UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**VALIDAÇÃO DE TÉCNICAS ESPECTROFOTOMÉTRICAS
APLICADAS AO CONTROLE DE QUALIDADE DO DICLOFENACO
SÓDICO E GLIMEPIRIDA EM MEDICAMENTOS**

Regina Celli Espires Carrion

Tese para obtenção do grau de

DOUTOR

Orientador:

Prof. Titular João Fernandes Magalhães

São Paulo

2004

DEDALUS - Acervo - CQ

30100010406

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Espíres-Carrion, Regina Celli

E77v Validação de técnicas espectrofotométricas aplicadas
ao controle de qualidade do diclofenaco sódico e glimepirida
em medicamentos / Regina Celli Espíres-Carrion. -- São
Paulo, 2004.
254p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Magalhães, João Fernandes

1. Análise de medicamentos 2. Medicamento : Controle de
qualidade 3. Fármaco : Controle de qualidade 4. Espectrofotometria :
Análise de drogas I. T. II. Magalhães, João Fernandes, orientador.

615.19015 CDD

Regina Celli Espires Carrion

Validação de técnicas espectrofotométricas aplicadas ao controle de
qualidade de diclofenaco sódico e glimepirida em medicamentos

Comissão Julgadora da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Titular João Fernandes Magalhães
orientador / presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, __ de ____ de ____.

*"O Senhor Nosso Deus nos segura pela mão e diz: Não temas, Eu te
ajudo"*

Isaias 41:13

Ao meu esposo Luiz Fernando,

“Melhor é serem dois que um, porque se um cair o outro levanta. Também, se dois dormirem juntos eles se esquentarão; mas um só como se esquentará? E se alguém quiser prevalecer contra um, os dois lhe resistirão; e o cordão de três dobras não se quebra tão depressa”.

Eclesiastes 4:9-12

Ao meu filho Bernardo,

“Herança do Senhor são os filhos ; o fruto do ventre , grande recompensa dada por Ele”.

Salmo 127:3

Aos meus pais Oswaldo e Milena,

*“Filhos, obedecei a vossos pais no Senhor, pois isto é justo.
Honra teu pai e tua mãe para que te vá bem, e sejas de longa vida sobre a
terra”*

Efésios 6: 1-3

Ao Prof.º João F. Magalhães

*"Bons professores possuem metodologia,
professores fascinantes possuem sensibilidade;*

*Bons professores educam a inteligência lógica,
professores fascinantes educam a emoção;*

*Bons professores usam a memória como depósito de informações,
professores fascinantes usam-na como suporte da arte de pensar;*

*Bons professores são mestres temporários,
professores fascinantes são mestres inesquecíveis;*

*Bons professores educam para uma profissão,
professores fascinantes educam para a vida"*

Augusto Cury

AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior ,
À Universidade Estadual de Maringá;
Aos Laboratórios Hexal do Brasil e Eurofarma.

“Deus não espera que saibamos tudo!! (Isso não é um alívio?)”.
É por isto que Ele nos cerca de pessoas que possuem uma grande variedade de
aptidões, talentos, percepções e capacidade excepcionais”.

Norm Wakefield

A estas pessoas especiais meu respeito e gratidão:

Profª. Dra. Érika R.M. Kedor-Hachmann,
Profª. Dr. Anil Kumar Singh,
Profª. Dr. Jorge Luiz S. Martins,
Profª. Dr. José de Jesus R. Gomes de Pinho,
Profª. Dra. Akimi Mori Honda,
Profª. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião,
Profª. Dra. Claudenice Francisca P. Sartor,
Adriana de Almeida Barreiro,
Carlos Eduardo Lessa Aleixo,
Bruno Henrique Espires Martin,
Nájla Kassab,
Ixis Taymes Hidalgo,
Iria R. da Silva,
Regina M. Rojas,
Elizabeth Claro Paiva,
Benedita E. Santo de Oliveira, Jorge Lima e Elaine Michico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
3. REVISÃO DA LITERATURA	6
3.1 – Generalidades sobre anti-inflamatórios não-esteróides e diclofenaco.....	6
3.1.1 - Propriedades físico-químicas.....	7
3.1.2 - Propriedades farmacológicas	8
3.2 – Generalidades sobre diabetes mellitus, sulfoniluréias e glimepirida.....	11
3.2.1 - Propriedades físico-químicas.....	24
3.2.2 - Propriedades farmacológicas	24
3.3 – Metodologia analítica para diclofenaco sódico.....	28
3.3.1 - Métodos espectrofotométricos	29
3.3.2 - Outros métodos analíticos.....	37
3.4 – Metodologia analítica para a glimepirida	39
3.5 – Espectrofotometria derivada	42
3.6 – Determinação dos parâmetros de validação.....	56
3.6.1- Validação de métodos analíticos.....	59
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	72
4.1- Material.....	72
4.1.1 – Diclofenaco sódico	72
4.1.2 – Glimepirida	73
4.2 – Métodos espectrofotométricos.....	78
4.2.1 – Diclofenaco sódico	78
4.2.2 - Glimepirida.....	84
5 . RESULTADOS	107
5.1 – Diclofenaco sódico	107
5.2 – Glimepirida.....	116
6. DISCUSSÃO	212
6.1- Diclofenaco sódico.....	213
6.2- Glimepirida.....	218
7. CONCLUSÕES	233

7.1 – Diclofenaco sódico:	233
7.2 – Glimepirida	233
8 . REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	235
9. ANEXOS	250

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura química do diclofenaco sódico	7
Figura 2.	Estrutura química da glimepirida	24
Figura 3.	Espectros de absorção obtidos de soluções padrão de DS preparadas em concentrações iguais a 4,0; 6,0; 8,0 10,0; 12,5 e 15,0 µg/mL. As absorvâncias foram determinadas entre 220 e 350 nm	107
Figura 4.	Curva de Ringbom obtida de soluções padrão de DS preparadas com metanol em concentrações variáveis entre 2,0 e 26,0 µg/mL. As absorvâncias foram determinadas em 282 nm contra branco	108
Figura 5.	Curva de calibração obtida a partir de uma solução padrão de DS /metanol. As concentrações variaram entre 4,0 e 22,0 µg/mL e as absorvâncias foram determinadas em 282 nm.	109
Figura 6.	Espectros diretos obtidos a partir de uma solução padrão de DS e de uma solução preparada com a MA 2 – DS. A concentração final de leitura foi igual a 15,0 µg/mL de DS e as absorvâncias foram determinadas em 282 nm contra branco	110
Figura 7.	Reta teórica construída para avaliação da linearidade segundo PASTEELNICK (1993) onde se considera a quantidade de diclofenaco sódico adicionada e a média da concentração encontrada de três alíquotas, preparadas a partir da MA 2. As absorvâncias foram determinadas em 282 nm contra branco. Valores de $a = 0,3759$ e $r = 0,9995$	112
Figura 8.	Reta teórica construída para avaliação da linearidade segundo BRITAIN (1998) onde se considera a concentração teórica de diclofenaco sódico e a média das absorvâncias de três alíquotas, preparadas a partir da MA 2. As absorvâncias foram determinadas em 282 nm contra	113

	branco. Valores de $a = 0,01615$ e $r = 0,9995$	
Figura 9.	Reta construída para cálculo do coeficiente angular a partir da concentração teórica de DS e a média das absorvâncias obtidas, para determinação dos limites de detecção e quantificação. A tomada de ensaio correspondeu a 100,0 mg de DS a partir da MA 1. As absorvâncias foram determinadas em 282 nm contra branco. Valor $b = 0,0415$	114
Figura 10.	Espectro no infravermelho do padrão glimepirida - GP em pastilhas de KBr (lote NC 21819).	116
Figura 11.	Espectro no infravermelho do padrão glimepirida - GP em pastilhas de KBr (lote 8022).	117
Figura 12.	Espectro de absorção de ordem zero obtido a partir de uma solução contendo 20,0 $\mu\text{g/mL}$ de glimepinda padrão em NaOH 0,1M após aquecimento. O intervalo de leitura foi entre 200 e 400 nm.	118
Figura 13.	Representação gráfica do comportamento das soluções padrão de glimepirida analisadas a intervalos de 15 minutos. As concentrações foram iguais a 3,2; 4,8; 6,4; 8,0; 9,6; 11,2; 12,8; 14,4; 16,0 e 17,6 $\mu\text{g/mL}$ de glimepinda	120
Figura 14.	Espectros de absorção de ordem zero obtidos a partir de soluções padrão de glimepinda em concentrações iguais a 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 12,0; 14,0; 16,0; 18,0; 20,0 e 22,0 $\mu\text{g/mL}$, após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As absorvâncias foram determinadas entre 215 e 260 nm contra branco.	120
Figura 15.	Curva de Ringbom obtida a partir de soluções padrão de glimepinda com concentrações variáveis entre 1,6 e 22,4 $\mu\text{g/mL}$ após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As absorvâncias foram determinadas a 230 nm	121
Figura 16.	Curva de calibração obtida a partir de soluções padrão de	122

glimepirida em concentrações entre 4,0 e 22,0 µg/mL após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As absorvâncias foram determinadas em 230 nm contra branco.

- Figura 17.** Espectros diretos obtidos de soluções preparadas com glimepirida padrão, celulose, lactose (lac), MA 2^{2mg} F1 e MA 1^{2mg} F1, após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As concentrações corresponderam a 15,0 µg/mL de GP. 123
- Figura 18.** Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão, lactose, celulose, MA 2^{2mg} F1 e MA 1^{2mg} F1 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As concentrações corresponderam a 15,0 µg/mL de GP. 123
- Figura 19.** Espectro derivado de 1ª ordem obtido a partir de solução contendo 20,0 µg/mL de glimepirida padrão em NaOH 0,1M após aquecimento. O intervalo avaliado foi entre 200 e 400 nm. 124
- Figura 20.** Espectros de absorção da 1ª derivada obtidos de soluções padrão de glimepirida em concentrações iguais a 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 12,0; 14,0; 16,0; 18,0; 20,0 e 22,0 µg/mL, após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. O intervalo avaliado foi entre 215 e 260 nm. 124
- Figura 21.** Curva de calibração obtida a partir de soluções padrão de glimepirida em concentrações entre 4,0 e 22,0 µg/mL, após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As derivadas de 1ª ordem foram determinadas em 244 nm. 125
- Figura 22.** Curva de calibração obtida a partir de soluções padrão de glimepirida em concentrações entre 4,0 e 22,0 µg/mL, após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As derivadas de 1ª ordem foram determinadas em 126

246 nm.

- Figura 23.** Curva de calibração obtida a partir de soluções padrão de glimepirida em concentrações entre 4,0 e 22,0 µg/mL, após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As derivadas de 1ª ordem foram determinadas em 251 nm. 127
- Figura 24.** Espectros diretos obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão e excipientes utilizados na F 2 : explotab, estearato de magnésio, celulose, lactose e PVP, após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1 M. As absorvâncias foram determinadas no intervalo entre 215 e 260 nm contra branco e as concentrações corresponderam a 15,0 µg/mL de GP. 129
- Figura 25.** Espectros de 1ª derivada obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão e excipientes utilizados na F 2 : explotab, estearato de magnésio, celulose, lactose e PVP, após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1 M. As absorvâncias foram determinadas no intervalo entre 215 e 260 nm contra branco e as concentrações corresponderam a 15,0 µg/mL de GP. 129
- Figura 26.** Espectros diretos obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão, lactose, MA 2^{1mg} F2, MA 2^{2mg} F2 e MA 2^{4mg} F2, após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As concentrações corresponderam a 15,0 µg/mL de GP 131
- Figura 27.** Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão, lactose, MA 2^{1mg}, MA 2^{2mg} e MA 2^{4mg} F2 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As concentrações corresponderam a 15,0 µg/mL de GP. 131
- Figura 28 .** Espectros diretos obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão, misturas L1a, L1b e L1c e lactose 132

após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As concentrações corresponderam a 15,0 µg/mL de GP.

- Figura 29.** Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão, misturas L1a, L1b e L1c e lactose após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As concentrações corresponderam a 15,0 µg/mL de GP. 132
- Figura 30.** Espectros diretos obtidos partir de soluções preparadas com glimepirida padrão, misturas L2a, L2b , L2c e lactose após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As concentrações corresponderam a 15,0 µg/mL de GP. 133
- Figura 31.** Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão, misturas L2a, L2b e L2c e lactose após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As concentrações corresponderam a 15,0 µg/mL de GP. 133
- Figura 32.** Espectros diretos obtidos partir de soluções preparadas com glimepirida padrão, misturas L4a, L4b , L4c e lactose após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As concentrações corresponderam a 15,0 µg/mL de GP. 134
- Figura 33.** Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão, misturas L4a, L4b e L4c e lactose após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As concentrações corresponderam a 15,0 µg/mL de GP 135
- Figura 34.** Espectros diretos obtidos de soluções preparadas com glimepirida padrão, PVP, mistura 1a , mistura 1b e mistura 1c, após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As absorvâncias foram determinadas em 230 136

nm. As concentrações corresponderam a 15,0 µg/mL de GP.

- Figura 35.** Espectros da derivada de 1ª ordem obtidos a partir de soluções padrão de Glimepirida, PVP, mistura 1a , mistura 1b e mistura 1c, após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As concentrações corresponderam a 15,0 µg/mL de GP. 136
- Figura 36.** Espectros diretos obtidos de soluções preparadas com glimepirida padrão, PVP, mistura 2a , mistura 2b e mistura 2c, após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As absorvâncias foram determinadas em 230 nm. As concentrações corresponderam a 15,0 µg/mL de GP. 137
- Figura 37.** Espectros de derivada de 1ª ordem obtidos a partir de soluções padrão de Glimepirida, PVP, mistura 2a , mistura 2b e mistura 2c, após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As concentrações corresponderam a 15,0 µg/mL de GP. 137
- Figura 38.** Espectros diretos obtidos de soluções preparadas com glimepirida padrão, PVP, mistura 4a , mistura 4b e mistura 4c, após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As absorvâncias foram determinadas em 230 nm. As concentrações corresponderam a 15,0 µg/mL de GP. 138
- Figura 39.** Espectros de derivada de 1ª ordem obtidos a partir de soluções padrão de Glimepirida, PVP, mistura 4a , mistura 4b e mistura 4c, após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As concentrações corresponderam a 15,0 µg/mL de GP 138
- Figura 40.** Espectros diretos obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão, lactose, MA 2^{1mg} F3, MA 2^{2mg} F3 e MA 2^{4mg} F3 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 140

minutos em NaOH 0,1M. As absorvâncias foram determinadas entre 215 e 260 nm contra branco. As concentrações corresponderam a 15,0 µg/mL de GP.

- Figura 41.** Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão, lactose, MA 2^{1mg} F3, MA 2^{2mg} F3 e MA 2^{4mg} F3 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As absorvâncias foram determinadas entre 215 e 260 nm contra branco. As concentrações corresponderam a 15,0 µg/mL de GP. 140
- Figura 42.** Espectros diretos obtidos a partir de soluções de glimepirida padrão, cellactose e carbonato de magnésio após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio corresponderam a 75,0 mg de glimepirida. 142
- Figura 43.** Espectros de 1ª derivada obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão, celactose e carbonato de magnésio após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio corresponderam a 75,0 mg de glimepirida 142
- Figura 44.** Espectros diretos obtidos a partir de soluções de glimepirida padrão e das MA2 F4, MA2 F5 e MA2 F6 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio correspondem a 75,0 mg de glimepirida e as absorvâncias foram determinadas entre 220-260 nm contra branco. 144
- Figura 45.** Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções de glimepirida padrão, MA2 1 F4, MA2 F5 e MA2 F6 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio corresponderam a 75,0 mg de glimepirida 144
- Figura 46.** Espectros diretos obtidos a partir de soluções de glimepirida padrão, MA1 F4, MA1 F5 e MA1 F6 após 146

aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio correspondem a 75,0 mg de glimepirida e as absorvâncias foram determinadas entre 220-260 nm contra branco.

- Figura 47.** Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções de glimepirida padrão, MA1 F4, MA1 F5 e MA1 F6 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio corresponderam a 75,0 mg de glimepirida 146
- Figura 48.** Espectros diretos obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão (15,0 µg/mL) corantes vermelho ponceau (VP), amarelo quinoleína laca (AQ) + azul índigo laca (AI) e azul índigo laca (AI) (5,0 µg/mL) após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M 148
- Figura 49.** Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão (15,0 µg/mL) corantes vermelho ponceau (VP), amarelo quinoleína laca (AQ) + azul índigo laca (AI) e azul índigo laca (AI) (5,0 µg/mL) após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M 148
- Figura 50.** Espectros diretos obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão (15,0 µg/mL) e corantes diluídos 10 vezes (0,5 µg/mL): vermelho ponceau (VP), amarelo quinoleína laca (AQ) + azul índigo laca (AI) e azul índigo laca (AI) após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As concentrações corresponderam a 15,0 µg/mL de GP. 150
- Figura 51.** Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão (15,0 µg/mL) e corantes diluídos 10 vezes (0,5 µg/mL): vermelho ponceau (VP), amarelo quinoleína laca (AQ) + azul índigo laca (AI) e azul índigo laca (AI), após aquecimento a 80- 150

- 90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As concentrações corresponderam a 15,0 µg/mL de GP.
- Figura 52.** Espectros diretos obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão (15,0 µg/mL) e 3 replicatas da MA 2^{1mg} F7 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio corresponderam a 25,0 mg de glimepirida. 152
- Figura 53.** Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão (15,0 µg/mL) e 3 replicatas da MA 2^{1mg} F7 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio corresponderam a 25,0 mg de glimepirida. 152
- Figura 54.** Espectros diretos obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão(15,0 µg/mL) e 3 replicatas da MA2^{2mg} F7 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio corresponderam a 25,0 mg de glimepirida. 153
- Figura 55.** Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão (15,0 µg/mL) e 3 replicatas da MA 2^{2mg} F7 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio corresponderam a 25,0 mg de glimepirida 153
- Figura 56.** Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão (15,0 µg/mL) e 3 replicatas da MA 2^{4mg} F7 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1 M. As tomadas de ensaio corresponderam a 25,0 mg de glimepirida. 154
- Figura 57.** Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão (15,0 µg/mL) e 3 replicatas da MA 2^{4mg} F7 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio corresponderam a 25,0 mg de glimepirida. 154

- Figura 58.** Espectros diretos obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão (15,0 µg/mL) e 9 replicatas da MA 1^{1mg} F7 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio corresponderam a 25,0 mg de glimepirida. 156
- Figura 59.** Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão (15,0 µg/mL) e 9 replicatas da MA 1^{1mg} F7 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio corresponderam a 25,0 mg de glimepirida 156
- Figura 60.** Espectros diretos obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão (15,0 µg/mL) e 9 replicatas da MA 1^{2mg} F7 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1N. As tomadas de ensaio corresponderam a 25,0 mg de glimepirida. 157
- Figura 61.** Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão (15,0 µg/mL) e 9 replicatas da MA 1^{2mg} F7 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio corresponderam a 25,0 mg de glimepirida. 157
- Figura 62.** Espectros diretos obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão (15,0 µg/mL) e 9 replicatas da MA 1^{4 mg} F7 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio corresponderam a 25,0 mg de glimepirida 158
- Figura 63.** Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão (15,0 µg/mL) e 9 replicatas da MA 1^{4 mg} F7 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio corresponderam a 25,0 mg de glimepirida 158
- Figura 64.** Espectros diretos obtidos após teste de linearidade aplicado à MA 2^{4 mg} – F7. As concentrações da soluções 162

de leitura variaram entre 7,2 a 21,6 $\mu\text{g/mL}$ de GP. A solução padrão apresentou concentração igual a 15,0 $\mu\text{g/mL}$ de GP e as absorvâncias foram determinadas em 230 nm.

- Figura 65.** Reta teórica construída para avaliação da linearidade segundo PASTEELNICK (1993) onde se considera a concentração teórica de glimepirida e a média da concentração de três replicatas, preparadas a partir da MA 2^{4 mg} F7. As absorvâncias foram determinadas em 230 nm contra branco. Valores de $a = 0,127$ e $r = 0,9999$ 163
- Figura 66.** Reta teórica construída para avaliação da linearidade segundo BRITAIN (1998) onde se considera a concentração teórica de glimepirida e a média das absorvâncias de três replicatas, preparadas a partir da MA 2^{4 mg} F7. As absorvâncias foram determinadas em 230 nm contra branco. Valores de $a = 0,00598$ e $r = 0,9999$. 163
- Figura 67.** Espectros derivados de 1ª ordem obtidos após teste de linearidade aplicado à MA 2^{4 mg} – F7. As concentrações da soluções de leitura variaram entre 7,2 e 21,6 $\mu\text{g/mL}$ de GP. A solução padrão apresentou concentração igual a 15,0 $\mu\text{g/mL}$ de GP e os valores da 1ª derivada foram determinados em 244, 246 e 251 nm. 164
- Figura 68.** Reta teórica construída para avaliação da linearidade segundo PASTEELNICK (1993) onde se considera a concentração teórica da GP e a média da concentração de triplicatas, preparadas a partir da MA 2^{4mg} – F7. Os valores da 1ª derivada foram determinados em 244 nm. Valores de $a = 0,414$ e $r = 0,9995$ 165
- Figura 69.** Reta teórica construída para avaliação da linearidade segundo BRITAIN (1998) onde se considera a concentração teórica da GP e a média da concentração de triplicatas, preparadas a partir da MA 2^{4mg} – F7. Os 166

valores da 1ª derivada foram determinados em 244 nm.
Valores de $a = 0,0692$ e $r = 0,9995$

- Figura 70.** Reta teórica construída para avaliação da linearidade segundo PASTEELNICK (1993) onde se considera a concentração teórica da GP e a média da concentração de triplicatas, preparadas a partir da MA 2^{4mg} – F7. Os valores da 1ª derivada foram determinados em 246 nm. Valores de $a = 0,264$ e $r = 0,99975$ 167
- Figura 71.** Reta teórica construída para avaliação da linearidade segundo BRITAIN (1998) onde se considera a concentração teórica da GP e a média da concentração de triplicatas, preparadas a partir da MA 2^{4mg} – F7. Os valores da 1ª derivada foram determinados em 246 nm. Valores de $a = 0,078$ e $r = 0,9997$ 168
- Figura 72.** Reta teórica construída para avaliação da linearidade segundo PASTEELNICK (1993) onde se considera a concentração teórica da GP e a média da concentração de triplicatas, preparadas a partir da MA 2^{4mg} – F7. Os valores da 1ª derivada foram determinados em 251 nm. Valores de $a = 0,33$ e $r = 0,9998$ 169
- Figura 73.** Reta teórica construída para avaliação da linearidade segundo BRITAIN (1998) onde se considera a concentração teórica da GP e a média da concentração de triplicatas, preparadas a partir da MA 2^{4mg} – F7. Os valores da 1ª derivada foram determinados em 251 nm. Valores de $a = 0,078$ e $r = 0,9997$ 170
- Figura 74.** Espectros diretos obtidos a partir de soluções de glimepirida padrão, MA 2^{1mg}, MA 2^{2mg} e MA 2^{4mg} F 8 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. A concentração da solução de GP padrão foi igual a 15,0 µg/ml. 171
- Figura 75.** Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de 171

soluções preparadas com glimepirida padrão e MA 2^{1mg}, MA 2^{2mg} e MA 2^{4mg} F 8 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio corresponderam a 25,0 mg de glimepirida padrão

- Figura 76.** Espectros diretos obtidos a partir de soluções de glimepirida padrão e 9 alíquotas da MA 1^{1mg} F8 que foram submetidas a aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio corresponderam a 25,0 mg de glimepirida 173
- Figura 77.** Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções de glimepirida padrão e 9 alíquotas da MA 1^{1mg} F 8 que foram submetidas a aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio corresponderam a 25,0 mg de glimepirida 173
- Figura 78.** Espectros diretos obtidos a partir de soluções de glimepirida padrão e 9 alíquotas da MA 1^{2mg} F8 que foram submetidas a aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio corresponderam a 25,0 mg de glimepirida 174
- Figura 79.** Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções de glimepirida padrão e 9 alíquotas da MA 1^{2mg} F8 que foram submetidas a aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio corresponderam a 25,0 mg de glimepirida. 174
- Figura 80.** Espectros diretos obtidos a partir de soluções de glimepirida padrão e 9 alíquotas da MA 1^{4mg} F8 que foram submetidas a aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio corresponderam a 25,0 mg de glimepirida 175
- Figura 81.** Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções de glimepirida padrão e 9 alíquotas da MA 1^{4mg} F8 que foram submetidas a aquecimento a 80-90°C entre 175

5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio corresponderam a 25,0 mg de glimepirida

- Figura 82.** Espectros diretos obtidos após teste de linearidade aplicado à MA 2^{4 mg} – F8. As concentrações da soluções de leitura variaram entre 7,2 a 21,6 µg/mL de GP. A solução padrão apresentou concentração igual a 15,0 µg/mL de GP e as absorvâncias foram determinadas em 230 nm. 179
- Figura 83.** Reta teórica construída para avaliação da linearidade segundo PASTEELNICK (1993) onde se considera a concentração teórica de glimepirida e a média da concentração encontrada de três replicatas, preparadas a partir da MA 2^{4 mg} F8. As absorvâncias foram determinadas em 230 nm. Valores de $a = 0,0784$ e $r = 0,999$ 180
- Figura 84.** Reta teórica construída para avaliação da linearidade segundo BRITAIN (1998) onde se considera a concentração teórica de glimepirida e a média das absorvâncias de três replicatas, preparadas a partir da MA 2^{4 mg} F8 . As absorvâncias foram determinadas em 230 nm. Valores de $a = 0,00367$ e $r = 0,9999$ 180
- Figura 85.** Espectros derivados de 1ª ordem obtidos após teste de linearidade aplicado à MA 2^{4 mg} – F8. As concentrações da soluções de leitura variaram entre 7,2 e 21,6 µg/mL de GP. A solução padrão apresentou concentração igual a 15,0 µg/mL de GP e os valores da 1ª derivada foram determinados em 244, 246 e 251 nm 181
- Figura 86.** Reta teórica construída para avaliação da linearidade segundo PASTEELNICK (1993) onde se considera a concentração teórica da GP e a média da concentração de triplicatas, preparadas a partir da MA 2^{4 mg} – F8. Os valores da 1ª derivada foram determinados em 244 nm. Valores de $a = 0,34$ e $r = 0,9993$ 182

- Figura 87.** Reta teórica construída para avaliação da linearidade segundo BRITAIN (1998) onde se considera a concentração teórica da GP e a média da concentração de triplicatas, preparadas a partir da MA 2^{4mg} – F8. Os valores da 1ª derivada foram determinados em 244 nm. Valores de $a = 0,0678$ e $r = 0,9993$ 183
- Figura 88.** Reta teórica construída para avaliação da linearidade segundo PASTEELNICK (1993) onde se considera a concentração teórica da GP e a média da concentração de triplicatas, preparadas a partir da MA 2^{4mg} – F8. Os valores da 1ª derivada foram determinados em 246 nm. Valores de $a = 0,0406$ e $r = 0,9992$ 184
- Figura 89.** Reta teórica construída para avaliação da linearidade segundo BRITAIN (1998) onde se considera a concentração teórica da GP e a média da concentração de triplicatas, preparadas a partir da MA 2^{4mg} – F8. Os valores da 1ª derivada foram determinados em 246 nm. Valores de $a = 0,0406$ e $r = 0,9992$ 185
- Figura 90.** Reta teórica construída para avaliação da linearidade segundo PASTEELNICK (1993) onde se considera a concentração teórica da GP e a média da concentração de triplicatas, preparadas a partir da MA 2^{4mg} – F8. Os valores da 1ª derivada foram determinados em 251 nm. Valores de $a = 0,34$ e $r = 0,9993$ 186
- Figura 91.** Reta teórica construída para avaliação da linearidade segundo BRITAIN (1998) onde se considera a concentração teórica da GP e a média da concentração de triplicatas, preparadas a partir da MA 2^{4mg} – F8. Os valores da 1ª derivada foram determinados em 251 nm. Valores de $a = 0,0602$ e $r = 0,9998$ 187
- Figura 92.** Espectros diretos obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão e MA 1^{4mg} - F8 com concentração 188

igual a 0,5 µg/mL de GP (9 alíquotas), após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. A concentração da solução padrão de GP foi igual a 15,0 µg/mL

- Figura 93.** Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão e MA 1^{4mg} - F8 com concentração igual a 0,5 µg/mL de GP (9 alíquotas) após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. A concentração da solução padrão de GP foi igual a 15,0 µg/mL 188
- Figura 94.** Espectros diretos obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão e MA 1^{4mg} - F8 com concentração igual a 1,0 µg/mL de GP (9 alíquotas) após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M . A concentração da solução padrão de GP foi igual a 15,0 µg/mL 189
- Figura 95.** Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão e MA 1^{4mg} - F8 com concentração igual a 1,0 µg/mL de GP (9 alíquotas) após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M .A concentração da solução padrão de GP foi igual a 15,0 µg/mL 189
- Figura 96.** Espectros diretos obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão e MA 1^{4mg} - F8 com concentração igual a 1,5 µg/mL de GP (9 alíquotas) após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1N .A concentração da solução padrão de GP foi igual a 15,0 µg/mL 190
- Figura 97.** Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão e MA 1^{4mg} - F8 com concentração igual a 1,5 µg/mL de GP (9 alíquotas) após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos 190

em NaOH 0,1N . A concentração da solução padrão de GP foi igual a 15,0 µg/mL

- Figura 98.** Espectros diretos obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão e MA 1^{4mg} – F8 com concentração igual a 2,0 µg/mL de GP (9 alíquotas) após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M . A concentração da solução padrão de GP foi igual a 15,0 µg/mL 191
- Figura 99.** Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão e MA 1^{4mg} - F8 com concentração igual a 2,0 µg/mL de GP (9 alíquotas) após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. A concentração da solução padrão de GP foi igual a 15,0 µg/mL 191
- Figura 100.** Espectros diretos obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão e MA 1^{4mg} - F8 com concentração igual a 2,5 µg/mL de GP (9 alíquotas) após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M . A concentração da solução padrão de GP foi igual a 15,0 µg/mL 192
- Figura 101.** Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão e MA 1^{4mg} - F8 com concentração igual a 2,5 µg/mL de GP (9 alíquotas) após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M . A concentração da solução padrão de GP foi igual a 15,0 µg/mL 192
- Figura 102.** Espectros diretos obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão e MA 1^{4mg} - F8 com concentração igual a 3,0 µg/mL de GP (9 alíquotas) após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. A concentração da solução padrão de GP foi igual a 15,0 µg/mL 193

- Figura 103.** Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão e MA 1^{4mg} - F8 com concentração igual a 3,0 µg/mL de GP (9 alíquotas) após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. A concentração da solução padrão de GP foi igual a 15,0 µg/mL 193
- Figura 104.** Espectros diretos obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão e MA 1^{4mg} - F8 com concentração igual a 3,5 µg/mL de GP (9 alíquotas) após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. A concentração da solução padrão de GP foi igual a 15,0 µg/mL 194
- Figura 105.** Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão e MA 1^{4mg} - F8 com concentração igual a 3,5 µg/mL de GP (9 alíquotas) após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. A concentração da solução padrão de GP foi igual a 15,0 µg/mL 194
- Figura 106.** Reta construída para cálculo do coeficiente angular (b) a partir da concentração teórica de glimepirida e a média das absorvâncias obtidas, para determinação dos limites de detecção e quantificação. A tomada de ensaio correspondeu a 25,0 mg de glimepirida a partir da MA 1. As absorvâncias foram determinadas em 230 nm. Valor b = 0,04531 196
- Figura 107.** Reta construída para cálculo do coeficiente angular (b) a partir da concentração teórica de glimepirida e a média das absorvâncias obtidas, para determinação dos limites de detecção e quantificação. A tomada de ensaio correspondeu a 25,0 mg de glimepirida a partir da MA 1^{4mg} - F8. Os valores da 1ª derivada foram determinados em 244 nm. Valor b = 0,01843 197

- Figura 108.** Reta construída para cálculo do coeficiente angular a partir da concentração teórica de glimepirida e a média das absorvâncias obtidas, para determinação dos limites de detecção e quantificação. A tomada de ensaio correspondeu a 25,0 mg de glimepirida a partir da MA 1⁴^{mg} – F8. Os valores da 1^a derivada foram determinados em 246 nm. Valor b = 0,01837 199
- Figura 109.** Reta construída para cálculo do coeficiente angular a partir da concentração teórica de glimepirida e a média das absorvâncias obtidas, para determinação dos limites de detecção e quantificação. A tomada de ensaio correspondeu a 25,0 mg de glimepirida a partir da MA 1⁴^{mg} – F8. Os valores da 1^a derivada foram determinados em 251 nm. Valor b = 0,01562 200
- Figura 110.** Espectros de absorção de ordem zero obtidos a partir de soluções padrão de glimepirida em concentrações no intervalo de 3,0 a 30,0 µg/mL, após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As absorvâncias foram determinadas em 230 nm contra branco 201
- Figura 111.** Curva de calibração obtida a partir de soluções padrão em concentrações variáveis entre 3,0 a 30,0 µg/mL de GP. As absorvâncias foram determinadas em 230 nm contra branco 202
- Figura 112.** Espectros de absorção da primeira derivada de soluções padrão em concentrações variáveis entre 3,0 e 30,0 µg/mL de GP padrão, após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As leituras foram feitas em 244, 246 e 251 nm 203
- Figura 113.** Curva de calibração obtida a partir de soluções padrão de GP em concentrações entre 3,0 e 30,0 µg/mL, após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As derivadas de primeira ordem foram determinadas 204

em 244 nm contra branco

- Figura 114.** Curva de calibração obtida a partir de soluções padrão de GP em concentrações entre 3,0 e 30,0 µg/mL, após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As derivadas de primeira ordem foram determinadas em 246 nm contra branco. 205
- Figura 115.** Curva de calibração obtida a partir de soluções padrão de GP em concentrações entre 3,0 e 30,0 µg/mL, após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As derivadas de primeira ordem foram determinadas em 246 nm contra branco. 206
- Figura 116.** Espectros diretos obtidos de soluções preparadas com padrão de GP e 9 alíquotas da amostra comercial de comprimidos AS de GP (4 mg). A concentração do padrão foi igual a 20,0 µg/mL e as absorvâncias foram determinadas em 230 nm 208
- Figura 117.** Espectros derivados de primeira ordem obtidos de solução padrão de GP e 9 alíquotas da amostra comercial de comprimidos AS de GP (4 mg). A concentração do padrão foi igual a 20,0 µg/mL e as derivadas foram determinadas em 244, 246 e 251 nm 208
- Figura 118.** Espectros diretos obtidos de soluções preparadas com padrão de GP e 9 alíquotas da amostra comercial de comprimidos AR de GP (4 mg). A concentração do padrão foi igual a 20,0 µg/mL e as absorvâncias foram determinadas em 230 nm. 209
- Figura 119.** Espectros derivados de primeira ordem obtidos de solução padrão de GP e 9 alíquotas da amostra comercial de comprimidos AR de GP (4 mg). A concentração do padrão foi igual a 20,0 µg/mL e as derivadas foram determinadas em 244, 246 e 251 nm 209

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Absorvâncias determinadas a partir de soluções padrão de diclofenaco sódico em metanol. As concentrações variaram entre 4,0 a 22,0 µg/mL de DS e as leituras foram feitas em 282 nm contra branco	108
Tabela 2.	Valores em absorvância obtidos de soluções preparadas a partir de DS padrão e MA 2 em metanol. A tomada de ensaio foi igual a 150,0 mg de DS e a concentração final de leitura correspondeu a 15,0 µg/mL de DS. As absorvâncias foram determinadas em 282 nm e os valores representam a média de 3 alíquotas	110
Tabela 3.	Resultados estatísticos obtidos com as amostras de comprimidos de DS 50 mg após aplicação do método espectrofotométrico no UV/metanol. A tomada de ensaio foi igual ao peso médio de cada amostra e os valores expressos representam a média após análise de 10 alíquotas	111
Tabela 4.	Resultados encontrados após o teste de recuperação do padrão, aplicado às amostras comerciais de comprimidos de DS 50 mg e à MA 1. Os valores apresentados representam a média da análise de 10 alíquotas	111
Tabela 5.	Resultados encontrados referentes a cinco concentrações de DS utilizadas na avaliação da linearidade. Os valores de absorvâncias e de concentração encontrada de DS referem-se a média de 3 alíquotas obtidas a partir da MA2	112
Tabela 6.	Valores obtidos em termos de Fator de Linearidade (FL) considerando a concentração de DS e respectivas absorvâncias determinadas em 282 nm, a partir da MA 2. Segundo LEITE (1996) o método é considerado linear quando o coeficiente de variação (CV) é igual ou inferior a 2%. Os valores expressam a média de 3 determinações	113
Tabela 7.	Resultados obtidos após determinação das concentrações	114

decrecentes de DS a partir da MA 1. Os valores expressos representam a média após análise de 10 alíquotas

Tabela 8.	Resultados obtidos com soluções contendo 15,0 µg/mL de glimepirida em diferentes concentrações de NaOH aquecidas a 80-90°C em tempos de 5, 10 e 15 minutos	118
Tabela 9.	Absorvâncias encontradas na análise de soluções de glimepirida padrão em concentrações variáveis entre 3,2 e 17,6 µg/mL em NaOH 0,1M após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos. As leituras foram feitas a intervalos de 15 minutos em 230 nm contra branco	119
Tabela 10.	Absorvâncias determinadas em 230 nm contra branco de soluções padrão de glimepirida em concentrações variáveis entre 4,0 e 22,0 µg/mL em NaOH 0,1M após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos	121
Tabela 11.	Valores obtidos da 1ª derivada em 244 nm de soluções padrão de glimepirida com concentrações variáveis entre 4,0 e 22,0 µg/mL preparadas em NaOH 0,1M após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos.	125
Tabela 12.	Valores obtidos da 1ª derivada em 246 nm de soluções padrão de glimepirida com concentrações variáveis entre 4,0 e 22,0 µg/mL preparadas em NaOH 0,1M após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos	126
Tabela 13.	Valores obtidos da 1ª derivada em 251 nm de soluções padrão de glimepirida com concentrações variáveis entre 4,0 e 22,0 µg/mL preparadas em NaOH 0,1M após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos	127
Tabela 14.	Valores obtidos em absorvâncias e derivada de 1ª ordem após leitura das soluções contendo GP padrão, estearato de magnésio, celulose, explotab, lactose e PVP. As tomadas de ensaio corresponderam a 75,0 mg de glimepirida	130
Tabela 15.	Valores obtidos em absorvâncias e derivada de 1ª ordem após leitura das soluções contendo GP padrão, lactose e misturas	135

GP + lactose em quantidades variáveis (50, 100 e 150% de lactose). As tomadas de ensaio foram correspondentes a 75,0 mg de glimepirida

- Tabela 16.** Valores obtidos em absorvâncias e derivada de 1ª ordem após leitura das soluções contendo GP padrão, PVP S 630 e misturas GP + PVP em quantidades variáveis (50, 100 e 150% de PVP). As tomadas de ensaio corresponderam a 75,0 mg de glimepirida 139
- Tabela 17.** Valores obtidos em absorbância e 1ª derivada de soluções preparadas com GP padrão, MA 2^{1mg}F3, MA 2^{2mg}F3 e MA 2^{4mg}F3 , após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M . As tomadas de ensaio foram correspondentes a 75,0 mg de glimepirida 141
- Tabela 18.** Valores obtidos em absorbância e 1ª derivada de soluções preparadas com GP padrão, cellactose e carbonato de magnésio, após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M . As tomadas de ensaio foram correspondentes a 75,0 mg de glimepirida 143
- Tabela 19.** Valores obtidos em absorbância e 1ª derivada de soluções preparadas com GP padrão, MA 1^{2mg}F4, MA 1^{2mg}F5 e MA 1^{2mg}F6 , após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M . As tomadas de ensaio foram correspondentes a 75,0 mg de glimepirida 145
- Tabela 20.** Valores obtidos em absorbância e 1ª derivada de soluções preparadas com GP padrão, MA 1^{2mg}F4, MA 1^{2mg}F5 e MA 1^{2mg}F6 , após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M . As tomadas de ensaio foram correspondentes a 75,0 mg de glimepirida 147
- Tabela 21.** Valores obtidos em absorbância e 1ª derivada de soluções preparadas com GP padrão (15,0 µg/mL), corantes vermelho ponceau, amarelo quinoleína laca e azul índigo laca (5,0 µg/m) 149

	após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M	
Tabela 22.	Valores obtidos em absorbância e 1ª derivada de soluções preparadas com GP padrão(15,0 µg/mL) e corantes diluídos 10 vezes (0,5 µg/mL) corantes vermelho ponceau, amarelo quinoleína laca e azul índigo laca, após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio foram correspondentes a 75,0 mg de glimepirida	151
Tabela 23.	Valores médios de 3 leituras obtidos em absorbância e 1ª derivada de soluções preparadas com GP padrão (15,0 µg/mL), MA 2 ^{1mg} , MA 2 ^{2mg} e MA 2 ^{4mg} da F 7 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio foram correspondentes a 25,0 mg de glimepirida	155
Tabela 24.	Valores obtidos em espectrofotometria direta e 1ª derivada de soluções preparadas com MA 1 ^{1mg} , MA 1 ^{2mg} e MA 1 ^{4mg} da F 7 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio foram correspondentes a 25,0 mg de glimepirida e os valores representam a média da leitura de 9 replicatas contra solução padrão de GP (15,0 µg/mL)	159
Tabela 25.	Resultados obtidos após aplicação do teste de recuperação do padrão às soluções preparadas com MA 1 ^{1mg} , MA 1 ^{2mg} e MA 1 ^{4mg} da F7. Estas foram avaliadas em 230 nm contra de solução padrão de GP com concentração igual a 15,0 µg/mL	160
Tabela 26.	Resultados obtidos após aplicação do teste de recuperação do padrão às soluções preparadas com MA 1 ^{1mg} , MA 1 ^{2mg} e MA 1 ^{4mg} da F7 Estas foram avaliadas na 1ª derivada em 244 nm, 246 nm e 251 nm contra de solução padrão de GP com concentração igual a 15,0 µg/mL	161
Tabela 27.	Resultados encontrados após teste da linearidade aplicado à MA 2 ^{4 mg} – F7. As absorvâncias referem-se a média de triplicatas determinadas em 230 nm	162
Tabela 28.	Valores obtidos em termos de Fator de Linearidade (FL)	164

considerando a concentração de GP e respectivas absorvâncias determinadas em 230 nm, a partir da MA 2^4 mg – F7. Segundo LEITE (1996) o método é considerado linear quando o coeficiente de variação (CV) é igual ou inferior a 2%. Os valores expressam a média de 3 determinações

