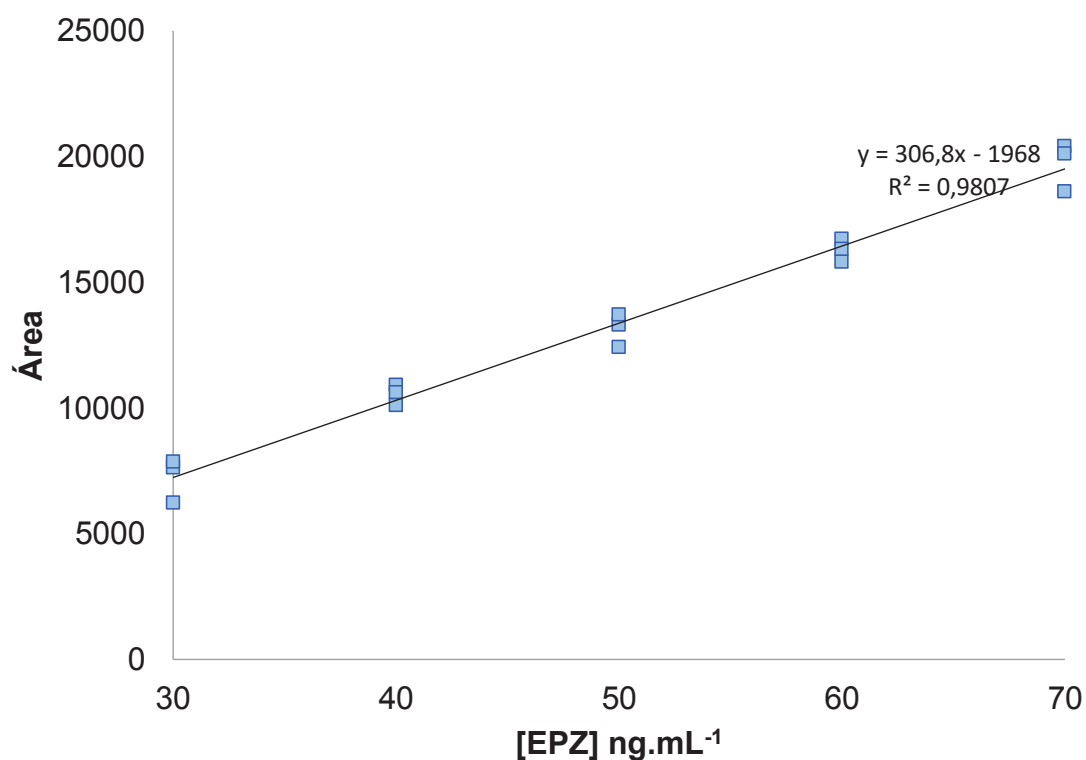
As curvas de calibração utilizadas na avaliação da linearidade foram construídas utilizando cinco níveis de concentração para cada analito, cada um em triplicata, a fim de confirmar a relação de proporcionalidade entre as áreas dos picos dos analitos *versus* concentrações destes. Os dados foram submetidos à análise de regressão linear, obtendo-se a equação da reta e coeficiente de correlação (FIGURAS 39 e 40). As curvas realizadas apresentaram coeficiente de correlação (r) maiores que 0,99, indicando uma boa correlação linear. Foi investigada ainda a homocedasticidade dos dados a partir do teste de Cochran e foram obtidos os valores de C : 0,575 para MET e 0,370 para EPZ. Ambos inferiores ao C crítico para este valor amostral (C_{crit} : 0,648) indicando a homocedasticidade dos dados.

FIGURA 39 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA LINEARIDADE DE MET



Fonte: O autor, 2018.

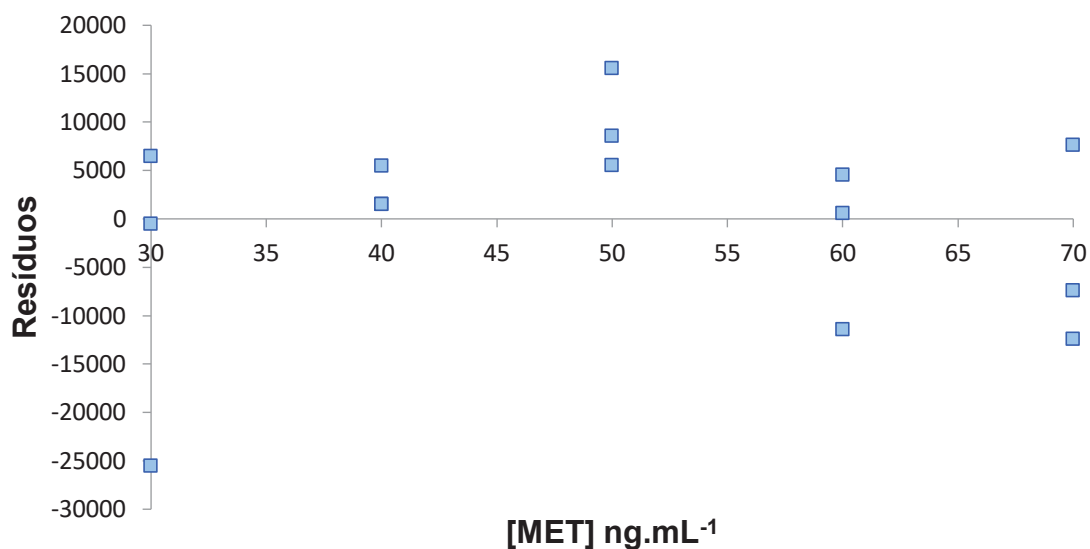
FIGURA 40 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA LINEARIDADE DE EPZ



Fonte: O autor, 2018.

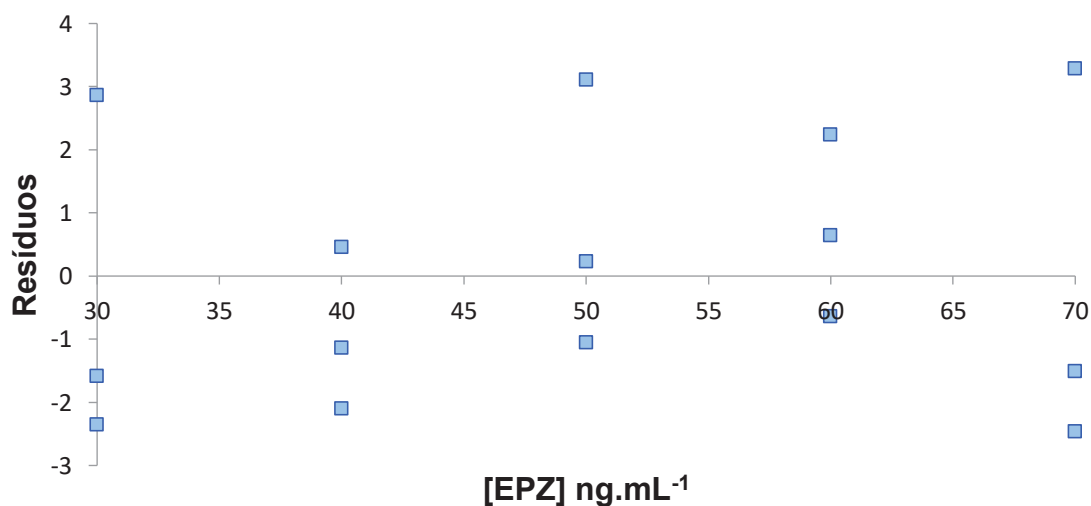
Pela avaliação dos gráficos dos resíduos (FIGURAS 41 e 42) nota-se que há um comportamento aleatório na distribuição dos pontos ao redor do eixo x, fato que evidencia a ausência de comportamento regular ou tendência.

FIGURA 41 - GRÁFICO DE RESÍDUOS DOS PONTOS DA CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA MET



Fonte: O autor, 2018.

FIGURA 42 - GRÁFICO DE RESÍDUOS DOS PONTOS DA CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA EPZ



Fonte: O autor, 2018.

O intervalo de trabalho compreendeu entre 80% a 120% da concentração de 50 ng.mL^{-1} .

O efeito matriz foi avaliado através da aplicação do mesmo procedimento para o preparo das curvas de calibração para o ensaio de linearidade, empregando o extrato do excipiente da forma farmacêutica como diluente dos

níveis e realizando a comparação dos coeficientes angulares das equações das retas.

O paralelismo das retas, indicado pelo valor de $p > 0,05$ no teste de paralelismo ($p = 0,13$ para MET e $p = 0,10$ para EPZ), indicou ausência de interferência dos componentes da matriz no parâmetro linearidade.

5.3.2.3 Precisão

A repetibilidade e a precisão intermediária foram avaliadas realizando-se seis análises de determinação para uma mesma amostra, a 100% da concentração, sendo que as análises da precisão intermediária foram executadas por um segundo analista em um intervalo de 2 dias. Conforme mostrado na (TABELA 6), na página a seguir, os DPR obtidos para as amostras analisadas foram $< 5\%$ tanto para MET quanto para EPZ. Além disso, obteve-se valor de $p > 0,05$ para ambos os analitos, indicando que as médias comparadas são estatisticamente equivalentes. O método foi considerado preciso e os desvios ficaram dentro dos limites no ensaio de repetibilidade e precisão intermediária. O valor de t obtido (0,32 para MET e 0,41 para EPZ) foi menor que o valor de t_{tabelado} (2,57) para esta amostra, corroborando com a precisão do método. Ainda, o teste F revelou que tanto para MET ($F = 0,71$) quanto para EPZ ($F = 1,49$), os valores foram inferiores ao $F_{\text{crítico}}$ (5,05).