- Tabela 29.** Resultados encontrados após teste da linearidade aplicado à MA 2^4 mg – F7. Os valores da 1ª derivada em 244 nm referem-se a média de triplicatas 165
- Tabela 30.** Valores obtidos em termos de Fator de Linearidade (FL) considerando a concentração de GP e respectivos valores de derivada de 1ª ordem determinadas em 244 nm, a partir da MA 2^4 mg – F7. Segundo LEITE (1996) o método é considerado linear quando o coeficiente de variação (CV) é igual ou inferior a 2%. Os valores expressam a média de 3 determinações 166
- Tabela 31.** Resultados encontrados no teste da linearidade aplicado à MA 2^4 mg – F7. Os valores da 1ª derivada em 246 nm referem-se a média de triplicatas 167
- Tabela 32.** Valores obtidos em termos de Fator de Linearidade (FL) considerando a concentração de GP e respectivos valores de derivada de 1ª ordem determinadas em 246 nm, a partir da MA 2^4 mg – F7. Segundo LEITE (1996) o método é considerado linear quando o coeficiente de variação (CV) é igual ou inferior a 2%. Os valores expressam a média de 3 determinações 168
- Tabela 33.** Resultados encontrados no teste da linearidade aplicado à MA 2^4 mg – F7. Os valores da 1ª derivada em 251 nm referem-se a média de triplicatas 169
- Tabela 34.** Valores obtidos em termos de Fator de Linearidade (FL) considerando a concentração de GP e respectivos valores de derivada de 1ª ordem determinadas em 251 nm, a partir da MA 2^4 mg – F7. Segundo LEITE (1996) o método é considerado linear quando o coeficiente de variação (CV) é igual ou inferior a 2%. Os valores expressam a média de 3 determinações 170

Tabela 35.	Valores obtidos em absorbância e 1ª derivada de soluções preparadas com GP padrão, MA 2 ^{1mg} , MA 2 ^{2mg} e MA 2 ^{4mg} da F 8 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio foram correspondentes a 25,0 mg de glimepirida	172
Tabela 36.	Valores obtidos a partir de soluções preparadas com MA 1 ^{1mg} , MA 1 ^{2mg} e MA 1 ^{4mg} da F 8 submetidas a aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M, avaliadas na espectrofotometria direta e 1ª derivada. As tomadas de ensaio foram correspondentes a 25,0 mg de glimepirida. Os valores representam a média de 9 leituras	176
Tabela 37.	Resultados obtidos após aplicação do teste de recuperação do padrão às soluções preparadas com MA 1 ^{1mg} , MA 1 ^{2mg} e MA 1 ^{4mg} da F8 e avaliadas em 230 nm	177
Tabela 38.	Resultados obtidos após aplicação do teste de recuperação do padrão às soluções preparadas com MA 1 ^{1mg} , MA 1 ^{2mg} e MA 1 ^{4mg} da F8 e avaliadas na 1ª derivada em 244 nm, 246 nm e 251 nm	178
Tabela 39.	Resultados encontrados na avaliação da linearidade da MA 2 ^{4mg} - F8. Os valores de absorvâncias e da concentração encontrada de GP referem-se a média de triplicatas	179
Tabela 40.	Valores obtidos em termos de Fator de Linearidade (FL) considerando a concentração de GP e respectivas absorvâncias determinadas em 230 nm, a partir da MA 2 ^{4mg} - F8. Segundo LEITE (1996) o método é considerado linear quando o coeficiente de variação (CV) é igual ou inferior a 2%. Os valores expressam a média de 3 determinações	181
Tabela 41.	Resultados encontrados após teste da linearidade aplicado à MA 2 ^{4mg} - F8. Os valores da 1ª derivada em 244 nm referem-se a média de triplicatas	182
Tabela 42.	Valores obtidos em termos de Fator de Linearidade (FL) considerando a concentração de GP e respectivos valores de	183

derivada de 1ª ordem determinadas em 244 nm, a partir da MA 2⁴ mg – F8. Segundo LEITE (1996) o método é considerado linear quando o coeficiente de variação (CV) é igual ou inferior a 2%. Os valores expressam a média de 3 determinações

- Tabela 43.** Resultados encontrados após teste da linearidade aplicado à MA 2⁴ mg – F8. Os valores da 1ª derivada em 246 nm referem-se a média de triplicatas 184
- Tabela 45.** Valores obtidos em termos de Fator de Linearidade (FL) considerando a concentração de GP e respectivos valores de derivada de 1ª ordem determinadas em 246 nm, a partir da MA 2⁴ mg – F8. Segundo LEITE (1996) o método é considerado linear quando o coeficiente de variação (CV) é igual ou inferior a 2%. Os valores expressam a média de 3 determinações 185
- Tabela 45.** Resultados encontrados após teste da linearidade aplicado à MA 2⁴ mg – F8. Os valores da 1ª derivada em 251 nm referem-se a média de triplicatas 186
- Tabela 46.** Valores obtidos em termos de Fator de Linearidade (FL) considerando a concentração de GP e respectivos valores de derivada de 1ª ordem determinadas em 251 nm, a partir da MA 2⁴ mg – F8. Segundo LEITE (1996) o método é considerado linear quando o coeficiente de variação (CV) é igual ou inferior a 2%. Os valores expressam a média de 3 determinações 187
- Tabela 47.** Valores obtidos de soluções preparadas a partir da MA 1⁴ mg F8, após serem submetidas a aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M e a leituras em 230 nm. Os resultados expressam a média de 9 leituras 195
- Tabela 48.** Valores obtidos de soluções preparadas a partir da MA 1⁴ mg F8, após serem submetidas a aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M e a leituras em 244 nm contra branco. Os resultados expressam a média de 9 leituras 197
- Tabela 49.** Valores obtidos de soluções preparadas a partir da MA 1⁴ mg F8, após serem submetidas a aquecimento a 80-90°C entre 5- 198

10 minutos em NaOH 0,1M e a leituras em 246 nm contra branco. Os resultados expressam a média de 9 leituras	
Tabela 50. Valores obtidos de soluções preparadas a partir da MA 1 ^{4mg} F8, após serem submetidas a aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M e a leituras em 251 nm. Os resultados expressam a média de 9 leituras	200
Tabela 51. Absorvâncias determinadas em 230 nm contra branco de soluções padrão de glimepirida em concentrações variáveis entre 3,0 e 30,0 µg/mL em NaOH 0,1M após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos	202
Tabela 52. Valores obtidos da 1ª derivada das soluções padrão em concentrações variáveis entre 3,0 e 30,0µg/mL de GP padrão, após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As leituras foram feitas em 244 nm	203
Tabela 53. Valores obtidos da 1ª derivada das soluções padrão em concentrações variáveis entre 3,0 e 30,0 µg/mL de GP padrão, após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As leituras foram feitas em 246 nm	204
Tabela 54. Valores obtidos da 1ª derivada das soluções padrão em concentrações variáveis entre 3,0 e 30,0 µg/mL de GP padrão, após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As leituras foram feitas em 251 nm	205
Tabela 55. Resultados obtidos com a espectrofotometria direta e derivada, após leitura de 9 alíquotas de uma solução padrão de concentração igual a 20,0 µg/mL, submetida a aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M	207
Tabela 56. Valores médios obtidos a partir de solução padrão de GP (3 alíquotas) e soluções preparadas com as amostras comerciais de comprimidos de GP – AS (9 alíquotas) após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. A concentração de leitura foi igual a 20,0 µg/mL de GP	210
Tabela 57. Valores médios obtidos a partir de solução padrão de GP (3	210

aliquotas) e soluções preparadas com as amostras comerciais de comprimidos de GP – AR (9 aliquotas) após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. A concentração de leitura foi igual a 20,0 µg/mL de GP

Tabela 58. Resultados obtidos após análise das amostras comerciais de comprimidos de GP (4 mg) segundo os métodos espectrofotométricos direto e derivado. A tomada de ensaio correspondeu a 100,0 mg de GP e os valores expressam a média da análise de 9 aliquotas

LISTA DE ABREVIATURAS/SIGLAS

A = amplitude

a = intersecção da reta

Abs – absorvância

ADA – American Diabetes Association

AG – amostra de genérico

AINEs – antiinflamatórios não-esteróides

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AR – amostra de referência

AS – amostra similar

AVC – acidente vascular cerebral

b = coeficiente angular

COX 1 e COX 2 – enzima araquidonato cicloxigenase 1 e 2

CV – coeficiente de variação

DCCT – Diabetes Control Complication Trial

DM – diabetes mellitus

DMG – diabetes mellitus gestacional

DMID – diabetes mellitus insulino dependente

DMNID – diabetes mellitus não insulino dependente

DP – desvio padrão

DPR – desvio padrão relativo

DS – diclofenaco sódico

ED – espectrofotometria derivada

GP – glimepirida

GP pad – glimepirida padrão

ICH – Internacional Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use

MA 1 / 2 – matriz analítica 1 / 2

MA 1 / 2 – matrizes analíticas 1 / 2

OMS – Organização Mundial da Saúde

POP – Procedimento Operacional Padrão

r = coeficiente de correlação ou de Pearson

RSD – relative standard deviation

SV – solução volumétrica

TTG – teste de tolerância à glicose

$\Delta \lambda$ = delta lambda

λ = lambda

RESUMO

O controle de qualidade de um fármaco ou forma farmacêutica exige adoção de metodologia analítica adequada. Com a validação, processo pelo qual são obtidos resultados estatisticamente significativos, pode-se garantir um produto final seguro e eficaz. Um método espectrofotométrico rápido e sensível foi desenvolvido para análise de diclofenaco sódico (DS) em comprimidos. Este método utiliza o metanol como reagente e o DS pode ser avaliado em 282 nm. A curva de calibração foi linear entre 4,0 e 22,0 µg/mL de DS. Um método espectrofotométrico derivado de primeira ordem foi desenvolvido para quantificação de glimepirida (GP) em comprimidos, usando NaOH 0,1M e aquecimento na faixa de 80-90°C entre 5-10 minutos. A avaliação da GP foi possível usando o método "zero-crossing" em 251 nm onde a interferência da lactose pode ser anulada. A curva de calibração foi linear de 3,0 a 30,0 µg/mL de GP. A substituição da lactose pelo carbonato de magnésio permitiu a quantificação de GP pela espectrofotometria direta em 230 nm. Os dois métodos apresentados e validados, revelaram boa linearidade, exatidão e precisão nas condições analíticas. Os excipientes comumente utilizados não interferem nos métodos propostos. As vantagens destes métodos são procedimentos analíticos simples, estabilidade, uso de reagentes e equipamentos de baixo custo e são adequados ao uso rotineiro nas análises farmacêuticas.

ABSTRACT

The quality control of an active substance or pharmaceutical dosage forms demands an adequate analytical methodology. With validation, process by which are obtained statistically significant data, it can be assured safe and efficient final product. A rapid and sensitive spectrophotometric method was developed for the analysis of diclofenic sodium (DS) in tablets. This method involves the use of methanol as background reagent and absorptions were taken at 282 nm. The calibration curves of DS were linear between 4.0 and 22.0 µg/mL. A first-derivative spectrophotometric method was developed for the analysis of glimepiride (GP) in tablets using 0.1M NaOH solution by heating at 80-90°C for 5-10 minutes. The determination of GP was possible using zero-crossing method at 251 nm, where the interference from lactose can be eliminated. The calibration curves of GP were linear between 3.0 and 30.0 µg/mL. The substitution of lactose with magnesium carbonate in simulated samples permitted quantification of GP with direct spectrophotometry at 230 nm. The two spectrophotometric methods described and validated, showed good linearity, accuracy and precision at determined conditions. The common excipients used as additive do not interfere in the proposed methods. The major advantage of these methods are simple analytical procedure, stability, use of reagents and apparatus of low costs and are suitable for routine pharmaceutical analysis.

1. INTRODUÇÃO

Na indústria farmacêutica, as normas que regem a atividade, produtos e processos são baseadas em trabalhos criteriosos adequadamente documentados, em atendimento aos princípios da validação. Esta, considerada como atividade necessária e obrigatória, tem conduzido a resultados significativos determinando melhoria no desempenho industrial e na qualidade de seus produtos.

Dentro de seus objetivos, o processo de validação geral permite o entrosamento das mais diferentes áreas ou setores da indústria e o destaque deve ser feito em relação à validação de métodos analíticos. Isto é justificado pelo fato de que a ausência de um método validado adequadamente pode comprometer todo o programa de validação.

No controle de qualidade de um fármaco ou forma farmacêutica é imprescindível a aplicação de uma metodologia de análise apropriada à aquele caso. A grande diversidade de formulações vem justificar a impossibilidade de aplicação irrestrita de metodologia oficial. A obtenção de dados experimentais estatisticamente confiáveis garante a utilização rotineira de um determinado método analítico e isto é possível com a validação (DUX, 1990).

Na validação de métodos analíticos para aplicação no controle de qualidade de medicamentos, qualquer que seja a natureza da amostra, deve ser considerado o potencial interferente dos componentes da forma farmacêutica. O fosfato de cálcio presente em comprimidos de tetraciclina como diluente determinou uma redução em cerca de 50% na biodisponibilidade do fármaco (LACHMAN, LIEBERMAN, KANIG, 2001). Na indústria farmacêutica um dos excipientes mais utilizados, a lactose pode interagir com fármacos que apresentam função amina em sua estrutura como a fluoxetina, sulfato de dextroanfetamina, lisinopril por exemplo determinando instabilidade do produto com comprometimento de sua eficácia (BLAUG e HUANG, 1972; KITSON, HUDSON, DICKINSON, 1976

WADE e WELLER, 1994; LI *et al*, 1996; WIRTH *et al*, 1998; EYJOLFSSON, 1998; GELBHAR BERTHOLDI, BUENO, BERGOLD, 2001).

Por mais simples que seja uma formulação, em maior ou menor grau, há possibilidade de um ou mais excipientes interferirem no desempenho do método analítico.

A idéia básica foi avaliar a interferência de excipientes na validação de métodos analíticos, permitindo a aplicação segura e confiável. Considerando a existência em nosso país de medicamentos pertencentes às classes de genéricos, similares e de referência o que representa uma grande variabilidade nas fórmulas, e com base no levantamento realizado no ano de 2000 junto à Regional de Saúde de Maringá (PR) que abrange 41 municípios, Secretaria Municipal de Saúde, hospitais particulares e públicos, farmácia 24 horas selecionou-se para estudo inicial o diclofenaco disponível na forma de comprimidos. O resultado então apresentado em termos de consumo e indicação deste princípio ativo não é muito diferente do obtido em recente pesquisa nacional. Analgésicos como Neosaldina®, Cataflan®, Novalgina® e Tylenol® ocupam respectivamente 1º, 2º, 4º e 5º lugares em termos de unidades vendidas. Em termos de valores, as posições não sofrem muita alteração: 2º lugar –Tylenol®, 3º lugar Dorflex®, 4º lugar Cataflan® e 5º lugar, o Viox® (MORAIS, 2003).

No mesmo levantamento, observou-se uma distribuição significativa de glibenclamida, um agente hipoglicemiante oral, confirmando dados da Organização Mundial de Saúde – OMS em relação ao aumento na incidência de diabetes *mellitus* (DM) prevendo a existência de cerca de 240 milhões de portadores desta doença até 2020 (JAGER, 2000; CHACRA, LERARIO, 2001; HERNANDEZ-HIERO, GONZALEZ, 2001).

A Organização Mundial da Saúde – OMS justifica o aumento nos índices de portadores de DM para os próximos 10 anos, principalmente pelos maus hábitos da vida moderna: dieta rica em gorduras, sedentarismo, stress e fumo representando um enorme problema de saúde pública. Decorrente destes fatores, atualmente a classe médica associa a obesidade, hipertensão, dislipidemias e hiperglicemia determinando o aparecimento da

síndrome plurimetabólica, síndrome X ou síndrome insulino-resistência que atinge um em cada quatro/cinco indivíduos (DeFRONZO, 1997; JAGER, 2000; DAVIS, GRANNER, 2001; OLIVEIRA, 2002).

Como o DM está associado ao aparecimento de complicações microvasculares específicas como retinopatia, nefropatia e neuropatia, assim como as macrovasculares - doença arterial coronariana, doença vascular periférica e doença arterial cerebrovascular, representadas pelo infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral (AVC) consideradas, nos dias de hoje, principais causas de mortalidade (SITEMEDICO, 2001; CHACRA, LERARIO, 2001; TAMBASCIA, COELHO, 2001; DAVIS, GARNER, 2003), o Diabetes Control Complication Trial - DCCT, que estuda portadores de diabetes *mellitus* tipo 1, mostrou que o controle estrito da doença pode prevenir e diminuir a incidência de manifestações crônicas micro e macrovasculares (GAMA, 2002).

Em nosso país, o número de portadores desta doença fica próximo a 9 milhões atingindo indivíduos na faixa etária entre 30/69 anos correspondendo a 7,6% e deste total, metade apenas tem consciência que está doente. Destes, 23% não se tratam resultando em cerca de 24.000 mortes por ano. O envelhecimento da população vem contribuindo para o aumento nos casos do DM, predominantemente em adultos e idosos. (JAGER, 2000;).

Estudos revelam que o impacto econômico do diabetes *mellitus* corresponde entre dois e 3% dos gastos totais com saúde em um país. Cerca de 0,2% do PIB do Brasil é destinado às internações hospitalares decorrentes do DM ou de suas complicações (OLIVEIRA, 2002).

Com o levantamento bibliográfico, observou-se a introdução do mais recente hipoglicemiante da classe das sulfoniluréias, a glimepirida (GP), cuja propriedade farmacológica tem sido mérito de intensa investigação. O fato de até a presente data os compêndios oficiais como United States Pharmacopeia (2002) e Bristish Pharmacopea (1999) não apresentarem monografia para análise da glimepirida, decidiu-se pelo desenvolvimento de

uma metodologia analítica avaliando ainda a possibilidade de interferência dos excipientes presentes em comprimidos de GP.

O uso da espectrofotometria UV-vis nos dias atuais foi destacada por Ciurczak (1999) que descreveu a aplicação da espectrofotometria derivada na análise de dois ou mais princípios ativos presentes em uma mesma formulação e na determinação de fármacos e seus derivados no plasma.

O bom desempenho dos métodos espectrofotométricos é justificado pelos resultados em termos de exatidão e precisão, além da sensibilidade que permite operar na quase totalidade dos fármacos. Outra característica importante é a comparação de amostra e padrão o que favorece o acompanhamento das operações analíticas. Emprego de equipamentos simples, existentes na maioria dos laboratórios analíticos, a fácil execução e custo relativamente baixo explicam o interesse pelo desenvolvimento e emprego de métodos espectrofotométricos.

2. OBJETIVOS

A proposta desta pesquisa foi:

1. desenvolver e validar um método analítico espectrofotométrico para determinação de diclofenaco sódico presente em comprimidos;
2. desenvolver e validar método analítico por espectrofotometria direta/derivada para determinação de glimepirida presente em comprimidos;
3. avaliar a interferência dos excipientes na análise quantitativa dos fármacos diclofenaco sódico e glimepirida presente em comprimidos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 – Generalidades sobre antiinflamatórios não-esteróides e diclofenaco

Os principais agentes antiinflamatórios são representados pelos glicocorticóides e antiinflamatórios não esteróides (AINEs) que estão entre os agentes terapêuticos de maior utilização. A indicação refere-se a queixas músculo-esqueléticas (ROBERT, MORROW; 2001, 2003) e são amplamente utilizados para dores menores sem a devida prescrição médica, conduta que caracteriza a prática da automedicação.

No mercado estão disponibilizados cerca de 50 AINEs, porém nenhum é o mais indicado para controle e/ou modificação da sintomatologia, principalmente das dores articulares comuns. São exemplos de AINEs de uso comum: aspirina, ibuprofeno, naproxeno, ácido mefenâmico, nabumetona, paracetamol, diclofenaco, sulindaco, indometacina, piroxicam, tenoxicam entre outros. Novos compostos estão sendo introduzidos como etodolaco, meloxicam e nimesulida (RANG, DALE, RITTER, 2001). São mencionados ainda a tolmetina e cetorolaco (ROBERT, MORROW, 2001).

Estes fármacos são pertencentes a diferentes classes químicas e apresentam três efeitos: antiinflamatório, analgésico e antipirético. Os efeitos farmacológicos se devem à inibição da atividade da enzima *araquiconato cicloxigenase* (COX), determinando uma redução no nível de formação dos precursores das prostaglandinas e tromboxanos a partir do ácido aracdônico. Esta enzima é representada por duas enzimas: a COX 1, presente na maioria dos tecidos inclusive nas plaquetas e relaciona-se à sinalização entre células e hemostasia tecidual, e a COX 2 que é induzida nas células inflamatórias quando são ativadas. Nesta fase, a COX 2 responde pela produção de mediadores prostanóides da inflamação (RANG, DALE, RITTER, 2001; ROBERT, MORROW, 2003).

Os graus de inibição dos AINEs atuais sobre as 2 enzimas são variáveis, mas é certo que a ação antiinflamatória está relacionada com a

inibição da COX 2 enquanto que os efeitos adversos referem-se à inativação da COX 1. Pesquisas clínicas preliminares que avaliam novos agentes como nimesulida, etodolaco e meloxicam com inibição seletiva para a COX 2 mostram poucos ou reduzidos efeitos gástricos (RANG, DALE, RITTER, 2001). Robert e Morrow (2001; 2003) assinalam que a COX 1 é constitutivamente expressa no estômago, explicando assim a reduzida toxicidade gástrica observada com o uso dos inibidores seletivos da COX 2, exemplificados com o rofecoxib, celecoxib, etodolaco e nimesulida.

Rasmussen e Binzer (2004) avaliaram vários AINEs na profilaxia e no tratamento agudo da enxaqueca considerando mecanismos de ação, efeitos colaterais e associações medicamentosas possíveis. O uso destes é seguro para pacientes jovens, enquanto idosos e portadores de distúrbios gástricos, hepáticos e renais devem ser monitorados

Figura 1. Estrutura química do diclofenaco sódico

3.1.1 - *Propriedades físico-químicas*

Diclofenaco sódico - $C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$, peso molecular igual a 318,1 g/mol. Pó cristalino branco ou levemente amarelado, pouco solúvel em água, facilmente solúvel em metanol, solúvel em etanol, fracamente solúvel em acetona, praticamente insolúvel em clorofórmio e éter. Fracamente higroscópico, deve ser mantido em recipiente fechado e ao abrigo de luz.

Ponto de fusão entre 283° e 285°C. (CLARKE'S, 1986; REMINGTON, 1995; MERCK, 1996; BRITISH PHARMACOPEA, 1999).

3.1.2 – Propriedades farmacológicas

O diclofenaco sódico (DS) foi introduzido no mercado mundial a partir de 1974 e é classificado como um antiinflamatório não-esteróide, derivado do ácido fenilacético. Apresenta ainda atividades analgésicas e ocasionalmente antipiréticas (REMINGTON, 1995; ROBERT, MORROW, 2003)

As indicações terapêuticas para efeito a longo prazo referem-se as doenças reumáticas como artrite reumatóide, osteoartrite e espondilite anquilosante nas formas aguda e crônica, artrite gotosa aguda, tratamento de dismenorréia primária e secundária. O DS também é indicado para tratamento a curto prazo nos casos de lesões atléticas, bursites, capsulites, sinovites, tendinites e tenosinovites. (MARTINDALE, 1993; CARVALHO, 2002; ROBERT, MORROW, 2003).

Sua atividade antiinflamatória pode ser considerada cerca de 2,5 vezes mais potente que a indometacina. Enquanto analgésico, sua potência é superior em mais de oito vezes à ação do ibuprofeno (REMINGTON, 1995).

Apresenta rápida absorção, seja após administração oral, retal ou intramuscular determinando um pico plasmático após 30 minutos. Sua ligação às proteínas plasmáticas é na ordem de 99%. A metabolização hepática origina principalmente o derivado 4-hidroxidiclofenaco além de outras formas hidroxiladas. Após a glicuronização e sulfatação determinando o aparecimento de conjugados glicuronídeos e sulfatos, a eliminação é predominantemente renal na ordem de 65% e em menor proporção, biliar (35%) (MARTINDALE, 1993; CARVALHO, 1998; ROBERT, MORROW, 2003)

Comprimidos, injetável, supositórios, solução oral, gel e pomadas são as formas de apresentação encontradas no mercado. A dose recomendada para dores moderadas é de 75 a 100 mg/dia. Como antiinflamatório, a

prescrição é de 150 a 200 mg/dia fracionadas (75 mg 2X/dia ou 50 mg 3 a 4 X/dia (REMINGTON, 1995, RANG, DALE, RITTER, 2001). A associação do DS ao misoprostol (análogo da prostaglandina) permite uma melhor eficácia do primeiro além de diminuir as complicações gástricas (ROBERT, MORROW, 2003).

Há divergências quanto ao efeito desejado após a aplicação tópica uma vez que as concentrações plasmáticas ficam próximas a 10% comparadas à administração oral. No entanto, há evidências de que concentrações substanciais podem ser alcançadas nos tecidos musculares e articulações onde o efeito antiinflamatório é alcançado (MEDSCAPE, 2004).

Butt e Fsadni (2004) considerando o pós-operatório de cirurgias de catarata e implante de lentes avaliaram comparativamente 2 formulações de colírios sendo o primeiro o Maxitrol® (dexametazona-neomicina-polimixina B) e uma segunda formulação contendo diclofenaco-gentamicina. A ausência de corticoesteróide e os resultados clínicos também favoráveis a esta segunda formulação, garantem sua indicação na recuperação de pacientes submetidos a este tipo de intervenção cirúrgica.

O DS é utilizado em diferentes países no tratamento de inúmeras doenças e como a maioria dos fármacos é, em potencial, causador de reações adversas. A ampla utilização, sob prescrição médica ou não, pode ser constatada com o levantamento realizado em Maringá e região, quando da determinação dos fármacos mais utilizados.

Os efeitos colaterais ocorrem em cerca de 20% dos pacientes que fazem uso de diclofenaco e cerca de 2% decidem pela interrupção no tratamento. Dentre os mais conhecidos estão os efeitos gastrointestinais representando um risco maior para pacientes acima de 60 anos. Clinicamente, estas alterações podem ser observadas na forma de dores abdominais, sensação de plenitude, flatulência e meteorismo, constipação e diarreia, náuseas, azia, dispepsia chegando a ulcerações gástricas e quadros hemorrágicos (MARTINDALE, 1993; ANACLETO, MELO, 2000). Outras respostas adversas são representadas pelos exantemas cutâneos,

reações alérgicas, retenção hídrica e edema podendo determinar efeitos no sistema nervoso central (ROBERT, MORROW, 2001).

A forma injetável merece atenção considerando a possibilidade de acidentes isquêmicos levando a abscessos e necrose tecidual (DICLOFENACO injetável ..., 2003; SANCHES HERARDO, TAMEZ PÉREZ, 2004) e em função disto, alguns países como os Estados Unidos têm adotado a conduta de não utilizar a forma injetável. A necrose caracterizada pelo rápido desenvolvimento de infecção da fáscia e gordura subcutânea, denominada Síndrome de Nicolau, tende a evoluir causando danos irreversíveis que exigem enxertos de pele e este quadro pode surgir independente do local de aplicação (músculos deltóide ou glúteo).

São considerados três fatores determinantes para o aparecimento desta injúria tecidual: embolia, angioespasmo e trombose. A presença de propilenoglicol utilizada na formulação injetável é a provável causadora da trombose. A embolia por sua vez pode ser explicada pela ação da pressão e velocidade no ato da aplicação, comprometendo áreas próximas. O angioespasmo pode ser explicado pela compressão dos vasos pelo próprio líquido injetado assim como pela lesão direta da agulha sobre o local (ANACLETO, MELO, 2000).

Observa-se o direcionamento das pesquisas para o desenvolvimento de representantes com maior seletividade para a COX 2. Estudos em culturas de células e estudos epidemiológicos e clínicos têm demonstrado o potencial dos AINEs como agentes anti-tumorais, principalmente os inibidores da COX 2.

Bernardi e Jacques-Silva (2003) descreveram que o papel da COX nas neoplasias foi sugerido após observação de altos níveis de metabólitos de ácido aracdônico com a prostaglandina E2. Tumores de cólon, mama, pele e bexiga apresentam significativamente a COX 2 que parece ser a responsável pela vascularização e crescimento do tumor. O crescimento *in vitro* de células tumorais pancreáticas e de câncer de mama foi inibido com o uso de inibidores da COX. Em vários modelos experimentais, observou-se uma redução na angiogênese e no crescimento celular de alguns

carcinomas. As reduções mais expressivas foram observadas com o uso de indometacina, diclofenaco e aspirina. Com a elucidação dos mecanismos moleculares e estudos clínicos mais detalhados, a abrangência de utilização destes fármacos poderá ser aumentada.

Subongkot *et al* (2004) fazem referências aos novos alvos para prevenção e tratamento de cancer. Nestes casos vem se observando significativa presença de ciclooxigenase 2 e vários mecanismos estão sendo propostos para explicar o papel desta enzima na proliferação de células neoplásicas e angiogênese. Nos estudos preliminares em animais e humanos, onde há inibição da síntese de prostaglandinas determinada pelo bloqueio da COX 2, foram observados efeitos de proteção contra alguns tipos de câncer (pulmão, pele, mama, bexiga, colon, pâncreas, ouvido e pescoço).

3.2 – Generalidades sobre diabetes mellitus, sulfoniluréias e glimepirida

A causa do diabetes *mellitus* (DM) ainda é uma incógnita, mas fatores genéticos e comportamentais como obesidade e sedentarismo podem ser responsabilizados pelo seu aparecimento (RAMALHO, 1998; GAMA, 2002; ASSOCIAÇÃO ..., 2002; DAVIS, GARNER, 2003).

O Instituto Nacional de Diabetes e Doenças Renais e Digestivas dos Estados Unidos estima que 16 milhões de americanos apresentam esta doença, representando um aumento de cerca de 5 milhões de indivíduos, comparados aos últimos 10 anos. Para cada 100.000 habitantes, existem 18 pessoas portadoras de DM tipo 1 e de 440 para DM tipo 2 sendo considerada na atualidade a quarta causa de mortes (CENTERWATCH, 2002).

Em Portugal, calcula-se que existam entre 400 a 500 mil diabéticos ASSOCIAÇÃO..., 2002).

Segundo a AVENTIS PHARMA - Divisão Índia, de cada 20 adultos provavelmente um é diabético e sem consciência deste estado (AVENTIS,

1,68 % representando 100.000 pessoas ao ano com mortalidade de 2,38% (PATHOINDIA, 2003). Uma pesquisa para estimar o predomínio de diabetes *mellitus* tipo 2 entre trabalhadores de fábricas no Sul de Kerala (Sul da Índia) revelou uma proporção de 11 portadores para cada 1000 indivíduos (PISHARODY, NAIR, RAMANKUTTY, 1997).

No Reino Unido estima-se em 17 portadores de DM tipo 1 para cada 100.000 habitantes, enquanto na Finlândia esta proporção sobe para 43 diabéticos. França, Itália e Israel apresentam dados semelhantes com cerca de 8 portadores de DM tipo 1 e 100-250 de DM tipo 2 para cada 100.000 habitantes (DAVIS, GARNER, 2001).

A doença diabetes *mellitus* é caracterizada por um metabolismo desordenado dos carboidratos devido à deficiência de insulina, hormônio este necessário para conversão de amido, açúcares e outros alimentos em fonte energética para o organismo (HERNANDEZ-HIERO, GONZALEZ, 2001; RANG, DALE, RITTER, 2001). As causas desta deficiência podem ser pela lesão das células *beta* das ilhotas de Langerhans existentes no pâncreas, ou pela inativação da insulina ou ainda, pelo aumento das necessidades do hormônio como ocorre na obesidade (MELO, 1998; RAMALHO, 1998; DAVIS, GARNER, 2001; SITEMEDICO, 2001; ASSOCIAÇÃO ..., 2002).

Com a falta de insulina, as células não recebem a glicose obrigando-as a buscar fontes alternativas de energia como proteínas (músculo) e gordura (tecido adiposo). Há assim um aumento de glicose circulante (hiperglicemia) causando, por sua vez, elevação da pressão osmótica intravascular, que promove transferência de líquido de outros compartimentos celulares resultando em desidratação celular (RANG, DALE, RITTER, 2001; SITEMEDICO, 2001; ASSOCIAÇÃO ..., 2002).

Em paralelo, a capacidade renal de reabsorção da glicose em concentrações acima de 170 mg/dL é comprometida, causando a glicosúria, ou seja, presença de glicose na urina em proporções acima do normal. Esta concentração mais elevada provoca um aumento na pressão osmótica

dificultando a reabsorção tubular de água o que significa desidratação extracelular (DAVIS, GARNER; 2003).

Estas modificações fisiológicas explicam os sinais clássicos do DM: poliúria – pela incapacidade do rim em reabsorver água; polidipsia – pela desidratação intra e extracelular e, polifagia – pela falta de energia da glicose (RANG, DALE, RITTER, 2001; SITEMEDICO, 2001; ASSOCIAÇÃO ..., 2002; DAVIS, GARNER, 2003). A deficiência de insulina provoca um definhamento em função da degradação acentuada de proteínas e da redução na síntese protéica, caracterizando rápida perda de peso do indivíduo. A cetose observada nos diabéticos é decorrente da metabolização acelerada de gorduras em acetil-CoA, que por sua vez origina derivados cetônicos facilmente perceptíveis no hálito dos diabéticos (RANG, DALE, RITTER, 2001).

A classificação da DM de acordo com a Associação Americana de Diabetes baseia-se na etiologia da doença. Estão descritos dois tipos principais de DM: tipo 1, caracterizado pela ausência de insulina no organismo que também é conhecida como DM insulino dependente ou diabetes de início juvenil e a tipo 2, cujo sinônimo é DM não insulino dependente ou diabetes de início na maturidade (RANG, DALE, RITTER, 2001, DAVIS, GARNER, 2001). São descritos ainda a DM gestacional e DM decorrentes de fatores ambientais como agentes químicos e vírus ou ainda pelo uso de medicamentos diabetogênicos (DAVIS, GARNER, 2001; UNIMEDS, 2001; SITEMEDICO, 2001).

Na DM tipo 1, a ausência de insulina no organismo pode ser explicada por genes relacionados à obesidade, resistência insulínica e à destruição nas células *beta* do pâncreas. Alguns autores consideram ainda o ataque do próprio sistema imunológico sobre estas células. Há necessidade de administração do hormônio diariamente (CHACRA, LERRARIO, 2001; DAVIS, GRANER, 2001; RANG, DALE, RITTER, 2001; GAMA, 2002; ASSOCIAÇÃO..., 2002) e considerando a inviabilidade de administrar insulina via oral em função de sua destruição pelo estômago, a forma disponível e segura de administração da insulina é por injeção na gordura

abaixo da pele (subcutânea) (ASSOCIAÇÃO..., 2002). Sem a instituição da terapia insulínica, o paciente pode morrer de cetoacidose diabética.

Observa-se o desenvolvimento deste tipo de DM pela primeira vez, em crianças e jovens geralmente não obesos e a incidência é dez vezes maior em parentes de primeiro grau a partir de um caso inicial (RANG, DALE, RITTER, 2001). No estudo conduzido por Ruggiero *et al* (1999) foram avaliados 1875 indivíduos diabéticos e destes, 258 apresentavam a DM tipo 1, estavam na faixa dos 40 anos e eram portadores há cerca de 24 anos.

Os portadores de DM tipo 1 podem ter uma vida saudável sem grandes limitações desde que sigam o tratamento de forma correta. Controlando o nível de glicose no sangue o mais próximo dos limites normais, mesmo sem a apresentação de sintomas, pode-se prevenir as manifestações tardias como retinopatia, nefropatia, má circulação nos membros inferiores e danos cardiovasculares como infarto e trombooses, e ainda diminuir os riscos das descompensações agudas – hiper/hipoglicemia e cetoacidose (ASSOCIAÇÃO...2002, DAVIS, GARNER, 2003).

Harmel (2004) reconhecendo estas complicações micro e macrovasculares como importantes em pacientes diabéticos, apresenta resultados clínicos onde, além do efeito hipoglicemiante, os níveis de colesterol e triglicerídeos foram reduzidos sensivelmente com o uso de metformin, troglitazova e pioglitazona.

A base de tratamento para portadores de DM tipo 1 e alguns com DM tipo 2 refere-se à administração de insulina, via intravenosa ou via intramuscular. Para o tratamento crônico predomina a aplicação subcutânea (DAVIS, GARNER, 2001). As insulinas utilizadas na clínica médica podem ser de origem suína (que difere da humana em um aminoácido), a bovina (que apresenta outros dois aminoácidos – alanina e valina substituindo, respectivamente treonina e isoleucina) e a humana.

A insulina humana pode ser obtida por tecnologia de DNA recombinante ou através de processos enzimáticos que convertem a insulina suína em humana onde um aminoácido (treonina) é substituído na cadeia

terminal B por outro aminoácido (alanina) o que permite maior solubilidade em água (DAVIS, GARNER, 2003; ASSOCIAÇÃO..., 2002). Em resumo, as propriedades físico-químicas das diferentes insulinas são justificadas pelas seqüências de aminoácidos. Em Portugal é comercializada uma insulina igual à humana, produzida por técnicas de engenharia genética e a baixa incidência observada de reações alérgicas é reputada ao seu grau de pureza. (ASSOCIAÇÃO..., 2002).

Em função do início de tempo de ação e duração as insulinas podem se divididas em ação curta (início entre 30 minutos a 1 hora e duração entre 4 a 6 horas), ação intermediária e prolongada (início entre 1 e 3 horas e duração entre 18 a 24/36 horas). O tempo de ação das diferentes insulinas depende da variabilidade dos comportamentos individuais (RAMALHO, 1998; SITEMEDICO, 2001; DAVIS, GARNER, 2003).

O presidente da Associação Latino-Americana de Diabetes, Dr. Antonio Chacra, divulgou que a partir do segundo semestre de 2003 nosso país já disporia da nova insulina, denominada insulina glargina, com atividade hipoglicêmica por até 24 horas com a vantagem de uma única aplicação e menores riscos de hipoglicemia (FRAZÃO, 2003). Esta insulina é análoga à insulina humana obtida por tecnologia recombinante a partir de cepas não patogênicas de *Escherichia coli* (K12). A diferença estrutural é na posição 21 da cadeia A onde o aminoácido asparagina é substituído por um aminoácido glicina e são adicionados dois aminoácidos arginina no final da cadeia B. A fórmula empírica é $C_{267}H_{404}N_{72}O_{78}S_6$ com peso molecular de 6003 g/mol.(CLÍNICA DIABETOLÓGICA, 2003).

O laboratório farmacêutico AVENTIS PHARMA, responsável pela produção da insulina glargina com o nome de LANTUS®, faz referências na limitação de uso para crianças e pacientes com deficiência renal ou hepática. Alertam ainda sobre as interações medicamentosas com outros agentes hipoglicemiantes orais, fluoxetina, inibidores da MAO, salicilatos, sulfonamidas, corticóides, diuréticos entre outros e os efeitos sobre a capacidade de conduzir e manusear maquinários (INSTITUTO NACIONAL...2003).

São situações indicativas de aplicação da insulinoaterapia: pacientes muito sintomáticos em termos de sede, poliúria, glicemia de jejum acima 140 mg/dL, hemoglobina glicosilada (Hb A_{1c}) superior a 8% e/ou surgimento de grave disfunção renal (SITEMEDICO, 2001).

Além da aplicação subcutânea de insulina, há uma alternativa eficiente sem a necessidade da picada, que é a administração através de um aerossol para inalação pulmonar, utilizando um aparelho semelhante aquele utilizado por pacientes asmáticos. Até o momento só está disponibilizada a insulina de ação rápida para aplicação por via pulmonar. Segundo a Associação Protetora de Diabéticos de Portugal (ASSOCIAÇÃO...,2002), estudos comparativos entre as 2 vias de administração insulínica revelaram resultados excelentes quando o controle da glicemia é bem conduzido, além de se eliminar as injeções. No entanto, alertaram sobre a necessidade de aplicação convencional de insulina de ação prolongada à noite.

Bloomgarden (2004) destaca a importância da administração de insulina via nasal considerando suas vantagens, mas alerta sobre o comprometimento da absorção em casos de doenças pulmonares. O artigo apresenta os resultados clínicos obtidos nos estudos que avaliaram medicamentos como Exubera®, AIR particle technology®, AERx®, Alveair® e Tecnosphere®.

As novidades e perspectivas dizem respeito a outras formas de administração de insulina como aplicação nasal, retal e transdérmica. Estão investigando ainda, os comprimidos de insulina com revestimento adequado para garantir a integridade desta no trato gastrintestinal. Ressalvas no entanto são feitas sobre o processo de absorção que seria lento determinando um tempo de ação muito prolongado trazendo dificuldades no monitoramento glicêmico (DAVIS, GARNER, 2001; ASSOCIAÇÃO ..., 2002).

As bombas de perfusão contínua com aplicação de insulina através de um catéter inserido embaixo da pele do abdome estão sendo aperfeiçoadas a cada dia. São muito comuns nos Estados Unidos e Europa apesar do alto custo em termos de aparelho, insulina e demais componentes. Este fato implica na limitação de uso, principalmente para

aqueles países que necessitam importá-las (ASSOCIAÇÃO ..., 2002). Adolescentes que apresentam retardo no crescimento, pacientes com expectativa de vida longa, ou aqueles que planejam gravidez, ou ainda aqueles pacientes de difícil controle mesmo com adesão ao tratamento podem ser beneficiados com o uso deste tipo de aparelho (RAMALHO,1998).

Weissberg-Benchell *et al* (2003) avaliaram 1.547 pacientes usuários da infusão contínua de insulina, via subcutânea. Consideraram entre outros aspectos, idade do paciente, duração da doença, tempo de utilização desta terapia, glicemia, hemoglobina glicosilada e doses de insulina. Os resultados indicaram que a terapia de infusão contínua melhora significativamente o controle da glicemia, com redução da hemoglobina glicosilada e manutenção da média glicêmica. Também foram avaliados complicações em potencial do uso da terapia como hipoglicemia, cetoacidose diabética, mau funcionamento da bomba de insulina e infecções locais. Os resultados comparativos entre esta terapia e a convencional não revelaram diferenças significantes.

Encontram-se disponíveis até o momento apenas em centros de pesquisas, bombas semelhantes ao marco-passo cardíaco com perfusão de insulina diretamente no peritônio na tentativa de simular condições fisiológicas (ASSOCIAÇÃO ..., 2002).

O transplante de pâncreas tem indicação para aqueles casos de diabetes cujos pacientes já apresentaram insuficiência renal crônica com possibilidades de transplante renal. Nestas circunstâncias, os transplantados que requerem terapia especializada, apresentam riscos maiores. Por isto, o transplante deve ser considerado como última alternativa. A possibilidade de transplantar células produtoras de insulina para o fígado tem sido avaliada e o destaque se faz em relação ao número de células a serem transplantadas e ao mecanismo de rejeição, aspectos merecedores de estudos mais aprofundados (ASSOCIAÇÃO ..., 2002).