TABELA 7 - AVALIAÇÃO DA PRECISÃO

Analito	Concentração nominal	Dia 1 (n=6)	Dia 2 (n=6)	Precisão intermediária
MET	50 ng.ml ⁻¹	50,37	50,97	(n=12)
		48,13	50,47	
		50,03	47,57	
		48,63	50,23	
		50,93	47,77	
	DPR	2,62	3,13	2,54
EPZ	50 ng.ml ⁻¹	48,60	50,53	(n=12)
		51,83	49,90	
		50,97	51,70	
		51,87	49,50	
		51,80	52,17	
	50,97	50,57		
DPR	2,46	2,02	2,17	

Nota: DPR – desvio padrão relativo. Intervalo de confiança utilizado no teste t – 95%.

Fonte: O autor, 2018.

5.3.2.4 Exatidão

O ensaio de exatidão avaliou a porcentagem recuperada dos IFA das amostras preparadas com 80, 100 e 120% destes componentes. Os valores de exatidão foram considerados satisfatórios com recuperação compreendidos entre 95 e 105%, como mostrado na (TABELA 7) e, portanto, o método desenvolvido foi considerado exato.

TABELA 8 - AVALIAÇÃO DA EXATIDÃO

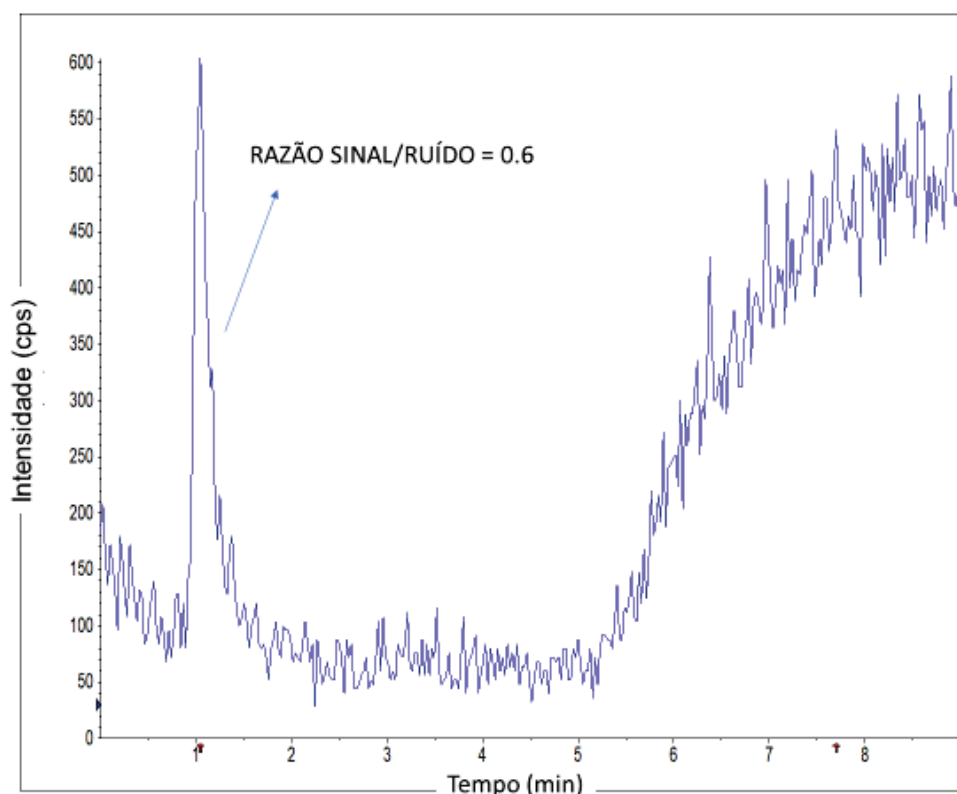
Analito	Concentração nominal		
	80% (40 ng.mL ⁻¹)	100% (50 ng.mL ⁻¹)	120% (60 ng.mL ⁻¹)
Porcentagem de recuperação			
MET	98,15	97,52	98,78
EPZ	99,65	97,92	98,2

Fonte: O autor, 2018.

5.3.2.5 Teste do efeito residual (*carryover*)

Como mostrado nas (FIGURAS 43 e 44) não houve *carryover* visto que a razão sinal/ruído para o sinal referente à MET não foi considerada significativa e o sinal referente à EPZ não foi evidenciado.