O transplante de parte do pâncreas apresentou resultados satisfatórios em pacientes com a doença em estado avançado e com

complicações, apesar da técnica ser complexa. Em tese, o transplante das ilhotas parece ser menos complicado. Um novo esquema imunossupressor isento de glicocorticóides e a técnica baseada na introdução de um gene da insulina ativa em células de roedores (como fibroblastos) que podem ser reintroduzidas no hospedeiro se constitui em alternativa recente para tratamento do DM (DAVIS, GARNER, 2003).

O DM tipo 2 é a forma mais freqüente desta moléstia representando cerca de 90% dos casos diagnosticados atualmente no mundo (RAMALHO, 1998; TAMBASCIA, COELHO, 2001; DAVIS, GARNER, 2003). Considerando a população idosa, o predomínio de obesos e hábitos de vida sedentários, esta doença atinge proporções epidêmicas nos Estados Unidos (CENTERWATCH, 2002). Dados da OMS de 1994 revelaram cifras próximas a 100 milhões de pacientes diabéticos, com uma previsão pessimista de alcançar a 215 milhões nos próximos 15 anos (CHACRA, LERARIO, 2001; DAVIS, GARNER, 2003; HERNANDEZ-HIERO, GONZALEZ, 2001; RANG, DALE, RITTER, 2001).

Nas pesquisas de Ruggiero *et al* (1999), dos 1.875 diabéticos avaliados 1.617 eram portadores da DM tipo 2 há cerca de 11 anos e apresentavam-se na faixa etária dos 63 anos. O predomínio do diabetes do tipo 2 está intimamente ligado à média de peso da população e à incidência aumenta com o avanço da idade decorrente do declínio funcional das células beta (RANG, DALE, RITTER, 2001). A adiposidade, em especial a visceral/abdominal, dada pela ingestão excessiva de alimentos gordurosos está diretamente relacionada à resistência insulínica e à DM (80% dos diabéticos tipo 2 são obesos). Isto significa que medidas de controle no peso são procedimentos importantes para diminuir o risco do desenvolvimento da doença ou amenizar um quadro diabético já existente (CHACRA, LERARIO, 2001; GAMA, 2002; ASSOCIAÇÃO ..., 2002).

No DM tipo 2, o pâncreas tem capacidade de produzir insulina em concentração basal normal. No entanto, hábitos alimentares inadequados, vida sedentária e até o stress tomam o organismo resistente à ação do hormônio com comprometimento na sua regulação. Em consequência, há

uma sobrecarga de trabalho do órgão até o ponto em que não se produz mais insulina em quantidade suficiente à necessidade (ASSOCIAÇÃO ..., 2002). Esta característica de insulino-resistência pode ser adequadamente controlada com a prática regular de atividade física (CHACRA, LERARIO, 2001; RANG, DALE, RITTER, 2001; TAMBASCIA, COELHO, 2001; HERNANDEZ-YERO, GONZALEZ, 2001; ASSOCIAÇÃO ..., 2002; GAMA, 2002).

A diminuição na formação de glicogênio muscular parece ser a causa real da insulino-resistência (GAMA, 2002). Este tipo de DM está freqüentemente associada à hipertensão arterial, obesidade e dislipidemia o que faz ser também conhecido como síndrome plurimetabólica (CHACRA, LERARIO, 2001; GAMA, 2002; ASSOCIAÇÃO ..., 2002). Anormalidades como resistência periférica à insulina, a produção hepática excessiva de glicose e a redução na secreção do hormônio conduzem à hiperglicemia.

Dentre as complicações agudas do DM podem ser citadas ainda a sudorese, palidez, fome intensa, tremores, vômitos, hálito cetônico, sonolência, chegando à confusão mental e coma. Comumente associados à DM estão descritas alterações em termos de triglicéides e colesterol, hipertensão arterial (RAMALHO, 1998; DAVIS, GARNER, 2001; RANG, DALE, RITTER, 2001), além de infecções urinárias, periodontais, colecistites, furunculose e candidíase vulvar (SITEMEDICO, 2001).

A terceira forma de manifestação da DM ocorre em cerca de 2 a 3% das gestações e é definida como intolerância variável a carboidrato com início reconhecido durante a gravidez (GABBE *et al*, 1998). Os hormônios gestacionais - lactogênio placentário, estrógeno e progesterona aumentam a necessidade insulínica (RAMALHO, 1998).

Na avaliação do DM gestacional (DMG) são aplicados os mesmos critérios empregados na ausência da gravidez, como glicemia de jejum, teste de tolerância à glicose e hemoglobina glicosilada.

O rastreamento do DM gestacional deve ser realizado entre a 24ª e 28ª semana de gestação e o teste é considerado positivo, quando após uma hora da ingesta de 50 g/dL de glicose, a glicemia apresenta-se em torno de

140mg/dL. Diante destes valores é realizado o Teste de Tolerância à Glicose (TTG) a partir de 75g de glicose administrada via oral. A positividade para DMG é reconhecida quando o resultado de glicemia de jejum se aproxima de 126 mg/dL e/ou a glicemia é igual a 140 mg/dL após 2 horas. Resultados glicêmicos em torno de 185 mg/dL, após 1 hora da ingesta de 50 g de glicose, são indicativos de DM gestacional (UNIMEDS, 2001).

Gabbe *et al* (1998) avaliaram respostas de 1250 obstetras/ginecologistas sobre os cuidados com o DMG. Deste total, 96% afirmaram que conduzem uma avaliação sobre a possibilidade de DMG e 55% avaliam a DM em pacientes não grávidas se há algum relato da doença na família. Do total, 62% acreditam que pacientes com DMG estão com risco de desenvolver outro tipo de diabetes mais tarde e 71% recomendam a avaliação através do teste de tolerância à glicose. De todos os profissionais avaliados, 99% prescrevem anticoncepcionais às mulheres que apresentaram DMG e o acompanhamento pós-parto é importante para detectar o aparecimento em potencial da DM tipo 2 na mãe.

Em gestantes com DM pré-existente há o risco de complicações neonatais, assim como de malformações ósseas, aborto, macrossomia, anomalias cardíacas, nervosas e esqueléticas, hiperbilirrubinemia, hipocalcemia, hipoglicemia neonatal, síndrome de regressão caudal, síndrome do desconforto respiratório (RAMALHO, 1998; ABERG, WESTBOM, KÄLLÉN, 2001).

Aberg *et al* (2001), considerando que a DM tipo 1 está associada ao desenvolvimento de riscos de má formação congênita em crianças, decidiram avaliar se esta afirmação era verdadeira também em casos de diabetes gestacional. Para tanto, foram avaliados 1,2 milhão nascimentos entre 1987 e 1997 na Suécia, sendo o grupo constituído de 3864 mães com diabetes pré-existente e 8688 de mães que desenvolveram diabetes gestacional. Naqueles casos de diabetes pré-existente, certas condições foram mais comuns que o esperado como fissura orofacial, defeitos cardiovasculares, atresia intestinal/esofageana, hipospadia, redução de membros, má formação de coluna vertebral, polidactilia correspondendo a

9,5%. Os casos de má formação observados com mães que desenvolveram a DM na gestação corresponderam a 5,7%, valor este muito próximo ao valor de casos de deformação que ocorrem com a população normal. Sugeriram ainda a possibilidade de existir um subgrupo dentro da diabetes gestacional, o diabetes embriopática, decorrente talvez de um DM tipo 2 pré-existente mas não detectado.

Considerando as implicações desta doença, a estratégia de tratamento consiste em princípio, na adesão de um programa de orientação alimentar individual acompanhado de prática regular de atividade física. Vale ressaltar que a conduta de controle domiciliar da glicemia é indicada e os resultados são positivos. Maiores informações sobre a doença, as diferentes terapias, as consequências da DM não tratada ou inadequadamente controlada devem ser sempre enfatizadas aos diabéticos (CHACRA, LERARIO, 2001; UNIMEDS, 2001; HERNANDEZ-YERO, GONZALEZ, 2001; TAMBASCIA, COELHO, 2001). Não havendo a normalização do quadro diabético através da dieta e da atividade física, faz-se necessária a introdução de agentes hipoglicemiantes orais.

Atualmente existem vários grupos terapêuticos para tratamento do DM tipo 2 ou diabetes *mellitus* não insulino dependente (DMNID). Estas drogas podem ser classificadas como as secretagogas de insulina (sulfoniluréias e repaglinida), as sensibilizadoras de insulina (metformina e troglitazona) e as inibidoras da *alfa* glicosidase (acarbose) (CHACRA, LERARIO, 2001; TAMBASCIA, COELHO, 2001; GAMA, 2002; HERNANDEZ-YERO, GONZALEZ, 2001; DAVIS, GARNER, 2001; RANG, DALE, RITTER, 2001; DIABETESNET, 2002).

Na medida que o diabetes evolui, o tratamento precisa ser dinâmico e adequado às fases intermediárias da doença. Percebe-se com a evolução da doença, a associação da resistência insulínica à deficiência na secreção do hormônio e é nesta fase que um outro grupo de hipoglicemiantes é indicado – as sulfoniluréias. Estas podem ser utilizadas em conjunto ou não com os outros agentes hipoglicemiantes.

As sulfoniluréias são classificadas como secretagogas de insulina por estimular a secreção do hormônio, tanto basal como após ingestão de alimentos, diretamente sobre as células *beta* pancreáticas (DAVIS, GARNER, 2003). Estão indicadas para pacientes acima de 30 anos com peso normal, com células *beta* funcionantes e nos quais a dieta e atividades físicas não foram suficientes para controlar o quadro (MEDYNET, 2003). Deve-se considerar as contra-indicações das sulfoniluréias para DM tipo 1 como indivíduos sensíveis a sulfonamidas, insuficiência hepática ou renal e gestação uma vez que ao atravessar a placenta atua sobre as células *beta* fetais determinando hipoglicemia severa (RANG, DALE, RITTER, 2001).

As sulfoniluréias foram introduzidas nos Estados Unidos em 1954 e considera-se a existência de três gerações (HERNANDEZ-YERO, GONZALEZ, 2001; TAMBASCIA, COELHO, 2001). Os membros desta classe são arilsulfoniluréias substituídas e diferem pelas alterações estruturais na posição *para* do anel benzênico e em um resíduo de nitrogênio do componente uréia (DAVIS, GARNER, 2001; 2003).

A clorpropamida é a representante do primeiro grupo, enquanto a glibenclamida, glipizida e glicazida relacionam-se às de segunda geração e encontram-se disponíveis em quase todos os países. No entanto, outras são encontradas num único país como por exemplo, a carbutamida (França), glixosepide (Alemanha), glimidina e glicopiramida (Japão), tolazamida (EUA) e glipentide (Espanha). Embora não existam evidências de vantagens das de segunda geração sobre as de primeira, alguma referência é feita em termos de potência maior com melhor absorção gastrointestinal superior (HERNANDEZ-YERO, GONZALEZ, 2001) e diferenças no tempo de ação e metabolização (TAMBASCIA, COELHO, 2001). A representante das sulfoniluréias de terceira geração é a glimepirida (GP) desenvolvida nos laboratórios HOECHST há cerca de 15 anos.

A ação mais importante das sulfoniluréias é diretamente sobre as células *beta*, liberando a insulina. Portanto, para se utilizar estes agentes é necessário que se tenha reserva do hormônio (GAMA, 2002). Quando o nível de glicose se eleva no sangue, a atividade das células *beta* também

aumenta ocasionando maior geração de ATP e provocando o fechamento dos canais de potássio (ou canais ATP sensíveis). Com isto, a célula se despolariza e os canais de cálcio se abrem permitindo entrada de cálcio para o interior celular. Assim, uma série de reações intracelulares ocorre, culminando com a saída dos grânulos de insulina pré-formada. As sulfonilurêias agem da mesma maneira, ou seja, ligam-se ao receptor específico na célula *beta* promovendo o fechamento do canal de potássio, implicando na despolarização da membrana com entrada de cálcio seguida da liberação da insulina (UNIMEDS, 2001; DAVIS, GARNER, 2001; TAMBASCIA, COELHO, 2001; GAMA, 2002; DIABETESNET, 2002). O que se discute é se os canais de potássio e os receptores do fármaco são distintos, uma vez que estes canais estão presentes em outros órgãos como coração e outras células (células endoteliais) o que poderia explicar a possibilidade de efeitos cardiovasculares indesejáveis (UNIMEDS, 2001; TAMBASCIA, COELHO, 2001; DIABETESNET, 2002).

Sabe-se atualmente que os fármacos deste grupo se unem a um receptor constituído de duas unidades (140 kDa e 64 kDa) com diferentes níveis de afinidade e reversibilidade de ligação. As ligações com a unidade 140 kDa são mais prolongadas e irreversíveis do que as com a outra unidade (GAMA, 2002). Talvez isto justifique a vantagem da glimepirida frente às outras sulfonilurêias, no que se refere à ligação específica aos receptores da célula *beta* e aos efeitos colaterais menores (UNIMEDS, 2001; DAVIS, GARNER, 2001; TAMBASCIA, COELHO, 2001).

São candidatos em potencial ao uso de sulfonilurêias, pacientes com DM tipo 2 não obesos que apresentam reserva pancreática de insulina de preferência com diagnóstico estabelecido há menos de cinco anos. Em cerca de 15% dos pacientes com DMNID recém-diagnosticados pode ocorrer a falência primária, ou seja, ausência na resposta à ação das sulfonilurêias (CHACRA, LERARIO, 2001).

A maior complicação do tratamento com este grupo de fármacos é a hipoglicemia (DIABETESNET, 2001; CHACRA, LERARIO, 2001; DIABETESNET, 2001; DAVIS, GARNER, 2003). Os sintomas deste quadro

são mais freqüentes em pacientes com glicemia normal ou próxima da normalidade sob tratamento a menos de quatro anos e naqueles que possam estar utilizando também drogas potencializadoras do efeito hipoglicêmico como antiinflamatórios não esteróides, sulfonamidas, cumarinas, agentes bloqueadores *beta* adrenérgicos, salicilatos, cloranfenicol, etanol e inibidores da monoamino-oxidase que agem deslocando as sulfoniluréias das proteínas de ligação, aumentando assim a fração livre do fármaco (PDR, 1997; CHACRA, LERARIO, 2001; DAVIS, GARNER, 2003).

Figura 2. Estrutura química da glimepirida

3.2.1 – Propriedades físico-químicas

Glimepirida - $C_{24}H_{34}N_4O_5S$ e peso molecular igual a 490,62 g/mol.

Cristais brancos ou levemente amarelados, inodoros, praticamente insolúveis em água e ponto de fusão de 207°C. Identificada como 1-[[p-[2-(3ethyl-4-methyl-2-oxo-3-pyrroline-1-carboxamido) ethyl] phenyl] sulfonyl] -3-(trans-4-methylcyclohexyl) urea. (PDR, 1997; MERCK, 1996).

3.2.2 – Propriedades farmacológicas

Em contraste às demais sulfoniluréias, a glimepirida tem a capacidade de reduzir a resistência insulínica e não causar hipoglicemia. Parece também não reduzir a glicose no sangue daqueles pacientes que

apresentam função renal prejudicada, uma vez que, a droga não se acumula no organismo. O fato de não afetar vasos sanguíneos e artérias coronarianas se constitui em outra vantagem quando da escolha desta para o tratamento do DM tipo 2 (TAMBASCIA, COELHO, 2001; UNIMEDS, 2001; DIABETESNET, 2002). Em outras palavras, o fato de apresentar ligação específica ao receptor, sem interagir com células endoteliais e do miocárdio, não determina efeitos cardiovasculares indesejáveis.

Dose única, absorção independente da alimentação, menos incidência de hipoglicemia, vida média plasmática de 8-10 horas podendo ser indicada a idosos ou diabéticos obesos são as principais vantagens descritas para a glimepirida quando comparadas às outras representantes deste grupo como tolbutamida, glipizida e glibenclamida (MEDYNET, 2003).

São considerações vantajosas na utilização da glimepinda, segundo Gama (2002), a meia vida curta com menor risco de hipoglicemia, ausência de interferência com os canais de potássio no miocárdio, ligação reversível e menos prolongada com subunidade 64 kDA. O controle glicêmico é obtido com doses entre 1 e 8 mg/dia, as mais baixas em comparação às outras sulfoniluréias e outros grupos de agentes hipoglicemiantes (ALTINOZ, TEKELI, 2001; GAMA, 2002), além de poder ser utilizada em dosagem única (SITEMEDICO, 2001; CENTERWATCH, 2002; BANQUE ..., 2001) habitualmente pela manhã (ASSOCIAÇÃO..., 2002).

Após administração oral, a glimepinda é completamente absorvida no trato gastrointestinal atingindo pico máximo de concentração por volta de 2/3 horas após a ingestão. Sua ligação a proteínas plasmáticas é na ordem de 99,5% e meia vida plasmática entre 1,3 a 3,4 horas (PDR, 1997; HERNANDEZ-YERO, GONZALEZ, 2001; BANQUE..., 2001; MEDYNET, 2003).

A glimepirida é metabolizada por biotransformação oxidativa, seja após administração oral ou intravenosa, parecendo estar envolvido o citocromo 450 IIC9. Este citocromo também é importante na metabolização de outras drogas como fenitoína, diclofenaco, ibuprofen, naproxeno e ácido mefenâmico indicando com isto possibilidade de interações medicamentosas

entre estes e a glimepirida (PDR, 1997). Os metabólitos formados são os derivados ciclohexilhidroximetil (M1) e o carboxil (M2) presentes em cerca de 80% na urina com predomínio do M1. A glimepirida por sua vez é detectada predominantemente no soro (LEHR, DAMM, 1990). A eliminação é de cerca de 35% da dose por via fecal e 58% por via renal (BANQUE..., 2001).

Interações com suplementos alimentares como vitamina B3 (niacina), magnésio e lítio (utilizado também no tratamento de quadro maniaco-depressivo) são relatadas considerando o potencial destes de induzirem a hipoglicemia (LAURUSHEALTH, 2002;). Uma pesquisa onde pacientes diabéticos tipo 2 sob medicação hipoglicemiante receberam doses diárias de 120 mg de extrato de *Ginko biloba* por 3 meses, revelou uma redução significativa na tolerância à glicose (MYCUSTOMPAK, 2003).

Não foram observados nos estudos em animais expostos a grandes doses de glimepirida, efeitos carcinogênicos ou teratogênicos. Seu uso em pediatria ainda não foi estabelecido com segurança. Náuseas, dor de cabeça, astenia, vômitos, diarreia, desconforto abdominal são alguns sintomas relatados por cerca de 1% dos pacientes que fizeram uso da glimepirida. Também na mesma porcentagem descrevem-se reações alérgicas com urticárias, eritema e erupção maculopapular (PDR, 1997).

Evidências experimentais demonstram que a glimepirida apresenta ainda efeitos hipoglicemiantes extrapancreáticos independente da liberação de insulina (efeito poupador deste hormônio), aumentando a captura de glicose no tecido adiposo e muscular. Consideram haver um mecanismo duplo de controle na redução da glicemia (CHACRA, LERARIO, 2001; BANQUE..., 2001). No entanto, argumentos contra esta atividade são descritos considerando, por exemplo, que não se conseguiu reduzir o nível de glicemia em diabéticos do tipo 1 e em animais pancreatetomizados (HERNANDEZ-YERO, GONZALEZ, 2001).

Ao se comentar sobre DM é importante lembrar os resultados obtidos com dois importantes estudos. O primeiro estudo refere-se ao Diabetes Control and Complication Trial – DCCT, que envolveu 29 centros de saúde dos Estados Unidos e Canadá no período de 1983 a 1993, avaliando 1441

portadores de DM tipo 1. Procedeu-se a uma avaliação comparativa entre tratamento convencional e intensivo e os resultados mostraram que o uso intensivo de insulina retardou ou reduziu o aparecimento das complicações como retinopatia (76%), neuropatia (50%) e nefropatia (66%) diabéticas. Há recomendações sobre um controle alimentar e atividade física permanente com 4 ou mais autoglicemias acompanhadas da administração de insulina de 3 a 4 vezes ao dia (ASSOCIAÇÃO..., 2002).

Davis e Garnner (2003) fizeram referências ao University Group Diabetes Program ou UGDP, cuja finalidade foi avaliar o efeito da dieta, da tolbutamida ou fenformina e da terapia insulínica sobre o aparecimento de complicações cardiovasculares na DM tipo 2. Os autores mencionaram que durante um período de oito anos foi observado um aumento no número de mortes decorrentes de complicações cardiovasculares naqueles pacientes sob administração de tolbutamida. Apesar deste resultado, durante 10 anos procurou-se avaliar a validade desta conclusão.

Um segundo estudo, o United Kingdom Prospective Diabetes Study – UKPDS, avaliou 5102 diabéticos tipo 2 durante o ano de 1998. A avaliação baseou-se na análise comparativa entre dois grupos: um sob tratamento convencional (para obtenção de glicemias abaixo de 270 mg/dL) e outro tratamento intensivo com hipoglicemiantes orais/insulina (para obtenção de glicemias abaixo de 108 mg/dL). Os resultados demonstraram que os riscos de complicações tardias, como retinopatia foram menores no grupo 2, significando que tanto o controle rigoroso da glicemia como da pressão arterial reduziram os casos de complicações associadas ao diabetes. Foi observada também a ausência de mortalidade cardiovascular em pacientes sob terapia com sulfoniluréias. (DAVIS, GARNER, 2001; GAMA, 2002).

Gama (2002) citou outros estudos menores como Veteran Affir Study e Heart Outcome and Prevention Trial (HOPE) e estes confirmaram que o controle da glicemia diminui o risco de morte por doença cardiovascular.

No 64º Encontro Científico Anual da American Diabetes Association (ADA), Baggio e Drucker (2004) apresentaram os hormônios denominados incretina, representados pelo polipeptídeo inibitório gástrico (GIP) e peptídeo

semelhante ao glucagon (GLP), agora como potencialmente agentes hipoglicemiantes para DM tipo 2. A redução da glicemia pode ser explicada pela ação insulínica, efeito neogênico e proliferativo das células beta pancreáticas. Os autores, no entanto chamam a atenção ao fato da meia-vida destes no plasma ser muito limitada (cerca de 2 minutos) justificada pela inativação enzimática e clearance renal. Considerando isto, novas estratégias estão sendo avaliadas no sentido de desenvolvimento de agentes inibidores da enzima como a exenatida, liraglutide, CJC 1131, LFF 237, MK 0431 e P93/01.

O composto exenatida foi obtido a partir de uma substância isolada da saliva do monstro-de-gila, o único lagarto venenoso do mundo. Segundo Pastore (2004), este fármaco pertence a classe dos medicamentos ditos inteligentes uma vez que após administração parenteral, as moléculas só são ativadas a partir da elevação da glicemia. Ainda, a xenatida auxilia na redução de peso e na proliferação das células beta das ilhotas pancreáticas.

Chertow (2004) acredita que o stress oxidante e radicais livres desempenham papel importante na patogênese da DM e nas alterações micro e macrovasculares. A normalização da glicemia e o uso de antioxidantes podem contribuir com o controle da doença e suas considerações relacionam o papel das vitaminas A, D, E e C aos distúrbios metabólicos e danos teciduais comuns na DM.

Novas tecnologias para liberação de insulina, experimentação clínica de novos agentes hipoglicemiantes, estratégias de tratamento associando outros medicamentos para redução de peso entre outros tópicos apresentados no 64º Encontro Científico da ADA realizado em junho de 2004 representam o grau de interesse e preocupação pelo crescimento dos casos de DM se constituindo em mais um desafio a ser vencido pela ciência.

3.3 – Metodologia analítica para diclofenaco sódico

O levantamento bibliográfico apontou várias alternativas analíticas, com predomínio das técnicas espectrofotométricas e cromatográficas,

indicadas para a determinação de DS tanto na forma isolada como associada, presente em medicamentos e em fluidos biológicos.

3.3.1 - Métodos espectrofotométricos

Ao proporem uma metodologia analítica para alguns anti-inflamatórios como ibuprofeno, cetoprofeno, piroxicam, diclofenaco sódico e ácido enfenâmico, Sastry *et al* (1989 a) consideraram que alguns métodos espectrofotométricos descritos pecam pela falta de sensibilidade ou simplicidade. Os autores propuseram um método espectrofotométrico extrativo utilizando o violeta metileno, um corante básico preparado em tampão fosfato pH 7,6 que ao reagir com fármacos na forma ácida, formam um complexo colorido. As absorvâncias da fase clorofórmica contendo o complexo foram avaliadas a 540 nm e a concentração de cada droga foi determinada através da construção de uma curva de calibração. O potencial de extração do complexo pode ser afetado pela concentração do corante.

Com os experimentos, estes autores concluíram que 1,0 mL do corante com concentração igual a $1,95 \cdot 10^{-3} \text{M}$ é o volume ideal para o desenvolvimento da reação. A comparação entre vários solventes orgânicos determinou a escolha pelo clorofórmio, que se mostrou mais adequado. O tempo de agitação da solução colorida também foi avaliado (entre 0,5 e 4 minutos) e o melhor resultado foi obtido com o tempo de 1 minuto. Os extratos mostraram-se estáveis por mais de 1 hora. Os valores obtidos em termos de limites da Lei de Beer, absorvidade molar, coeficiente de correlação, desvio padrão relativo (RSD), estabilidade do complexo corante-droga mostraram-se satisfatórios levando à conclusão de tratar-se de um método simples, sensível, rápido, preciso e exato quando comparado a outros métodos. Outros componentes associados aos fármacos descritos, como paracetamol, diazepam, cloreto de dextropropoxifeno e os excipientes não revelaram nenhuma interferência no método.

Um método espectrofotométrico no visível foi proposto por Sastry *et al* (1989 b) para doseamento de três derivados do ácido antranílico – DS, ácido

enfenâmico (AE) e ácido mefenâmico (AM) presentes em comprimidos, cápsulas e xaropes. O método é baseado na reação destes com o p-N-N dimetilfenilodiamina (DMPD) na presença de Cr^{VI} ou $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ (perssulfato) determinando o aparecimento de um produto colorido com λ máximo em 670 nm para o DS, 720 nm para AE e 740 nm para AM. A sensibilidade do método permitiu determinações na ordem de 2,0 a 24,0 $\mu\text{g/mL}$ de DS, 0,125 a 2,0 $\mu\text{g/mL}$ de AE e 0,25 a 4,0 $\mu\text{g/mL}$ de AM.

A reação de formação dos produtos coloridos ocorre em pH 6 implicando no uso de tampão fosfato. A estabilidade destes foi observada em até 60 minutos para o DS e 80 minutos para AE e AM. As concentrações das diferentes amostras foram determinadas através de curva de calibração e os resultados obtidos em termos de equação da reta, coeficiente de correlação e RSD foram estatisticamente válidos. O volume ideal de DMPD foi igual a 1,5 mL ($2,5 \cdot 10^{-3}$ M) enquanto para os agentes oxidantes – dicromato de potássio ($2 \cdot 10^{-2}$ M) ou perssulfato de potássio ($1 \cdot 10^{-1}$ M), foi estabelecido em 1,0 mL. A adição do tampão, fármaco, DMPD e oxidante foi a sequência que determinou maior estabilidade e intensidade na formação do produto colorido. Outros princípios ativos normalmente associados (ibuprofen, cetoprofen, paracetamol e diazepam) não se mostraram interferentes. A análise das diferentes formas farmacêuticas revelou exatidão do método e a recuperação foi em torno de 99%. Segundo os autores, o método avaliado é simples, seletivo e sensível.

Ácido flufenâmico (AF), ácido mefenâmico (AM), ácido niflúmico (AN), ibuprofen (IB), cetoprofen (CT), diclofenaco sódico (DS) e indometacina – classificados como anti-inflamatórios não esteróides apresentados nas formas de comprimidos, cápsulas, supositórios e injetável foram avaliados por um método espectrofotométrico no visível proposto por Abdel-Hay *et al* (1990). A metodologia é fundamentada na reação destes (que apresentam COOH) com 2-nitrofenilhidrazina na presença de dicloro hexilcarbodiimida (DCC) em meio metanólico, originando hidrazina caracterizada pela intensa cor violeta. O máximo de absorção foi observado em 550 nm e condições de reação

como tempo e temperatura de aquecimento bem como efeito da concentração dos reagentes foram avaliados.

Abdel-Hay *et al* (1990) descreveram ainda a utilização de uma solução etanólica de piridina a 5,5% usada como catalizador no desenvolvimento do produto colorido e de uma solução de KOH 10%, que pelo pH básico permite melhor coloração. Foram tabelados os valores individuais dos 7 fármacos referentes àqueles que atendem à Lei de Beer, equação da reta, coeficiente de correlação e RSD% significando segundo os autores, sensibilidade, linearidade e precisão.

El Sadek (1991) propôs uma metodologia espectrofotométrica no visível para comprimidos e injetável (Voltaren®), onde o DS é submetido a aquecimento junto ao metanol e H₂SO₄ R. Com a oxidação são formados derivados indolona que reagem com o N-N-dimetil-p-aminobenzaldeído 0,1N na presença de pirrolidona. O produto colorido formado é amarelo e apresenta um máximo de absorbância em 420 nm. Foi estabelecido um volume de 4,0 mL do aldeído como o responsável pela maior intensidade de cor, que permanece estável por cerca de 2 horas. A Lei de Beer é atendida no intervalo de 0,5 a 7,0 µg/mL de DS. Segundo o autor, a análise estatística revelou que o método é exato e preciso, e que os aditivos, excipientes comumente usados e algumas impurezas não interferiram nos resultados.

Comprimidos e injetável, contendo respectivamente 50 mg e 25 mg de DS foram submetidos à metodologia analítica desenvolvida por Shakya, Joshi e Mishra (1992), baseada na reação do fármaco com o cobaltinitrito sódico em meio ácido (ácido ortofosfórico) e metanólico. A solução foi aquecida em banho-maria a 45-50°C por 30 minutos. O composto amarelo formado apresentou um λ máximo em 368 nm e mostrou-se estável por cerca de uma hora. Com os resultados, os autores consideraram o método simples, exato (98-100%), sensível (25,0 a 125,0 µg/mL de DS) e reprodutível.

Método simples, sensível, sem interferência de excipientes normalmente utilizados, valores satisfatórios de RSD e recuperação são afirmações feitas por Kamath e Shivram (1992) ao descreverem o método

espectrofotométrico extrativo utilizando diferentes corantes. Este se fundamenta na formação de complexos par-ions entre a droga e corantes como amarelo acridina (AA), fucsina básica (FB), azul de metileno (AM), safranina (SF) e toluidina azul (TA) na presença de tampão fosfato pH 6,8-7,4. A extração dos complexos formados foi feita com clorofórmio e os valores de λ máximo encontrados foram 470 nm (AA), 556 nm (FB), 640 nm (AM), 515 nm (SF) e 630 nm (TA). Foram apresentados para cada corante utilizado, valores referentes aos limites relacionados à linearidade, absortividade molar, RSD% e recuperação indicando que o método é exato e preciso. Permitiu ainda a análise de DS mesmo na presença de paracetamol, fármaco geralmente associado ao primeiro.

Um método alternativo baseado na utilização de 2,3-dicloro-5,6-diciano-benzoquinona (DDQ), 2,4-dicloro-6-nitrofenol (DCNP) e iodo para determinação espectrofotométrica de DS presente em comprimidos e injetável, foi proposto por Kamath *et al* (1993). Soluções contendo o fármaco foram expostas a cada um dos três compostos descritos acima originando compostos coloridos que apresentaram λ máximo em 396 nm (que determina maior sensibilidade) e 460 nm (DDQ), 425 nm (DCNP) e 360 nm (iodo). O volume de 1,0 mL de cada reagente foi suficiente para o desenvolvimento de coloração, que foi mais intensa por 5 minutos para o DDQ, 30 minutos para o DCNP e 15 minutos para o iodo, permanecendo estável por até 1 hora. Os limites em atendimento à Lei de Beer, foram entre 15,0 a 120,0 $\mu\text{g/mL}$, 10,0 a 100,0 $\mu\text{g/mL}$ e 2,0 a 20,0 $\mu\text{g/mL}$ de DS, respectivamente aos métodos com DDQ, DCNP e iodo. Os coeficientes de correlação dos três experimentos foram na ordem de 0,999. Em paralelo, os autores submeteram as amostras à análise por HPLC e na comparação dos resultados entre estes, o método proposto destacou-se pela simplicidade e custo reduzido. Os estudos de recuperação revelaram valores entre 98,9 a 100,8%. Nas amostras onde o DS estava associado ao paracetamol, os autores realizaram uma extração do DS com clorofórmio em meio ácido, seguida da evaporação, solubilização do resíduo com metanol e aplicação do método.

Kamath e Shivram (1993) por sua vez descreveram um outro método espectrofotométrico fundamentado na oxidação do DS por diferentes reagentes como sulfato cérico amoniacal (CAS), dibromodimetilhidantoína (DBH) ou N-bromosuccinamida (NBS) e bromato de potássio (PBT). Os valores de máximo de absorvância encontrados foram 450 nm, 385 nm e 495 nm, respectivamente. A linearidade foi observada nos intervalos de 2,0 a 16,0 µg/mL para CAS; 40,0 a 500,0 µg/mL para DBH/NBS e 50,0 a 600,0 µg/mL de DS com coeficientes de correlação em torno de 0,999. Na otimização dos parâmetros analíticos, o método que faz uso de CAS revelou o benzeno como agente extrator mais adequado com leitura do produto colorido em 10 minutos. Para o método que utilizou DBH/NBS, o meio metanólico mostrou-se mais sensível que o meio aquoso e o máximo de coloração do produto oxidado foi observado após 15 minutos. No método com PBT, o volume de componentes aquosos na reação não deve ser superior a 2,0 mL, evitando assim uma precipitação que pode alterar a coloração/leitura. Os resultados do teste de recuperação apresentaram-se entre 97,8 e 100,2%.

Os excipientes mais utilizados nas formulações avaliadas não demonstraram interferência, porém agentes redutores presentes podem alterar os resultados. Nestes casos, os autores recomendam que o DS seja primeiramente extraído com éter em meio ácido e redissolvido com metanol ou mínima quantidade de álcali diluído. Este método não foi recomendado para análise de DS quando associado ao paracetamol que se mostrou interferente.

Baseados no princípio de complexação entre droga-corante seguida de extração do complexo formado, Botello e Perez-Caballero (1995) estabeleceram um método espectrofotométrico para avaliação do DS. Nesta proposta, o reagente azul de metileno (AM) preparado em solução aquosa reage com o DS em meio alcalino (pH 9,2-9,4) formando complexo que é extraído com clorofórmio e analisado em 653 nm. O branco foi preparado nas mesmas condições e apresentou máximo de absorção 642 nm. No estabelecimento das condições analíticas ideais, pH acima de 9,5 promoveu

diminuição acentuada da absorbância devido a complexação entre o AM e anions OH do meio alcalino empregado. Para estabelecer concentração ideal de AM, os autores relacionaram absorvâncias e concentração, adotando para todo o experimento uma concentração de AM igual a $5,0 \cdot 10^{-4}$ M. Foram necessárias duas extrações para recuperação quantitativa do complexo que se mostrou estável por cerca de 1 hora. A resposta linear foi observada entre 0,8 e 6,4 $\mu\text{g/mL}$ de DS com coeficiente de correlação (r) igual a 0,998. Os autores compararam resultados em termos de limite de detecção deste método (0,37 $\mu\text{g/mL}$ de DS) com outros que utilizam acetato de cobre (1,0 $\mu\text{g/mL}$) e violeta metileno (72,0 $\mu\text{g/mL}$). O RSD% foi inferior a 1% indicando boa precisão do método.

Kanna Babu, Uday Shankar, Madhu Kumar (1995) desenvolveram metodologia analítica para o DS utilizando 1,0 mL de *p*-dimetilaminobenzaldeído (PDAB) a 0,1% e 4,0 mL de sulfato cénico amoniacal 0,5% sob condições ácidas (1,0 mL de HCl 1N). A coloração amarelada desenvolvida exibiu um máximo de absorção em 440 nm. A obediência à Lei de Beer foi observada no intervalo de 2,0 a 16,0 $\mu\text{g/mL}$ e o complexo formado mostrou-se estável por 15 minutos. As amostras de comprimidos analisadas revelaram teor de 99% com desvio-padrão inferior a 0,5. O estudo de recuperação (adição de quantidades variáveis de DS) apontou valores entre 98,5 e 100,98%.

Metodologia espectrofotométrica para avaliação simultânea de DS, clorxazona (CZ) e paracetamol (PM) foi proposta por Bhatia e Dhaneshwar (1995), utilizando como solvente NaOH 0,02 N e um multicomponente de análise no espectrofotômetro. A partir de soluções padrão de cada fármaco e da varredura no intervalo de 220 a 350 nm, os respectivos espectros foram obtidos. Foram preparadas outras soluções padrão com diferentes concentrações dos fármacos, ditas misturadas e submetidas também à mesma varredura com registro dos espectros. Estes dados foram utilizados para determinação da concentração das três drogas nas soluções obtidas das amostras de comprimidos. Segundo os autores, os três fármacos avaliados atenderam à Lei de Beer nos limites de concentração empregados

no método. Os valores máximos de absorbância detectados foram iguais a 276 nm para o DS, 244 e 288 nm para CZ e 257 nm para o PM. Após aplicação do método, as amostras e as quantidades encontradas dos fármacos ficaram em torno de 99%, com RSD inferior a 1,0. Os estudos de recuperação para cada fármaco nas diferentes concentrações demonstraram resultados entre 96,5 e 100,07%. Os autores afirmaram que o método apresentado é específico para espectrofotômetros Shimadzu, modelo UV-160.

Um trabalho comparativo entre três métodos espectrofotométricos aplicados à determinação simultânea de DS e paracetamol (PM) presentes em comprimido foi apresentado por Bhatia, Kashedikar e Chaturved (1996). O primeiro método considerou a determinação da absorvidade molar de cada droga baseado no λ máximo de 276 nm para o DS e 257 nm para o PM. A partir das absorvâncias encontradas e por meio de equações, as concentrações dos fármacos foram encontradas. O método foi considerado simples requerendo apenas instrumento comum aos laboratórios e poucos cálculos.

A espectrofotometria de primeira derivada foi o segundo método proposto por estes autores, através da qual ficou evidente a anulação das absorvâncias em 276 nm e 257 nm, respectivamente ao DS e PM, indicativa de ausência de interferência de uma droga sobre a outra. A avaliação da quantidade dos princípios ativos na amostra de comprimidos foi obtida através da construção de uma curva de calibração. Este método não se mostrou mais vantajoso que o primeiro, exceto pela eliminação da calibração manual requerida para resolver a equação.

O terceiro método apresentado por Bhatia, Kashedikar e Chaturved (1996) fez referência à utilização de um multicomponente específico acoplado ao espectrofotômetro utilizado pelos autores e reproduziu condições analíticas descritas no trabalho anterior. A partir de soluções padrão contendo diferentes concentrações dos dois fármacos foram obtidos os espectros entre 220 e 350 nm. Os dados obtidos possibilitaram a determinação das concentrações dos mesmos na amostra de comprimidos.

Em todos os métodos descritos, o solvente utilizado foi o NaOH 0,02 N. Os resultados apresentados em termos de teor encontrado, RSD, coeficiente de variação e recuperação para os 3 métodos, foram considerados satisfatórios atendendo aos padrões analíticos.

A forma injetável contendo DS apresenta o álcool benzílico como agente antisséptico em teores variáveis de 4-10%. A quantificação deste excipiente é importante uma vez que pode desencadear síndromes tóxicas, alergias e efeitos no sistema nervoso central. Métodos cromatográficos (HPLC e CG) são usados para a determinação de DS e álcool benzílico. Com o objetivo de solucionar a sobreposição de bandas observadas no espectro de zero ordem destas substâncias, Micalizzi, Pappano e De Batista (1998) propuseram a aplicação da espectrofotometria derivada.

O espectro de zero ordem foi avaliado a uma velocidade de 480 nm/min entre 230-300 nm. Para a primeira derivada foi empregado $\Delta\lambda = 7,2$ enquanto para a segunda derivada $\Delta\lambda = 0,7$ nm. Foram preparadas soluções padrão de DS (15,0 a 50,0 $\mu\text{g/mL}$) na presença de uma concentração constante de álcool benzílico (16,0 $\mu\text{g/mL}$) e dos outros excipientes. Com a aplicação da primeira derivada, a anulação do álcool benzílico foi observada em 257 nm, ponto utilizado para determinação do DS. Da mesma forma, foram preparadas soluções com concentrações variáveis de álcool benzílico (40,0 a 130,0 $\mu\text{g/mL}$) na presença de concentração constante de DS (52,0 $\mu\text{g/mL}$). Estas soluções foram avaliadas com a segunda derivada que revelou um espectro com dois máximos e um mínimo, este coincidente com o máximo de absorção do espectro original. O $\Delta A (h_{277} - h_{271})$ é proporcional à concentração de álcool benzílico. A quantificação de DS e álcool benzílico em amostras de injetáveis pela espectrofotometria derivada de primeira e segunda ordens revelou valores próximos a 100% e segundo os autores, apresenta vantagens significativas frente a outras técnicas analíticas.

3.3.2 - Outros métodos analíticos

Hassan, Abdel Aziz e Abdel Samad (1994) descreveram uma técnica baseada no princípio de sensores potenciométricos para a análise de DS presente em comprimidos. O anion diclofenaco reagiu com o cátion Ni (II)-tris(batofenantrolina) formando um complexo insolúvel em água. A este foi incorporada uma membrana de PVC, cujas características eletroquímicas foram avaliadas de acordo com recomendações da IUPAC. As vantagens apresentadas pelos autores referem-se à resposta linear e rápida para o diclofenaco em limites de concentração e pH maiores, baixo limite de detecção com maior precisão e reprodutibilidade. Ainda consideraram, a direta aplicação para aquelas soluções de amostras turvas ou coloridas que não sofreram pré-tratamento e, a mínima interferência de outras espécies associadas. As amostras foram submetidas ao método oficial descrito na USP XXI e os resultados obtidos com as duas metodologias foram muito próximos. Apesar das várias etapas exigidas para o desenvolvimento da técnica analítica, os autores a consideraram simples, seletiva, não necessitando de pré-tratamento ou extração oferecendo ainda resultados mais exatos e precisos.

Chawla, Sodi e Sane (1996) compararam três técnicas cromatográficas – GC, HPLC e HPTLC utilizadas na determinação de DS, cloxazona (CZ) e paracetamol (PM) associados na forma de comprimidos. As condições analíticas empregadas como tipo de coluna, solventes, gás carreador, tempo e velocidade de fluxo, pH, concentrações das soluções padrão e amostra para cada técnica foram apresentadas. Os padrões internos escolhidos foram maleato de clorfeniramina, furoato de dicloxacilina e teofilina, respectivamente ao DS, CZ e PM. Este estudo comparativo objetivando determinação simultânea dos fármacos demonstrou não haver necessidade de preparação elaborada da amostra exigindo, porém pessoal qualificado. Os baixos valores em termos de desvio-padrão e coeficiente de variação indicaram boa precisão dos métodos. Os percentuais de

recuperação entre 98 e 102% confirmaram, segundo os autores, ausência de interferência por parte dos excipientes. A escolha por um método ou outro será dependente da necessidade e disponibilidade de equipamentos.

Uma metodologia baseada na propriedade de fluorescência dos íons da classe dos Lantanídeos para o doseamento de DS foi planejada por Carreira *et al* (1995). O íon Europium⁺³ apresenta propriedades hipersensitivas de transição em 660 nm e que normalmente é impedida. No entanto, ligado ao DS (que apresenta grupos carboxílicos) esta transição acontece e a intensidade de emissão de fluorescência é aumentada. O complexo formado entre DS e Eu⁺³ apresentou-se insolúvel em água e solúvel em muitos solventes como etanol, metanol, acetonitrila e p-dioxano, sendo este o escolhido para os experimentos por não determinar interferência nas medidas. Vários tampões foram avaliados uma vez que o pH é fator determinante na formação do complexo, ou seja, em pH abaixo de 4 a ligação entre o íon e o fármaco é diminuída. O pH ideal, segundo os autores é em torno de 5,5.

Outro parâmetro analisado foi o efeito do tempo e temperatura na formação do complexo. Este é formado rapidamente como um precipitado branco e para impedir este fenômeno, os autores recomendaram a adição do dioxano antes do íon. Como a temperatura não pareceu ser determinante, o experimento foi conduzido à temperatura ambiente. O complexo formado apresentou-se estável por cerca de 24 horas. A relação linear entre o limite de Eu⁺³ e a concentração de DS foi determinada no intervalo de 10,0 a 200,0 µg/mL, com valores de recuperação iguais a 100,2%. O método mostrou uma boa concordância com o método espectrofotométrico, também aplicado para avaliação comparativa.

Prado *et al* (1999) propuseram como método analítico para comprimidos de DS, a eletroforese capilar. Esta técnica é baseada nas diferenças e mobilidade eletroforética que resulta em diferentes velocidades de migração das espécies iônicas em um tampão eletroforético através de um capilar. A curva de calibração apresentou-se linear entre concentrações de 40,0 e 120,0 µg/mL de DS e os resultados obtidos em termos de

coeficiente de correlação, coeficiente angular e intercepto apresentaram-se estatisticamente válidos. O teste de recuperação determinou valores em torno de 103,1%. O trabalho apresentou ainda, os eletroferogramas do DS e acetaminofeno (usado como padrão interno), das amostras comercial e simulada de comprimidos e do placebo preparado para a aplicação do método. Os resultados demonstraram que os excipientes não interferem na análise do DS. A precisão do método, obtida após 10 determinações, revelou valores em termos de CV na ordem de 1,68 e 1,30. Facilidade na operação, precisão, exatidão, simplicidade, rapidez e baixo custo são características do método descritas pelos autores .

3.4 – Metodologia analítica para a glimepirida

Lehr e Damm (1990) apresentaram um método cromatográfico para avaliação simultânea da glimepirida (dose oral de 3 mg) e seus metabólitos, presentes no soro e urina objetivando o estudo farmacocinético em humanos. Segundo os autores, este tipo de material requer métodos mais sensíveis e específicos. Salientaram ainda que muitos métodos cromatográficos utilizados para avaliação da glibenclamida (outro agente hipoglicemiante do grupo sulfoniluréia) falharam em termos de sensibilidade e especificidade, especialmente na faixa de ng/mL.

O método apresentado baseia-se na clivagem térmica da glimepirida a 100°C e os derivados formados reagem com 2- nitrofluorbenzeno (NFB). O produto resultante pode ser detectado a 350 nm através de coluna de fase reversa. A preparação da amostra (soro/urina) envolve extração com dietileter, agitação por cerca de 20 minutos, centrifugação e reação da fase orgânica com dimetilclorosilane. Após evaporação foi adicionada ao resíduo obtido uma solução de NFB preparada em ácido n-butilester acético. A solução foi aquecida a 100°C por exatos 20 minutos seguidos de evaporação do ácido. Os novos resíduos foram então diluídos com a fase móvel A (ácido perclórico:acetonitrila 60:4 para soro) e fase móvel B (ácido

perclórico:acetonitrila 42:58 para urina). Fármacos análogos foram utilizados como padrão interno.

A validação do método descrito por Lehr e Damm (1990) priorizou exatidão, precisão e linearidade para a glimepirida e metabólitos 1 e 2 presentes no soro e metabólitos 1 e 2 presentes na urina. Isto se justifica pela excreção predominantemente renal (80%) dos metabólitos enquanto a glimepirida está presente em grande proporção no sangue. O limite de detecção para a glimepirida e o metabólito 2 em 1,0 mL de soro foi de 5,0 ng/mL enquanto que para o metabólito 1 o valor foi igual a 10,0 ng/mL. Os autores consideraram o método sensível e seletivo uma vez que a administração oral de doses muito baixas determina níveis da droga na ordem de ng/mL.

A glimepirida apresentada na forma de comprimidos (Amaryl®) em doses de 1 e 2 mg foi objeto de avaliação de Altinoz e Tekeli (2001) empregando a espectrofotometria derivada. Referências ao método cromatográfico descrito acima e a inexistência de método espectrofotométrico para a glimepirida a ser analisada para qualquer tipo de amostra foram consideradas pelos autores. O método proposto pode ser uma alternativa mais simples e de custo reduzido sem exigência de tratamento da amostra quando comparado à técnica cromatográfica.

O solvente escolhido para o método foi a dimetilformamida, em função da solubilização do fármaco. O espectro de ordem zero revelou 2 picos em 268 e 272 nm e de aparência não muito bem definida (bandas largas). A aplicação da espectrofotometria derivada foi conduzida considerando que a amplitude do sinal do espectro derivado foi maior, com picos bem definidos e com melhor separação. Na otimização das condições analíticas foram estabelecidas a segunda derivada, $\Delta\lambda = 21$ e faixa de leitura entre 245-290 nm.

A linearidade do método descrito por Altinos e Tekeli (2001), expressa pela curva de calibração, foi avaliada em concentrações entre 1,0 e 500,0 $\mu\text{g/mL}$ e o espectro da segunda derivada foi calculada pelos 3 métodos (pico-pico $\lambda = 263$ e 268 nm), pico zero ($\lambda = 268$ nm) e tangente ($\lambda = 263$ e

272 nm). Segundo os autores, o método pico-pico foi o que apresentou a maior inclinação em relação aos outros dois.

O limite de detecção foi igual a 0,4 µg/mL enquanto o limite de quantificação apresentou valor de 1,0 µg/mL de glimepirida. Em termos de especificidade/seletividade, a comparação entre os espectros de ordem zero e de segunda derivada para a glimepirida padrão e a presente na formulação, não revelou alterações nos λ máximos. As impurezas conhecidas adicionadas à amostra pura não determinaram resultados diferentes quando comparados àqueles obtidos com a droga pura.

No desenvolvimento do método, procedeu-se apenas a uma centrifugação para obtenção de uma solução mais límpida, não implicando em operações mais elaboradas. Objetivando avaliar a interação dos excipientes no método proposto, a técnica de adição do padrão foi aplicada e a equação da reta para a segunda derivada foi igual a Y (Amplitude) = $0,0032X + 0,3199$ com $r = 0,9998$. O estudo da recuperação para a técnica de segunda derivada aplicada a uma solução padrão de glimepirida apresentou resultado de 110,1% com RSD igual a 0,18%. Num outro estudo de recuperação a partir de amostras sintéticas às quais foram adicionadas 1,0 e 2,0 mg de GP, os resultados apresentaram variáveis entre 100 e 105%.

Através de uma solução padrão de GP de concentração igual a 200,0 µg/mL e análise de 7 replicatas, foi determinada a precisão do método com resultado médio de 200,03 µg/mL e DP igual a 0,79. A repetibilidade foi avaliada com 4 soluções de diferentes concentrações (50,0; 100,0; 200,0 e 400,0 µg /mL de GP) inter-dia e intra-dias (por 4 semanas).

A quantificação de GP segundo Altinoz e Tekeli (2001) foi avaliada também em termos de diferentes analistas e diferentes aparelhos para verificação da resistência do método. Os resultados não revelaram diferenças estatísticas significativas. Procedeu-se ainda a avaliação diária durante 30 dias, de soluções contendo GP em dimetilformamida submetidas ao escuro a +4°C. Os resultados apontaram estabilidade das mesmas neste período. Outras condições de stress como luz/4 dias; UV por 1 dia;

temperatura a 50°C, 70°C e 100°C por 24 horas, diluição em HCl 0,1N e NaOH 0,1N também foram aplicadas.

A degradação da glimepirida foi observada quando da exposição às soluções ácida e básica e os produtos de degradação não puderam ser avaliados pelo método proposto. Os autores concluíram que se trata de um método exato, preciso, linear, reprodutível, robusto, resistente, com níveis aceitáveis de recuperação que pode ser aplicado direta e facilmente na análise de comprimidos de glimepirida.

3.5 – Espectrofotometria derivada

Em seu artigo, Ciurczak (1999) comentou a importância de técnicas analíticas como infravermelho (IR), NIV, Raman, HPLC reconhecidas como métodos de futuro, porém considerou que a espectrofotometria UV-vis deveria ser revista e reconduzida à rotina dos laboratórios de análise.

Com a evolução dos instrumentos analíticos, onde espectrofotômetros são equipados com dispositivos (software), pode-se calcular de imediato a derivada desejada ou determinar em simultâneo a concentração de várias substâncias presentes em uma mistura. Em outras palavras, modelos computadorizados revitalizaram a técnica espectrofotométrica, além de se considerar, que os espectrofotômetros são significativamente mais acessíveis em termos de custo quando comparados aos outros equipamentos necessários para o desenvolvimento das outras técnicas analíticas.

A aplicabilidade segura e eficaz da espectrofotometria na análise de fármacos presentes em diferentes formulações farmacêuticas pode ser comprovada com a publicação de muitos trabalhos recentes descrevendo o emprego desta técnica. São exemplos a determinação de alumínio em preparações farmacêuticas utilizando corantes azóicos da série 1,2,4-triazol (ZAREBA, MELKE, 2000) avaliação de catecolaminas (dopamina, levodopa, metildopa e adrenalina) presentes em formulações farmacêuticas através de reação com sulfanilamida em meio ácido e na presença de íon molibdato

(NAGARAJA, VASANTHA, SUNITHA, 2001) e quantificação de alguns beta lactâmicos (ampicilina, amoxacilina, cloxacilina, dicloxacilina e fluoxacilina) pela reação com o violeta pirocatecol como reagente cromogênico (AMIN, 2001).

Exemplificam ainda a aplicação da espectrofotometria nos dias de hoje, avaliação de fármacos de ação antialérgica como methildilazina, prometazina e isotipendil através da complexação com vermelho bromopirogalol e azul de bromotimol (RAMESH *et al*, 2001), determinação de íon superóxido formado durante a reação de Maillard por meio de sal tetrazolium altamente hidrossolúvel (UKEDA *et al*, 2002) e determinação de fármacos adrenérgicos (pirocatecol, levodopa, metildopa e dopamina), utilizando a ácido sulfanílico na presença de K_2CrO_4 (GOWDA, MELWANKI, SEETHARAMAPPA, 2001)..

Nos anos 80, Levillain e Fompeydie (1986) já destacavam a aplicação crescente e abrangente da espectrofotometria derivada (ED). No mesmo sentido e considerando o pouco conhecimento do assunto na época em nosso país, Hackmann, Beneton e Santoro (1991) prepararam uma revisão abordando as vantagens e aplicações da espectrofotometria derivada na análise qualitativa e quantitativa de fármacos e medicamentos.

Ojeda, Rojas e Pavon (1995) reavaliaram o desenvolvimento e utilização da espectrofotometria derivada no período 1987-1995 e destacaram a habilidade desta técnica em solucionar problemas sobretudo de misturas binárias e ternárias de compostos que apresentavam sobreposição em espectros. Nesta revisão, os autores fizeram considerações quanto a programas de computador desenvolvidos que permitiram avaliar e registrar os dados espectrofotométricos. Uma das inconveniências da espectrofotometria derivada - a relação sinal-ruído que pode piorar com o aumento na ordem da derivada, pode ser amenizada com o uso de programas que "filtram" este ruído.

Comentaram ainda os autores, a associação da ED com técnicas cromatográficas e análise cinética. O trabalho, extenso, apresenta tabelas onde constam os tipos de materiais (orgânico, inorgânico, biológico,

ambiental, forense, alimentos e farmacêutico), reagentes empregados e condições analíticas assim como a ordem de derivada e faixa de concentração ideal onde o íon/composto/fármaco pode ser investigado.

As vantagens e versatilidade da ED podem ser constatadas na prática pela análise de misturas complexas, onde os constituintes são individualizados eliminando a interferência dada por excipientes ou impurezas, e de produtos de decomposição que se apresentam estruturalmente semelhantes ao composto de origem.

Consiglieri (1992) mencionou que a ED permite a extração de um maior número de informações a partir de um espectro de ordem zero. Muitos espectros no UV-vis apresentam-se geralmente pouco característicos, com perfis mal definidos (bandas largas) comprometendo seu entendimento. A diferenciação ativa nas bandas largas afinando-as, permite ainda isolar aquelas bandas parcialmente encobertas. A diferenciação possibilita ainda evidenciar inclinação e curvatura caracterizando assim um composto e eliminar a deformação da curva em função de uma substância estranha presente (LEVILLAIN, FOMPEYDIE, 1986; HACKMANN, BENETON e SANTORO, 1991; CONSIGLIERI, 1992).

A partir de um espectro que representa uma curva onde $A=f(\lambda)$, pode-se calcular em qualquer ponto, derivadas sucessivas considerando:

$$\frac{dA}{d\lambda}, \frac{d^2A}{d\lambda^2}, \dots, \frac{d^nA}{d\lambda^n}$$

e a partir dos valores obtidos, a curva diferencial d^nA/λ^n pode ser traçada, originando o espectro derivado de ordem n (LEVILLAIN, FOMPEYDIE, 1986; HACKMANN, BENETON e SANTORO, 1991).

A derivada de primeira ordem de um espectro com pico simples é caracterizada por um ponto máximo e um ponto mínimo e a distância vertical entre estes 2 pontos representa a amplitude (A) que é proporcional à concentração daquela substância que originou o pico inicial. Observa-se um cruzamento – ponto de anulação com absorvância zero e que no espectro original representa o máximo de absorção (LEVILLAIN, FOMPEYDIE, 1986;

CIURCZAK, 1999; WATSON, 1999). A derivada de primeira ordem é positiva onde a absorção aumenta e negativa onde a absorção diminui.

A derivada de segunda ordem se caracteriza por dois pontos de anulação que correspondem ao máximo e ao mínimo da derivada de primeira ordem separados por um mínimo, resultado do ponto de anulação da derivada de primeira ordem. Quanto mais diferenciações forem feitas, mais complexo é o espectro. A curva derivada de ordem n se anula n vezes, originando $n + 1$ bandas, ora positivas ora negativas. O ponto de absorção máximo do espectro de zero ordem corresponde a um ponto de anulação nas derivadas de ordem ímpar. Para as de ordem par, o máximo de absorção será representado inicialmente por um mínimo e após, por um sinal máximo. Num mesmo intervalo de λ pode-se observar o afinamento das bandas acompanhado pelo aumento no número de bandas (LEVILLAIN, FOMPEYDIE, 1986; HACKMANN, BENETON, SANTORO, 1991; WATSON, 1999)

Vogel (2002) ao considerar uma banda de perfil normal (gaussiana), afirma que as curvas derivadas de primeira e terceira ordem apresentam-se muito diferentes da original e que podem ser usados para determinar o comprimento de onda de máxima absorção. As curvas derivadas de segunda e quarta ordem apresentam um pico central mais agudo que a curva original, porém com a mesma altura.

No caso de um espectro com 2 bandas de absorvâncias iguais, porém com larguras diferentes, a amplitude (**A**) da banda mais estreita/fina é maior que da outra banda, ficando evidente que com o aumento na ordem da derivada esta diferença se acentuará (CONSIGLIERI, 1992). Com o aumento na ordem da derivada, observa-se um aumento no número de picos (mínimo, máximo) e de ponto de anulação, melhorando o entendimento do espectro. Estes elementos permitem obter uma imagem personalizada da substância, representando sua "impressão digital".

Levillain e Fompeydie (1986) consideraram, no entanto, que o aumento na ordem da derivada facilita a separação, mas com

comprometimento da sensibilidade. Orientam assim, a encontrar a melhor concordância entre estes parâmetros.

A determinação quantitativa de uma substância a partir de espectro derivado pode ser feita com auxílio de métodos escolhidos experimentalmente. Estes podem ser:

► método zero-pico – a amplitude (**A**) é medida em qualquer λ com exceção do ponto de anulação. Um alerta é feito por HackmanN, Beneton e Santoro (1991) referente à sensibilidade desta medida que pode ser comprometida dependendo do local onde esta é efetuada. Implícito neste, consideram o método do ponto de anulação ou de "zero-crossing", que mede o valor absoluto da **A** da derivada de uma curva, onde a absorção é a soma de mais de uma substância em dado λ , correspondente ao ponto de anulação da derivada do interferente. Este método tem aplicação para eliminar erros sistemáticos originados de interferências específicas.

► método pico-pico – por este método, é determinada a diferença entre os valores da derivada obtida entre um máximo e um mínimo contíguos. Sua sensibilidade é maior que a do método zero-pico, porém o resultado pode ser comprometido se a derivada da matriz não foi anulada na zona de leitura.

► método da tangente – entre 2 máximos (ou 2 mínimos) contíguos é traçada uma tangente e a distância da tangente a um mínimo (ou máximo) intermediário é tomada.

Consiglieri (1992) considerou que estes dois últimos métodos são classificados como métodos gráficos. Seus resultados são expressos em mm, utilizando-se de réguas de precisão, que podem introduzir erros comprometendo o resultado.

Na padronização de um método espectrofotométrico derivado são considerados importantes os seguintes parâmetros :

► ordem da derivada – sabe-se que a relação sinal/ruído piora com o aumento da ordem da derivada. No entanto, quanto maior a ordem, melhor a resolução. A aplicação da derivada permite um estreitamento das bandas e

isto será mais acentuado com o aumento da ordem, representado pela maior amplitude (HACKMANN, BENETON, SANTORO, 1991; HIDALGO, 2001).

► assentamento das ordenadas – considerando que a A da derivada é inversamente proporcional à largura da banda original, o intervalo na escala do eixo Y deve ser avaliado de maneira a garantir a maior amplitude. Este assentamento deve permitir a melhor visualização das curvas derivadas (HACKMANN, BENETON, SANTORO, 1991).

► escolha do $\Delta\lambda$ – este é determinado experimentalmente e observa-se que quanto maior for a variação de λ , maiores informações serão apresentadas no espectro, ou seja, obtém-se uma curva mais detalhada. Por outro lado, é detectado um maior nível de ruído. Cuidados devem ser tomados quando se decide por $\Delta\lambda$ muito alto que pode comprometer a resolução da curva derivada. Em função disto, recomenda-se que $\Delta\lambda$ não deve ser muito maior que a largura da banda de absorção à meia altura (HACKMANN, BENETON e SANTORO, 1991; HIDALGO, 2001).

Consiglieri (1992) fez referência ainda a parâmetros como velocidade de varredura, uma vez que o espectro original obtido com velocidade menor permite a obtenção de derivadas com resolução maior, e a concentração ideal que permite obter valores de absorvâncias dentro da menor faixa de erro. Em relação a isto, atualmente admite-se diluições que determinem absorvâncias entre 0,3 e 1,5 (VOGEL, 2002).

Levillain e Fompeydie (1986) descreveram possíveis aplicações da espectrofotometria derivada na análise orgânica, inorgânica, gases, alimentos, água e medicamentos. Hackmann, Beneton e Santoro (1991) também descreveram várias aplicações da ED na análise de preparações farmacêuticas e em estudos de estabilidade. Ciurczak (1999), por sua vez, ilustrou seu artigo com análises de melatonina associada ao cloridrato de piridoxina; haloperidol na presença de parabenos; piroxicam e seu principal metabólito no soro e anfotericina B no plasma, utilizando a técnica espectrofotométrica.

Mariaud, Conti e Levillain (1995) desenvolveram um método analítico que emprega derivadas de primeira e segunda ordem para determinação de

beta-dicetonas consideradas indicadoras de processos de degradação química ou bioquímica. A presença de succinilcetona em urina de recém-nascidos é significado de tirosinemia, uma grave doença metabólica, enquanto o malanoaldeído está relacionado com a degradação de lipídeos por radicais livres. Este grupo de substâncias pode assim ser relacionado com insuficiência renal, aterosclerose e reumatismo.

O princípio deste método é a reação entre o composto 2,3-diaminonaftaleno (DAN) formando com as β -dicetonas, compostos do tipo benzodiazepínicos caracterizados por alta absorção em 310 nm. O padrão de β -dicetonas utilizado nos experimentos foi o 2,4 dioxopentano (acetilacetona) que em meio ácido reage com o DAN, formando o monoclórato de 2,4-dimetil 2,3-b-nafta1,5diazepínico (naftadiazepínico).

Estes autores avaliaram ainda a influência da temperatura e o tempo de aquecimento na reação de formação do naftadiazepínico, além da concentração ideal de DAN. Em 309 nm, a absorvância da mistura é devido ao composto formado e ao excesso de DAN. Neste ponto foi aplicada a técnica espectrofotométrica derivada de primeira e segunda ordem para eliminação do efeito do excesso de DAN, uma vez que a absorvância da mistura não pode dar por si só o rendimento da formação do naftadiazepínico. A avaliação do produto formado considerou o método do ponto de anulação tendo como parâmetros experimentais: $\Delta\lambda = 2$ nm, velocidade de 600 nm/min, pH = 2, temperatura de 56°C por 20 min e concentração de DAN igual a $5 \cdot 10^{-4}$ mol/L. Foram observados os pontos de anulação do DAN na derivada de primeira ordem em 304,2 nm e para a derivada de segunda ordem, em 317,8 nm. Curvas padrão foram construídas a partir de concentrações variáveis entre 2,0 e 30,0 μ mol/L que originaram as equações de reta referentes ao método direto e de derivadas de primeira e segunda ordem. Foram avaliados ainda a precisão, limite de detecção e especificidade para as β -dicetonas.

Uma avaliação simultânea de corantes sintéticos empregados em produtos cosméticos – tartrazina (TT) e azul brilhante (BB), mais especificamente em colônias e água de colônia foi proposta por Capitáin-

Vallvey *et al* (1995). Considerando reações alérgicas já detectadas, a Comunidade Européia exige quantidades muito pequenas destes compostos nestas formulações. Quando uma amostra apresenta apenas um dos corantes, rotineiramente é empregada a espectrofotometria convencional. No entanto, a presença de dois ou mais corantes implica na utilização de uma separação preliminar com TLC.

Este trabalho fez considerações sobre outras técnicas como HPLC e voltametria. A metodologia apresentada descreve inicialmente um processo de extração com CH_2Cl_2 . Os autores consideraram a formação de diferentes fases orgânicas dependentes da proporção de água:etanol existente na amostra. Em função disto, foi determinada que a proporção ideal para a extração entre CH_2Cl_2 / água:etanol é 4/5. Outro parâmetro avaliado foi o tempo de agitação.

Foi observado no espectro de zero ordem, valores de absorvância de BB em torno de 400 nm e 630 nm, enquanto a TT foi detectada em torno de 430 nm. Em função disto, o BB pode ser determinado na presença de TT, porém este não pode ser avaliado em conjunto ao BB considerando a proximidade das absorvâncias. Com a aplicação da derivada de primeira ordem à TT, este problema foi resolvido. Alguns parâmetros foram estabelecidos pelos autores como $\Delta\lambda = 4$ nm; velocidade = 480nm/min; λ máx TT = 429 nm; λ máx BB= 629 nm com a avaliação da derivada pelo método “zero-crossing”.

Capitáin-Vallvey *et al* (1995) apresentaram ainda as curvas de calibração relacionadas aos dois corantes e os resultados referentes à precisão, limites de detecção e quantificação considerados satisfatórios. Medida direta da absorvância na fase hidroalcolica, baixos limites de detecção, simplicidade, uso de aparelhagem convencional e ausência de interferência por parte das fragrâncias/outras aditivos utilizados neste tipo de produto foram algumas vantagens descritas pelos autores em relação ao método apresentado.

Técnicas analíticas como HPLC normal e de fase reversa, espectrofotometria convencional, voltametria adsortiva e espectrofotometria

de derivada de primeira ordem com o 2-2piridilmetilenoaminofenol foram mencionadas por Seco-Lago *et al* (1996) para determinação de Pb e Ni presentes em misturas. O trabalho apresentou uma metodologia espectrofotométrica derivada de primeira ordem ainda não encontrada na revisão bibliográfica, e que segundo seus proponentes é simples, econômica e precisa com avaliação estatística muito satisfatória.

A partir de soluções padrão de Pb e Ni que foram preparadas com acetato de chumbo trihidratado e cloreto de níquel hexahidratado, e às quais foi associada solução aquosa a 5% de ácido metiletilenodiaminotetracético (MEDTA), Seco-Lago *et al* (1996) analisaram as curvas de calibração dos complexos formados, nos intervalos de concentração correspondentes a 0,04-0,30 mg/mL de Pb e 0,2-2,6 mg/mL de Ni com valores de r próximos a 1.

Os produtos formados foram avaliados pela derivada de primeira ordem no intervalo entre 200 e 500 nm com um $\Delta\lambda = 16$ nm. Os espectros desta derivada apresentaram a região de 225-300 nm correspondente ao complexo Pb-MEDTA, enquanto o intervalo 300-475 nm relacionou-se ao complexo Ni-MEDTA. O método adotado foi o do pico-pico (máx-mín) e observou-se que o pH influi na derivada de primeira ordem sendo o intervalo ideal, entre 4 e 9. O excesso de MEDTA não influi na reação e os complexos formados são estáveis a 100° C por cerca de 24 horas. Foi avaliada também a interferência de cátions e íons e em qual concentração isto ocorre, recorrendo-se à cromatografia de troca iônica para eliminá-la. Foram preparadas 4 matrizes com quantidades variáveis de Pb, Ni e diferentes cátions, às quais foi aplicado o método proposto. As amostras foram avaliadas também pela espectrofotometria de absorção atômica e os resultados após o teste F não revelaram diferenças entre os dois métodos em termos de precisão.

Erk e Onur (1997) descreveram o uso da espectrofotometria derivada e método da relação de absorvâncias para a determinação simultânea do cloridrato de benazepril e hidroclortiazida presentes em comprimidos, utilizados como antihipertensivo e diurético, respectivamente. Os parâmetros

analíticos estabelecidos foram célula de 1 cm; $\Delta\lambda = 3,2$ nm; intervalo de 200-350 nm; velocidade de 40 nm/seg; assentamento das ordenadas entre 0,40 e -0,60 tendo como solvente o metanol.

Para obtenção dos espectros da derivada de primeira ordem foram preparadas soluções de concentração variável entre 10,0 - 50,0 $\mu\text{g/mL}$ de cada fármaco. Para o método de relação entre as absorvâncias, as concentrações foram iguais a 2,5 a 6,5 $\mu\text{g/mL}$ de cloridrato de benazepril e 3,0 a 24,8 $\mu\text{g/mL}$ de hidroclortiazida. O λ máximo determinado para o benazepril na derivada de primeira ordem foi igual a 260,7 nm, enquanto que para a hidroclortiazida de 239,8 nm. O segundo método é baseado na relação entre absorvância da mistura e a concentração relativa, utilizando como λ de 236,4 nm e 264 nm respectivamente para benazepril e hidroclortiazida.

O espectro de zero ordem das soluções padrão dos 2 fármacos revelou uma sobreposição no intervalo de 200-350 nm. Aplicada a derivada de primeira ordem, o espectro obtido neste mesmo intervalo apresentou 2 pontos de anulação correspondentes aos dois fármacos (260,7 nm para o benazepril e 239,8 nm para a hidroclortiazida). Segundo Erk e Onur (1997), isto significou a possibilidade de doseamento destes fármacos em simultâneo sem a necessidade de separação preliminar e consideraram ainda a inexistência de metodologia oficial para esta mistura.

Comparando-se as metodologias, o método da absorvância apresentou um RSD ligeiramente maior que o da derivada, porém com a linearidade inferior. Enquanto o método da derivada requer um aparelho com modo derivativo, o outro método tem a vantagem de utilizar um espectrofotômetro simples, sendo suficiente para o doseamento desta associação. Considerando os resultados em termos de recuperação e da aplicação a amostra comercial de comprimidos, os 2 métodos mostraram simplicidade, rapidez e precisão habilitando-os à rotina no controle de qualidade. ERK e ONUR (1997) destacaram o fato de que estas metodologias propostas não requererem procedimentos prévios de separação, procedimento este exigido pela técnica cromatográfica (HPLC).

A determinação dos metais do grupo da platina constitui um dos maiores problemas analíticos. Grande variedade e complexidade de materiais (geológico, industrial, biológico), distribuição não homogênea dos metais além de uma larga faixa de concentração são fatores que determinam a escolha do método de análise mais adequado. Platina (Pt) e Rutênio (Ru) são utilizados como catalizadores em processos químicos e os métodos espectrofotométricos podem determiná-los na ordem de μg . A extração simultânea de Pt e Ru de soluções ácidas (clorídrica) e a quantificação direta um na presença do outro, usando a espectrofotometria derivada foi o objetivo principal do trabalho desenvolvido por Balcerzak e Wyrzykowska (1999).

Em meio clorídrico, os metais citados reagem prontamente com o SnCl_3 , formando complexos aniônicos como $\text{PtCl}_2(\text{SnCl}_3)_2$ e $\text{RuCl}_2(\text{SnCl}_3)_2$. Estes são extraídos (para separação e pré-concentração) através de aminas de alto peso molecular como trioctilamina (TOA) ou diantipirilmetano (DAM) preparadas em 1,2-dicloroetano. Dissolvidas em solventes orgânicos, estas aminas se comportam como cátions, podendo assim reagir com os complexos aniônicos (que apresentam os metais) formando então os pares de íons. É neste ponto que é aplicada a espectrofotometria derivada.

A concentração de 2-5% de TOA ou DAM foi considerada como a ideal para a extração dos metais e observou-se que o complexo-Ru se mantém estável por 2 dias. O artigo de Balcerzak e Wyrzykowska (1999) apresentou os espectros de zero ordem, onde são observadas as sobreposições justificando a aplicação das derivadas de primeira e segunda ordens. O método de avaliação considerou o ponto de anulação, tendo como intervalo de leitura 350-550 nm e não há menção quanto ao assentamento das ordenadas nem ao $\Delta\lambda$. A aplicação de TOA como agente extrator revelou resultados mais exatos e precisos na determinação de platina e rutênio através da espectrofotometria derivada. Os valores de RSD obtidos com a análise da mistura simulada relativos à Pt e Ru não ultrapassaram a 2,7% e 3,2%, respectivamente.

Determinação simultânea de acetoaminofen (ACE) e codeína (COD) através da espectrofotometria derivada de primeira ordem foi apresentada por Hanaee (1997) . O autor mencionou as diferentes técnicas analíticas utilizadas para a avaliação destes fármacos que, no entanto requerem maior tempo de execução e equipamentos mais sofisticados. O solvente utilizado na preparação das soluções foi o etanol 96%. O espectro de zero ordem demonstrou sobreposição de bandas inviabilizando a quantificação dos compostos.

A transformação deste espectro em derivada de primeira ordem resolveu a sobreposição permitindo determinar valores para ACE em 263,4 e 302,8 nm e para a COD em 227,8; 251,2 e 294,2 nm. Foram selecionados 263,4nm para o ACE e 251,2 nm para a COD uma vez que estes representam o ponto de anulação. Experimentos de recuperação simultânea dos dois compostos foram conduzidos e revelaram recuperação entre 99,6 a 103%.

Toral *et al* (1999), considerando a associação de clordiazepóxido e brometo de clidinium (para tratamento da depressão e ansiedade), e as técnicas cromatográficas existente para a determinação simultânea destes dois fármacos, desenvolveram um método espectrofotométrico derivado com a mesma finalidade. A acetonitrila foi o solvente selecionado após avaliações do comportamento dos fármacos em outros solventes.

O espectro de zero ordem obtido mostrou que o clordiazepóxido pode ser medido diretamente entre 240 e 350 nm, porém foi observada uma sobreposição de bandas. Toral *et al* (1999) avaliaram derivadas de primeira a quarta ordem e decidiram pela derivada de primeira ordem, pois apesar desta apresentar menor resolução, o ruído é significativamente menor. O método "zero-crossing" foi selecionado para determinação do brometo de clidinium em 220,8 nm enquanto que o método gráfico foi adotado para análise do clordiazepóxido com leitura em 283,6 nm. Os gráficos de calibração mostraram-se lineares entre 0,98 e 21,62 mg/L para o brometo de clidinium e 0,74 a 12,0 mg/L para o clordiazepóxido.

Os resultados obtidos por Toral *et al* (1999) com a recuperação das drogas foram estatisticamente válidos e a aplicação do método dentro das condições estabelecidas revelou teores em torno de 99,5% para os dois fármacos. Não foi observada interferência dos excipientes e os autores consideraram o método simples, exato, preciso e barato podendo ser uma alternativa analítica para determinação simultânea dos fármacos.

São reconhecidas as atividades antitérmica e analgésica do paracetamol (PA), largamente utilizado por via oral. Uma modificação química em sua estrutura permitiu a obtenção de um composto altamente hidrossolúvel, o cloridrato de propacetamol (PRO) viabilizando a administração parenteral. Este composto pode ser preparado em soluções salina ou de glicose onde sofre rapidamente hidrólise originando o PA. O método espectrofotométrico direto aplicado às substâncias revelou sobreposição nos espectros. Em função disto, Rodenas *et al* (2000) desenvolveram um método analítico utilizando a derivada de primeira ordem aplicada a soluções parenterais.

O solvente utilizado foi o etanol e $\Delta\lambda = 4$ nm. Com a aplicação da derivada, o PRO foi medido em 239 nm pelo método “zero-crossing” e a curva de calibração apresentou-se linear acima de 20,0 mg/L. A linearidade para o PA foi observada acima de 15,0 mg/L. Glicose (1g/L), cloreto de sódio (180 mg/L) e citrato de sódio (1 mg/L) não demonstraram interferência sobre PRO (10 mg/L) e PA (5 mg/L).

A estabilidade do PRO em etanol (100 mg/L) também foi avaliada. Após 4 dias, ocorreu perda próxima a 5% com formação de PA. Rodenas *et al* (2000) recomendaram o preparo diário de soluções mais diluídas (10 mg/L), uma vez que foi observada redução em 6% de PRO em 24 horas. A estabilidade do PRO em glicose é comprometida na ordem de 19,2% em 5 minutos, em 41,5% em 20 minutos e 75,4% em 80 minutos. Rodenas *et al* (2000) observaram em solução salina, uma redução de 50% em 3 horas.

A nisoldipina, um agente antihipertensivo e antianginal, sob efeito de luz UV e ambiental origina dois sub-produtos: nitrofenilpiridina e nitrosofenilpiridina. O trabalho de Marinkovic *et al* (2000) teve como objetivo

avaliar a foto-decomposição da matéria-prima e de comprimidos de nisoldipina utilizando a espectrofotometria derivada. Foram preparadas soluções padrão de nisoldipina e do seu análogo nitrofenilnisoldipina em metanol e construídas as respectivas curvas de calibração nas derivadas de primeira e segunda ordens. As amostras foram deixadas à luz ambiente a 25°C por 30 dias e a cada 5 dias, uma amostra foi coletada.

O espectro de zero ordem da nisoldipina, do análogo e de uma mistura com estes compostos (com a mesma concentração) revelou sobreposição de bandas. Aplicada a derivada de primeira ordem, foi possível avaliar a nisoldipina em 386 nm (*A* é maior) e o análogo em 285 nm. Marinkovic *et al* (2000) consideraram que esta circunstância é favorecida quando a concentração de nisoldipina está acima de 5,0 µg/mL.

A recuperação do análogo foi conduzida a partir de uma solução de concentração fixa de nisoldipina (5,0 µg/mL) à qual foram acrescentadas concentrações iguais a 0,25 e 0,5 µg/mL do análogo e os resultados obtidos na derivada de primeira ordem (em 285 nm) foram correspondentes a 98,7 e 100,1%, respectivamente. A quantidade mínima detectável do análogo na derivada de primeira ordem foi equivalente a 5% (0,25 µg/mL), enquanto na derivada de segunda ordem a concentração encontrada correspondeu a 2% com leitura em 291 nm. A aplicação do método às amostras de comprimidos comerciais submetidos às condições analíticas revelou redução no teor de 0,15-0,19% ao dia enquanto que a matéria prima apresentou perdas de 1,6% ao dia.

A espectrofotometria derivada de primeira ordem também foi explorada por Pascoal e Ferreira (2000) na análise simultânea de benzocaína (BEN) e cloreto de cetilpiridínio (CC) presentes em pastilhas. Os métodos descritos – termogravimetria, volumetria e espectrofotometria exigem separação e extração prévias. As soluções-padrão foram preparadas em solução hidroalcoólica 1:1 com concentrações iguais a 16,0 mg/L de CC e 15,0 mg/L de BEN.

Com a aplicação da derivada de primeira ordem usando o método do "zero-crossing", foram observadas leituras para o CC em 209,6; 220,7 e

240,5 nm, enquanto que para a BEN detectaram 4 pontos (214; 231,4; 258,8 e 310 nm). A relação linear entre *A* (amplitude) e concentração de BEN foi entre 10,0 a 25,0 mg/L e para o CC, o intervalo de 4,0 a 20,0 mg/L. Os melhores resultados foram obtidos com a regressão linear em 220,7 nm para o CC e 231,4 e 310 nm para a BEN.

Pascoal e Ferreira (2000) avaliaram ainda a influência da concentração de um fármaco sobre o outro através de soluções onde a concentração de um composto foi variável mantendo fixa a do segundo. Foram confirmados os λ ideais para a quantificação dos 2 fármacos simultaneamente. Os valores de recuperação obtidos dos dois compostos nas amostras simulada e comercial variaram entre 96,5 e 102,4% e os excipientes não demonstraram interferência. Os autores concluíram que o método apresentado é sensível, simples e seletivo.

3.6 – Determinação dos parâmetros de validação

A palavra qualidade apresenta várias definições segundo o Dicionário Aurélio Século XXI (FERREIRA, 1999). De origem latina – *quilate*, pode significar “*propriedade, atributo ou condição das coisas ou pessoas capaz de distinguí-los das outras e de lhes determinar a natureza*”. Pode ainda ser definida como “*numa escala de valores e que permite avaliar e, conseqüentemente aprovar, aceitar ou recusar qualquer coisa*”. São apresentados ainda conceitos relacionados a aspectos filosóficos, lógicos, estudos de linguagem e depreciativos.

Dentre as diferentes definições apresentadas por Dux (1990) em relação à qualidade, uma delas faz referência ao grau de satisfação que um dado objeto traz ao usuário, o que a princípio parece ser uma definição razoável. O autor exemplificou esta situação comparando custo, conforto e segurança ao se percorrer um determinado trecho de estrada, utilizando ora um carro tipo popular, ora um automóvel tipo Porsche. Ressalta, no entanto, que este tipo de raciocínio não pode ser aplicado quando se trata da qualidade de resultados analíticos.

O tema qualidade vem sendo explorado exhaustivamente o que conduz a uma evolução constante. Moretto e Mookherjea (2000) descreveram que a idéia de qualidade nos dias de hoje foi inicialmente abordada no livro "The Control of Quality in manufacturing" de G.S. Bradford de 1922. Os autores consideraram que desta data aos dias de hoje, podem ser reconhecidas cinco eras da qualidade: da inspeção, do controle estatístico, da garantia, da gestão estratégica e da validação.

A caracterização da primeira era é dada pelo controle dos artigos produzidos sob responsabilidade exclusiva do departamento de inspeção. A introdução de planos de amostragem e gráficos de controle em processo ilustram a era do Controle Estatístico, enquanto que na terceira fase o destaque é pela integração do Controle com a Produção. A consequência imediata desta associação foi a redução nas perdas originadas em produção inadequada.

A interação da direção da empresa com os setores de Controle e Produção caracterizaram a quarta fase ou da gestão estratégica, onde o nível de qualidade e os recursos para obtê-la foram estabelecidos. A quinta etapa pode ser identificada com a validação (MORETTO e MOOKHERJEA, 2000).

Tetzlaff, Sheperd e LeBlanc (1999) consideraram que a validação não se originou da regulamentação das Boas Práticas de Fabricação (GMPs) acreditando que a história da validação deve reportar-se aos incidentes que determinaram o Food and Drugs Administration (FDA) a solicitar tal procedimento. Tais incidentes incluem a morte de 107 indivíduos pelo uso de sulfanilamida (1937), deformações causadas pela talidomida (1962), intoxicações por tylenol (1982) e o escândalo dos medicamentos genéricos (1989).

Estes autores mencionaram ainda no trabalho, os sérios problemas de contaminação e/ou falta de esterilidade de injetáveis de grande volume, que levaram ao aparecimento de seis picos de septicemia nos EUA (1970-1976) e que resultaram nas propostas para a regulamentação dos injetáveis. Tetzlaff, Sheperd e LeBlanc (1999) então funcionários do FDA, estiveram

envolvidos diretamente com as atividades que conduziram à regulamentação da GMP.

Uma das idéias básicas de validação era garantir a responsabilidade de operação, produção e controle a pessoas ou grupos específicos, que responderiam pelo registro de dados e condução dos procedimentos pré-determinados, de maneira segura e reprodutível. A consequência seria uma produção rotineira confiável originando produtos acabados com qualidade e terapeuticamente eficazes. Protocolo, qualificação e validação foram então incorporados as GMPs. Os conceitos foram reavaliados e incluídos na revisão das GMPs de 1978, estendendo-se para todas as operações farmacêuticas (TETZLAFF, SHEPERD e LeBLANC, 1999).

Considera-se que o primeiro registro oficial de validação ocorreu no ano de 1978; em 1980 a validação foi definida como “o estabelecimento de evidência documentada de que o desenvolvimento de um processo específico permite cumprir com o objetivo para o qual foi desenhado” (MORETO, MOOKHERJEA, 2000).

Em 1983, o FDA adotou nova definição: validação de processos é um programa documentado que proporciona um alto grau de segurança de que um processo específico produzirá uma forma farmacêutica que satisfaz as especificações e atributos de qualidade pré-determinados. A Organização Mundial da Saúde (OMS) em 1992 adotou em sua GMP a validação de métodos e processos (MORETO, MOOKHERJEA, 2000).

Com a produção de algum bem dentro das exigências legais e éticas, acompanhada de um processo de validação adequado, pode-se admitir a confiabilidade do processo produtivo. Além disto, pode-se reduzir perdas, racionalizar o processo, proporcionar treinamento técnico, definir etapas críticas com conseqüente controle destas (COMISSÃO..., 1998; BARROS, HIRATA, 1998).