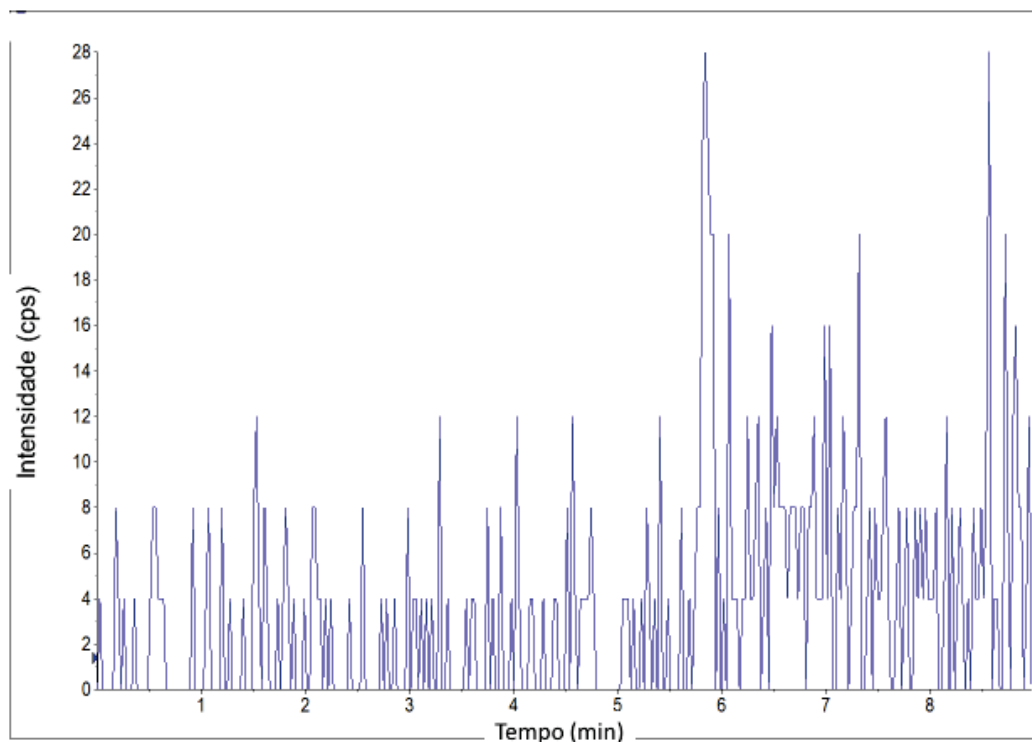
FIGURA 43 - CROMATOGRAMA REFERENTE À TRANSIÇÃO DE QUANTIFICAÇÃO DE MET NO BRANCO



Nota: Diluente: água/acetonitrila 50:50 (v/v). Coluna: XBridge C18 (2,1 X 50 mm, 5 µm), Fase móvel gradiente: A: água, B: acetonitrila:água (95:5, v/v) e ambos com formiato de amônio 1 mM e ácido fórmico 0,1 %. Fluxo: 0,2 mL.min⁻¹. Temperatura do forno da coluna: 35°C. Volume de injeção: 20 µL. Detector: EM/EM.

Fonte: O autor (2018).

FIGURA 44 - CROMATOGRAMA REFERENTE À TRANSIÇÃO DE QUANTIFICAÇÃO DE EPZ NO BRANCO



Nota: Diluente: água/acetonitrila 50:50 (v/v). Coluna: XBridge C18 (2,1 X 50 mm, 5 μ m), Fase móvel gradiente: A: água, B: acetonitrila:água (95:5, v/v) e ambos com formiato de amônio 1 mM e ácido fórmico 0,1 %. Fluxo: 0,2 mL.min⁻¹. Temperatura do forno da coluna: 35°C. Volume de injeção: 20 μ L. Detector: EM/EM.
Fonte: O autor (2018).

5.4 QUANTIFICAÇÃO DOS FÁRMACOS EM AMOSTRAS REAIS

Ao analisar custos e impactos gerados pela utilização de ambos métodos (IV e CLAE-EM/EM) na quantificação de uma amostra da associação farmacêutica, percebe-se que:

1. No preparo de amostra no método CLAE-EM/EM foram utilizados mais de 60 mL de solvente para uma única amostra, enquanto no método IV não foi utilizado nenhum solvente no preparo nem na análise das amostras.
2. Ainda sobre o preparo de amostra, a manipulação pelo analista é mínima no método IV, pois considera-se que a amostra integra deve ser apenas triturada, no caso de um comprimido (ou até mesmo já se encontra pronta para leitura, antes do processo de compressão, no caso de uma amostra

para controle de processo). Isso reduz a inserção de erros analíticos inerentes ao analista nesse método. Em contrapartida, o preparo de amostra no método CLAE-EM/EM conta com diversas etapas de diluição, transferência de líquidos e filtração, o que aumenta a inserção de erros analíticos.