Os procedimentos de validação significam custos expressivos, mas devem ser encarados como investimentos. Milhões de análises químicas são realizadas no mundo diariamente envolvendo indústrias como alimentícia, farmacêutica, siderúrgica e análise forense. Resultados inadequados podem

significar gastos com indenizações e aqui se destaca a importância da validação: obtenção de dados corretos garantindo qualidade dos bens/produtos a serem utilizados ou consumidos (LEITE, 1996, EURACHEM, 1998).

O processo de fabricação pode ser afetado direta ou indiretamente com comprometimento da qualidade final do produto. É de conhecimento nos meios acadêmicos e industriais a necessidade de se validar desde pessoal, edifícios, equipamentos, matérias-prima, embalagem, rotulação, armazenamento e distribuição, utilidades (água, luz, aquecimento, ventilação, vapor, resíduos, limpeza) chegando à produção e métodos analíticos (COMISSÃO..., 1998).

Observa-se de maneira clara que a validação permite a integração entre as diferentes áreas de uma empresa, possibilitando um aprendizado coletivo e os resultados obtidos em termos de qualidade de um produto são muito significativos.

3.6.1- Validação de métodos analíticos

Pasteelnick (1993) considerou que a validação de métodos analíticos é a pedra fundamental no processo de validação, uma vez que a falta de avaliação adequada não permite julgar se o processo atingiu seu objetivo. Em outras palavras, se não há confiança nas medidas tomadas nas amostras em processo e produto final, a afirmação que se trata de um produto uniforme dentro dos padrões com garantia de uso com segurança e eficácia fica comprometida.

As Boas Práticas de Fabricação (BPF) determinam que os métodos analíticos devem assegurar que os produtos farmacêuticos apresentem-se de acordo com as especificações oficiais, atendendo padrões de exatidão e reprodutibilidade (RUDOLPH, 1993).

Uma vez desenvolvido um método analítico, deve ser validado, antes ou durante seu uso. A validação de uma metodologia analítica permite estabelecer as características adequadas ao uso pretendido. Na indústria

farmacêutica, a validação destes é uma exigência para o registro do medicamento (MEHTA, 1997).

Britain (1998) afirmou, baseado nos compêndios oficiais, que qualquer método analítico deve ser validado de acordo com as exigências farmacopéicas, considerando que qualquer metodologia pode ser incluída em uma monografia.

A dedicação de um capítulo sobre validação de métodos analíticos na farmacopéia americana expressa a importância deste tema.

A descrição básica sobre validação de métodos com resumo dos atributos necessários é entendida por muitos profissionais como de aplicação exclusiva a métodos cromatográficos. No entanto, tais procedimentos podem e devem ser aplicados a outras técnicas analíticas. Considerando isto, Britain (1998) ilustrou seu artigo com a aplicação destes princípios em espectrofotometria UV e de absorção atômica. O levantamento bibliográfico do autor apontou vários trabalhos com técnicas espectrofotométricas e a questão de validação é sistematicamente abordada.

Rudolph (1993) e Pastelnick (1993) concordaram que se não houver metodologia analítica adequada que garanta a qualidade de um produto, o programa de validação estará comprometido considerando que a validação de métodos é parte integrante do Controle de Qualidade.

A USP 25 (2002) refere-se à validação de métodos como *“o processo pelo qual é estabelecido, através de estudos laboratoriais, as características de desempenho do método e que reúne os requerimentos para a aplicação analítica desejada”*. Apresenta ainda, os parâmetros individuais de desempenho necessários aos métodos como exatidão, precisão, especificidade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, resistência e robustez.

Apesar de pequenas variações no significado dos parâmetros e nos procedimentos de aplicação, observa-se a preocupação de harmonização dos termos (EURACHEM, 1998; INTERNACIONAL...,2002).

Implícito no processo de validação de métodos para avaliar o desempenho analítico, está a utilização de equipamentos calibrados adequadamente, bem como a condução das análises de forma competente pelo analista, que na necessidade, poderá tomar decisões apropriadas a partir dos resultados (EURACHEM, 1998).

Mehta (1997) afirmou que a qualidade dos resultados analíticos depende tanto da capacidade instrumental como da experiência do analista que deverá seguir exatamente à descrição apresentada no Procedimento Operacional Padrão (POP). Enfatiza que um treinamento deficiente do pessoal, operação inadequada de instrumentos entre outros problemas que podem ocorrer no laboratório conduzirão a resultados inadequados. O autor destacou ainda, a importância do uso de vidrarias calibradas, reagentes de grau analítico e padrões garantidos prevenindo uma eventual interferência de impurezas. Concordantes com esta colocação, Pastelnick (1993) e Garfield (1994) reforçaram a importância de analista, equipamentos, reagentes e consideram que condições ambientais podem influir nestes pontos.

Desde que um método foi adotado para uso em um laboratório, deverá ser exatamente reproduzido pelo analista sem desvios significativos. Qualquer modificação deve ser claramente entendida e registrada na técnica original. Alterações significativas não validadas podem gerar resultados ruins determinados mais pelo desempenho questionável do analista, do que em relação ao método (GARFIELD, 1994).

Uma análise quantitativa deve ser avaliada em termos de propensão a diferentes erros (WATSON, 1999).

Dux (1990) por sua vez relacionou o Controle de Qualidade com operações necessárias para avaliar a exatidão de um resultado analítico. Leite (1996) considerou que ao se avaliar um resultado/medida, o valor experimental está sujeito a erro.

A validação de um método não significa ausência de erros (MEHTA, 1997). Em uma análise quantitativa, basicamente existem dois tipos de erros: sistemáticos (ou *bias*) e indeterminados (*random*). Os erros

sistemáticos são aqueles considerados possíveis de serem eliminados ou corrigidos. Dentre estes podem ser citados os erros humanos, os mais fáceis e comuns de ocorrer durante uma análise. Tomada de amostra não representativa, identificação incorreta da amostra, desenvolvimento inadequado do método, leitura e transposição de dados incorretos, diluição e padronização de soluções erradas, uso de vidraria não apropriada e mal lavada, volumes errados e falha ao zerar um aparelho podem perfeitamente representar os erros humanos. Estes podem ser minimizados com treinamento e redobrando a atenção sobre os analistas (DUX, 1990; GARFIELD, 1994; WATSON, 1999).

A prática efetiva da calibração periódica dos equipamentos colabora com a redução nos erros exemplificados por falha na checagem do nível da balança analítica, falha na tomada de material que não foi estabilizado em termos de temperatura/umidade antes da pesagem, inadequado pré-aquecimento de aparelho com comprometimento da estabilidade do mesmo e falhas em componentes de um cromatógrafo (DUX, 1990; GARFIELD, 1994; WATSON, 1999).

Erros devido a variações ao acaso, de causas desconhecidas geralmente irregulares e de difícil controle pelo analista como temperatura, iluminação, pureza dos reagentes, controle de aquecimento com ou sem ebulição, homogeneidade da amostra, variação no grau de extração de um princípio ativo podem ilustrar os erros indeterminados (LEITE, 1996).

Garfield (1994) exemplificou erros indeterminados com as amostras sensíveis à luz (solar, UV), contaminantes do ar e água, picos ou irregularidades na eletricidade, efeito da temperatura na medida de volumes de líquidos voláteis e umidade entre outros. Como estes erros não podem ser previstos, eliminados ou controlados, seus efeitos nos resultados podem ser medidos com a análise estatística.

Ao se produzir um medicamento de acordo com uma fórmula, pode-se considerar o teor do princípio ativo rotulado como o valor teórico ou declarado. Após a produção, embalagem e acondicionamento, este produto

apresentará um valor verdadeiro do fármaco que pode ser denominado de valor real.

Rudolph (1993), ao mencionar a exatidão como um dos principais critérios analíticos a ser avaliado, objetivando a validação de um método analítico, a considerou como a capacidade do método em determinar o valor verdadeiro da amostra. A concordância entre valor experimental e o valor verdadeiro é entendida por Leite (1996), pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (AGENCIA..., 2003) e pela Internacional Conference on Harmonization of Technical – ICH (2002) como sendo a exatidão do método.

Carr, Wahlich e Tanner (1994), consideraram satisfatória a definição de exatidão onde se observa a maior proximidade dos resultados das análises obtidas pela aplicação do método, com o valor verdadeiro. Esta definição é coincidente com a apresentada na USP 25 (2002).

Considerando que não há credibilidade para um resultado isolado em química analítica, o número de 10 determinações é recomendado permitindo uma boa visão estatística em termos de média aritmética (LEITE, 1996).

São caminhos legítimos para determinar a exatidão de um método: aplicação do método proposto a um padrão de referência; comparação de resultados deste procedimento com aqueles obtidos com um segundo método bem caracterizado e validado e a aplicação do método a misturas sintéticas preparadas simulando o produto acabado, às quais são acrescentadas quantidades conhecidas de analito (CAAR, WAHLICH, TANNER, 1994; GARFIELD, 1994; EURACHEM, 1998; USP 25, 2002).

Como a utilização de um padrão de referência apresenta disponibilidade limitada e custos elevados, é usual o emprego de padrões que tiveram estabilidade e pureza avaliadas (EURACHEM, 1998).

Pasteelnick (1993), considerou que um método é exato se na média, promove a resposta verdadeira e cujos erros sistemáticos foram corrigidos. A questão resposta verdadeira está ligada a valores obtidos em função do analito e não pela presença química/física ou por coincidência de outro agente.

A especificidade é definida segundo a USP 25 (2002) como “a capacidade de calcular sem equívocos, o analisado na presença de componentes que podem estar presentes como impurezas, produtos de degradação e excipientes da matriz”. No caso de análises, a especificidade pode ser entendida na demonstração de que o procedimento analítico não foi afetado pela presença de excipientes ou impurezas. Estas considerações também são apresentadas pela ICH (2002) e pela ANVISA (AGENCIA..., 2003).

Leite (1996), apresentou como sinônimo de especificidade a seletividade, esta relacionada ao fato do método ser indiferente a presença de interferentes na determinação da analito, ou seja, o valor encontrado provém somente do analisado.

Carr, Wahlich e Tanner (1994), declararam que especificidade e seletividade são comumente considerados termos intercambiáveis. No entanto, fazem uma distinção entre estes dois. Consideraram que especificidade de um método refere-se à determinação quantitativa de um parâmetro físico-químico ou grupo funcional de um ou mais diferentes analitos da matriz, enquanto que seletividade é decorrente da detecção qualitativa do analito na presença de componentes da matriz. Estes autores mencionaram ainda que especificidade é a habilidade de um método não separativo (titrimetria e UV, por exemplo) distinguir os diferentes componentes e, seletividade é a habilidade de um método separativo analisar diferentes componentes.

Swartz e Krull (1998) comentaram que específico é um termo geralmente usado para avaliar a resposta analítica para um único componente em exame. O termo seletivo é considerado pelos autores como adequado para descrever um método que dá resposta para diferentes componentes que podem ou não ser diferenciados. A USP 25 (2002) descreve que IUPAC e AOAC preferem o termo seletividade.

Britain (1998) justificou a determinação da especificidade para métodos não cromatográficos uma vez que estes não apresentam etapa prévia de separação, processo este que garante a não interferência dos

excipientes. Nestes métodos, em função das propriedades físicas ou químicas, pode-se garantir sua capacidade de determinar com exatidão, a concentração da analito, mesmo em amostras de composição mais complexa.

Mesmo com algumas diferenças na terminologia, o atributo exatidão está associado à especificidade ou seletividade deixando clara a importância de se proceder à análise de misturas sintéticas, às quais são acrescentadas quantidades conhecidas do analisado para avaliação da exatidão (BRITAIN, 1998; USP, 2002).

Após adição de uma quantidade conhecida de analito a uma matriz, a porcentagem recuperada no ensaio pode expressar a exatidão. De acordo com isto, Garfield (1994) sugeriu dois procedimentos com este objetivo. Primeiramente a amostra é analisada em replicatas para assegurar uma razoável precisão. Uma tomada de ensaio é obtida correspondente à metade do valor declarado do analito e a esta porção, é adicionada quantidade de padrão igual à outra metade do analito. Após submeter a amostra reforçada ao método, determina-se a quantidade total recuperada através de uma fórmula que considera a quantidade encontrada menos a metade da concentração do analito encontrada na primeira análise, dividido pela quantidade adicionada de padrão e multiplicado por 100.

No segundo procedimento sugerido por Garfield (1994), são tomadas amostras de placebo às quais são acrescentadas quantidades variáveis de padrão e Britain (1998) sugere acréscimos na ordem de 50, 75, 100, 125 e 150% em relação ao valor teórico. Com os dados é possível construir uma curva de calibração e o desempenho do método é considerado significativo quando as concentrações determinadas respondem linearmente aos acréscimos feitos.

Para Garfield (1994), este procedimento é especialmente apropriado naquelas circunstâncias onde se observa a interferência dos componentes da matriz e não há possibilidade de suprimi-los. Ressalta ainda a importância de adicionar o padrão no início da análise, uma vez que a adição tardia pode significar uma recuperação falsa.

O Eurachem Guide (1998) sugere para teste de recuperação, análise de seis alíquotas da amostra fortificada e respectivas amostras não fortificadas. A porcentagem de recuperação é calculada considerando o resultado da amostra fortificada menos o valor da amostra não fortificada, dividida pela quantidade adicionada de padrão multiplicado por 100.

Outro importante atributo exigido na validação de métodos analíticos é a precisão, definida como a concordância entre valores experimentais obtidos nas mesmas condições analíticas, com avaliação da dispersão dos dados individuais em relação ao valor médio encontrado (RUDOLPH, 1993).

A precisão é definida na USP 25 (2002) como “o grau de concordância entre resultados individuais quando o método é aplicado repetidamente a múltiplas tomadas de ensaio de uma amostra homogênea. A precisão de um método analítico é usualmente expressa com o Desvio-Padrão (DP) ou Desvio padrão-relativo (Coeficiente de Variação – CV) de uma série de medidas”.

Determinada a média de uma série de valores, indicativa de um valor em torno do qual os dados se distribuem, a estatística fornece ferramentas para avaliar o grau de variabilidade dos dados. O Coeficiente de Variação (CV) ou Desvio-Padrão Relativo (DPR) é muito utilizado para expressar a relação percentual do DP com a média dos valores obtidos (LEITE, 1996). Em outras palavras, a precisão através do CV avalia o quanto o resultado médio de ensaio está suficientemente próximo do valor verdadeiro.

As definições de precisão e como pode ser determinada são muito semelhantes e não geram dúvidas entre os diferentes autores e compêndios (PASTEELNICK, 1993; GARFIELD, 1994; CAAR, WAHLICH, TANNER, 1994; BRITAIN, 1998; WATSON, 1999; ICH, 2002; USP 25, 2002, AGENCIA...,2003).

A precisão é uma indicação de erros *random* ou ao acaso (PASTEELNICK, 1993; CAAR, WAHLICH e TANNER, 1994; EURACHEM 1998) e geralmente entendida ou sub-dividida em repetibilidade e reprodutibilidade.

A repetibilidade de um método é avaliada pela análise de replicatas de uma determinada amostra por um analista, fazendo uso de um mesmo equipamento e reagentes, dentro de um curto intervalo de tempo no mesmo laboratório (CAAR, WAHLICH, TANNER, 1994; JARDY, VIAL, 1999; ICH, 2002; USP 25, 2002).

Análises de uma mesma amostra feitas no mesmo laboratório por diferentes analistas em diferentes dias em diferentes equipamentos expressam a precisão intermediária (PASTEELNICK, 1993; ICH, 2002; USP 25, 2002)). Normalmente nesta avaliação há um grande espaço de tempo entre as análises e é útil em casos particulares (ICH, 2002). Esta precisão pode ser valiosa quando da padronização do método antes da submissão a farmacopéias (USP25, 2002).

Na avaliação da reprodutibilidade são introduzidas variáveis como diferentes ocasiões, diferentes equipamentos, diferentes analistas, diferentes laboratórios e diferentes lotes de reagentes. Os dados obtidos devem demonstrar que as mudanças, dentro das condições analíticas, não colaboram com o aumento nos erros *random* garantindo segurança e confiabilidade nos resultados (CAAR, WAHLICH, TANNER, 1994; JARDY, VIAL, 1999; PINTO, FERRARINI, GATTI, 2003).

A reprodutibilidade, considerando sua definição, tem aplicação importante nos estudos colaborativos (ICH, 2002). Neste sentido, DUX (1990) sugeriu a aplicação do teste F para comparação de precisão seja entre métodos analíticos ou entre analistas.

A determinação da precisão pela análise de número suficiente de alíquotas de uma amostra homogênea, capaz de calcular estatisticamente DP ou CV é consensual. A USP 25 (2002) considera que a repetibilidade pode ser calculada a partir de três concentrações, sendo cada uma representada por três replicatas ou um mínimo de seis determinações considerando 100% da concentração teórica respeitando os limites do método.

Vários fatores que podem comprometer estes dois atributos na validação de um método analítico foram descritos anteriormente. Garfield

(1994) alerta sobre as pequenas variações do dia-a-dia em termos de equipamentos. Muitas das alterações são negligenciadas uma vez que os resultados obtidos decorrem da comparação entre padrão e amostra. Este autor comenta que se estas pequenas oscilações não forem monitoradas, serão evidentes os comprometimentos a médio e longo prazo.

A linearidade é outro importante atributo de um método analítico a ser investigado. Oficialmente é descrita como *"a habilidade de elucidar resultados do teste que, direta ou através de uma transformação matemática, são proporcionais à concentração do analisado nas amostras dentro de um determinado intervalo"* (USP 25, 2002). Sua determinação pode ser estabelecida graficamente relacionando valores obtidos em função da concentração analisada. Havendo relação linear, os resultados podem ser avaliados pelo cálculo da regressão linear. A própria USP 25 (2002) sugere um mínimo de cinco concentrações a serem avaliadas.

Britain (1998), Watson (1999) e ICH (2002) admitiram a linearidade de um procedimento como a capacidade de gerar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito dentro de uma determinada variação. Considerando a importância da regressão linear na avaliação dos resultados, Britain (1998) ressaltou o valor do coeficiente de correlação alegando que um valor deste menor de 0,99 ou acima de 1,01 indicam pouca precisão ou não linearidade do método. O atendimento à Lei de Beer na faixa de concentração utilizada foi destacado pelos autores.

Concordantes com definição e procedimentos para avaliação da linearidade estão Carr, Wahlich e Tanner (1994) e a ANVISA (AGENCIA...,2003) acreditando que a regressão linear representa o caminho mais apropriado para análise dos dados.

Para verificar a linearidade de um método analítico, Pasteelnick (1993) recomendou o uso de concentrações que compreendam de 25 a 125% do valor declarado. Leite (1996) acrescentou que uma forma de observar a linearidade é relacionar a leitura com a concentração, denominando o resultado de fator de resposta da linearidade (FL). Com os vários FL, calcula-se o CV que deve ser igual ou inferior a 2% para que o

método seja considerado linear. Este autor sugeriu ainda que as análises sejam feitas em triplicata por ponto.

Limites de detecção e de quantificação são considerados parâmetros requeridos para garantir o uso de métodos que analisam traços, por exemplo, de impurezas, resíduo de solventes e metais. Carr, Wahlich, Tanner (1994) e Leite (1996) concordaram que estes limites devem ser avaliados quando os métodos utilizam equipamentos que operam com o máximo de sensibilidade. Britain (1998) ilustrou seu artigo com a determinação destes limites empregando a técnica de absorção atômica no doseamento de traços de um metal em um determinado fármaco.

A USP 25 (2002) define limite de detecção como a *“menor concentração ou quantidade do analisado em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada dentro das condições experimentais estabelecidas”*. Sugere que a determinação seja baseada na análise de amostras com quantidades conhecidas de analito com o estabelecimento do nível mínimo o qual pode ser confiavelmente detectado. Esta definição é coincidente com a apresentada pela ICH (2002) e pela ANVISA (AGENCIA..., 2003).

O limite de quantificação corresponde a menor quantidade de uma substância em exame presente na amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão por meio de um procedimento experimental (CAAR, WAHLICH, TANNER, 1994; LEITE, 1996; BRITTAIN, 1998; EURACHEM, 1998; ICH, 2002; USP 25, 2002, AGENCIA..., 2003).

Para Britain (1998) estes dois limites podem ser determinados através de análises de um certo número de amostras com baixa concentração, repetidas vezes calculando ao final o DP dos resultados. O DP médio é então calculado que será dividido pela inclinação da reta (b) para se estimar o ruído/sinal associado ao método. Os fatores 3 e 10 multiplicados a este valor representam respectivamente limite de detecção e limite de quantificação. Carr, Wahlich, Tanner (1994) justificaram o uso destes fatores – 3 e 10, admitindo que estes permitem níveis de confiança iguais a 99,86%.

Os dois últimos atributos mencionados na USP 25 (2002) são a resistência e robustez. A resistência de um método analítico representa o grau de reprodutibilidade nos resultados após análises de amostras sob variadas condições como diferentes laboratórios, diferentes analistas e instrumentos, diferentes lotes de reagentes, diferentes temperaturas em diferentes dias. É entendida como a falta de interferência destes fatores sobre os resultados analíticos. De acordo com este compêndio oficial, a determinação da resistência pode ser feita através da análise de alíquotas dentro de condições ambientais e de equipamentos diferentes, mas dentro das especificações do método. Com o grau de reprodutibilidade obtido em função das variáveis, pode-se então comparar estes resultados com aqueles obtidos nas condições normais de análise.

A repetição de quase todo o trabalho da validação por um segundo analista enfocando exatidão, precisão e linearidade é a consideração que Britain (1998) fez em relação à resistência de um método analítico.

Oficialmente, a robustez, parâmetro analítico introduzido na Farmacopéia Americana 23ª edição (BRITAIN, 1996), é definida como a capacidade do método analítico se manter inalterado em função de pequenas e deliberadas variações, além de dar indicação de confiabilidade durante seu uso, definição apresentada também na USP 25 (2002), EURACHEM (1998) e adotada pela ANVISA (AGENCIA..., 2003). Em outras palavras, é a capacidade do método continuar a apresentar resultados exatos e precisos (confiáveis) mesmo diante de pequenas variações e ainda analisar a influência destas variáveis nos resultados.

Alterações deliberadas no método com investigação do efeito subsequente no desempenho do mesmo é considerado na avaliação da robustez. Ainda que em qualquer método se determinadas etapas não se desenvolvem correta e cuidadosamente, efeitos severos no desempenho do mesmo podem determinar a inviabilidade de uso rotineiro. Estes pontos críticos devem ser identificados durante o desenvolvimento do método e avaliados para proceder ao devido controle. Os testes de robustez são

normalmente aplicados para avaliar tanto precisão como exatidão (EURACHEM, 1998).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1– Material

4.1.1 – Diclofenaco sódico

4.1.1.1 – Padrão:

- substância química de referência – diclofenaco sódico (DS), identificada com o lote 45H0058 SIGMA com teor de pureza igual a 99%.

4.1.1.2 - Matrizes analíticas:

- para a preparação da matriz analítica 1 (MA1) que simula formulações já existentes no mercado, utilizou-se da substância padrão descrita acima e de substâncias de grau farmacêutico procedentes de laboratórios Galena, Milkaut S.A., Palmares e Quimibras e a fórmula é apresentada abaixo:

diclofenaco sódico	50,0 mg
lactose	75,0 mg
amido	65,0 mg
estearato de magnésio	5,0 mg
goma arábica	25,0 mg
total	220,0 mg

A matriz analítica isenta do padrão (placebo ou MA 2) foi preparada obedecendo as mesmas proporções descritas acima.

4.1.1.3 - Amostras de medicamentos :

- foram adquiridas em farmácias de Maringá – PR amostras de comprimidos de DS, identificadas como amostra referência (AR), amostras similares (AS 1, 2, 3, 4, e 5) e amostras genéricas (AG 1 e 2) procedentes de diferentes laboratórios farmacêuticos.

4.1.1.4 - Reagentes e equipamentos :

- a avaliação do grau de pureza do DS padrão foi realizada segundo British Pharmacopea 1988, utilizando ácido perclórico 0,1N SV, ácido acético glacial R, violeta cristal SI, bureta 25,0 mL, erlenmeyer de 250,0 mL e agitador magnético FISATOM 202. Para a padronização do ácido perclórico, foram utilizados biftalato de potássio, ácido acético glacial e violeta cristal SI. No desenvolvimento do método espectrofotométrico proposto, foi empregado o espectrofotômetro SHIMADZU UV-1601, cubetas de 1 cm e metanol. Todos os reagentes e sais empregados foram de grau analítico.

4.1.2 – Glimepirida

4.1.2.1 – Padrão:

- substância padrão de glimepirida (lote 8022) com teor de pureza igual a 99%. Este padrão foi analisado no Infra-Vermelho e os resultados comparados àqueles obtidos com outro padrão de GP (lote NC 21891-01). Os principais grupos e funções químicas foram então comparados aos dados descritos para a glibenclamida (outra sulfoniluréia).

4.1.2.2 – Matrizes analíticas:

- foram preparadas matrizes analíticas, correspondentes a 1, 2 e 4 mg de glimepirida por comprimido e para diferenciá-las foram utilizados corantes. As substâncias utilizadas nas formulações são de grau farmacêutico e são as seguintes: lactose DCL 111® e M 200® (diluyente), celulose microcristalina PH 102® e 200® (diluyente/desintegrante), estearato de magnésio (lubrificante), EXPLOTAB® (aglutinante/deslizante), corante vermelho ponceau, corante amarelo quinoleína laca, corante azul índigo laca, polivinilpirrolidona (PVP) S 630® (aglutinante), CELLACTOSE® (diluyente) e carbonato de magnésio (diluyente) (WADE e WELLER, 1994). Considerando o desenvolvimento da parte experimental, foram preparadas as seguintes matrizes analíticas, identificadas como fórmulas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8.

Fórmula 1 (F 1)

	MA 1 ^{1mg}	MA 1 ^{2mg}	MA 1 ^{4mg}
glimepirida	1,0 mg	2,0 mg	4,0 mg
lactose DCL 111	22,5 mg	22,5 mg	22,5 mg
celulose microcristalina PH 102	121,5 mg	120, 0 mg	118,0 mg
estearato de magnésio	3,0 mg	3,0 mg	3,0 mg
explotab	1,5 mg	1,5 mg	1,5 mg
corante	0,5 mg (VP)*	0,5 mg (AQ + AI)*	0,5 mg (AI)*
total	150,0 mg	150,0 mg	150,0 mg

(VP)* - corante vermelho ponceau (AI)* - corante azul índigo laca

(AQ + AI)* - corantes amarelo quinoleína laca e azul índigo laca

Fórmula 2 (F 2)

	MA 1 ^{1mg}	MA 1 ^{2mg}	MA 1 ^{4mg}
glimepirida	1,0 mg	2,0 mg	4,0 mg
lactose M 200	69,5 mg	69,5 mg	68,7 mg
celulose microcristalina PH 200	71,5 mg	71,0 mg	70,5 mg
estearato de magnésio	2,5 mg	2,5 mg	2,5 mg
explotab	1,5 mg	1,5 mg	1,5 mg
PVP S 630	2,5 mg	2,5 mg	2,5 mg
corante	1,5 mg (VP)*	1,0 mg (AQ + AI)*	0,33 mg (AI)*
total	150,0 mg	150,0 mg	150,0 mg

Fórmula 3 (F 3)

	MA 1 ^{1mg}	MA 1 ^{2mg}	MA 1 ^{4mg}
glimepirida	1,0 mg	2,0 mg	4,0 mg
lactose M 200	22,5 mg	22,5 mg	22,5 mg
celulose microcristalina PH 200	121,5 mg	120,5 mg	118,5 mg
estearato de magnésio	3,0 mg	3,0 mg	3,0 mg
explotab	1,5 mg	1,5 mg	1,5 mg
corante	0,5 mg (VP)*	1,0 mg (AQ + Al)*	0,5 mg (Al)*
total	150,0 mg	150,0 mg	150,0 mg

Fórmula 4 (F 4)

	MA 1 ^{2mg}
glimepirida	2,0 mg
cellactose	141,0 mg
estearato de magnésio	2,5 mg
explotab	1,5 mg
PVP S 630	2,5 mg
corante (AQ + Al)*	0,5 mg
total	150,0 mg

Fórmula 5 (F 5)

	MA 1 ^{2mg}
glimepirida	2,0 mg
cellulose microcristalina PH 200	90,0 mg
carbonato de magnésio	51,0 mg
estearato de magnésio	2,5 mg
explotab	1,5 mg
PVP S 630	2,5 mg
corante (AQ + Al)*	0,5 mg
total	150,0 mg

Fórmula 6 (F 6)

	MA 1 ^{2 mg}
glimepirida	2,0 mg
cellulose microcristalina PH 200	71,0 mg
cellactose	70,0 mg
estearato de magnésio	2,5 mg
explotab	1,5 mg
PVP S 630	2,5 mg
corante (AQ + AI)*	0,5 mg
total	150,0 mg

Fórmula 7 (F 7)

	MA 1 ^{1mg}	MA 1 ^{2 mg}	MA 1 ^{4 mg}
glimepirida	1,0 mg	2,0 mg	4,0 mg
celulose microcristalina PH 200	94 mg	92,5 mg	90,0 mg
carbonato de magnésio	50,0 mg	50,0 mg	50,0 mg
estearato de magnésio	2,5 mg	2,5 mg	2,5 mg
explotab	1,5 mg	1,5 mg	1,5 mg
PVP S 630	2,5 mg	2,5 mg	2,5 mg
corante	0,05 mg (VP)*	0,05 mg (AQ + AI)*	0,05 mg (AI)*
total	150,0 mg	150,0 mg	150,0 mg

Fórmula 8 (F 8)

	MA 1 ^{1mg}	MA 1 ^{2 mg}	MA 1 ^{4 mg}
glimepirida	1,0 mg	2,0 mg	4,0 mg
celulose microcristalina PH 200	94,0 mg	92,5 mg	90,0 mg
carbonato de magnésio	50,0 mg	50,0 mg	50,0 mg
Estearato de magnésio	2,5 mg	2,5 mg	2,5 mg
explotab	1,5 mg	1,5 mg	1,5 mg
PVP S 630	2,5 mg	2,5 mg	2,5 mg
total	150,0 mg	150,0 mg	150,0 mg

Em paralelo, foram preparadas as respectivas Matrizes Analíticas 2 (isentas de glimepirida).

4.1.2.3 - Amostras de medicamentos :

- foram compradas amostras de medicamentos disponíveis atualmente no Brasil, na forma de comprimidos sendo uma amostra de referência (AR) e uma amostra similar (AS). Estes comprimidos apresentam dose declarada igual a 4 mg de GP.

4.1.2.4 – Reagentes e equipamentos :

- soluções de NaOH 0,1M; 0,5M e 1M (grau analítico), termômetro, espectrofotômetro SHIMADZU UV-1601, cubetas de quartzo de 1 cm, manta de aquecimento e vidraria calibrada.

Foi acoplado ao espectrofotômetro um computador, no qual foi implantado o *UVPC Personal Spectroscopy Software Package* que permitiu o armazenamento dos dados obtidos bem como a construção dos espectros. Foi implantado também o programa *Microcall ORIGIN® versão 3.5* para construção das curvas de calibração.

4.2 – Métodos espectrofotométricos

4.2.1 – Diclofenaco sódico

4.2.1.1 – Espectros de absorção

Procedimento: foram pesadas exatamente cerca de 100,0 mg de DS padrão e transferidas para balão volumétrico de 100 mL com q.s. de metanol. Uma alíquota de 5,0 mL foi transferida para outro balão volumétrico de 100 mL completando-se o volume com metanol. Alíquotas iguais a 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 12,5 e 15,0 mL foram transferidas para balões volumétricos de 50 mL e o volume foi ajustado com o solvente. As concentrações finais foram iguais a 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 12,5 e 15,0 $\mu\text{g/mL}$ de DS que foram submetidas a varredura entre 200 e 350 nm.

4.2.1.2 – Curva de Ringbom

Procedimento: para um balão volumétrico de 100 mL foram transferidas 100,0 mg de DS padrão exatamente pesadas e solubilizadas em q.s de metanol. Uma alíquota igual a 20,0 mL foi transferida para balão volumétrico de 200 mL ajustando-se o volume com q.s. de solvente. Para uma série de 20 balões volumétricos de 50 mL foram transferidos sucessivamente volumes variáveis entre 1,0 e 13,0 mL completando-se o volume com metanol. As concentrações finais variaram de 2,0 a 26,0 $\mu\text{g/mL}$ de DS e o λ máximo utilizado para leitura destas foi igual a 282 nm.

4.2.1.3 – Curva de calibração

Procedimento: foram exatamente pesadas 100,0 mg de DS padrão e transferidas para balão volumétrico de 100 mL solubilizando-as com volume suficiente de metanol. Uma alíquota de 10,0 mL foi transferida para outro balão volumétrico de 100 mL diluindo ao volume final com o solvente. Volumes variáveis entre 2,0 e 11,0 mL foram transferidos para uma série de 10 balões volumétricos de 50 mL ajustando o volume final com q.s. de

metanol. As concentrações finais corresponderam ao intervalo de 4,0 a 22,0 µg/mL de DS e as absorvâncias foram determinadas em 282 nm contra branco (metanol).

4.2.1.4 – Avaliação da MA 2 – diclofenaco sódico

4.2.1.4.1 – Preparo da solução padrão de DS

Procedimento: foram transferidas para um balão volumétrico de 100 mL, 150,0 mg de DS padrão exatamente pesadas e solubilizadas em q.s. de metanol. Foi tomada uma alíquota de 10,0 mL e transferida para balão volumétrico de 100 mL com ajuste do volume com o solvente. Para uma série de 3 balões volumétricos de 50 mL foram transferidas alíquotas de 5,0 mL e q.s de metanol. A concentração final destas soluções foi igual a 15,0 µg/mL de DS com a leitura espectrofotométrica em 282 nm contra branco.

4.2.1.4.2 – Preparo da solução a partir da MA 2

Procedimento: a partir do pó da MA 2, foi pesado o equivalente a 150,0 mg de DS transferindo para um balão volumétrico de 100 mL. Foram então adicionados cerca de 30 mL de metanol e a solução foi agitada por cerca de 5 minutos. Após, o volume foi ajustado com q.s. de metanol. A solução obtida foi submetida a uma filtração simples com descarte dos primeiros 10 mL. Do novo filtrado, foi tomada uma alíquota de 10,0 mL sendo transferida para um balão volumétrico de 100 mL. O volume final foi ajustado com metanol e desta solução, foram transferidas 3 alíquotas de 5,0 mL para respectivos balões volumétricos de 50 mL. Após ajuste dos volumes finais com o solvente, as soluções foram submetidas à leitura espectrofotométrica em 282 nm contra branco.

4.2.1.5 – Aplicação do método às amostras

4.2.1.5.1 – Preparo da solução padrão de DS

Procedimento: foram transferidas para um balão volumétrico de 100 mL, 150,0 mg de DS padrão exatamente pesadas e solubilizadas em q.s. de metanol. Os demais procedimentos seguiram a descrição do item 5.2.1.4.1. A concentração final destas soluções foi igual a 15,0 µg/mL de DS com a leitura espectrofotométrica em 282 nm contra branco.

4.2.1.5.2 – Preparo das soluções a partir da MA1 e amostras AR, AS e AG

Procedimento: a partir do pó das amostras, foram exatamente pesadas o correspondente a 150,0 mg de DS transferindo para respectivos balões volumétricos de 100 mL. Cerca de 50 mL de metanol foram acrescentados e cada solução foi então agitada por 5 minutos. Os volumes foram ajustados com metanol e as soluções foram submetidas a uma filtração simples com papel de filtro tomando o cuidado de rejeitar os primeiros 10 mL. De cada novo filtrado, exatos 10,0 mL foram tomados e transferidos para uma série de balões volumétricos de 100 mL. Os volumes foram então ajustados com metanol. De cada uma destas soluções, foram transferidos 5,0 mL para uma série de 10 balões volumétricos de 50 mL aos quais foram acrescentadas q.s. de metanol. As absorvâncias foram avaliadas em 282 nm contra branco.

4.2.1.6 – Recuperação do padrão

4.2.1.6.1 – Preparo da solução padrão de DS

Procedimento: foram preparadas 3 replicatas de solução padrão contendo 15,0 µg/mL de DS seguindo descrição do item 4.2.1.4.1

4.2.1.6.2 – Preparo das soluções a partir da MA1, amostras AR, AS e AG

Procedimento: para balão volumétrico de 100 mL foram transferidas exatas 75,0 mg de DS padrão e solubilizadas com cerca de 30 mL de metanol. A esta solução foi acrescentado o equivalente a 75,0 mg da DS proveniente do pó de cada amostra. As soluções foram agitadas por cerca de 5 minutos e os volumes ajustados com o solvente. Procedeu-se à

filtração simples com papel de filtro rejeitando os primeiros 10 mL. De cada novo filtrado, exatos 10,0 mL foram transferidos para respectivos balões volumétricos de 100 mL completando os volumes com q.s. de metanol. De cada solução obtida, foram tomadas 10 replicatas de 5,0 mL e transferidas para uma série de balões volumétricos de 50 mL. Os volumes foram ajustados e as absorvâncias foram determinadas em 282 nm contra branco. Para cálculo dos resultados de cada análise, foi utilizada a seguinte expressão (GARFIELD, 1994):

$$\%R = \frac{F - \frac{1}{2}O}{S} \cdot 100$$

Onde :

F = teor em mg de DS encontrado na análise da amostra adicionada de padrão
--

O = teor em mg de DS encontrado na análise da amostra sem adição de padrão
--

S = quantidade de DS padrão adicionada (mg)

A porcentagem média de recuperação de cada amostra foi obtida após análise de 10 replicatas.

4.2.1.7 – Linearidade

4.2.1.7.1 – Preparo de solução padrão de DS

Procedimento: foram exatamente pesadas 75,0 mg de DS padrão e devidamente transferidas para um balão volumétrico de 100 mL. Foram acrescentados cerca de 30 mL de metanol agitando a solução por cerca de 5 minutos. Após, o volume foi ajustado com metanol. Exatos 10,0 mL foram transferidos para balão volumétrico de 50 mL completado-se o volume com o solvente. Da solução obtida, foram transferidas sucessivamente para 3 balões volumétricos de 50 mL, alíquotas de 5,0 mL com ajuste do volume final com metanol. A concentração destas soluções foi igual a 15,0 µg/mL de DS e as absorvâncias determinadas em 282 nm contra branco.

4.2.1.7.2 – Preparo de solução a partir da MA 2 acrescida de diferentes teores de padrão

Procedimento: inicialmente foi preparada uma solução padrão de DS contendo 7500,0 µg/mL a partir de 750,0 mg de DS exatamente pesadas e solubilizadas em 100 mL de metanol. Considerando o peso médio da MA 1 (220 mg) menos a quantidade declarada de DS (50 mg), foram pesadas do pó da MA 2, 5 alíquotas iguais a 170,0 mg. Estas foram sucessivamente transferidas para balões volumétricos de 100 mL. Foram acrescentados 30 mL de metanol a cada balão volumétrico e as soluções foram agitadas por cerca de 5 minutos. Após, foram acrescentados sucessivamente volumes exatos iguais a 5,0; 8,0; 10,0; 12,0 e 15,0 mL da solução padrão de DS recém preparada. Os volumes finais foram ajustados com o metanol e as 5 soluções preparadas foram então filtradas com papel de filtro com descarte dos primeiros 10 mL. De cada novo filtrado, uma alíquota de 5,0 mL foi transferida para balão volumétrico de 50 mL à qual foi associado volume suficiente de metanol. De cada nova diluição, foram tomadas 3 alíquotas de 5,0 mL que foram então transferidas para 3 balões volumétricos de 50 mL. Os volumes dos 15 balões volumétricos foram ajustados com o solvente e após homogeneização das soluções, as absorvâncias foram determinadas em 282 nm contra branco. As concentrações das soluções acrescidas de padrão de DS foram calculadas considerando a média das 3 absorvâncias, divididas pela média das 3 absorvâncias do padrão e multiplicadas pela concentração do padrão. Com os resultados das absorvâncias médias, concentrações experimentais de DS e as quantidades de DS padrão acrescentadas foram construídas retas com a determinação de r (coeficiente de correlação) e a (intersecção da reta). Admite-se como método linear àquele que apresenta reta com coeficiente de correlação r próximo a 1 e com a próximo de zero (BRITAIN, 1998).

4.2.1.8 – Limite de Detecção e Limite de Quantificação

4.2.1.8.1 – Preparo da solução padrão de DS

Procedimento: foram pesadas exatamente 100,0 mg de DS padrão e transferidas para balão volumétrico de 100 mL com adição de cerca de 30 mL de metanol. Após solubilização do padrão, o volume final foi ajustado com q.s. de metanol. Desta solução, uma alíquota de 5,0 mL foi tomada e transferida para outro balão volumétrico de 100 mL e diluída com q.s. de solvente. Para uma série de 3 balões volumétricos de 50 mL foram transferidas sucessivamente alíquotas de 5,0 mL. O volume foi então ajustado com metanol ficando as soluções com uma concentração de 5,0 µg/mL de DS. As absorvâncias foram determinadas em 282 nm contra branco.

4.2.1.8.2 – Preparo das soluções contendo diferentes teores de DS padrão

Procedimento: a partir do pó da MA 1, foi pesado exatamente o correspondente a 100,0 mg de DS transferindo para balão volumétrico de 100 mL. Cerca de 30 ml de solvente foi acrescentado e após agitação de 5 minutos o volume foi ajustado. Procedeu-se à filtração e rejeição dos primeiros 10 mL como descrito anteriormente. Do novo filtrado, foi tomada uma alíquota de 10,0 mL e diluída com q.s de metanol em balão volumétrico de 200 mL. Foram preparadas 5 séries de 10 balões volumétricos de 50 mL. A cada série de 10 balões volumétricos foram transferidas sucessivamente da última solução, alíquotas de 5,0; 4,0; 3,0; 2,0 e 1,0 mL. Os volumes foram ajustados com metanol e as absorvâncias foram determinadas em 282 nm contra branco. As concentrações finais das soluções ficaram no intervalo decrescente de 5,0 a 1,0 µg/mL de DS e o resultado encontrado em mg de DS é expressão da média das leituras de 10 replicatas. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) podem ser obtidos através das fórmulas abaixo (BRITAIN, 1998):

$$LD = \frac{\text{desviopadrão médio}}{b} \cdot 3 = X \text{ } \mu\text{g/mL de DS}$$

$$LQ = \frac{\text{desviopadrão médio}}{b} \cdot 10 = Y \text{ } \mu\text{g/mL de DS}$$

4.2.2 - Glimepirida

4.2.2.1 – Avaliação de condições da solubilidade considerando concentração da solução alcalina e tempo de aquecimento

Procedimento: foram pesadas exatamente 9 alíquotas de 125,0 mg de GP e transferidas para 9 beckers de 100 mL. A cada série de 3 beckers, foram acrescentados sucessivamente cerca de 30 mL de NaOH 0,1M, 0,5M e 1M. Foram separados 3 grupos de beckers contendo um representante de solução 0,1M, 0,5M e 1M. O primeiro grupo foi aquecido em manta na faixa de 80-90°C durante 5 minutos, enquanto o segundo grupo de balões volumétricos a 10 minutos e o terceiro grupo a 15 minutos. Após, as 9 soluções foram resfriadas e transferidas para respectivos balões volumétricos de 100 mL e os volumes ajustados com as respectivas soluções de NaOH. De cada balão volumétrico, uma alíquota de 10,0 mL foi transferida sucessivamente para outra série de 9 balões volumétricos de 100 mL. Os volumes foram ajustados com as devidas soluções alcalinas. De cada solução preparada, com auxílio de uma bureta, alíquotas de 6,0 ml foram sucessivamente transferidas para outra série de 9 balões volumétricos de 50 mL. Após ajuste dos volumes, a concentração final das soluções foi igual a 15,0 $\mu\text{g/mL}$ de glimepirida e as absorvâncias foram observadas no intervalo entre 215 e 260 nm.