3. No método CLAE-EM/EM utilizou-se em média 2 mL de fase móvel por amostra + o mesmo volume de solvente para limpeza do sistema de injeção, o que gerou resíduos químicos e acrescentou custos à cada análise. Foram utilizadas ponteiros, pipetas de microvolume e frascos *vial* e tampa, o que também encarece cada análise.
4. Antes de cada sequência de amostras, foi necessário equilibrar o sistema cromatográfico, o que requer um tempo longo e também o consumo de solvente.
5. Com relação ao tempo de análise, considerando apenas a corrida cromatográfica no método CLAE-EM/EM, cada amostra necessita de aproximadamente 10 min, para injeção, eluição e detecção. Se for incluído o tempo utilizado no preparo de amostra, esse total sobe para mais de 40 min por amostra. Já no método IV, o tempo de análise no aparato do espectrômetro é inferior à 1 min.
6. Ao final da análise, as amostras são perdidas no método CLAE-EM/EM, sendo gerados resíduos químicos, além de vidro, plástico e borracha. Já o método IV apresentou análises não-destrutivas e nem houve a geração de resíduos.

A partir da comparação de custos e tempo de análise e do impacto ambiental gerado pela utilização do método CLAE-EM/EM proposto para a análise dessa associação, é possível observar que o método IV apresenta-se bem mais vantajoso.

Com fins de comparação, dez amostras magistrais, com concentração teórica de 500 mg/dose de MET e 12,5 mg/dose de EPZ, foram analisadas por ambos métodos: o método desenvolvido por IVP-PLS1 e o método validado por CLAE-EM/EM, em triplicata. Os dados obtidos estão apresentados na (TABELA 8).

TABELA 9 - COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA DOS MÉTODOS IV E CLAE-EM/EM

	MET			EPZ	
	Amostras	IVP-PLS1	CLAE-EM/EM	IVP-PLS1	CLAE-EM/EM
Teor previsto^a	1	488,44	503,67	12,25	12,15
	2	504,25	504,67	11,66	12,96
	3	503,41	500,33	12,23	12,74
	4	504,32	486,33	12,49	12,97
	5	498,01	509,67	12,71	12,63
	6	505,80	481,33	12,69	12,48
	7	498,07	475,67	12,61	12,93
	8	499,60	502,33	12,81	12,38
	9	510,31	477,67	13,23	13,04
	10	506,60	508,67	13,02	12,64
Valor de t		1,32		-0,72	
t_{tabelado}		2,26		2,26	
Valor de p		0,22		0,49	

Nota: ^aForam realizados os cálculos de correção de teor para a amostra considerando o procedimento de diluição a fim de se comparar unidades iguais entre ambos métodos. Teor previsto expresso em mg.650mg⁻¹. Intervalo de confiança empregado no teste t – 95%. IVP-PLS1 – espectroscopia por infravermelho aliada à quimiometria. CLAE-EM/EM – cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial.

Fonte: O autor, 2018.

Os valores obtidos pelo teste t foram inferiores ao valor de t_{tabelado}, indicando que não houve diferenças estatísticas entre as previsões dos métodos desenvolvidos para IVP-PLS1 e CLAE-EM/EM, para ambos os analitos.

Portanto, considerando que os modelos IV foram adequadamente validados segundo as figuras de mérito elencadas anteriormente e que apresentaram dados de quantificação estatisticamente equivalentes aos do método CLAE-EM/EM utilizado, é possível concluir que o método IV proposto nesse trabalho pode ser utilizado para análise da associação de fármacos MET e EPZ.

6 CONCLUSÃO

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

- Nas condições de degradação testadas, EPZ apresentou-se estável.
- Os métodos desenvolvidos por algoritmo PLS e espectroscopia na região do IV próximo foram validados de acordo com orientações nacionais (ANVISA) e internacionais. A combinação de modelagem por algoritmo PLS e espectroscopia na região do infravermelho próximo permitiu a determinação simultânea dos fármacos MET e EPZ, em formulações de concentrações bastante distantes entre si, em forma farmacêutica sólida, demonstrando o potencial para a futura aceitação por agências reguladoras.
- Os modelos desenvolvidos e validados foram:
 - a) IVP-siPLS1 MET: pré-processamentos: dados centrados na média, 3 VL e intervalo espectral de 9400-8200 e 6400-5800 cm^{-1} ;
 - b) IVP-iPLS1 EPZ: pré-processamentos: MSC e dados centrado na média, 4 VL e faixa espectral de 6300-5500 cm^{-1} .
- O método CLAE-EM/EM desenvolvido neste trabalho mostrou-se adequado para a finalidade de quantificação dos analitos. Além disso, este método apresentou seletividade, linearidade, precisão e exatidão para os dois preparos das amostras, conforme critérios determinados com base nas legislações nacionais e internacionais vigentes.
- Em amostras magistrais, os métodos desenvolvidos na região do IVP-PLS1 forneceram resultados de quantificação estatisticamente não-diferentes do método cromatográfico validado.
- O método multivariado desenvolvido é simples, rápido, de baixo custo e uma excelente alternativa para o controle de qualidade em laboratórios de indústrias, bem como no controle de processo de fabricação, e para a análise fiscal em farmácias.