4.2.2.2 – Avaliação de soluções padrão de GP em NaOH 0,1M após aquecimento entre 5-10 minutos à cerca de 92°C seguidas de leituras a intervalos de 15 minutos

Procedimento: foram pesadas exatamente 160,0 mg de GP padrão e transferidas para um becker de 100 mL. Foram acrescentados 30 mL de NaOH 0,1M e a solução foi aquecida em manta na faixa de 80-90°C entre 5-10 minutos. Após o resfriamento, a solução foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL e o volume foi ajustado com q.s. da solução alcalina. Desta solução, uma alíquota de 10,0 mL foi transferida para um balão volumétrico de 200 mL completando-se o volume com NaOH 0,1M. Para uma série de 10 balões volumétricos de 50 mL foram transferidas alíquotas exatas variáveis entre 2,0 e 11,0 mL aos quais foram adicionados volumes de solução alcalina para ajuste de volumes. As concentrações finais variaram entre 3,2 e 17,6 µg/mL de GP e as absorvâncias foram determinadas a 230 nm. As soluções foram reavaliadas a cada 15 minutos até completar 75 minutos. Uma última leitura foi feita aos 120 minutos.

4.5.2.2.3 - Espectros de absorção de ordem zero da glimepirida padrão

Procedimento: foram exatamente pesadas 100,0 mg de glimepirida padrão e transferidas para um becker de 100 mL. Cerca de 30 mL de NaOH 0,1M foram acrescentados levando a mistura a aquecimento na faixa de 80-90°C entre 5-10 minutos. A solução obtida foi resfriada e transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL e q.s. de NaOH 0,1M foi adicionada. Desta, uma alíquota de 10,0 mL foi transferida para um balão volumétrico de 200 mL e o volume foi ajustado com a solução alcalina. Para uma série de 10 balões volumétricos de 50 mL, foram transferidos volumes iguais a 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 12,0; 14,0; 16,0; 18,0; 20,0 e 22,0 mL aos quais foram acrescentadas q.s. de NaOH 0,1M. As absorvâncias das soluções foram determinadas no intervalo entre 215-260 nm contra branco (NaOH 0,1M).

4.2.2.4 – Curva de Ringbom

Procedimento: foram transferidas 160,0 mg de GP padrão exatamente pesada para um becker com cerca de 30 mL de NaOH 0,1M,. Esta solução foi aquecida em manta na faixa de 80-90°C entre 5-10 minutos e após seu resfriamento, foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e q.s. de NaOH 0,1M foi acrescentada. Uma alíquota de exatos 10,0 mL foi transferida para balão volumétrico de 200 mL e o volume foi ajustado com a solução alcalina. Para uma série de 20 balões volumétricos de 50 mL foram transferidos sucessivamente volumes variáveis entre 1,0 e 14,0 mL aos quais foram acrescentadas q.s. de NaOH 0,1M. As concentrações das soluções apresentaram-se na faixa de 1,6 a 22,4 µg/mL de GP padrão e as absorvâncias foram determinadas em 230 nm contra branco.

4.2.2.5 - Curva de calibração

Procedimento: foram exatamente pesadas 200,0 mg de glimepirida padrão e transferidas para um becker de 100 mL. Cerca de 30 mL de NaOH 0,1M foram acrescentados levando a mistura a aquecimento em manta na faixa de 80-90°C entre 5-10 minutos. A solução obtida foi resfriada e transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL e q.s. de NaOH 0,1M foi adicionada. Desta, uma alíquota de 10,0 mL foi transferida para um balão volumétrico de 200 mL e o volume foi ajustado com a solução alcalina. Para uma série de 10 balões volumétricos de 50 mL, foram transferidos quantitativamente volumes iguais a 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0 e 11,0 mL aos quais foram acrescentadas q.s. de NaOH 0,1M. As concentrações destas foram variáveis entre 4,0 e 22,0 µg/mL de glimepirida e as absorvâncias das soluções foram determinadas em 230 nm contra branco (NaOH 0,1M).

4.2.2.6 – Avaliação dos excipientes lactose e celulose e das MAs 1 e 2 da fórmula 1– F1

4.2.2.6.1- Preparo da solução padrão de glimepirida

Procedimento: 150,0 mg de glimepirida padrão foram exatamente pesadas e transferidas para um becker de 100 mL e cerca de 30 mL de NaOH 0,1M foram acrescentados. A mistura foi aquecida em manta na faixa de 80-90°C entre 5 e 10 minutos. Após o resfriamento, a solução foi quantitativamente transferida para um balão volumétrico de 100 mL e o volume foi ajustado com a solução alcalina. Uma alíquota de 10,0 mL foi transferida para outro balão volumétrico de 100 mL e q.s. de NaOH 0,1M foi adicionada. Desta, 3 alíquotas de exatos 5,0 mL foram transferidas sucessivamente para 3 balões volumétricos de 50 mL e os volumes foram ajustados com NaOH 0,1M. A concentração final destas soluções foi igual a 15,0 µg/mL de GP e submetidas a varredura entre 215 e 250 nm contra branco (NaOH 0,1M).

4.2.2.6.2 – Preparo da solução da MA 1^{2mg} F1

Procedimento: a partir do pó da MA 1^{2mg} F1, o equivalente a 75,0 mg de glimepirida foi exatamente pesado e transferido para um becker de 100 mL com cerca de 50 mL de NaOH 0,1M. Após o aquecimento dentro das condições analíticas estabelecidas, a solução foi resfriada e quantitativamente transferida para um balão volumétrico de 100 mL com q.s. da solução alcalina. A solução foi homogeneizada e submetida a uma filtração simples com papel de filtro, rejeitando os primeiros 15 mL. Do novo filtrado, foi tomada uma alíquota de 10,0 mL e transferida para um balão volumétrico de 50 mL ao qual foi acrescentada q.s. de NaOH 0,1M. Para outro balão volumétrico de 50 mL foram transferidos 5,0 mL ajustando o volume com NaOH 0,1M. A solução foi avaliada entre 215 e 250 nm contra banco.

4.2.2.6.3 – Preparo da solução da MA 2^{2mg} F1

Procedimento: o equivalente a 75,0 mg de GP, foi exatamente pesado a partir do pó da MA 2^{2mg} F1 e transferido para um becker de 100 mL ao qual foram adicionados cerca de 30 mL de NaOH 0,1M. O aquecimento,

filtração, rejeição do filtrado e demais procedimentos analíticos reproduziram a descrição do item 4.2.2.6.2.

4.2.2.6.4 - Preparo da solução de lactose DCL 111

Procedimento: o equivalente a 75,0 mg de GP foi exatamente pesado e transferido para um becker de 100 mL. Após adição de cerca de 30 mL de NaOH 0,1M, reproduziram-se os procedimentos analíticos descritos no item 4.2.2.6.2.

4.2.2.6.5 – Preparo da solução de celulose microcristalina PH 102

Procedimento: para um becker de 100 mL foi transferido o correspondente a 75,0 mg de GP exatamente pesado. Foram adicionados cerca de 30 mL de NaOH 0,1M e foram reproduzidas as condições analíticas descritas no item 4.2.2.6.2.

4.2.2.7 – Avaliação dos excipientes da fórmula 2 – F2

4.2.2.7.1 - Preparo da solução padrão de glimepírida (GP)

Procedimento: para um becker de 100 mL foram transferidas exatas 75,0 mg de GP padrão e foram acrescentados cerca de 30 mL de NaOH 0,1M. Após aquecimento na faixa de 80-90°C entre 5-10 minutos, a solução foi resfriada e transferida volumetricamente para balão volumétrico de 100 mL. Desta solução, uma alíquota exata de 10,0 mL foi tomada e transferida para balão volumétrico de 50 mL e q.s. de NaOH 0,1 M foi acrescentada completando-se a seguir o volume. Para 3 balões volumétricos de 50 mL foram transferidos sucessivamente volumes de 5,0 mL ajustando o volume final com a solução alcalina. Procedeu-se a leitura das soluções contra branco no intervalo entre 215-260 nm.

4.2.2.7.2 – Preparo da solução de lactose M 200

Procedimento: o equivalente a 75,0 mg de GP foi exatamente pesado e transferido para becker de 100 mL. Foram acrescentados 50 mL de NaOH

0,1M e a solução foi aquecida entre 80-90°C respeitando o tempo estabelecido. Após o resfriamento, esta solução foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL e o volume foi então ajustado com NaOH 0,1M. Uma filtração simples foi conduzida rejeitando os primeiros 15 mL. Do filtrado seguinte, um volume de 10,0 mL foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL e q.s. de NaOH 0,1M foi adicionada. Para 3 balões volumétricos de 50 mL foram transferidas 3 alíquotas de exatos 5,0 mL e os volumes finais foram ajustados com a solução alcalina. A leitura das soluções foi entre 215-260 nm contra branco.

4.2.2.7.3 – Preparo da solução de celulose microcristalina PH 200

Procedimento: para um becker de 100 mL foi transferido o equivalente a 75,0 mg de GP exatamente pesado ao qual foram adicionados cerca de 50 mL de NaOH 0,1M. O aquecimento assim como as demais condições analíticas subseqüentes seguiram a descrição do item 4.2.2.7.2.

4.2.2.7.4 – Preparo da solução de PVP S 630

Procedimento: o equivalente a 75,0 mg de GP foi exatamente pesado, transferido para um becker de 100 mL com a condução do experimento nas mesmas condições descritas no item 4.2.2.7.2.

4.2.2.7.5 – Preparo da solução de explotab

Procedimento: foi transferido para um becker de 100 mL o correspondente a 75,0 mg de GP, exatamente pesado e a seguir foram adicionados 30 mL de NaOH 0,1M. Aquecimento, resfriamento, ajuste de volumes, filtração e demais condições analíticas obedeceram à descrição do item 4.2.2.7.2.

4.2.2.7.6 – Preparo da solução de estearato de magnésio

Procedimento: a quantidade de estearato de magnésio correspondente a 75,0 mg de glimepirida foi exatamente pesada, transferida para um becker de 100 mL e submetida aos mesmos procedimentos analíticos descritos no item 4.2.2.7.2.

4.2.2.8 – Avaliação das MAs 2 e lactose da fórmula 2 – F2

4.2.2.8.1 - Preparo da solução padrão de glimepirida (GP)

Procedimento: foram reproduzidos os mesmos procedimentos analíticos descritos no item 4.2.2.7.1 para obtenção de uma solução com concentração final igual a 15,0 µg/mL de GP.

4.2.2.8.2 – Preparo das soluções das MA 2^{1mg}, MA 2^{2mg} e MA 2^{4mg} - F 2

Procedimento: foram pesadas exatamente 5,70 g do pó de cada MA 2 (equivalentes a 75,0 mg de GP) e sucessivamente transferidas para 3 beakers de 100 mL aos quais foram adicionados 50 mL de NaOH 0,1M. Foram aquecidas a 80-90°C entre 5-10 minutos, resfriadas e quantitativamente transferidas para 3 balões volumétricos de 100 mL, com ajuste de volume com a solução alcalina. As soluções foram filtradas com o cuidado de rejeitar os primeiros 15 mL e, de cada segundo filtrado, 3 alíquotas iguais a 10,0 mL foram transferidas para outros 3 balões volumétricos de 50 mL. Os volumes foram ajustados com NaOH 0,1M e para outra série de 3 balões volumétricos de 50 mL foram transferidas alíquotas de 5,0 mL. Foram acrescentadas q.s. de NaOH 0,1M e as absorvâncias das soluções foram determinadas entre 215-260 nm.contra branco.

4.2.2.8.3 – Preparo da solução de lactose M 200

Procedimento: foram reproduzidas as condições analíticas conforme item 4.2.2.7.2.

4.2.2.9 –Avaliação das misturas de glimepirida padrão e teores variáveis de lactose (50, 100 e 150% em relação ao valor 69,5 mg de lactose presente na F2)

	GP pad	lactose
mistura L1a	100 mg	3,475 g
mistura L1b	100 mg	6,950 g
mistura L1c	100 mg	10,425 g
mstura L2a	200 mg	3,475 g
mistura L2b	200 mg	6,950 g
mistura L2c	200 mg	10,425 g
mistura L4a	400 mg	3,475 g
mistura L4b	400 mg	6,950 g
mistura L4c	400 mg	10,425 g

4.2.2.9.1 – Preparo da solução de glimepirida padrão

Procedimento: foi preparada uma solução padrão de glimepirida com concentração final igual a 15,0 µg/mL nas mesmas condições experimentais descritas no item 4.2.2.7.1.

4.2.2.9.2 – Preparo da solução de lactose M 200

Procedimento: a quantidade de lactose correspondente a 75,0 mg de GP foi exatamente pesada e transferida para becker de 100 mL. Foram acrescentados 50 mL de NaOH 0,1M e a solução foi aquecida a 80-90°C entre 5-10 minutos. Após o resfriamento, filtração, rejeição dos primeiros 15,0 mL, os mesmos procedimentos analíticos descritos no item 4.2.2.7.2 foram obedecidos. A leitura das soluções foi entre 215-260 nm contra branco.

4.2.2.9.3 – Preparo das soluções das Misturas L 1a, 1b, 1c; L 2a, 2b, 2c e L 4a, 4b, 4c

Procedimento: do pó de cada mistura, foram pesadas alíquotas equivalentes a 75,0 mg de GP e transferidas sucessivamente para 9 beckers de 100 mL. A estas foram adicionadas respectivos volumes de 50 mL de NaOH 0,1M as soluções foram aquecidas à temperatura e no tempo descritos no item anterior. Após o resfriamento, as soluções foram

quantitativamente transferidas para 9 balões volumétricos de 100 mL ajustando-se os volumes com NaOH 0,1M. Procedimentos de filtração, rejeição dos primeiros 15 mL foram obedecidos. Dos novos filtrados obtidos, foram transferidas alíquotas de 10,0 mL para uma série de 9 balões volumétricos de 50 mL aos quais foram adicionadas q.s. de NaOH 0,1M. Para outra série de 9 balões volumétricos de 50 mL foram transferidas sucessivamente alíquotas de 5,0 mL. Os volumes foram ajustados com a solução alcalina e as 9 soluções foram avaliadas contra branco entre 220-260 nm.

4.2.2.10 – Avaliação das misturas de glimepirida padrão e diferentes teores de PVP (50, 100 e 150% em relação ao valor de 2,5 mg de PVP presente na F2)

	GP pad	PVP
mistura 1 ^a	100 mg	125 mg
mistura 1 ^b	100 mg	250 mg
mistura 1 ^c	100 mg	375 mg
mistura 2 ^a	200 mg	125 mg
mistura 2 ^b	200 mg	250 mg
mistura 2 ^c	200 mg	375 mg
mistura 4 ^a	400 mg	125 mg
mistura 4 ^b	400 mg	250 mg
mistura 4 ^c	400 mg	375 mg

4.2.2.10.1 – Preparo da solução padrão de GP

Procedimento: foi obtida uma solução de concentração igual a 15,0 µg/mL de GP e para tanto reproduziram-se os procedimentos analíticos conforme item 4.2.2.7.1.

4.2.2.10.2 – Preparo da solução de PVP S 630

Procedimento: a quantidade de PVP correspondente a 75,0 mg de GP foi exatamente pesada e transferida para um becker de 100 mL e tratada de acordo com o item 4.2.2.7.2. A leitura das soluções foi entre 215-260 nm contra branco.

4.2.2.10.3 – Preparo das soluções das Misturas 1^{a,b,c}, 2^{a,b,c} e 4^{a,b,c}

Procedimento: do pó de cada mistura, foi pesado o equivalente a 75,0 mg de GP que foram transferidas sucessivamente para uma série de 9 beakers de 100 mL. Volumes de 30 mL de NaOH 0,1M foram adicionados e os demais procedimentos analíticos reproduziram a descrição do item 4.2.2.9.3.

4.2.2.11 –Avaliação da lactose M 200 e MAs 2 da fórmula 3 – F3

4.2.2.11.1 – Preparo da solução padrão de glimepirida

Procedimento: a partir de 75,0 mg de GP padrão foi obtida solução de concentração igual a 15,0 µg/mL conforme descrição no item 4.2.2.7.1.

4.2.2.11.2 – Preparo da solução de lactose M 200

Procedimento: considerando que em cada comprimido segundo a fórmula 3, existem 22,5 mg de lactose, foi exatamente pesado o equivalente a 75,0 mg de GP, transferindo para um becker de 100 mL. Foram adicionados 30 mL de NaOH 0,1M levando a mistura ao aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos. Os demais procedimentos foram conduzidos conforme item 4.2.2.7.2.

4.2.2.11.3 – Preparo das soluções das MAs 2^{1mg, 2mg e 4mg} F3

Procedimento: do pó de cada MA 2, o correspondente a 75,0 mg de GP, foi exatamente pesado e transferido sucessivamente para 3 beakers de 100 mL. Foram adicionados 50 mL de NaOH 0,1M, as soluções foram aquecidas a 80-90°C entre 5-10 minutos e após, resfriadas. Quantitativamente foram transferidas para 3 balões volumétricos de 100 mL e q.s. de NaOH 0,1M foi acrescentada para ajuste de volume. As mesmas foram filtradas com rejeição dos primeiros 15 mL e, de cada novo filtrado, foram tomadas alíquotas de 10,0 mL e transferidas para 3 balões volumétricos de 50 mL completando-se os volumes com a solução alcalina.

Para outros 3 balões volumétricos de 50 mL foram transferidas alíquotas de 5,0 mL ajustando os volumes finais com NaOH 0,1M. As soluções foram avaliadas contra branco entre 215-260 nm.

4.2.2.11 – Avaliação da cellactose e carbonato de magnésio

4.2.2.11.1 – Preparo da solução padrão de glimepirida

Procedimento: foram reproduzidos os procedimentos analíticos conforme item 4.2.2.7.1 para obtenção de uma solução de concentração igual a 15,0 µg/mL de GP.

4.2.2.11.2 – Preparo da solução de cellactose

Procedimento: a quantidade de cellactose correspondente a 75,0 mg de glimepirida foi exatamente pesada e transferida para um becker de 100 mL ao qual foram adicionados 50 mL de NaOH 0,1M. Aquecimento, filtração e demais procedimentos analíticos foram obedecidos conforme item 4.2.2.7.2. A solução foi avaliada entre 215 e 260 nm contra branco.

4.2.2.11.3 – Preparo da solução de carbonato de magnésio

Procedimento: a quantidade de carbonato de magnésio equivalente a 75,0 mg de glimepirida foi exatamente pesada e submetida às mesmas condições da análise descritas no item 4.2.2.7.2. O intervalo entre 215-260 nm foi utilizado para leitura da solução.

4.2.2.12 – Avaliação das MAs 2 das fórmulas F4, F5 e F6

4.2.2.12.1 – Preparo da solução padrão de GP

Procedimento: foram exatamente pesadas 25,0 mg de GP padrão e adequadamente transferidas para um becker de 100 mL. Os demais procedimentos analíticos obedeceram à descrição constante no item 4.2.2.7.1. A concentração final da solução foi igual a 15,0 µg/mL de GP.

4.2.2.12.2 – Preparo das soluções das MAs 2 das fórmulas F4, F5 e F6.

Procedimento: foram exatamente pesadas do pó de cada MA 2 o equivalente a 25,0 mg de GP e transferidas para 3 beakers de 100 mL aos quais foram adicionadas 3 alíquotas de 50 mL de NaOH 0,1M. Os procedimentos experimentais subsequentes desenvolveram-se conforme item 4.2.2.7.2.

4.2.2.13 – Avaliação das MAs 1 das fórmulas F4, F5 e F6

4.2.2.13.1– Preparo da solução padrão de GP

Procedimento: foram reproduzidos os procedimentos analíticos conforme item 4.2.2.7.1 para obtenção de uma solução de concentração igual a 15,0 µg/mL de GP.

4.2.2.13.2 - Preparo das soluções das MAs 1^{2mg} - Fórmulas 4, 5 e 6

Procedimento: a quantidade de pó de cada MA 1 equivalente a 75,0 mg de glimepirida foi exatamente pesada e transferida para um becker de 100 mL. Foram adicionadas as respectivas alíquotas de 30 mL de NaOH 0,1M levando as soluções ao aquecimento entre 80-90°C durante 5-10 minutos. As mesmas foram resfriadas e quantitativamente transferidas para respectivos balões volumétricos de 100 mL com q.s. de NaOH 0,1M. Estas foram filtradas com rejeição dos primeiros 15 mL e, de cada novo filtrado, alíquotas de 10,0 ml foram sucessivamente transferidas para outra série de balões volumétricos de 50 mL. Os volumes foram ajustados e após, para 3 séries de 3 balões volumétricos de 50 mL foram transferidas alíquotas de 5,0 mL. As soluções respectivas às F4, F5 e F6 tiveram seus volumes ajustados com NaOH 0,1M e submetidas à leitura no intervalo 215-260 nm contra branco.

4.2.2.14 – Avaliação das soluções do corantes vermelho ponceau (VP), amarelo quinoleína laca (AQ) + azul índigo laca e azul índigo laca (AI)

4.2.2.14.1– Preparo da solução padrão de GP

Procedimento: foram reproduzidos os procedimentos analíticos conforme item 4.2.2.7.1 para obtenção de uma solução de leitura com concentração igual a 15,0 µg/mL de GP.

4.2.2.14.2 – Preparo da soluções dos corantes vermelho ponceau (VP), amarelo quinoleína laca (AQ) + azul índigo laca (AI) e azul índigo laca (AI)

Procedimento: foram exatamente pesadas quantidades iguais a 25,0 mg dos corantes VP e AI. Dos corantes AI e AQ foram pesadas exatamente 12,5 mg e misturadas. Cada tomada de ensaio (correspondente a quantidade de corantes em 50 comprimidos) foi então transferida para respectivos beakers de 100 mL. Foram acrescentados 30 mL de NaOH 0,1N e as soluções foram aquecidas a 80-90°C entre 5-10 minutos. Após o resfriamento das soluções, estas foram quantitativamente transferidas para 3 balões volumétricos de 100 mL ajustando os volumes com NaOH 0,1M. Filtração e rejeição dos primeiros 15 mL foram feitas. De cada solução filtrada, foram tomados 10,0 mL transferindo para uma série de 3 balões volumétricos de 50 mL aos quais foram acrescentadas q.s. de solução alcalina. Para outra série de 3 balões volumétricos de 50 mL foram transferidos 5,0 mL e os volumes foram então ajustados com NaOH 0,1M. A concentração final destas soluções foi igual a 5,0 µg/mL de corante (VP, AQ e AI) e as absorvâncias foram determinadas entre 215-260 nm contra branco.

4.2.2.15 –Avaliação das soluções do corantes vermelho ponceau (VP), amarelo quinoleína laca (AQ) + azul índigo laca e azul índigo laca (AI) diluídos em 10 vezes

4.2.2.15.1– Preparo da solução padrão de GP

Procedimento: foram reproduzidos os procedimentos analíticos conforme item 4.2.2.7.1 para obtenção de uma solução de leitura com concentração igual a 15,0 µg/mL de GP.

4.2.2.15.2 - Preparo das soluções dos corantes diluídos 10 vezes

Procedimento: a partir da primeira diluição do item 4.2.2.14.2 (concentração igual a 250,0 µg/mL de corante), foram tomadas alíquotas de 10,0 mL que foram transferidas sucessivamente para 3 balões volumétricos de 50 mL completando-se os volumes com NaOH 0,1M. Destas, para outra série de 3 balões volumétricos de 50 mL foram transferidas exatamente alíquotas de 5,0 mL e os volumes foram ajustados com a solução alcalina. A concentração final das soluções foi igual a 0,5 µg/mL de corante e as absorvâncias foram determinadas entre 220-260 nm contra branco.

4.2.2.16 – Avaliação das MAs 2 da fórmula 7 – F7

4.2.2.16.1 – Preparo da solução de glimepirida padrão

Procedimento: foram exatamente pesadas 25,0 mg de GP padrão e transferidas para um becker de 100 mL com 30 mL de NaOH 0,1N. A solução foi aquecida a 80-90°C entre 5-10 minutos e após, resfriada. Foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL e o volume foi ajustado com NaOH 0,1M. Para um balão volumétrico de 50 mL foi transferida uma alíquota de 15,0 mL à qual foi acrescentada q.s. de solução alcalina. Para uma série de 3 balões volumétricos de 50 mL foram transferidas sucessivamente alíquotas de 10,0 mL completando o volume em seguida com NaOH 0,1M. A concentração das soluções de leitura foi igual a 15,0µg/mL de glimepirida e as absorvâncias foram determinadas entre 215-260 nm contra branco.

4.2.2.16.2 – Preparo das soluções das MA 2^{1mg}, MA 2^{2mg} e MA 2^{4mg} F7

Procedimento: quantidades dos pós de cada MA 2 da F7, equivalentes a 25,0 mg de GP foram exatamente pesadas e transferidas para 3 beckers de 100 mL aos quais foram adicionados cerca de 30 mL de NaOH 0,1M. Após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos, as soluções foram resfriadas e transferidas para uma série de 3 balões volumétricos de

100 mL. Os volumes foram ajustados com NaOH 0,1M e na seqüência, as soluções foram filtradas com rejeição dos primeiros 15 mL. Das 3 novas soluções obtidas, foram sucessivamente transferidas alíquotas de 15,0 mL para uma série de balões volumétricos de 50 mL aos quais foram adicionadas q.s. de NaOH 0,1M. De cada solução, foram transferidas 3 alíquotas de 10,0 mL para uma série de 3 balões volumétricos de 50 mL e q.s. da solução alcalina foi acrescentada. Foram obtidas assim, 3 soluções de uma mesma MA 2 totalizando 9 soluções a serem avaliadas. As absorvâncias foram determinadas em 230 nm contra branco.

4.2.2.17 – Avaliação das MAs 1 da fórmula 7 – F7

4.2.2.17.1 – Preparo da solução de glimepirida padrão

Procedimento: foram reproduzidas as condições analíticas do item 4.2.2.16.1 para obtenção de soluções com concentração igual a 15,0 µg/mL de GP.

4.2.2.17.2 – Preparo das soluções das MA 1^{1mg}, MA 1^{2mg} e MA 1^{4mg} F7

Procedimento: a partir do pó de cada MA1 da F7, foram exatamente pesadas quantidades equivalentes a 25,0 mg de GP e transferidas para 3 beakers de 100 mL. Foram acrescentados 50 mL de NaOH 0,1M e as 3 soluções foram aquecidas a 80-90°C entre 5-10 minutos e após, resfriadas. Quantitativamente foram transferidas para um balão volumétrico de 100 mL e q.s. de NaOH 0,1M foram adicionadas para ajuste de volumes. Estas foram filtradas com rejeição dos primeiros 15 mL. Dos filtrados subsequentes, foram transferidas alíquotas de 30,0 mL para uma série de 3 balões volumétricos de 100 mL e os volumes foram ajustados com a solução alcalina. De cada solução obtida, para uma série de 9 balões volumétricos de 50 mL, foram transferidas alíquotas de 10,0 mL e após, os volumes foram ajustados com NaOH 0,1M. Foram obtidas 27 soluções, sendo 9 representativas de cada MA 1. Todas foram avaliadas entre 215-260 nm contra branco.

4.2.2.18 – Recuperação do padrão – F7

4.2.2.18.1 – Preparo da solução padrão de GP

Procedimento: foram pesadas exatamente 30,0 mg de GP padrão e adequadamente transferidas para um becker de 100 mL ao qual foi acrescentado 50 mL de NaOH 0,1M. A solução foi aquecida a 80-90°C entre 5-10 minutos. Após o resfriamento, foi transferida para um balão volumétrico de 200 mL, ao qual foram adicionados q.s. de NaOH 0,1M para ajuste de volume. A concentração desta solução foi igual a 150,0 µg/mL de GP. Desta solução, 3 alíquotas de 10,0 mL foram tomadas e transferidas para 3 balões volumétricos de 100 mL. Com os volumes ajustados com a solução alcalina, a concentração destas soluções foi igual a 15,0 µg/mL de GP. As absorvâncias foram determinadas em 230 nm contra branco.

4.2.2.18.2 – Preparo das soluções das MA 1^{1mg, 2mg e 4 mg} F7 acrescidas de GP padrão

Procedimento: do pó de cada MA 1, foi exatamente pesado o equivalente a 15,0 mg de GP e cada amostra foi transferida para respectivo becker de 100 mL. Foram acrescentados a cada amostra de pó, 50 mL de NaOH 0,1M submetendo-as ao mesmo tratamento descrito no item anterior. Após resfriamento, as 3 soluções foram transferidas para 3 balões volumétricos de 100 mL e os volumes foram ajustados com a solução alcalina, seguidas de filtração e descarte dos primeiros 10 mL. Foram obtidos novos filtrados. Para 18 balões volumétricos de 100 ml (divididos em 6 séries de 3), foram transferidos volumes das soluções das MAs e de solução padrão contendo 150,0 µg/mL de GP conforme o esquema abaixo (HIDALGO,2001):

	Volume do filtrado (150,0 µg/mL de GP)	Volume de solução padrão (150,0 µg/mL de GP)	Concentração final (µg/mL de GP)
MAs 1 ^{1, 2 e 4mg}	10,0 mL	-	15,0
MAs 1 ^{1, 2 e 4mg}	10,0 mL	7,0 mL	15,0 + 10,5
MAs 1 ^{1, 2 e 4mg}	10,0 mL	8,0 mL	15,0 + 12,0
MAs 1 ^{1, 2 e 4mg}	10,0 mL	9,0 mL	15,0 + 13,5
MAs 1 ^{1, 2 e 4mg}	10,0 mL	10,0 mL	15,0 + 15,0
MAs 1 ^{1, 2 e 4mg}	10,0 mL	11,0 mL	15,0 + 16,5

Ao final, os volumes foram ajustados com NaOH 0,1M e as absorvâncias determinadas em 230 nm contra branco. Para cálculo da porcentagem de recuperação do padrão, adotou-se a seguinte fórmula (EURACHEM, 1998) :

$$\% R = \frac{C1 - C2}{C3} \cdot 100 \quad \text{onde:}$$

C1 = concentração da amostra fortificada
C2 = concentração da amostra não fortificada
C3 = concentração teórica da adição

4.2.2.19 – Linearidade – F7

4.2.2.19.1 – Preparo da solução padrão de GP

Procedimento: a partir de 25,0 mg de GP padrão exatamente pesadas, foram preparadas 3 alíquotas de soluções padrão de concentração igual a 15,0 µg/mL de GP reproduzindo a descrição do item 4.2.2.16.1.

4.2.2.19.1 – Preparo de soluções a partir da MA 2^{4mg} F7 adicionadas de solução padrão de GP em 5 níveis

Procedimento: inicialmente foi preparada uma solução padrão de GP. Para tanto, foram pesadas exatamente 300,0 mg de GP padrão e transferidas para balão volumétrico de 100 mL ao qual foram adicionados 50 mL de NaOH 0,1M. Aquecimento e resfriamento foram reproduzidos conforme item 5.2.2.16.1. Após ajuste do volume final com NaOH 0,1M, a solução apresentou uma concentração igual a 3000,0 µg/mL de GP.

À parte, foram pesadas 5 alíquotas de exatas 146,0 mg da MA 2^{4mg} que foram transferidas sucessivamente para 5 beakers de 100 mL. Foram adicionados a cada becker, 50 mL de NaOH 0,1M submetendo as soluções a aquecimento na faixa de 80-90°C entre 5-10 minutos. Após o resfriamento, foram transferidas sucessivamente para respectivos balões volumétricos de 100 mL. Foram acrescentados sucessivamente, volumes exatos iguais a 4,0; 6,0; 8,0; 10,0 e 12,0 mL da solução padrão contendo 3000,0 µg/mL de GP. Cada balão teve seu volume final ajustado com NaOH 0,1M e as soluções foram homogeneizadas. Cada solução foi então filtrada com descarte dos primeiros 10,0 mL. De cada nova solução filtrada, foram tomados 15,0 mL transferido-os para respectivos balões volumétricos de 50 mL. Quantidade suficiente de solução alcalina foi adicionada para ajuste do volume. De cada uma destas soluções, foram transferidas 3 alíquotas de 10,0 mL para uma série de 3 balões volumétricos de 50 mL. Após ajuste dos volumes com NaOH 0,1M as soluções finais de leitura apresentaram (em triplicata) concentrações de 7,2; 10,8; 14,4; 18,0 e 21,6 µg/mL de GP. As absorvâncias foram determinadas em 230 nm contra branco.

4.2.2.20 – Avaliação das MAs 2 da fórmula 8 – F8

4.2.2.20.1 - Preparo da solução de glimepirida padrão

Procedimento: foram exatamente pesadas 25,0 mg de GP padrão e transferidas para um becker de 100 mL com 30 mL de NaOH 0,1M. A solução foi aquecida a 80-90°C entre 5-10 minutos e após, resfriada. As demais operações analíticas reproduziram a descrição do item 4.2.2.16.1.

4.2.2.20.2 – Preparo das soluções das MAs 2^{1mg, 2mg, 4mg} F8

Procedimento: a quantidade de pó de cada MA 2 da F8, equivalente a 25,0 mg de glimepirida foi exatamente pesada e transferida para respectivos beakers de 100 mL. Foram adicionados 30 mL de NaOH 0,1 M e as misturas foram aquecidas a 80-90°C entre 5-10 minutos. Após resfriamento, as soluções foram quantitativamente transferidas para balão volumétrico de 100 mL e q.s. de NaOH 0,1M foi adicionada. Estas foram filtradas em papel de filtro rejeitando os primeiros 10 mL. Dos novos filtrados, foram transferidas alíquotas de 10,0 mL para uma série de 3 balões volumétricos de 50 mL. Os volumes foram ajustados com a solução alcalina. Para outra série de 3 balões volumétricos de 50 mL foram transferidas destas últimas, alíquotas de 10,0 mL acrescentando após, volume suficiente de NaOH 0,1M. As soluções foram avaliadas entre 215-260 nm contra branco.

4.2.2.21 – Avaliação das MAs 1 da fórmula 8 – F8

4.2.2.21.1 – Preparo da solução padrão de GP

Procedimento: foram exatamente pesadas 25,0 mg de GP padrão e transferidas para um becker de 100 mL com de 30 mL de NaOH 0,1M. A solução foi aquecida obedecendo as condições analíticas estabelecidas e após, resfriada. Foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL e o volume foi ajustado com NaOH 0,1M. Para um balão volumétrico de 50 mL foi transferida uma alíquota de 15,0 mL à qual foi acrescentada q.s. de solução alcalina. Para uma série de 3 balões volumétricos de 25 mL foram transferidas sucessivamente alíquotas de 5,0 mL completando o volume em seguida com NaOH 0,1M. A concentração das soluções de leitura foi igual a 15,0 µg/mL de GP e as absorvâncias foram determinadas entre 215-260 nm contra branco.

4.2.2.21.2 - Preparo das soluções MA 1^{1mg, 2mg, 4mg} F8

Procedimento: a partir do pó de cada MA 1 da F8 foram exatamente pesadas quantidades equivalentes a 25,0 mg de GP e transferidas para 3

beckers de 100 mL. Foram acrescentados 50 mL de NaOH 0,1M e as 3 soluções foram aquecidas a 80-90°C entre 5-10 minutos e após, resfriadas. Quantitativamente foram transferidas para um balão volumétrico de 100 mL e q.s. de NaOH 0,1M foi adicionada para ajuste de volumes. As soluções foram filtradas com rejeição dos primeiros 15 mL. Dos filtrados subsequentes, foram transferidas alíquotas de 15,0 mL para uma série de 3 balões volumétricos de 50 mL e os volumes foram completados com a solução alcalina. De cada solução obtida, para uma série de 9 balões volumétricos de 25 mL, foram transferidas exatamente alíquotas de 5,0 mL e após, os volumes foram ajustados com NaOH 0,1M. As soluções foram avaliadas entre 215-260 nm contra branco.

4.2.2.22 - Recuperação do padrão – F8

- foram reproduzidas as condições analíticas descritas no item 4.2.2.18

4.2.2.23 - Limites de Detecção e Quantificação

- foram preparadas soluções padrão de GP em concentrações inferiores a 4,0 µg/mL, uma vez que esta apresenta absorvância próxima a 0,18. Foi utilizada a MA 1^{4mg} F8 considerando a menor quantidade de excipientes presentes.

4.2.2.23.1 - Preparo da solução padrão de GP

Procedimento: para obtenção de soluções padrão de GP com concentração igual a 15,0 µg/mL foram pesadas exatamente 25,0 mg de GP padrão e submetidas as mesmas condições analíticas descritas no item 4.2.2.16.1.

4.2.2.23.2 – Preparo das soluções da MA 1^{4mg} F8

Procedimento: a partir do pó da MA 1^{4mg} F8 a quantidade equivalente a 25,0 mg de GP foi exatamente pesada e transferida para respectivo becker de 100 mL. Foram adicionados 30 mL de NaOH 0,1M e a mistura foi aquecida a 80-90°C entre 5-10 minutos. Após o resfriamento, a solução foi

quantitativamente transferida para um balão volumétrico de 100 mL e o volume foi ajustado com NaOH 0,1M. Esta solução foi filtrada e os primeiros 15 mL foram descartados. Do novo filtrado, foi tomada uma alíquota de exatos 25,0 mL e transferida para um balão volumétrico de 250 ml adicionando q.s. de NaOH 0,1M. Foram preparadas 7 séries de 9 balões volumétricos de 50 mL. Para a primeira série de 9 balões volumétricos de 50 mL foram transferidas replicatas de 1,0 mL às quais foram acrescentadas q.s. de NaOH 0,1M. Este procedimento analítico foi repetido para as outras 6 séries de balões volumétricos de 50 ml respeitando a transferência de volumes de 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0 mL. Ao final, cada série de 9 balões volumétricos apresentaram respectivamente as concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 e 3,5 µg/mL de GP. As leituras das soluções obedeceram às descrições anteriores.

4.2.2.24 – Linearidade – F8

Procedimento: a partir da MA 2 – F8, foram reproduzidas as condições analíticas descritas no item 4.2.2.19.

4.2.2.25 – Curva de calibração 2

Procedimento: foram exatamente pesadas 150,0 mg de glimepirida padrão e transferidas para um becker de 100 mL. Cerca de 30 mL de NaOH 0,1M foram acrescentados levando a mistura a aquecimento em manta a 80-90°C entre 5-10 minutos. A solução obtida foi resfriada e transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL e q.s. de NaOH 0,1M foi adicionada. Desta, uma alíquota de 10,0 mL foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e o volume foi ajustado com a solução alcalina. Para uma série de 10 balões volumétricos de 50 mL, foram transferidos quantitativamente volumes iguais a 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 e 10,0 mL aos quais foram acrescentadas q.s. de NaOH 0,1M. As concentrações destas foram variáveis entre 3,0 e 30,0 µg/mL de

glimepirida e as absorvâncias das soluções foram determinadas em 230 nm contra branco (NaOH 0,1M).

4.2.2.26 – Avaliação da exatidão e precisão em relação à concentração de 20,0 µg/ml de GP

Procedimento: foram exatamente pesadas 200,0 mg de GP padrão e transferidas para um becker de 100 mL ao qual foram inicialmente acrescentados cerca de 30 mL de NaOH 0,1M. A solução foi submetida às condições analíticas descritas anteriormente e após resfriamento, foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL. O volume foi ajustado com a solução alcalina e desta, uma alíquota de 10,0 mL foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL. Com adição de q.s. de NaOH 0,1M esta solução apresentou uma concentração igual a 200,0 µg/ml de GP. Para uma série de 9 balões volumétricos de 50 mL, foram transferidos sucessivamente volumes iguais a 5,0 mL aos quais foram adicionadas q.s. de NaOH 0,1M. A concentração final destas soluções de leitura foi igual a 20,0 µg/ml de GP. As absorvâncias foram determinadas em 230 nm contra branco.

4.2.2.27 – Aplicação dos métodos espectrofotométricos direto e derivado às amostras comerciais de comprimidos (AR e AS) contendo 4 mg de GP

Procedimento: determinados os pesos médios das amostras comerciais de comprimidos (AR e AS), procedeu-se à pulverização dos mesmos em gral. Do pó obtido, foi pesado o equivalente a 100,0 mg de GP transferindo para um becker de 100 mL acrescentando 40 ml de NaOH 0,1M. As soluções foram aquecidas em manta a 80-90°C entre 5-10 minutos e após resfriadas, transferidas para um balão volumétrico de 100 mL. As mesmas foram filtradas em papel de filtro com descarte dos primeiros 10 mL. De cada novo filtrado, foi tomada uma alíquota de 10,0 ml transferindo para um balão volumétrico de 50 mL ao qual foi acrescentada q.s. de NaOH 0,1M. Para uma série de 9 balões volumétricos de 50 mL, foram transferidas alíquotas de 5,0 mL ajustando o volume com a solução alcalina. As

absorbâncias foram determinadas em 230 nm contra branco e os valores da primeira derivada foram obtidos em 244, 246 e 251 nm.

5 . RESULTADOS

5.1 – Diclofenaco sódico

Figura 3. Espectros de absorção obtidos de soluções padrão de DS preparadas em concentrações iguais a 4,0; 6,0; 8,0 10,0; 12,5 e 15,0 µg/mL. As absorvâncias foram determinadas entre 220 e 350 nm.

Figura 4. Curva de Ringbom obtida de soluções padrão de DS preparadas com metanol em concentrações variáveis entre 2,0 e 26,0 $\mu\text{g/mL}$. As absorvâncias foram determinadas em 282 nm contra branco.

Tabela 1. Absorvâncias determinadas a partir de soluções padrão de diclofenaco sódico em metanol. As concentrações variaram entre 4,0 a 22,0 $\mu\text{g/mL}$ e as leituras foram feitas em 282 nm contra branco.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvância
4,0	0,1665
6,0	0,2500
8,0	0,3292
10,0	0,4143
12,0	0,5029
14,0	0,5922
16,0	0,6644
18,0	0,7527
20,0	0,8348
22,0	0,9186

Figura 5. Curva de calibração obtida a partir de uma solução padrão de DS /metanol. As concentrações variaram entre 4,0 e 22,0 µg/mL e as absorvâncias foram determinadas em 282 nm.

Equação da reta :

$$Y (\text{Abs}) = -0,00184 + 0,04187X$$

$$r = 0,999$$

a não significativo (t(a) igual a 0,7937 para n=10, P= 95%),

Erro padrão de estimativa (S_e) = 0,0000124 e

Erro padrão de estimativa relativo (S_{er}) = 0,00228 %.