Cabe destacar a grande vantagem ecológica em função da utilização de métodos desenvolvidos para IV, visto que esta técnica não emprega solventes orgânicos, não gerando resíduos e apresentando análises mais rápidas que as de técnicas cromatográficas. Soma-se a estas vantagens o baixo custo do

equipamento, em comparação a um cromatógrafo ou espectrômetro de massas. Estes métodos ganham destaque na utilização em linhas de produção de indústrias farmacêuticas e também por laboratórios de controle de qualidade visto as vantagens para o meio ambiente e para as indústrias que os empregam.

REFERÊNCIAS

- ADA. American Diabetes Society. Standards of Medical Care in Diabetes. **Diab Care**, v. 38, n. 1, 2015.
- AHUJA, S. S. Assuring quality of drugs by monitoring impurities. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 59, n. 1, p. 3-11, 2007.
- ARAUJO, L. M. B.; BRITTO, M. M. S.; CRUZ, T. R. P.; Tratamento do Diabetes Mellitus do Tipo 2: Novas Opções. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 44, n. 6, 2000.
- ARSHAD, R. et al. Pattern of physical activity among persons with type 2 diabetes with special consideration to daily routine. **Pak J Med Sci**, v. 32, n. 1, p. 234-8, 2016.
- ASTM. **E1655-05: Standard Practices for Infrared Multivariate Quantitative Analysis**. ed. West Conshohocken, 2012.
- BARNETT, A. H. Linagliptin: a novel dipeptidyl peptidase 4 inhibitor with a unique place in therapy. **Adv Ther**, v. 28, n. 6, p. 447-59, 2011.
- BARTHUS, R. C.; MAZO, L. H.; POPPI, R. J. Aplicação de métodos de calibração multivariada para determinação simultânea de riboflavina (VB2), tiamina (VB), piridoxina (VB6) e nicotinamida (VPP). **Química Nova**, v. 30, n. 7, p.1638-1643, 2007.
- BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Validação de modelos de calibração multivariada: uma aplicação na determinação de pureza polimórfica de carbamazepina por espectroscopia no infravermelho próximo. **Química Nova**, v. 27, n., p.1004-1011, 2004.
- BRASIL. Lei nº 6.360 de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 24 set. 1976. p. 12647.
- BRASIL. Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, Cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, n. 18E, 27 jan. 1999a. Seção 1, p. 1.
- BRASIL. Lei nº 9.787, de 10 de fevereiro de 1999. Altera a Lei no 6.360, de 23 de setembro de 1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária, estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, n. 29E, 11 fev. 1999b. Seção 1, p. 1.

BRASIL. Anvisa. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, n. 104, 2 jun. 2003. Seção 1, p. 56-59.

BRASIL. Anvisa. Resolução RE nº 1 de 29 de julho de 2005. Determina o Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade – Revoga o disposto na Resolução RE nº 398 de 12 de novembro de 2004. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, n. 146, 1 ago. 2005. Seção 1, p. 119.

BRASIL. Anvisa. Resolução RDC nº 17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, n. 73, 19 abr. 2010. Seção 1, p. 94-110.

BRASIL. Anvisa. Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, n. 98, 22 mai. 2012. Seção 1, p. 93.

BRASIL. Anvisa. **Registro de medicamento – Jardiance**, 2014a. Disponível em: <http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/Consulta_Produto/rconsulta_produto_detalhe.asp>. Acesso em: 4 mai. 2016.

BRASIL. Anvisa. Resolução RDC nº 60, de 10 de outubro de 2014. Dispõe sobre os critérios para a concessão e renovação do registro de medicamentos com princípios ativos sintéticos e semissintéticos, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, n. 197, 13 out. 2014. Seção 1, p. 660.

BRASIL. Anvisa. Resolução RDC nº 53, de 4 de dezembro de 2015. Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, n. 233, 7 dez. 2015. Seção 1, p. 48-49.

BRASIL. Anvisa. Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, n. 141, 25 jul. 2017. Seção 1, p. 87-89.

BRERETON, R. G. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry. **The Analyst**, v. 125, p.2125-2154, 2000.

CARDOSO, M. H. W. M. et al. Validação de método para determinação de resíduos de agrotóxicos em tomate: uma experiência laboratorial. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v. 30, n. 1, 2010

CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de Sinalização da Insulina **Arq Bras Endocrinol Metab** v. 46, n. 4, p. 419-425, 2002.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos **Química Nova**, v. 31, n. 3, p.623-636, 2008.

ÇOLAK, T. K. et al. Association between the physical activity level and the quality of life of patients with type 2 diabetes mellitus. **J Phys Ther Sci**, v. 28, n. 1, p. 142-7, 2016.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. 1ª. ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006.