Figura 6. Espectros diretos obtidos a partir de uma solução padrão de DS e de uma solução preparada com a MA 2 – DS. A concentração final de leitura foi igual a 15,0 µg/mL de DS e as absorvâncias foram determinadas em 282 nm contra branco.

Tabela 2. Valores em absorvância obtidos de soluções preparadas a partir de DS padrão e MA 2 em metanol. A tomada de ensaio foi igual a 150,0 mg de DS e a concentração final de leitura correspondeu a 15,0 µg/mL de DS. As absorvâncias foram determinadas em 282 nm e os valores representam a média de 3 alíquotas.

Absorbância média	
DS padrão	0,6326
MA 2	0,0150

Tabela 3. Resultados estatísticos obtidos com as amostras de comprimidos de DS 50 mg após aplicação do método espectrofotométrico no UV/metanol. A tomada de ensaio foi igual ao peso médio de cada amostra e os valores expressos representam a média após análise de 10 alíquotas.

	Valor encontrado (mg)	Teor (%)	¹ DP	² CV (%)	Intervalo de confiança P=95%
MA1	49,25	98,50	0,4363	0,886	49,25 ± 0,31
AR	50,14	100,28	0,3619	0,722	50,14 ± 0,26
AS 1	48,64	97,28	0,4260	0,877	48,64 ± 0,30
AS 2	48,45	96,90	0,1260	0,260	48,45 ± 0,09
AS 3	49,54	99,08	0,3983	0,804	49,54 ± 0,28
AS 4	50,21	100,40	0,1922	0,383	50,21 ± 0,14
AG 1	47,10	94,2	0,4696	0,997	47,10 ± 0,33
AG 2	51,04	102,09	0,2869	0,187	51,04 ± 0,21

¹Desvio Padrão, ² Coeficiente de variação

Tabela 4. Resultados encontrados após o teste de recuperação do padrão, aplicado às amostras comerciais de comprimidos de DS 50 mg e à MA 1. Os valores apresentados representam a média da análise de 10 alíquotas.

	Teor médio recuperado	Recuperação média	Desvio padrão
MA 1	50,31 mg	102,0%	0,296
AR	50,05 mg	100,1%	0,222
AS 1	49,26 mg	99,70%	0,531
AS 2	49,49 mg	101,1%	0,229
AS 3	49,38 mg	98,77%	0,527
AS 4	50,05 mg	100,1%	0,218
AG 1	48,15 mg	98,41%	0,584
AG 2	49,84 mg	97,29%	0,236

Tabela 5. Resultados encontrados referentes a cinco concentrações de DS utilizadas na avaliação da linearidade. Os valores de absorvâncias e de concentração encontrada de DS referem-se a média de 3 alíquotas obtidas a partir da MA2.

Concentração teórica	Concentração média encontrada	Absorvância média
7,5 mg	7,58 mg	0,3163
12,0 mg	11,90 mg	0,4961
15,0 mg	14,95 mg	0,6234
18,0 mg	18,06 mg	0,7528
22,5 mg	21,95 mg	0,9149

Figura 7. Reta teórica construída para avaliação da linearidade segundo PASTEELNICK (1993) onde se considera a quantidade de diclofenaco sódico adicionada e a média da concentração encontrada de três alíquotas, preparadas a partir da MA 2. As absorvâncias foram determinadas em 282 nm contra branco. Valores de $a = 0,3759$ e $r = 0,9995$

Figura 8. Reta teórica construída para avaliação da linearidade segundo BRITAIN (1998) onde se considera a concentração teórica de diclofenaco sódico e a média das absorvâncias de três alíquotas, preparadas a partir da MA 2. As absorvâncias foram determinadas em 282 nm contra branco. Valores de $a = 0,01615$ e $r = 0,9995$

Tabela 6. Valores obtidos em termos de Fator de Linearidade (FL) considerando a concentração de DS e respectivas absorvâncias determinadas em 282 nm, a partir da MA 2. Segundo LEITE(1996) o método é considerado linear quando o coeficiente de variação (CV) é igual ou inferior a 2%. Os valores expressam a média de 3 determinações.

Concentração teórica	Absorbância	Fator de linearidade
7,5 mg	0,3163	0,042173
12,0 mg	0,4961	0,041342
15,0 mg	0,6235	0,041560
18,0 mg	0,7528	0,041822
22,5 mg	0,9149	0,040622
FL médio = 0,0415036		
DP = 0,000569916		
CV = 1,37%		

Tabela 7. Resultados obtidos após determinação das concentrações decrescentes de DS a partir da MA 1. Os valores expressos representam a média após análise de 10 alíquotas.

Concentração teórica	Absorvâncias médias	Concentração encontrada	Teor	DP	CV %
5,0 µg/mL	0,1928	4,60 µg/mL	92%	0,0345	0,751
4,0 µg/mL	0,1635	3,91 µg/mL	97%	0,050	1,281
3,0 µg/mL	0,1165	2,77 µg/mL	92%	0,0567	2,043
2,0 µg/mL	0,0715	1,72 µg/mL	86%	0,0118	0,748
1,0 µg/mL	0,0313	0,75 µg/mL	75%	0,0218	2,914

Desvio padrão médio= 0,03496

Figura 9. Reta construída para cálculo do coeficiente angular a partir da concentração teórica de DS e a média das absorvâncias obtidas, para determinação dos limites de detecção e quantificação. A tomada de ensaio correspondeu a 100,0 mg de DS a partir da MA 1. As absorvâncias foram determinadas em 282 nm contra branco. Valor $b = 0,0415$

Cálculos para determinação do Limite de Detecção e do Limite de Quantificação para o DS em 282 nm

$$\text{Limite de detecção (LD)} = \frac{\text{desviopadrão médio}}{b} \cdot 3 =$$

$$\text{LD} = 2,52 \mu\text{g/mL de DS}$$

$$\text{Limite de quantificação (LQ)} = \frac{\text{desviopadrão médio}}{b} \cdot 10 =$$

$$\text{LQ} = 8,42 \mu\text{g/mL de DS}$$

5.2 – Glimepirida

Figura 10. Espectro no infravermelho do padrão glimepirida - GP em pastilhas de KBr (lote NC 21819). Principais picos (comprimento de onda cm^{-1}) : 3368,94 – 3288,92 – 2930,53 – 1707,54 – 1673,95 – 1542,61 - 1345,98 – 1154,18

Figura 11. Espectro no infravermelho do padrão glimepirida – GP em pastilhas de KBr (lote 8022). Principais picos (comprimento de onda cm^{-1}) : 3369,2 – 3289,6 – 2930,84 – 1707,42 – 1673,34 – 1543,76 – 1346,72 – 1154,72.

Figura 12. Espectro de absorção de ordem zero obtido a partir de uma solução contendo 20,0 µg/mL de glimepirida padrão em NaOH 0,1M após aquecimento. O intervalo de leitura foi entre 200 e 400 nm.

Tabela 8. Resultados obtidos com soluções contendo 15,0 µg/mL de glimepirida em diferentes concentrações de NaOH aquecidas a 80-90°C em tempos de 5, 10 e 15 minutos.

	Absorbância após 5 min Δ	Absorbância após 10 min Δ	Absorbância após 15 min Δ	λ máx
NaOH 0,1M	0,676	0,720	0,701	227 nm
NaOH 0,5M	0,666	0,646	0,708	228 nm
NaOH 1M	0,005	-0,148	-0,507	222 nm

Tabela 9. Absorvâncias encontradas na análise de soluções de glimepinda padrão em concentrações variáveis entre 3,2 e 17,6 µg/mL em NaOH 0,1M após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos. As leituras foram feitas em 230 nm a intervalos de 15 minutos contra branco.

	15 min	30 min	45 min	60 min	75 min	120 min
3,2 µg/mL	0,150	0,160	0,132	0,117	0,120,	0,118
4,8 µg/mL	0,230	0,224	0,207	0,194	0,177	0,196
6,4 µg/mL	0,308	0,296	0,277	0,272	0,254	0,276
8,0 µg/mL	0,387	0,374	0,352	0,353	0,328	0,347
9,6 µg/mL	0,490	0,458	0,443	0,424	0,419	0,429
11,2 µg/mL	0,545	0,526	0,507	0,392	0,499	0,499
12,8 µg/mL	0,634	0,613	0,590	0,584	0,576	0,582
14,4 µg/mL	0,661	0,641	0,631	0,619	0,615	0,625
16,0 µg/mL	0,751	0,733	0,717	0,705	0,698	0,713
17,6 µg/mL	0,811	0,792	0,774	0,768	0,760	0,781

Figura 13. Representação gráfica do comportamento das soluções padrão de glimepirida analisadas a intervalos de 15 minutos. As concentrações foram iguais a 3,2; 4,8; 6,4; 8,0; 9,6; 11,2; ; 14,4; 16,0 e 17,6 µg/mL de glimepirida

Figura 14. Espectros de absorção de ordem zero obtidos a partir de soluções padrão de glimepirida em concentrações iguais a 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 12,0; 14,0; 16,0; 18,0; 20,0 e 22,0 µg/mL, após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As absorvâncias foram determinadas entre 215 e 260 nm contra branco.

Figura 15. Curva de Ringbom obtida a partir de soluções padrão de glimepírida com concentrações variáveis entre 1,6 e 22,4 µg/mL após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As absorvâncias foram determinadas em 230 nm.

Tabela 10. Absorvâncias determinadas em 230 nm contra branco de soluções padrão de glimepírida em concentrações variáveis entre 4,0 e 20,0 µg/mL em NaOH 0,1M após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos.

Concentração (µg/mL)	Absorvância
4,0	0,1873
6,0	0,2761
8,0	0,3729
10,0	0,4690
12,0	0,5541
14,0	0,6411
16,0	0,7372
18,0	0,8450
20,0	0,9210
22,0	1,0165

Figura 16. Curva de calibração obtida a partir de soluções padrão de glimepirida em concentrações entre 4,0 e 22,0 µg/mL após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As absorvâncias foram determinadas em 230 nm contra branco.

Equação da reta de ordem zero 230 nm :

$$Y (\text{Abs}) = 0,04615X + 0,00208$$

$$r = 0,9998$$

a não significativo ($t(a)$ igual a 0,507 para $n=10$, $P= 95\%$)

$$S_e = 0,00003 \text{ e } S_{er} = 0,00525\%.$$

Figura 17. Espectros diretos obtidos de soluções preparadas com glimepirida padrão, *celulose*, lactose, MA 2^{mg} F1 e MA 1^{mg} F1, após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As concentrações corresponderam a 15,0 µg/mL de GP.

Figura 18. Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão, lactose, *celulose*, MA 2^{mg} F1 e MA 1^{mg} F1 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As concentrações corresponderam a 15,0 µg/mL de GP.

Figura 19. Espectro derivado de 1ª ordem obtido a partir de solução contendo 20,0 µg/mL de glimepirida padrão em NaOH 0,1M após aquecimento. O intervalo avaliado foi entre 200 e 400 nm.

Figura 20. Espectros derivados de 1ª ordem obtidos de soluções padrão de glimepirida em concentrações iguais a 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 12,0; 14,0; 16,0; 18,0; 20,0 e 22,0 µg/mL, após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. O intervalo avaliado foi entre 215 e 260 nm.

Tabela 11. Valores obtidos da 1ª derivada em 244 nm de soluções padrão de glimepirida com concentrações variáveis entre 4,0 e 22,0 µg/mL preparadas em NaOH 0,1M após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos.

Concentração (µg/mL)	$d^1A/d\lambda$
4,0	-0,0707
6,0	-0,1032
8,0	-0,1375
10,0	-0,1706
12,0	-0,2048
14,0	-0,2396
16,0	-0,2788
18,0	-0,3121
20,0	-0,3398
22,0	-0,3756

Figura 21. Curva de calibração obtida a partir de soluções padrão de glimepirida em concentrações entre 4,0 e 22,0 µg/mL, após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As derivadas de 1ª ordem foram determinadas em 244 nm.

Tabela 12. Valores obtidos da 1ª derivada em 246 nm de soluções padrão de glimepirida com concentrações variáveis entre 4,0 e 22,0 µg/mL preparadas em NaOH 0,1M após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos.

Concentração (µg/mL)	$d^1A/d\lambda$
4,0	-0,0724
6,0	-0,1052
8,0	-0,1408
10,0	-0,1742
12,0	-0,2073
14,0	-0,2420
16,0	-0,2792
18,0	-0,3183
20,0	-0,3463
22,0	-0,3802

Figura 22. Curva de calibração obtida a partir de soluções padrão de glimepirida em concentrações entre 4,0 e 22,0 µg/mL, após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As derivadas de 1ª ordem foram determinadas em 246 nm.

Tabela 13. Valores obtidos da 1ª derivada em 251 nm de soluções padrão de glimepirida com concentrações variáveis entre 4,0 e 22,0 µg/mL preparadas em NaOH 0,1M após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos.

Concentração (µg/mL)	$d^1A/d\lambda$
4,0	-0,0630
6,0	-0,0903
8,0	-0,1220
10,0	-0,1510
12,0	-0,1798
14,0	-0,2095
16,0	-0,2387
18,0	-0,2691
20,0	-0,2950
22,0	-0,3275

Figura 23. Curva de calibração obtida a partir de soluções padrão de glimepirida em concentrações entre 4,0 e 22,0 µg/mL, após aquecimento 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As derivadas de 1ª ordem foram determinadas em 251 nm.

Equação da reta 1ª derivada em 244 nm

$$Y (d^1A/d\lambda) = 0,01707X + 0,00138$$

$$r = 0,9997$$

a não significativo (t(a) igual a 0,818 para n=10, P= 95%)
 $S_e = 0,000005$ e $S_{er} = 0,00251 \%$.

Equação da reta 1ª derivada em 246 nm

$$Y (d^1A/d\lambda) = 0,01726X + 0,00224$$

$$r = 0,9997$$

a não significativo (t(a) igual a 1,40 para n=10, P= 95%)
 $S_e = 0,000006$ e $S_{er} = 0,00265 \%$.

Equação da reta 1ª derivada em 251 nm

$$Y (d^1A/d\lambda) = 0,01467X + 0,00386$$

$$r = 0,9999$$

a não significativo (t(a) igual a 1,633 para n=10, P= 95%)
 $S_e = 0,000009$ e $S_{er} = 0,00452 \%$.

Considerando as condições de solubilidade e os espectros de absorção de zero ordem e 1ª derivada, inicialmente foram fixados os seguintes parâmetros:

- solvente – NaOH 0,1M
- aquecimento em manta a 80-90°C entre 5-10 minutos
- ordem da derivada – 1ª derivada
- $\Delta\lambda$ – 4 nm
- velocidade de varredura do espectro no aparelho- 3800 nm/min
- assentamento das ordenadas : -0,5 a +0,5
- intervalo de varredura – 215 a 260 nm
- concentração analítica – 15,0 µg/mL de glimepirida

Figura 24. Espectros diretos obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão e excipientes utilizados na F 2 : explotab, estearato de magnésio, celulose, lactose e PVP, após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1 M. As absorvâncias foram determinadas no intervalo entre 215 e 260 nm contra branco e as concentrações corresponderam a 15,0 µg/mL de GP.

Figura 25. Espectros de 1ª derivada obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão e excipientes utilizados na F 2 : explotab, estearato de magnésio, celulose, lactose e PVP, após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1 M. As absorvâncias foram determinadas no intervalo entre 215 e 260 nm contra branco e as concentrações corresponderam a 15,0 µg/mL de GP.

Tabela 14. Valores obtidos em absorvâncias e derivada de 1ª ordem após leitura das soluções contendo GP padrão, estearato de magnésio, celulose, explotab, lactose e PVP. As tomadas de ensaio corresponderam a 75,0 mg de glimepirida.

	Abs 230 nm	244 nm d¹A/dλ	246 nm d¹A/dλ	251 nm d¹A/dλ
GP pad*	0,7239	-0,2732	-0,2736	-0,2341
estear. Mg**	0,0184	-0,0013	-0,0014	-0,0016
explotab	0,0242	-0,0024	-0,0024	-0,0018
celulose	0,1448	0,0156	0,0179	0,0182
lactose	0,5198	0,0623	0,0738	0,1038
PVP	0,0338	-0,0014	-0,0011	-0,0011

*glimepirida padrão ** estearato de magnésio

Figura 26. Espectros diretos obtidos a partir de soluções preparadas com glimepinda padrão, lactose, MA 2^{1mg} F2, MA 2^{2mg} F2 e MA 2^{4mg} F2, após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As concentrações corresponderam a 15,0 µg/mL de GP.

Figura 27. Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções preparadas com glimepinda padrão, lactose, MA 2^{1mg}, MA 2^{2mg} e MA 2^{4mg} F2 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As concentrações corresponderam a 15,0 µg/mL de GP.

Figura 28 . Espectros diretos obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão, misturas L1a, e L1c e lactose após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As concentrações corresponderam a 15,0 µg/mL de GP.

Figura 29. Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão, misturas L1a, e L1c e lactose após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As concentrações corresponderam a 15,0 µg/mL de GP.

Figura 30. Espectros diretos obtidos partir de soluções preparadas com glimepirida padrão, misturas L2a, , L2c e lactose após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As concentrações corresponderam a 15,0 µg/mL de GP.

Figura 31. Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão, misturas L2a, e L2c e lactose após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As concentrações corresponderam a 15,0 µg/mL de GP.

Figura 32. Espectros diretos obtidos partir de soluções preparadas com glimepirida padrão, misturas L4a, , L4c e lactose após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As concentrações corresponderam a 15,0 µg/mL de GP.

Figura 33. Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão, misturas L4a, e L4c e lactose após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As concentrações corresponderam a 15,0 µg/mL de GP.

Tabela 15. Valores obtidos em absorvâncias e derivada de 1ª ordem após leitura das soluções contendo GP padrão, lactose e misturas GP + lactose em quantidades variáveis (50, 100 e 150% de lactose). As tomadas de ensaio foram correspondentes a 75,0 mg de glimepirida.

	Abs 230 nm	244 nm d¹A/dλ	246 nm d¹A/dλ	251 nm d¹A/dλ
GP pad*	0,4358	-0,2587	-0,2595	-0,2116
mist L 1a	0,3926	-0,1555	-0,1514	-0,1202
mist L 1b	0,4106	-0,1781	-0,1729	-0,1376
mist L 1c	0,4338	-0,1782	-0,1707	-0,1323
mist L 2a	0,3334	-0,1330	-0,1280	-0,0972
mist L 2b	0,3854	-0,1613	-0,1577	-0,1264
mist L 2c	0,4418	-0,1711	-0,1671	-0,1332
mist L 4a	0,2745	-0,1187	-0,1132	-0,0818
mist L 4b	0,5131	-0,1185	-0,1075	-0,0650
mist L 4c	0,2699	-0,1498	-0,1469	-0,1200
lactose	0,5198	-0,0351	-0,026	-0,0002

*glimepirida padrão

Figura 34. Espectros diretos obtidos de soluções preparadas com glimepirida padrão, PVP, mistura 1a, e mistura 1c, após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As absorvâncias foram determinadas em 230 nm. As concentrações corresponderam a 15,0 µg/mL de GP.

Figura 35. Espectros da derivada de 1ª ordem obtidos a partir de soluções padrão de glimepirida, PVP, mistura 1a, e mistura 1c, após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As concentrações corresponderam a 15,0 µg/mL de GP.

Figura 36. Espectros diretos obtidos de soluções preparadas com glimepirida padrão, PVP, mistura 2a , e mistura 2c, após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As absorvâncias foram determinadas em 230 nm. As concentrações corresponderam a 15,0 µg/mL de GP.

Figura 37. Espectros de derivada de 1ª ordem obtidos a partir de soluções padrão de glimepirida, PVP, mistura 2a , e mistura 2c, após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As concentrações corresponderam a 15,0 µg/mL de GP.

Figura 38. Espectros diretos obtidos de soluções preparadas com glimepirida padrão, PVP, mistura 4a, e mistura 4c, após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As absorvâncias foram determinadas em 230 nm. As concentrações corresponderam a 15,0 µg/mL de GP.

Figura 39. Espectros de derivada de 1ª ordem obtidos a partir de soluções padrão de glimepirida, PVP, mistura 4a, e mistura 4c, após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As concentrações corresponderam a 15,0 µg/mL de GP.

Tabela 16. Valores obtidos em absorvâncias e derivada de 1ª ordem após leitura das soluções contendo GP padrão, PVP S 630 e misturas GP + PVP em quantidades variáveis (50, 100 e 150% de PVP). As tomadas de ensaio corresponderam a 75,0 mg de glimepirida.

	Abs 230 nm	244 nm d¹A/dλ	246 nm d¹A/dλ	251 nm d¹A/dλ
GP pad*	0,697	-0,2493	-0,2501	-0,2258
mist 1a	0,735	-0,2613	-0,2628	-0,2348
mist 1b	0,745	-0,2769	-0,2790	-0,2475
mist 1c	0,798	-0,2543	-0,2566	-0,2298
mist 2a	0,699	-0,2487	-0,2520	-0,2252
mist 2b	0,744	-0,2606	-0,2636	-0,2334
mist 2c	0,789	-0,2780	-0,2822	-0,2506
mist 4a	0,695	-0,2375	-0,2396	-0,2149
mist 4b	0,655	-0,2358	-0,2376	-0,2125
mist 4c	0,655	-0,2498	-0,2521	-0,2235
PVP	0,030	-0,0014	-0,0011	-0,0011

*glimepirida padrão

Figura 40. Espectros diretos obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão, lactose, MA 2^{1mg} F3, MA 2^{2mg} F3 e MA 2^{4mg} F3 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As absorvâncias foram determinadas entre 215 e 260 nm contra branco. As concentrações corresponderam a 15,0 µg/mL de GP.

Figura 41. Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão, lactose, MA 2^{1mg} F3, MA 2^{2mg} F3 e MA 2^{4mg} F3 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As absorvâncias foram determinadas entre 215 e 260 nm contra branco. As concentrações corresponderam a 15,0 µg/mL de GP.

Tabela 17. Valores obtidos em absorbância e 1ª derivada de soluções preparadas com GP padrão, MA 2^{1mg}F3, MA 2^{2mg}F3 e MA 2^{4mg}F3 , após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M . As tomadas de ensaio foram correspondentes a 75,0 mg de glimepirida

	Abs 230 nm	244 nm d¹A/dλ	246 nm d¹A/dλ	251 nm d¹A/dλ
GP pad*	0,6882	-0,2559	-0,2492	-0,2146
MA 2^{1mg}F3	0,4677	-0,0531	-0,0622	-0,0503
MA 2^{2mg}F3	0,2789	-0,0131	-0,0025	-0,0215
MA 2^{4mg}F3	0,3773	-0,0032	-0,0181	-0,0489
lactose	0,5198	-0,0351	-0,0260	-0,0002

* glimepirida padrão

Figura 42. Espectros diretos obtidos a partir de soluções de glimepirida padrão, cellactose e carbonato de magnésio após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio corresponderam a 75,0 mg de glimepirida.

Figura 43. Espectros de 1ª derivada obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão, celactose e carbonato de magnésio após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio corresponderam a 75,0 mg de glimepirida.

Tabela 18. Valores obtidos em absorvância e 1ª derivada de soluções preparadas com GP padrão, cellactose e carbonato de magnésio, após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M . As tomadas de ensaio foram correspondentes a 75,0 mg de glimepirida.

	Abs 230 nm	244 nm $d^1A/d\lambda$	246 nm $d^1A/d\lambda$	251 nm $d^1A/d\lambda$
GP pad*	0,6969	-0,2493	-0,2501	-0,2258
cellactose	0,0361	-0,0321	-0,0258	-0,0099
carbon de Mg**	-0,2495	-0,0067	-0,0043	-0,0022

* glimepirida padrão ** carbonato de Mg

Figura 44. Espectros diretos obtidos a partir de soluções de glimepirida padrão e das MA2 F4, MA2 F5 e MA2 F6 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio correspondem a 75,0 mg de glimepirida e as absorvâncias foram determinadas entre 220-260 nm contra branco.

Figura 45. Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções de glimepirida padrão, MA2 1 F4, MA2 F5 e MA2 F6 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio corresponderam a 75,0 mg de glimepirida.

Tabela 19. Valores obtidos em absorvância e 1ª derivada de soluções preparadas com GP padrão, MA 1^{2mg} F4, MA 1^{2mg} F5 e MA 1^{2mg} F6 , após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M . As tomadas de ensaio foram correspondentes a 75,0 mg de glimepirida.

	Abs 230 nm	244 nm d¹A/dλ	246 nm d¹A/dλ	251 nm d¹A/dλ
GP pad*	0,7054	-0,2542	-0,2560	-0,2272
MA2^{2mg} F4	1,0535	-0,0311	-0,0074	0,054
MA 2^{2mg} F5	0,0397	-0,0084	-0,0056	-0,0011
MA2^{2mg} F6	0,5491	0,0117	0,0302	0,0721

* glimepirida padrão

Figura 46. Espectros diretos obtidos a partir de soluções de glimepirida padrão, MA1 F4, MA1 F5 e MA1 F6 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio correspondem a 75,0 mg de glimepirida e as absorvâncias foram determinadas entre 220-260 nm contra branco.

Figura 47. Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções de glimepirida padrão, MA1 F4, MA1 F5 e MA1 F6 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio corresponderam a 75,0 mg de glimepirida.

Tabela 20. Valores obtidos em absorvância e 1ª derivada de soluções preparadas com GP padrão, MA 1^{2mg}F4, MA 1^{2mg}F5 e MA 1^{2mg}F6 , após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio foram correspondentes a 75,0 mg de glimepirida.

	Abs 230 nm	244 nm d¹A/dλ	246 nm d¹A/dλ	251 nm d¹A/dλ
GP pad*	0,6726	-0,2618	-0,2575	-0,2299
MA1^{2mg}F4	1,026	-0,3137	-0,2957	-0,2267
MA1^{2mg}F5	0,6603	-0,2488	-0,2404	-0,2039
MA1^{2mg}F6	1,1096	-0,3028	-0,2876	-0,2288

* glimepirida padrão

Figura 48. Espectros diretos obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão (15,0 μ g/mL), corantes vermelho ponceau (VP), amarelo quinoleína laca (AQ) + azul índigo laca (AI) e azul índigo laca (AI) (5,0 μ g/mL) após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M

Figura 49. Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão (15,0 μ g/mL) corantes vermelho ponceau (VP), amarelo quinoleína laca (AQ) + azul índigo laca (AI) e azul índigo laca (AI) (5,0 μ g/mL) após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M.

Tabela 21. Valores obtidos em absorvância e derivada de 1ª ordem de soluções preparadas com GP padrão (15,0 µg/mL), corantes vermelho ponceau (VP), amarelo quinoleína laca (AQ) e azul índigo laca (AI) (5,0 µg/mL) após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M.

	Abs 230 nm	244 nm d¹A/dλ	246 nm d¹A/dλ	251 nm d¹A/dλ
GP pad*	0,7037	-0,2588	-0,2545	-0,2160
Corante VP	0,4713	0,0151	0,0165	-0,0005
Corante AQ + AI	0,1287	-0,0124	-0,0029	0,0079
Corante AI	0,092	-0,029	-0,015	0,0062

* glimepirida padrão

Figura 50. Espectros diretos obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão (15,0 $\mu\text{g/mL}$) e corantes diluídos em 10 vezes: **vermelho ponceau** (VP), **amarelo quinoleína laca** (AQ) + **azul índigo laca** (AI) e **azul índigo laca** (AI) após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As concentrações corresponderam a 15,0 $\mu\text{g/mL}$ de GP.

Figura 51. Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão (15,0 $\mu\text{g/mL}$) e corantes diluídos em 10 vezes: **vermelho ponceau** (VP), **amarelo quinoleína laca** (AQ) + **azul índigo laca** (AI) e **azul índigo laca** (AI), após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As concentrações corresponderam a 15,0 $\mu\text{g/mL}$ de GP.

Tabela 22. Valores obtidos em absorvância e derivada de 1ª ordem de soluções preparadas com GP padrão (15,0 µg/mL) e corantes diluídos em 10 vezes (0,5 µg/mL) : vermelho ponceau, amarelo quinoleína laca e azul índigo laca, após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M . As tomadas de ensaio foram correspondentes a 75,0 mg de glimepirida.

	Abs 230 nm	244 nm d¹A/dλ	246 nm d¹A/dλ	251 nm d¹A/dλ
GP pad*	0,7037	-0,2588	-0,2545	-0,2160
corante VP dil	0,0416	0,0017	0,0017	-0,0001
corante AQ + AI dil	0,0031	-0,0001	0,0005	0,0012
corante AI dil	-0,0015	-0,0015	-0,0004	0,0011

*glimepirida padrão ** corante diluído

Figura 52. Espectros diretos obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão (15,0 µg/mL) e 3 replicatas da MA 2^{1mg} F7 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio corresponderam a 25,0 mg de glimepirida.

Figura 53. Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão (15,0 µg/mL) e 3 replicatas da MA 2^{1mg} F7 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio corresponderam a 25,0 mg de glimepirida.

Figura 54. Espectros diretos obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão (15,0 µg/mL) e 3 replicatas da MA2^{2mg} F7 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio corresponderam a 25,0 mg de glimepirida.

Figura 55. Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão (15,0 µg/mL) e 3 replicatas da MA 2^{2mg} F7 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio corresponderam a 25,0 mg de glimepirida.

Figura 56. Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão (15,0 µg/mL) e 3 replicatas da MA 2 4mg F7 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1 M. As tomadas de ensaio corresponderam a 25,0 mg de glimepirida.

Figura 57. Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão (15,0 µg/mL) e 3 replicatas da MA 2 4mg F7 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio corresponderam a 25,0 mg de glimepirida.

Tabela 23. Valores médios de 3 leituras obtidos em absorbância e 1ª derivada de soluções preparadas com GP padrão (15,0 µg/mL), MA 2^{1mg}, MA 2^{2mg} e MA 2^{4mg} da F 7 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M . As tomadas de ensaio foram correspondentes a 25,0 mg de glimepirida.

	Abs 230 nm	244 nm d¹A/dλ	246 nm d¹A/dλ	251 nm d¹A/dλ
GP pad*	0,7239	-0,2589	-0,2570	-0,2248
MA 2^{1mg}	0,1841	-0,0329	-0,0264	-0,0141
MA 2^{2mg}	0,1003	-0,0131	-0,00813	-0,0005
MA 2^{4mg}	0,0635	-0,0072	-0,0042	0,0007

*glimepirida padrão

Figura 58. Espectros diretos obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão (15,0 µg/mL) e 9 replicatas da MA 1 1mg F7 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio corresponderam a 25,0 mg de glimepirida.

Figura 59. Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão (15,0 µg/mL) e 9 replicatas da MA 1 1mg F7 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio corresponderam a 25,0 mg de glimepirida.

Figura 60. Espectros diretos obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão (15,0 µg/mL) e 9 replicatas da MA 1^{2mg} F7 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1N. As tomadas de ensaio corresponderam a 25,0 mg de glimepirida.

Figura 61. Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão (15,0 µg/mL) e 9 replicatas da MA 1^{2mg} F7 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio corresponderam a 25,0 mg de glimepirida.

Figura 62. Espectros diretos obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão (15,0 µg/mL) e 9 replicatas da MA 14 mg F7 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio corresponderam a 25,0 mg de glimepirida

Figura 63. Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão (15,0 µg/mL) e 9 replicatas da MA 14 mg F7 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio corresponderam a 25,0 mg de glimepirida.

Tabela 24. Valores obtidos em espectrofotometria direta e 1ª derivada de soluções preparadas com MA 1^{1mg}, MA 1^{2mg} e MA 1^{4mg} da F 7 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio foram correspondentes a 25,0 mg de glimepirida e os valores representam a média da leitura de 9 replicatas contra solução padrão de GP (15,0 µg/mL).

MA 1^{1mg}	Abs 230 nm	244 nm d¹A/dλ	246 nm d¹A/dλ	251 nm d¹A/dλ
Concentração				
média (mg)	27,92	25,76	25,80	24,75
Teor %	111,6	103,1	103,2	99,0
DP	0,158	0,105	0,116	0,208
CV%	0,945	0,678	0,747	0,840
IC (P =95%)	27,92 ± 0,12	25,76 ± 0,08	25,80 ± 0,09	24,75 ± 0,16
MA 1^{2mg}				
Concentração				
média (mg)	26,85	26,00	25,83	24,59
Teor %	107,4	104,0	103,3	98,4
DP	0,202	0,137	0,115	0,367
CV%	1,250	0,880	0,744	1,48
IC (P =95%)	26,85± 0,15	26,00 ± 0,11	25,83 ± 0,09	24,59 ± 0,28
MA 1^{4mg}				
Concentração				
média (mg)	25,68	25,78	25,71	24,94
Teor %	102,7	103,1	102,8	99,34
DP	0,073	0,159	0,158	0,130
CV%	0,476	1,028	1,028	0,544
IC (P =95%)	25,68 ± 0,01	25,78 ± 0,12	25,71 ± 0,12	24,94 ± 0,10

IC = intervalo de confiança

Tabela 25. Resultados obtidos após aplicação do teste de recuperação do padrão às soluções preparadas com MA 1^{1mg}, MA 1^{2mg} e MA 1^{4mg} da F7. Estas foram avaliadas em 230 nm contra de solução padrão de GP com concentração igual a 15,0 µg/mL.

	Quantidade adicionada (µg/mL)	Quantidade recuperada (µg/mL)	% Recuperação
MA 1 ^{1mg}	10,5	10,19	97,04
	12,0	11,75	97,92
	13,5	13,21	97,9
	15,0	14,83	98,85
	16,5	16,36	99,20
MA 1 ^{2mg}	10,5	10,61	101,05
	12,0	11,51	95,92
	13,5	13,36	98,96
	15,0	14,73	98,18
	16,5	16,30	98,80
MA 1 ^{4mg}	10,5	10,44	99,43
	12,0	11,82	98,50
	13,5	13,21	97,85
	15,0	14,70	98,00
	16,5	16,27	98,60

Tabela 26. Resultados obtidos após aplicação do teste de recuperação do padrão às soluções preparadas com MA 1^{1mg}, MA 1^{2mg} e MA 1^{4mg} da F7. Estas foram avaliadas na 1ª derivada em 244 nm, 246 nm e 251 nm contra de solução padrão de GP com concentração igual a 15,0 µg/mL.

F7	Quantidade adicionada (µg/mL)	Quantidade recuperada (µg/mL)			Recuperação %		
		244 nm	246 nm	251 nm	244 nm	246 nm	251 nm
MA1 ^{1mg}	10,5	11,41	10,91	11,12	108,6	103,9	105,9
	12,0	13,04	12,55	12,73	108,7	104,6	106,1
	13,5	14,68	14,01	14,24	108,7	103,8	105,5
	15,0	16,44	15,63	15,92	109,6	104,1	106,1
	16,5	18,02	17,10	17,51	109,2	103,7	106,1
MA1 ^{2mg}	10,5	11,54	10,82	11,54	109,9	103,1	109,9
	12,0	12,80	12,06	12,74	106,6	100,5	106,1
	13,5	14,70	14,03	14,71	108,9	103,9	108,9
	15,0	16,10	15,45	15,95	107,3	103,0	106,3
	16,5	17,65	16,95	17,68	106,8	102,7	107,1
MA1 ^{4mg}	10,5	11,01	10,50	11,69	106,1	100,1	111,3
	12,0	12,60	11,93	13,30	105,0	99,42	110,8
	13,5	14,15	13,43	14,98	104,8	99,48	110,9
	15,0	15,70	14,92	16,56	104,7	99,46	110,4
	16,5	17,12	16,42	18,26	103,7	99,49	110,6

Figura 64. Espectros diretos obtidos após teste de linearidade aplicado à MA 2⁴ mg – F7. As concentrações das soluções de leitura variaram entre 7,2 e 21,6 µg/mL de GP. A solução padrão apresentou concentração igual a 15,0 µg/mL de GP e as absorvâncias foram determinadas em 230 nm.

Tabela 27. Resultados encontrados após teste da linearidade aplicado à MA 2⁴ mg – F7. As absorvâncias referem-se a média de triplicatas determinadas em 230 nm.

Concentração teórica	Concentração média encontrada	Absorvância Média
7,2 µg/mL	7,19µg/mL	0,3335
10,8 µg/mL	10,91 µg/mL	0,5060
14,4 µg/mL	14,48 µg/mL	0,6714
18,0 µg/mL	17,95 µg/mL	0,8325
21,6 µg/mL	21,53 µg/mL	0,9983

Figura 65. Retra teórica construída para avaliação da linearidade segundo PASTELNICK (1993) onde se considera a concentração teórica de glimepirida e a média da concentração de três replicatas, preparadas a partir da MA 24 mg F7. As absorvâncias foram determinadas em 230 nm contra branco. Valores de $a = 0,124$ e $r = 0,9999$

Figura 66. Retra teórica construída para avaliação da linearidade segundo BRITAIN (1998) onde se considera a concentração teórica de glimepirida e a média das absorvâncias de três replicatas, preparadas a partir da MA 24 mg F7. As absorvâncias foram determinadas em 230 nm contra branco. Valores de $a = 0,00598$ e $r = 0,9999$.

Tabela 28. Valores obtidos em termos de Fator de Linearidade (FL) considerando a concentração de GP e respectivas absorvâncias determinadas em 230 nm, a partir da MA 2⁴ mg – F7. Segundo LEITE (1998) o método é considerado linear quando o coeficiente de variação (CV) é igual ou inferior a 2%. Os valores expressam a média de 3 determinações.

Concentração teórica	Absorbância	Fator de linearidade
7,2 mg	0,3335	0,046319
10,8 mg	0,5060	0,046851
14,4 mg	0,6714	0,046625
18,0 mg	0,8325	0,046250
21,6 mg	0,9983	0,046217

FL médio = 0,046452
 DP = 0,000273
 CV = 0,589%

Figura 67. Espectros derivados de 1ª ordem obtidos após teste de linearidade aplicado à MA 2⁴ mg – F7. As concentrações das soluções de leitura variaram entre 7,2 e 21,6 µg/mL de GP. A solução padrão apresentou concentração igual a 15,0 µg/mL de GP e os valores da 1ª derivada foram determinados em 244, 246 e 251 nm.

Tabela 29. Resultados encontrados após teste da linearidade aplicado à MA 2⁴ mg – F7. Os valores da derivada de 1^a ordem em 244 nm referem-se a média de triplicatas.

Concentração teórica	Concentração média encontrada	$d^1A/d\lambda$ 244 nm
7,2 µg/mL	7,37 µg/mL	-0,1240
10,8 µg/mL	10,89 µg/mL	-0,1832
14,4 µg/mL	14,78 µg/mL	-0,2486
18,0 µg/mL	18,03 µg/mL	-0,3033
21,6 µg/mL	21,40 µg/mL	-0,3601

Figura 68. Reta teórica construída para avaliação da linearidade segundo PASTEELNICK (1993) onde se considera a concentração teórica da GP e a média da concentração de triplicatas, preparadas a partir da MA 2⁴mg – F7. Os valores da derivada de 1^a ordem foram determinados em 244 nm. Valores de $a = 0,414$ e $r = 0,9995$.

Figura 69. Reta teórica construída para avaliação da linearidade segundo BRITAIN (1998) onde se considera a concentração teórica da GP e a média da concentração de triplicatas, preparadas a partir da MA 2^{4mg} – F7. Os valores da derivada de 1ª ordem foram determinados em 244 nm. Valores de $a = 0,00692$ e $r = 0,9995$

Tabela 30. Valores obtidos em termos de Fator de Linearidade (FL) considerando a concentração de GP e respectivos valores de derivada de 1ª ordem determinadas em 244 nm, a partir da MA 2^{4mg} – F7. Segundo LEITE (1996) o método é considerado linear quando o coeficiente de variação (CV) é igual ou inferior a 2%. Os valores expressam a média de 3 determinações.

Concentração teórica	$d^1A/d\lambda$	Fator de linearidade
7,2 mg	-0,1240	0,01720
10,8 mg	-0,1832	0,01696
14,4 mg	-0,2486	0,01726
18,0 mg	-0,3033	0,01685
21,6 mg	-0,3601	0,01667
FL médio = 0,016988		
DP = 0,00021		
CV = 1,28%		

Tabela 31. Resultados encontrados no teste da linearidade aplicado à MA 2⁴ mg – F7. Os valores da derivada de 1ª ordem em 246 nm referem-se a média de triplicatas.

Concentração teórica	Concentração média encontrada	$d^1A/d\lambda$ 246 nm
7,2 µg/mL	7,36 µg/mL	-0,1239
10,8 µg/mL	10,87 µg/mL	-0,1831
14,4 µg/mL	14,69 µg/mL	-0,2474
18,0 µg/mL	18,22 µg/mL	-0,3068
21,6 µg/mL	21,52 µg/mL	-0,3623

Figura 70. Reta teórica construída para avaliação da linearidade segundo PASTEELNICK (1993) onde se considera a concentração teórica da GP e a média da concentração de triplicatas, preparadas a partir da MA 2⁴ mg – F7. Os valores da derivada de 1ª ordem foram determinados em 246 nm. Valores de $a = 0,264$ e $r = 0,99975$

Figura 71. Reta teórica construída para avaliação da linearidade segundo BRITAIN (1998) onde se considera a concentração teórica da GP e a média da concentração de triplicatas, preparadas a partir da MA 2⁴mg – F7. Os valores da derivada de 1ª ordem foram determinados em 246 nm. Valores de $a = 0,0045$ e $r = 0,9997$

Tabela 32. Valores obtidos em termos de Fator de Linearidade (FL) considerando a concentração de GP e respectivos valores de derivada de 1ª ordem determinadas em 246 nm, a partir da MA 2⁴mg – F7. Segundo LEITE (1996) o método é considerado linear quando o coeficiente de variação (CV) é igual ou inferior a 2%. Os valores expressam a média de 3 determinações.

Concentração teórica	$d^1A/d\lambda$	Fator de linearidade
7,2 mg	-0,1239	0,017208
10,8 mg	-0,1831	0,016953
14,4 mg	-0,2474	0,017805
18,0 mg	-0,3068	0,017044
21,6 mg	-0,3623	0,016759

FL médio = 0,017035

DP = 0,000181

CV = 1,06%

Tabela 33. Resultados encontrados no teste da linearidade aplicado à MA 2⁴ mg – F7. Os valores da derivada de 1ª ordem em 251 nm referem-se a média de triplicatas.