DEVINENI, D. et al. Single-dose Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Canagliflozin, a Selective Inhibitor of Sodium Glucose Cotransporter 2, in Healthy Indian Participants. **Clin Ther**, v. 38, n. 1, p. 89-98 e1, 2016.

DE ANDRADE, J.C.; CUSTODIO, R.: **ELEMENTOS DE ESPECTROSCOPIA**, 1996 – 2005. Disponível em: <http://chemkeys.com/en/>.

DOW, L. K. et al. The assessment of impurities for genotoxic potential and subsequent control in drug substance and drug product. **J Pharm Sci**, v. 102, n. 5, p. 1404-18, 2013.

EMA. European Medicines Agency. Jardiance, INN-Empagliflozin. Disponível em: <<http://www.ema.europa.eu/ema/>>. 2014.

FDA. Food and Drug Administration. **Drug approval package: Jardiance (empagliflozin) Tablets**, 2014. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2014/204629Orig1s000Ap prov.pdf>. Acesso em: 04/05/2016.

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

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**, 2012.

FEUDALE, R. N. et al. Transfer of multivariate calibration models: a review. **Chemometr. Intell. Lab. Syst.**, v. 64, n. 2, p. 181-192, 2002.

FRANCESQUETT, J. Z. *et al.* Modelos de regressão multivariada empregando seleção de intervalos para a quantificação do biodiesel em blendas biodiesel/diesel. **Tecno-Logica**, v. 14, n. 2, p.87-92, 2010.

GABRIELSSON, J.; LINDBERG, N.; LUNDSTEDT, T. Multivariate methods in pharmaceutical applications. **J Chemometrics**, v. 16, p.141-160, 2002.

GIL, E. S.; BATISTA FILHO, R. O. P. Validação de Processos. In: GIL, E. S. (Ed.). **Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos**. 2. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2007. p. 47-52.

GLISH, G. L.; VACHET, R. W. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. **Nat Rev Drug Discov**, v. 2, n. 2, p.140-50, 2003.

GOROG, S. Drug safety, drug quality, drug analysis. **J Pharm Biomed Anal**, v. 48, n. 2, p. 247-53, 2008.

GREMLER, R. et al. Empagliflozin, a novel selective sodium glucose cotransporter-2 (SGLT-2) inhibitor: characterisation and comparison with other SGLT-2 inhibitors. **Diabetes Obes Metab**, v. 14, n. 1, p. 83-90, 2012.

HATTERSLEY, A. T.; THORENS, B. Type 2 Diabetes, SGLT2 Inhibitors, and Glucose Secretion. **N Engl J Med**, v. 373, n. 10, p. 974-6, 2015.

ICH. Validation of analytical procedures: text and methodology. **INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE**, v. 1, n. 1, p. 1-17, 2005.

IDF. International Diabetes Federation. **IDF DIABETES ATLAS** 8th Edition. Disponível em: <www.diabetesatlas.org>. 2017.

LEE, B. et al. Pharmacokinetic, pharmacodynamic, and efficacy profiles of alogliptin, a novel inhibitor of dipeptidyl peptidase-4, in rats, dogs, and monkeys. **Eur J Pharmacol**, v. 589, n. 1-3, p. 306-14, 2008.

KORFMACHER, W. A. Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. **Drug Discov Today**, v. 10, n. 20, p.1357-67, 2005.

LIANG, X.; GIACOMINI K. M. Transporters involved in Metformin Pharmacokinetics and Treatment Response. **J Pharm Sci**, v. 106, n. 1, p. 2245-2250, 2017.

LIM, C. K.; LORD, G. Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis. **Biol Pharm Bull**, v. 25, n. 5, p.547-57, 2002.

LIMA, K. M. G. et al. Sensores ópticos com detecção no infravermelho próximo e médio. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p.1635-1643, 2009.

MORETTIN, P. A.; BUSSAB, W. O. **ESTATÍSTICA BÁSICA**. 6^a ed. São Paulo: Ed. Saraiva, 2010.

NATHAN, D. M. et al. Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. **Diabetes Care**, v. 32, n. 1, p.193-203, 2009.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 anos de Quimiometria no Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p.1401-1406, 2006.

OBERMEIER, M. et al. In vitro characterization and pharmacokinetics of dapagliflozin (BMS-512148), a potent sodium-glucose cotransporter type II inhibitor, in animals and humans. **Drug Metab Dispos**, v. 38, n. 3, p. 405-14, 2010.

OLIVIERI, A. C. *et al.* Uncertainty estimation and figures of merit for multivariate calibration. **Pure and Applied Chemistry**, v. 78, n. 3, p.633-661, 2003.

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.

PEREIRA, A. D. S. *et al.* Desafios da química analítica frente às necessidades da indústria farmacêutica. **Química Nova**, v. 28, n., p.S107-S111, 2005.

PÖLLANEN, K., HAKKINEN, A., HUHTANEN, M., REINIKAINEN, S., KARJALAINEN, M., RANTANEN, J., LOUHI-KULTANEN, M., NYSTROM, L. DRIFT-IR for quantitative characterization of polymorphic composition of sulphathiazole. **Anal Chim. Acta** 544, 108-117, 2005.

POWLEY, M. W. (Q)SAR assessments of potentially mutagenic impurities: a regulatory perspective on the utility of expert knowledge and data submission. **Regul Toxicol Pharmacol**, v. 71, n. 2, p. 295-300, 2015.

RAIMUNDO JR., I. M.; PASQUINI, C. Espectrofotometria multicanal e arranjos de fotodiodos. **Química nova**, v. 20, n. 1, 1997.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n., p.771-780, 2004.

RINNAN, A.; VAN DEN BERG, F.; ENGELSEN, S. B. Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 10, p.1201-1222, 2009.

RYDEN, L. et al. Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases: executive summary. The Task Force on Diabetes and Cardiovascular Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for the Study of Diabetes (EASD). **Eur Heart J**, v. 28, n. 1, p. 88-136, 2007.

SALAS-SALVADO, J. et al. Protective Effects of the Mediterranean Diet on Type 2 Diabetes and Metabolic Syndrome. **J Nutr**, 2016.

SARASHINA, A. et al. Safety, Tolerability, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Single Doses of Empagliflozin, a Sodium Glucose Cotransporter 2 (SGLT2) Inhibitor, in Healthy Japanese Subjects. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 28, n. 3, p. 213-219, 2013.

SBD. Sociedade Brasileira de Diabetes. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2014-2015**. [organização José Egidio Paulo de Oliveira, Sérgio Vencio]. São Paulo, SP: AC Farmacêutica, 2015.

SENA, M. M. *et al.* Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise de solos. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p.547-556, 2000.

SENA, M. M. *et al.* Direct determination of diclofenac in pharmaceutical formulations containing B vitamins by using UV spectrophotometry and partial least squares regression. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, n. 4, p.743-749, 2004.

SENA, M. M. *et al.* Determinação espectrofotométrica simultânea de paracetamol e ibuprofeno em formulações farmacêuticas usando calibração multivariada. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p.75-79, 2007.

SILVA, K. E. R. *et al.* Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 30, n. 2, p. 129-135, 2009a.

SILVA, F. E. B. *et al.* Simultaneous determination of sulphamethoxazole and trimethoprim in powder mixtures by attenuated total reflection-Fourier transform infrared and multivariate calibration. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, n. 3, p.800-805, 2009b.

SILVA, M. A. M. *et al.* Development and analytical validation of a multivariate calibration method for determination of amoxicillin in suspension formulations by near infrared spectroscopy. **Talanta**, v. 89, n., p.342-351, 2012.

SKOOG, D. A. *et al.* **Fundamentals of Analytical Chemistry**. 9^a ed. Belmont: Brooks/Cole, 2014.

SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I. **Química Nova**, v. 35, n., p.223-229, 2012.

STERNLICHT, H.; BAKRIS, G. L. Hypertension: SGLT2 inhibitors: not just another glucose-lowering agent. **Nat Rev Nephrol**, v. 12, n. 3, p. 128-9, 2016.

STUART, B. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**. 1. ed: John Wiley & Sons, Ltd, 2004.

TAHRANI, A. A. *et al.* Management of type 2 diabetes: new and future developments in treatment. **The Lancet**, v. 378, n. 9786, p. 182-197, 2011.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p.338-350, 2006.

USP. **The United States Pharmacopoeia**. 40. ed: Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2017.

VALDERRAMA, P. **Avaliação de figuras de mérito em calibração multivariada na determinação de parâmetros de controle de qualidade em indústria alcooleira por espectroscopia no infravermelho próximo**. 135 f. - Departamento de Química Analítica, Unicamp, Campinas, 2005.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Variable Selection, Outlier Detection, and Figures of Merit Estimation in a Partial Least-Squares Regression Multivariate Calibration Model. A Case Study for the Determination of Quality Parameters in the Alcohol Industry by Near-Infrared Spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 21, p.8331-8338, 2007.

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

VALENTINI S. R., SOMMER W. A., MATIOLI G. Validação de métodos analíticos. **Arq Mudi.**, v. 11, n. 2, p. 26-31, 2007.

VESSMAN, J. *et al.* Selectivity in analytical chemistry (IUPAC Recommendations 2001). **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 8, p.1381–1386, 2001.

WORKMAN JR, J.; WORKMAN, J. Practices for Data Preprocessing for Optical Spectrophotometry. In: (Ed.). **The Handbook of Organic Compounds**. Burlington: Academic Press, 2001. p. 295-300.