Concentração teórica	Concentração média encontrada	$d^1A/d\lambda$ 251 nm
7,2 µg/mL	7,35 µg/mL	-0,1101
10,8 µg/mL	10,96 µg/mL	-0,1643
14,4 µg/mL	14,41 µg/mL	-0,2160
18,0 µg/mL	17,77 µg/mL	-0,2662
21,6 µg/mL	21,54 µg/mL	-0,3227

Figura 72. Reta teórica construída para avaliação da linearidade segundo PASTEELNICK (1993) onde se considera a concentração teórica da GP e a média da concentração de triplicatas, preparadas a partir da MA 2⁴mg – F7. Os valores da derivada de 1ª ordem foram determinados em 251 nm. Valores de $a=0,33$ e $r=0,9998$

Figura 73. Reta teórica construída para avaliação da linearidade segundo BRITAIN (1998) onde se considera a concentração teórica da GP e a média da concentração de triplicatas, preparadas a partir da MA 2⁴mg – F7. Os valores da derivada de 1ª ordem foram determinados em 251 nm. Valores de $a = 0,0050$ e $r = 0,9998$

Tabela 34. Valores obtidos em termos de Fator de Linearidade (FL) considerando a concentração de GP e respectivos valores de derivada de 1ª ordem determinadas em 251 nm, a partir da MA 2⁴mg – F7. Segundo LEITE (1996) o método é considerado linear quando o coeficiente de variação (CV) é igual ou inferior a 2%. Os valores expressam a média de 3 determinações.

Concentração teórica	$d^1A/d\lambda$	Fator de linearidade
7,2 mg	-0,1101	0,01529
10,8 mg	-0,1643	0,01521
14,4 mg	-0,2160	0,01500
18,0 mg	-0,2662	0,01478
21,6 mg	-0,3327	0,01494
FL médio = 0,01505		
DP = 0,000202		
CV = 1,34%

Figura 74. Espectros diretos obtidos a partir de soluções de glimepirida padrão, MA 2^{1mg}, MA 2^{2mg} e MA 2^{4mg} F 8 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. A concentração da solução de GP padrão foi igual a 15,0 µg/mL e as tomadas de ensaio foram correspondentes a 25,0 mg de GP.

Figura 75. Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções de glimepirida padrão, MA 2^{1mg}, MA 2^{2mg} e MA 2^{4mg} F 8 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. A concentração da solução de GP padrão foi igual a 15,0 µg/mL e as tomadas de ensaio foram correspondentes a 25,0 mg de GP.

Tabela 35. Valores obtidos em absorbância e 1ª derivada de soluções preparadas com GP padrão, MA 2^{1mg}, MA 2^{2mg} e MA 2^{4mg} da F 8 após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M . As tomadas de ensaio foram correspondentes a 25,0 mg de glimepirida.

	Abs 230 nm	244 nm d¹A/dλ	246 nm d¹A/dλ	251 nm d¹A/dλ
GP pad*	0,6635	-0,2532	-0,2580	-0,2268
MA 2^{1mg}	0,1833	-0,0331	-0,0266	-0,0141
MA 2^{2mg}	0,1000	-0,0133	-0,0083	-0,0007
MA 2^{4mg}	0,0612	-0,0071	-0,0041	0,0008

*glimepirida padrão

Figura 76. Espectros diretos obtidos a partir de soluções de glimepirida padrão e 9 alíquotas da MA 11^{mg} F8 que foram submetidas a aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio corresponderam a 25,0 mg de glimepirida

Figura 77. Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções de glimepirida padrão e 9 alíquotas da MA 11^{mg} F8 que foram submetidas a aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio corresponderam a 25,0 mg de glimepirida.

Figura 78. Espectros diretos obtidos a partir de soluções de glimepirida padrão e 9 aliquotas da MA 12^{mg} F8 que foram submetidas a aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio corresponderam a 25,0 mg de glimepirida

Figura 79. Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções de glimepirida padrão e 9 aliquotas da MA 12^{mg} F8 que foram submetidas a aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio corresponderam a 25,0 mg de glimepirida.

Figura 80. Espectros diretos obtidos a partir de soluções de glimepirida padrão e 9 alíquotas da MA 14^{mg} F8 que foram submetidas a aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio corresponderam a 25,0 mg de glimepirida

Figura 81. Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções de glimepirida padrão e 9 alíquotas da MA 14^{mg} F8 que foram submetidas a aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As tomadas de ensaio corresponderam a 25,0 mg de glimepirida.

Tabela 36. Valores obtidos a partir de soluções preparadas com MA 1^{1mg}, MA 1^{2mg} e MA 1^{4mg} da F 8 submetidas a aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M, avaliadas na espectrofotometria direta e 1ª derivada. As tomadas de ensaio foram correspondentes a 25,0 mg de glimepirida. Os valores representam a média de 9 leituras.

F 8	Abs 230 nm	244 nm d¹A/dλ	246 nm d¹A/dλ	251 nm d¹A/dλ
MA 1^{1mg}				
Concentração				
média (mg)	25,70	24,40	24,37	23,98
Teor %	102,8	97,5	97,5	95,9
DP	0,118	0,184	0,111	0,1098
CV%	0,769	0,754	0,457	0,458
IC (95%)	25,70 ± 0,09	24,40 ± 0,14	24,37 ± 0,09	23,98 ± 0,08
MA 1^{2mg}				
Concentração				
média (mg)	25,66	23,95	23,75	24,67
Teor%	102,6	95,8	95,0	98,7
DP	0,1182	0,119	0,130	0,199
CV%	0,767	0,829	0,914	0,805
IC (95%)	25,66 ± 0,09	23,95 ± 0,09	23,75 ± 0,10	24,67 ± 0,15
MA 1^{4mg}				
Concentração média				
(mg)	25,86	24,89	24,45	24,71
Teor %	103,4	99,6	97,8	98,8
DP	0,153	0,219	0,202	0,143
CV%	0,602	0,882	0,825	0,580
IC (95%)	25,86 ± 0,12	24,89 ± 0,17	24,45 ± 0,16	24,71 ± 0,11

IC = intervalo de confiança

Tabela 37. Resultados obtidos após aplicação do teste de recuperação do padrão às soluções preparadas com MA 1^{1mg}, MA 1^{2mg} e MA 1^{4mg} da F8 e avaliadas em 230 nm.

	Quantidade adicionada (µg/mL)	Quantidade recuperada (µg/mL)	% Recuperação
MA 1 ^{1mg}	10,5	10,13	96,46
	12,0	12,18	101,55
	13,5	13,50	100,0
	15,0	14,81	98,80
	16,5	16,43	99,57
MA 1 ^{2mg}	10,5	10,33	98,45
	12,0	11,67	97,29
	13,5	13,16	97,53
	15,0	14,48	96,50
	16,5	16,09	97,51
MA 1 ^{4mg}	10,5	10,20	96,89
	12,0	11,66	97,22
	13,5	13,10	97,00
	15,0	14,60	97,20
	16,5	16,13	97,77

Tabela 38. Resultados obtidos após aplicação do teste de recuperação do padrão às soluções preparadas com MA 1^{1mg}, MA 1^{2mg} e MA 1^{4mg} da F8 e avaliadas na 1^a derivada em 244 nm, 246 nm e 251 nm.

	Quantidade adicionada (µg/mL)	Quantidade recuperada (µg/mL)			% Recuperação		
		244 nm	246 nm	251 nm	244 nm	246 nm	251 nm
MA 1 ^{1mg}	10,5	10,76	10,15	10,12	102,0	96,7	96,4
	12,0	12,36	11,98	12,24	103,0	99,8	102,1
	13,5	13,60	13,41	13,54	100,7	97,4	100,3
	15,0	15,0	14,60	14,94	100,0	97,73	99,6
	16,5	16,35	16,00	16,37	99,09	96,9	99,2
MA 1 ^{2mg}	10,5	10,36	10,11	10,73	98,7	96,3	102,2
	12,0	11,7	11,47	12,08	97,5	95,6	100,7
	13,5	13,2	12,94	13,55	97,8	95,9	100,4
	15,0	14,6	14,28	14,85	97,3	95,2	99,0
	16,5	16,21	15,88	16,52	98,3	96,3	100,1
MA 1 ^{4mg}	10,5	10,23	10,41	10,43	97,8	99,1	99,3
	12,0	11,65	11,58	12,13	97,1	96,5	101,1
	13,5	13,20	13,10	13,66	97,8	96,9	101,2
	15,0	14,65	14,52	15,07	97,7	96,8	100,5
	16,5	16,25	16,05	16,58	98,5	97,3	100,5

Figura 82. Espectros diretos obtidos após teste de linearidade aplicado à MA 24 mg – F8. As concentrações das soluções de leitura variaram entre 7,2 e 21,6 µg/mL de GP. A solução padrão apresentou uma concentração de 15,0 µg/mL de GP e as absorvâncias foram determinadas em 230 nm.

Tabela 39. Resultados encontrados na avaliação da linearidade da MA 24 mg - F8. Os valores de absorvâncias e da concentração encontrada de GP referem-se a média de triplicatas.

Concentração teórica	Concentração média encontrada	Absorvância média
7,2 µg/mL	7,293 µg/mL	0,3451
10,8 µg/mL	10,796 µg/mL	0,5108
14,4 µg/mL	14,30 µg/mL	0,6768
18,0 µg/mL	18,035 µg/mL	0,8533
21,6 µg/mL	21,34 µg/mL	1,011

Figura 83. Reto teórica construída para avaliação da linearidade segundo PASTELNICK (1993) onde se considera a concentração teórica de glimepirida e a média da concentração encontrada de três replicatas, preparadas a partir da MA 24 mg F8. As absorvâncias foram determinadas em 230 nm. Valores de $a = 0,0219$ e $r = 0,9998$

Figura 84. Reto teórica construída para avaliação da linearidade segundo BRITAIN (1998) onde se considera a concentração teórica de glimepirida e a média das absorvâncias de três replicatas, preparadas a partir da MA 24 mg F8. As absorvâncias foram determinadas em 230 nm. Valores de $a = 0,0096$ e $r = 0,9998$.

Tabela 40. Valores obtidos em termos de Fator de Linearidade (FL) considerando a concentração de GP e respectivas absorvâncias determinadas em 230 nm, a partir da MA 2⁴ mg – F8. Segundo LEITE (1996) o método é considerado linear quando o coeficiente de variação (CV) é igual ou inferior a 2%. Os valores expressam a média de 3 determinações.

Concentração teórica	Absorvâncias	Fator de linearidade
7,2 mg	0,3451	0,04793
10,8 mg	0,5108	0,04729
14,4 mg	0,6768	0,0470
18,0 mg	0,8533	0,0474
21,6 mg	1,011	0,04768
FL médio = 0,04728		
DP = 0,00043		
CV = 0,912%

Figura 85. Espectros derivados de 1ª ordem obtidos após teste de linearidade aplicado à MA 2⁴ mg – F8. As concentrações das soluções de leitura variaram entre 7,2 e 21,6 µg/mL de GP. A solução padrão apresentou concentração igual a 15,0 µg/mL e os valores da derivada de 1ª ordem foram determinados em 244, 246 e 251 nm.

Tabela 41. Resultados encontrados após teste da linearidade aplicado à MA 2⁴ mg – F8. Os valores da derivada de 1^a ordem em 244 nm referem-se a média de triplicatas.

Concentração teórica	Concentração média encontrada	$d^1A/d\lambda$ 244 nm
7,2 µg/mL	7,30 µg/mL	-0,1240
10,8 µg/mL	10,69 µg/mL	-0,1814
14,4 µg/mL	14,48 µg/mL	-0,2457
18,0 µg/mL	18,09 µg/mL	-0,3070
21,6 µg/mL	21,10 µg/mL	-0,3580

Figura 86. Reta teórica construída para avaliação da linearidade segundo PASTEELNICK (1993) onde se considera a concentração teórica da GP e a média da concentração de triplicatas, preparadas a partir da MA 2⁴mg – F8. Os valores da derivada de 1^a ordem foram determinados em 244 nm. Valores de $a = 0,332$ e $r = 0,9993$

Figura 87. Reta teórica construída para avaliação da linearidade segundo BRITAIN (1998) onde se considera a concentração teórica da GP e a média da concentração de triplicatas, preparadas a partir da MA 2^{4mg} – F8. Os valores da derivada de 1ª ordem foram determinados em 244 nm. Valores de $a = 0,0057$ e $r = 0,9993$

Tabela 42. Valores obtidos em termos de Fator de Linearidade (FL) considerando a concentração de GP e respectivos valores de derivada de 1ª ordem determinadas em 244 nm, a partir da MA 2^{4mg} – F87. Segundo LEITE (1996) o método é considerado linear quando o coeficiente de variação (CV) é igual ou inferior a 2%. Os valores expressam a média de 3 determinações.

Concentração teórica	$d^1A/d\lambda$	Fator de linearidade
7,2 mg	-0,1240	0,01722
10,8 mg	-0,1814	0,016796
14,4 mg	-0,2457	0,017062
18,0 mg	-0,3070	0,017055
21,6 mg	-0,3508	0,016574

FL médio = 0,01694

DP = 0,00028

CV = 1,61%

Tabela 43. Resultados encontrados após teste da linearidade aplicado à MA 2⁴ mg – F8. Os valores da derivada de 1^a ordem em 246 nm referem-se a média de triplicatas.

Concentração teórica	Concentração média encontrada	$d^1A/d\lambda$ 246 nm
7,2 µg/mL	7,28 µg/mL	-0,1239
10,8 µg/mL	10,69 µg/mL	-0,1818
14,4 µg/mL	14,42 µg/mL	-0,2452
18,0 µg/mL	18,24 µg/mL	-0,3101
21,6 µg/mL	21,17 µg/mL	-0,3599

Figura 88. Reta teórica construída para avaliação da linearidade segundo PASTELNICK (1993) onde se considera a concentração teórica da GP e a média da concentração de triplicatas, preparadas a partir da MA 2⁴mg – F8. Os valores da derivada de 1^a ordem foram determinados em 246 nm. Valores de $a = 0,228$ e $r = 0,9992$

Figura 89. Reta teórica construída para avaliação da linearidade segundo BRITAIN (1998) onde se considera a concentração teórica da GP e a média da concentração de triplicatas, preparadas a partir da MA 2⁴ mg – F8. Os valores da derivada de 1ª ordem foram determinados em 246 nm. Valores de $a = 0,00406$ e $r = 0,9992$

Tabela 44. Valores obtidos em termos de Fator de Linearidade (FL) considerando a concentração de GP e respectivos valores de derivada de 1ª ordem determinadas em 246 nm, a partir da MA 2⁴ mg – F8. Segundo LEITE (1996) o método é considerado linear quando o coeficiente de variação (CV) é igual ou inferior a 2%. Os valores expressam a média de 3 determinações.

Concentração teórica	$d^1A/d\lambda$	Fator de linearidade
7,2 mg	-0,1239	0,01721
10,8 mg	-0,1818	0,01683
14,4 mg	-0,2452	0,01703
18,0 mg	-0,3101	0,01722
21,6 mg	-0,3599	0,01666
FL médio = 0,01699		
DP = 0,00024		
CV = 1,43%		

Tabela 45. Resultados encontrados após teste da linearidade aplicado à MA 2⁴ mg – F8. Os valores da derivada de 1^a ordem em 251 nm referem-se a média de triplicatas

Concentração teórica	Concentração média encontrada	$d^1A/d\lambda$ 251 nm
7,2 µg/mL	7,29 µg/mL	-0,1107
10,8 µg/mL	10,86 µg/mL	-0,1648
14,4 µg/mL	14,42 µg/mL	-0,2176
18,0 µg/mL	18,24 µg/mL	-0,2730
21,6 µg/mL	21,17 µg/mL	-0,3208

Figura 90. Reta teórica construída para avaliação da linearidade segundo PASTEELNICK (1993) onde se considera a concentração teórica da GP e a média da concentração de triplicatas, preparadas a partir da MA 2⁴ mg – F8. Os valores da derivada de 1^a ordem foram determinados em 251 nm. Valores de $a = 0,34$ e $r = 0,9993$

Figura 91. Reta teórica construída para avaliação da linearidade segundo BRITAIN (1998) onde se considera a concentração teórica da GP e a média da concentração de triplicatas, preparadas a partir da MA 2⁴mg – F8. Os valores da derivada de 1ª ordem foram determinados em 251 nm. Valores de $a = 0,00602$ e $r = 0,9997$

Tabela 46. Valores obtidos em termos de Fator de Linearidade (FL) considerando a concentração de GP e respectivos valores de derivada de 1ª ordem determinadas em 251 nm, a partir da MA 2⁴mg – F87. Segundo LEITE (1996) o método é considerado linear quando o coeficiente de variação (CV) é igual ou inferior a 2%. Os valores expressam a média de 3 determinações.

Concentração teórica	$d^1A/d\lambda$	Fator de linearidade
7,2 mg	-0,1107	0,015375
10,8 mg	-0,1648	0,015259
14,4 mg	-0,2176	0,015111
18,0 mg	-0,2730	0,015166
21,6 mg	-0,3208	0,014851
FL médio = 0,011515		
DP = 0,000195		
CV = 1,28%

Figura 92. Espectros diretos obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão e MA 14^{mg} - F8 com concentração igual a 0,5 µg/mL de GP (9 alíquotas), após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. A concentração da solução padrão de GP foi igual a 15,0 µg/mL .

Figura 93. Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão e MA 14^{mg} - F8 com concentração igual a 0,5 µg/mL de GP (9 alíquotas) após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. A concentração da solução padrão de GP foi igual a 15,0 µg/mL .

Figura 94. Espectros diretos obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão e MA 14^{mg} - F8 com concentração igual a 1,0 µg/mL de GP (9 alíquotas) após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M . A concentração da solução padrão de GP foi igual a 15,0 µg/mL .

Figura 95. Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão e MA 14^{mg} - F8 com concentração igual a 1,0 µg/mL de GP (9 alíquotas) após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M . A concentração da solução padrão de GP foi igual a 15,0 µg/mL .

Figura 96. Espectros diretos obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão e MA 1^{4mg} · F8 com concentração igual a 1,5 µg/mL de GP (9 alíquotas) após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1N .A concentração da solução padrão de GP foi igual a 15,0 µg/mL .

Figura 97. Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão e MA 1^{4mg} · F8 com concentração igual a 1,5 µg/mL de GP (9 alíquotas) após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1N .A concentração da solução padrão de GP foi igual a 15,0 µg/mL.

Figura 98. Espectros diretos obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão e MA 14^{mg} - F8 com concentração igual a 2,0 µg/mL de GP (9 alíquotas) após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. A concentração da solução padrão de GP foi igual a 15,0 µg/mL.

Figura 99. Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão e MA 14^{mg} - F8 com concentração igual a 2,0 µg/mL de GP (9 alíquotas) após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. A concentração da solução padrão de GP foi igual a 15,0 µg/mL.

Figura 100. Espectros diretos obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão e MA 1⁴mg - F8 com concentração igual a 2,5 µg/mL de GP (9 alíquotas) após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M . A concentração da solução padrão de GP foi igual a 15,0 µg/mL .

Figura 101. Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão e MA 1⁴mg - F8 com concentração igual a 2,5 µg/mL de GP (9 alíquotas) após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M . A concentração da solução padrão de GP foi igual a 15,0 µg/mL.

Figura 102. Espectros diretos obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão e MA 1^{4mg} - F8 com concentração igual a 3,0 µg/mL de GP (9 alíquotas) após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. A concentração da solução padrão de GP foi igual a 15,0 µg/mL.

Figura 103. Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão e MA 1^{4mg} - F8 com concentração igual a 3,0 µg/mL de GP (9 alíquotas) após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. A concentração da solução padrão de GP foi igual a 15,0 µg/mL.

Figura 104. Espectros diretos obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão e MA 1^{4mg} - F8 com concentração **igual a 3,5 µg/mL de GP** (9 alíquotas) após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. A concentração da solução padrão de GP foi igual a 15,0 µg/mL.

Figura 105. Espectros derivados de 1ª ordem obtidos a partir de soluções preparadas com glimepirida padrão e MA 1^{4mg} - F8 com concentração **igual a 3,5 µg/mL de GP** (9 alíquotas) após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. A concentração da solução padrão de GP foi igual a 15,0 µg/mL.

Tabela 47. Valores obtidos de soluções preparadas a partir da MA 1^{4 mg} F8, após serem submetidas a aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M e a leituras em 230 nm. Os resultados expressam a média de 9 leituras.

	Absorvância	Concentração	Teor	DP	CV (%)
	média	média	%		
		µg/mL			
0,5 µg/mL	0,0236	0,501	100,2	0,0339	6,77
1,0 µg/mL	0,0457	0,970	97,0	0,0514	5,30
1,5 µg/mL	0,0666	1,413	94,2	0,0357	2,52
2,0 µg/mL	0,0909	1,927	96,4	0,0423	2,19
2,5 µg/mL	0,1168	2,519	100,7	0,0313	1,25
3,0 µg/mL	0,1368	2,897	96,6	0,0113	0,39
3,5 µg/mL	0,1576	3,310	94,6	0,0252	0,764
Desvio padrão médio = 0,03301

Figura 106. Reta construída para cálculo do coeficiente angular (**b**) a partir da concentração teórica de glimepirida e a média das absorvâncias obtidas, para determinação dos limites de detecção e quantificação. A tomada de ensaio correspondeu a 25,0 mg de glimepirida a partir da MA 1. As absorvâncias foram determinadas em 230 nm. Valor **b** = 0,04531.

Cálculos para determinação dos Limites de Detecção e Quantificação da GP em 230 nm

$$\text{Limite de detecção (LD)} = \frac{\text{desviopadrão médio}}{b} \cdot 3 = 2,18 \mu\text{g/mL de GP}$$

$$\text{Limite de quantificação (LQ)} = \frac{\text{desviopadrão médio}}{b} \cdot 10 = 7,28 \mu\text{g/mL de GP}$$

Tabela 48. Valores obtidos de soluções preparadas a partir da MA 1⁴ mg F8, após serem submetidas a aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M e a leituras em 244 nm contra branco. Os resultados expressam a média de 9 leituras.

	$d^1A/d\lambda$	Concentração média $\mu\text{g/mL}$	Teor %	DP	CV (%)
0,5 $\mu\text{g/mL}$	0,0087	0,502	100,5	0,01059	2,11
1,0 $\mu\text{g/mL}$	0,0175	1,008	100,8	0,01679	1,66
1,5 $\mu\text{g/mL}$	0,0263	1,515	101,4	0,0234	1,54
2,0 $\mu\text{g/mL}$	0,0357	2,049	102,5	0,0246	1,20
2,5 $\mu\text{g/mL}$	0,0463	2,660	106,4	0,0429	1,61
3,0 $\mu\text{g/mL}$	0,0549	3,170	105,0	0,0178	0,56
3,5 $\mu\text{g/mL}$	0,0631	3,630	103,7	0,0421	1,16

Desvio padrão médio = 0,025454

Figura 107. Retra construída para cálculo do coeficiente angular (**b**) a partir da concentração teórica de glimepirida e a média das absorvâncias obtidas, para determinação dos limites de detecção e quantificação. A tomada de ensaio correspondeu a 25,0 mg de glimepirida a partir da MA 1⁴ mg – F8. Os valores da derivada de 1ª ordem foram determinados em 244 nm. Valor **b** = 0,01843.

Cálculos para determinação dos Limites de Detecção e Quantificação da GP em 244 nm

$$\text{Limite de detecção (LD)} = \frac{\text{desviopadrão médio}}{b} \cdot 3 =$$

$$\text{LD} = 4,14 \mu\text{g/mL de GP}$$

$$\text{Limite de quantificação (LQ)} = \frac{\text{desviopadrão médio}}{b} \cdot 10 =$$

$$\text{LQ} = 13,80 \mu\text{g/mL de GP}$$

Tabela 49. Valores obtidos de soluções preparadas a partir da MA 1⁴ mg F8, após serem submetidas a aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M e a leituras em 246 nm contra branco. Os resultados expressam a média de 9 leituras.

	$d^1A/d\lambda$	Concentração	Teor%	DP	CV (%)
		média $\mu\text{g/mL}$			
0,5 $\mu\text{g/mL}$	0,0091	0,530	106,1	0,01438	2,71
1,0 $\mu\text{g/mL}$	0,01771	1,031	103,1	0,01927	1,86
1,5 $\mu\text{g/mL}$	0,02631	1,530	102,1	0,02154	1,41
2,0 $\mu\text{g/mL}$	0,0356	2,078	103,8	0,02569	1,24
2,5 $\mu\text{g/mL}$	0,0464	2,69	107,6	0,0424	1,58
3,0 $\mu\text{g/mL}$	0,0552	3,21	107,0	0,0161	0,50
3,5 $\mu\text{g/mL}$	0,0632	3,68	105,1	0,04427	1,20
Desvio padrão médio = 0,026235

Figura 108. Reta construída para cálculo do coeficiente angular a partir da concentração teórica de glimepirida e a média das absorvâncias obtidas, para determinação dos limites de detecção e quantificação. A tomada de ensaio correspondeu a 25,0 mg de glimepirida a partir da MA 14^{mg} – F8. Os valores da derivada de 1ª ordem foram determinados em 246 nm. Valor $b = 0,01839$.

Cálculos para determinação dos Limites de Detecção e Quantificação da GP em 246 nm

$$\text{Limite de detecção (LD)} = \frac{\text{desviopadrão médio}}{b} \cdot 3 =$$

LD = 4,28 µg/mL de GP

$$\text{Limite de quantificação (LQ)} = \frac{\text{desviopadrão médio}}{b} \cdot 10 =$$

LQ = 14,28 µg/mL de GP

Tabela 50. Valores obtidos de soluções preparadas a partir da MA 1⁴ mg F8, após serem submetidas a aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M e a leituras em 251 nm. Os resultados expressam a média de 9 leituras.

	$d^1A/d\lambda$	Concentração média $\mu\text{g}/\text{mL}$	Teor%	DP	CV (%)
0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,0076	0,51	102,0	0,03025	5,93
1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,0147	1,04	104,0	0,0214	2,05
1,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,0216	1,52	101,7	0,01182	0,74
2,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,0289	2,10	105,0	0,02489	1,18
2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,0391	2,75	110,0	0,0481	1,75
3,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,0466	3,27	109,0	0,0273	0,83
3,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,0533	3,74	107,0	0,0501	1,34

Desvio padrão médio = 0,03055

Figura 109. Reta construída para cálculo do coeficiente angular a partir da concentração teórica de glimepirida e a média das absorvâncias obtidas, para determinação dos limites de detecção e quantificação. A tomada de ensaio correspondeu a 25,0 mg de glimepirida a partir da MA 1⁴ mg – F8. Os valores da derivada de 1ª ordem foram determinados em 251 nm. Valor $b = 0,01562$.

Cálculos para determinação dos Limites de Detecção e Quantificação da GP em 251 nm

$$\text{Limite de detecção (LD)} = \frac{\text{desviopadrão médio}}{b} \cdot 3 = 5,86 \text{ } \mu\text{g/mL de GP}$$

$$\text{Limite de quantificação (LQ)} = \frac{\text{desviopadrão médio}}{b} \cdot 10 = 19,55 \text{ } \mu\text{g/mL de GP}$$

Figura 110. Espectros de absorção de ordem zero obtidos a partir de soluções padrão de glimepirida em concentrações no intervalo de 3,0 a 30,0 $\mu\text{g/mL}$, após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As absorvâncias foram determinadas em 230 nm contra branco.

Tabela 51. Absorvâncias determinadas em 230 nm contra branco de soluções padrão de glimepirida em concentrações variáveis entre 3,0 e 30,0 µg/mL em NaOH 0,1M após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos.

Concentração (µg/mL)	Absorvância
3,0	0,1554
6,0	0,2939
9,0	0,4382
12,0	0,5773
15,0	0,7137
18,0	0,8568
21,0	1,0127
24,0	1,1501
27,0	1,2920
30,0	1,4358

Figura 111. Curva de calibração obtida a partir de soluções padrão em concentrações variáveis entre 3,0 e 30,0 µg/ml de GP. As absorvâncias foram determinadas em 230 nm contra branco.

Figura 112. Espectros de absorção da primeira derivada de soluções padrão em concentrações variáveis entre 3,0 e 30,0 $\mu\text{g/mL}$ de GP padrão, após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As leituras foram feitas em 244, 246 e 251 nm.

Tabela 52. Valores obtidos da 1ª derivada das soluções padrão em concentrações variáveis entre 3,0 e 30,0 $\mu\text{g/mL}$ de Gp padrão após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As leituras foram feitas em 244 nm.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	$d^1A/d\lambda$
3,0	-0,0569
6,0	-0,1079
9,0	-0,1584
12,0	-0,2100
15,0	-0,2619
18,0	-0,3128
21,0	-0,3666
24,0	-0,4212
27,0	-0,4715
30,0	-0,5236

Figura 113. Curva de calibração obtida a partir de soluções padrão de GP em concentrações entre 3,0 e 30,0 $\mu\text{g/mL}$ após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As derivadas de primeira ordem foram determinadas em 244 nm contra branco.

Tabela 53. Valores obtidos da derivada de 1ª ordem das soluções padrão em concentrações variáveis entre 3,0 e 30,0 $\mu\text{g/mL}$ de GP padrão após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As leituras foram feitas em 246 nm.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	$d^1A/d\lambda$
3,0	-0,0568
6,0	-0,1073
9,0	-0,1592
12,0	-0,2082
15,0	-0,2605
18,0	-0,3139
21,0	-0,3662
24,0	-0,4176
27,0	-0,4700
30,0	-0,5222

Figura 114. Curva de calibração obtida a partir de soluções padrão de GP em concentrações entre 3,0 e 30,0 µg/mL após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As derivadas de primeira ordem foram determinadas em 246 nm contra branco.

Tabela 54. Valores obtidos da derivada de 1ª ordem das soluções padrão em concentrações variáveis entre 3,0 e 30,0 µg/mL de GP padrão, após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As leituras foram feitas em 251 nm.

Concentração (µg/mL)	d ¹ A/d λ
3,0	-0,0489
6,0	-0,0931
9,0	-0,1392
12,0	-0,1837
15,0	-0,2256
18,0	-0,2720
21,0	-0,3223
24,0	-0,3696
27,0	-0,4145
30,0	-0,4599

Figura 115. Curva de calibração obtida a partir de soluções padrão de GP em concentrações entre 3,0 e 30,0 µg/mL, após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. As derivadas de primeira ordem foram determinadas em 251 nm contra branco.

Equação da reta de ordem zero 230 nm :

$$Y (\text{Abs}) = 0,04715X + 0,0086$$

$$r = 0,9998$$

a não significativo (t(a) igual a 1,99 para n=10, P= 95%)

$$S_e = 0,00004 \text{ e } S_{er} = 0,0053\%.$$

Equação da reta 1ª derivada em 244 nm

$$Y (d^1A/d\lambda) = 0,01733X + 0,0031$$

$$r = 0,9999$$

a não significativo (t(a) igual 1,00 para n=10, P= 95%)

$$S_e = 0,000007 \text{ e } S_{er} = 0,0025 \%.$$

Equação da reta 1ª derivada em 246 nm

$$Y (d^1A/d\lambda) = 0,01726X + 0,0033$$

$$r = 0,9999$$

a não significativo (t(a) igual a 1,84 para n=10, P= 95%)
 $S_e = 0,000015$ e $S_{er} = 0,0052 \%$.

Equação da reta 1ª derivada em 251 nm

$$Y (d^1A/d\lambda) = 0,01528X + 0,00078$$

$$r = 0,9999$$

a não significativo (t(a) igual a 0,534 para n=10, P= 95%)
 $S_e = 0,00007$ e $S_{er} = 0,0028 \%$.

Tabela 55. Resultados obtidos com a espectrofotometria direta e derivada, após leitura de 9 alíquotas de uma solução padrão de concentração igual a 20,0 µg/mL de GP submetida a aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M.

	230 nm	244 nm	246 nm	251 nm
média das leituras	0,9131	-0,3326	-0,3374	-0,2961
DP	0,007	0,0036	0,0025	0,0017
CV	0,769%	1,01%	0,750%	0,571%

Figura 116. Espectros diretos obtidos de soluções preparadas com padrão de GP e 9 alíquotas da amostra comercial de comprimidos AS de GP (4 mg). A concentração do padrão foi igual a 20,0 $\mu\text{g/mL}$ e as absorvâncias foram determinadas em 230 nm.

Figura 117. Espectros derivados de primeira ordem obtidos de solução padrão de GP e 9 alíquotas da amostra comercial de comprimidos AS de GP (4 mg). A concentração do padrão foi igual a 20,0 $\mu\text{g/mL}$ e as derivadas foram determinadas em 244, 246 e 251 nm.

Figura 118. Espectros diretos obtidos de soluções preparadas com padrão de GP e 9 aliquotas da amostra comercial de comprimidos AR de GP (4 mg). A concentração do padrão foi igual a 20,0 $\mu\text{g/mL}$ e as absorvâncias foram determinadas em 230 nm.

Figura 119. Espectros derivados de primeira ordem obtidos de solução padrão de GP e 9 aliquotas da amostra comercial de comprimidos AR de GP (4 mg). A concentração do padrão foi igual a 20,0 $\mu\text{g/mL}$ e as derivadas foram determinadas em 244, 246 e 251 nm.

Tabela 56. Valores médios obtidos a partir de solução padrão de GP (3 alíquotas) e soluções preparadas com as amostras comerciais de comprimidos de GP – AS (9 alíquotas) após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. A concentração de leitura foi igual a 20,0 µg/mL de GP.

	230 nm	244 nm	246 nm	251 nm
GP pad	0,9451	-0,3457	-0,3475	-0,3020
AS	1,2230	-0,3926	-0,3839	-0,3173

Tabela 57. Valores médios obtidos a partir de solução padrão de GP (3 alíquotas) e soluções preparadas com as amostras comerciais de comprimidos de GP – AR (9 alíquotas) após aquecimento a 80-90°C entre 5-10 minutos em NaOH 0,1M. A concentração de leitura foi igual a 20,0 µg/mL de GP.

	230 nm	244 nm	246 nm	251 nm
GP pad	0,9279	-0,3435	-0,3401	-0,2995
AR	1,1968	-0,3779	-0,3642	-0,3110

Tabela 58. Resultados obtidos após análise das amostras comerciais de comprimidos de GP (4 mg) segundo os métodos espectrofotométricos direto e derivado. A tomada de ensaio correspondeu a 100,0 mg de GP e os valores expressam a média da análise de 9 alíquotas.

	Valor encontrado (mg)	Teor	DP	CV (%)	Intervalo de confiança (95%)
AS					
230 nm	129,37	129,37%	0,886	0,685	129,37 ± 0,668
244 nm	113,57	113,57%	0,719	0,633	113,57 ± 0,542
246 nm	109,08	109,08%	0,883	0,810	109,08 ± 0,665
251 nm	105,05	105,05%	0,752	0,716	105,05 ± 0,539
AR					
230 nm	128,98	128,98%	0,743	0,576	128,98 ± 0,560
244 nm	110,01	110,01%	0,576	0,524	110,01 ± 0,430
246 nm	106,98	106,98%	0,556	0,532	106,98 ± 0,419
251 nm	103,84	103,84	0,471	0,453	103,84 ± 0,355

AS = amostra similar, AR = amostra referência

6. DISCUSSÃO

Várias alternativas analíticas foram encontradas para a determinação de diclofenaco sódico (DS), isolado ou associado a outros fármacos, presentes em medicamentos (comprimidos e injetáveis) e fluidos biológicos. A escolha do metanol como solvente para o método espectrofotométrico UV foi feita considerando a descrição da solubilidade nos compêndios oficiais (CLARKE'S, 1986; MERCK, 1996; BRITISH PHARMACOPOEIA, 1999), a disponibilidade e custo, comparados a outros reagentes descritos.

A avaliação do grau de pureza do DS (grau farmacêutico) empregado obedeceu ao estabelecido na British Pharmacopoeia (1999), revelando teor igual a 99%, compatível com a informação do fornecedor (Sigma®).

Em contraste ao DS, a glimepirida (GP) foi discutida em 2 trabalhos, sendo o primeiro direcionado a análises de sangue e urina (LEHR, DAMM, 1990) e o segundo, a medicamentos (ALTINOZ, TEKELI, 2001). Este trabalho descreve a aplicação da espectrofotometria derivada de segunda ordem usando a dimetilformamida como solvente.

Considerando a inexistência de dados farmacopéicos, a avaliação do padrão de glimepirida (lote 8022) utilizado durante a pesquisa foi conduzida pela análise comparativa no infravermelho (IV) com outro padrão de GP (lote NC 21819). Os principais picos identificados referem - se a NH-uréia ($3368,94\text{ cm}^{-1}$ e $3288,92\text{ cm}^{-1}$); CH alifático ($2930,53\text{ cm}^{-1}$); carbonilas ($1707,54\text{ cm}^{-1}$ e $1673,95\text{ cm}^{-1}$); NH amida II ($1542,61\text{ cm}^{-1}$); $-\text{SO}_2\text{NH}-$ ($1345,98\text{ cm}^{-1}$) e $-\text{SO}_2-$ ($1154,18\text{ cm}^{-1}$). Os dois espectros obtidos podem ser observados nas figuras 10 e 11 e os valores referentes aos picos e funções químicas são significativamente próximos. Para garantir tais resultados, estes foram então comparados com o espectro no IV de outra sulfoniluréia, a glibenclamida (CLARKE'S, 1986; TAKLA, 1981) confirmando assim, os dados em termos de picos e grupos funcionais. Para os experimentos foi considerado o grau de pureza de 99% de GP indicado pelo laboratório fornecedor.

Garfield (1994) sugere quatro procedimentos básicos para a validação de métodos, principalmente em circunstâncias como introdução de um método novo com utilização regular no futuro ou que ainda não foi aplicado no laboratório ou utilizado pelo analista. Estas tentativas referem-se: à aplicação do método na análise de amostras reforçadas; comparação de resultados com aqueles obtidos através de um método oficial; análise de substâncias de referência e ainda análise de formulações sintéticas. Sua recomendação refere-se ao teste com uma amostra de composição conhecida que reproduza aquela amostra na qual será aplicado o método.

Considerando isto, e a exigência legal dos órgãos de fiscalização no que tange às Boas Práticas de Fabricação e conseqüentemente à validação de métodos analíticos, foram preparadas matrizes analíticas com e sem o fármaco (respectivamente MA1 e MA2), tanto para a pesquisa do DS como para a GP. As formulações estão descritas nos itens 4.1.1.2 e 4.1.2.2. e procurou-se reproduzir as formulações existentes para comprimidos de DS e GP, porém pequenas diferenças nas matrizes podem ser esperadas, o que é plenamente aceitável.

A preparação destas matrizes foi feita em bancada utilizando sacos plásticos resistentes e grandes, com agitação vigorosa e manual.

As edições da Farmacopéia Americana (2000 e 2002) descrevem os vários parâmetros exigidos para a validação de um método analítico, porém foram objeto de avaliação a especificidade, exatidão, precisão, linearidade e limites de detecção e quantificação, com o objetivo de garantir a aplicabilidade do método de maneira segura e confiável, atendendo aos objetivos desta pesquisa.

6.1- Diclofenaco sódico

O comportamento das soluções padrão de DS preparadas em diferentes concentrações em metanol (figura 3), revelou um espectro no UV que coincide com o descrito por Adeyeye e Li (1990) com máximo de absorção em 282 nm, muito próximo ao valor descrito que é de 283 nm

(MERCK, 1996). Os espectros apresentaram proporcionalidade entre concentração e absorvância, indicativa de estabilidade das condições analíticas. Estabelecidos o solvente, absorvâncias na faixa de 0,2-0,8 e respectivas concentrações, foi construída a curva de Ringbom (figura 4), utilizando-se de 20 soluções com concentrações entre 2,0 a 26,0 µg/mL de DS. O comportamento da reação pôde então ser avaliado em uma ampla faixa de concentração de DS confirmando a resposta proporcional entre absorvância e concentração. A representação gráfica da curva de Ringbom, traçada pelo programa Microcal Origin 3.5, revela um aspecto não muito nítido no ramo inferior da curva, o que pode ser entendido pelas baixas absorvâncias nas quais podem estar implícitos erros experimentais. Há de se reconhecer, no entanto, o traçado sigmóide característico deste tipo de curva.

A relação de proporcionalidade entre absorvância e concentração pode ser observada e confirmada pela reta de calibração apresentada na figura 5, cujos resultados estão descritos na tabela 1. A faixa de concentração adotada para este experimento foi de 4,0 a 22,0 µg/mL de DS. A reta obtida apresentou coeficiente de correlação (r) igual a 0,999 e coeficiente angular (b) próximo de zero (0,0418) podendo ser considerados estatisticamente válidos. Diante destes resultados, decidiu-se pela concentração analítica de 15,0 µg/mL de DS correspondente a uma absorvância próxima a 0,62. Este valor é compatível com valores aceitáveis de absorvâncias entre 0,2 e 1,5 (VOGEL, 2002).

A demonstração de que o procedimento analítico não sofreu alterações decorrentes da presença de excipientes/impurezas representa a especificidade do método (ICH, 2002; USP 25, 2002; PINTO, FERRARINI, GATTI, 2003). Britain (1998) considera que a especificidade ocupa destaque na validação de métodos não cromatográficos uma vez que nestes não há uma fase prévia de separação dos excipientes que podem determinar alguma interferência.

Neste sentido, a figura 6 e tabela 2 apresentam respectivamente, os espectros e valores em absorvâncias determinados em 282 nm das soluções

padrão de DS e da solução preparada a partir da matriz analítica 2. Os resultados indicaram ausência de interferência dos excipientes. O procedimento adotado na prática para eliminação dos excipientes foi filtração simples com papel de filtro.

Considerando estes resultados, os atributos exatidão e precisão foram avaliados após a aplicação do método espectrofotométrico UV/metanol à MA1 e amostras comerciais de comprimidos de DS. Os resultados obtidos e apresentados na tabela 3 (teores entre 97 e 103% de DS) demonstram proximidade do valor experimental com valor declarado de DS (50 mg) e bons resultados em termos de coeficiente de variação (inferiores a 1%) contemplando assim, a avaliação da exatidão e precisão satisfazendo os critérios de aceitação empregados na indústria farmacêutica (PASTEELNICK, 1993; RUDOLPH, 1993; CARR, WAHLICH, TANNER, 1994; BRITAIN, 1998; WATSON, 1999; ICH, 2002; USP 25, 2002).

Outro procedimento objetivando avaliar a exatidão é descrito por Garfield (1994) representado pelo teste de recuperação. O procedimento analítico conduzido de acordo com o item 4.2.1.6 utilizando a MA1-DS revelou resultados que demonstraram concordância do valor experimental com o valor declarado. O número de replicatas avaliadas (10) está de acordo com uma das recomendações da USP 25 ed. (2002) que sugere um mínimo de seis determinações contendo 100% da concentração teórica, respeitando a faixa de concentração ideal do método. Leite (1996) acredita que este número de determinações garante uma boa e segura avaliação estatística. A tabela 4 apresenta os resultados obtidos com a aplicação do teste de recuperação que podem ser considerados válidos.

Conforme recomendação das USP 24 ed. (2000) e 25 ed. (2002) a linearidade do método pode ser avaliada pela relação linear entre resultados do teste e concentração analisada, utilizando pelo menos cinco níveis de concentração. A regressão linear é considerada o melhor caminho para avaliação dos resultados (PASTEELNICK, 1993; BRITAIN, 1998; EURACHEM, 1998; WATSON, 1999). Leite (1996) e Garfield (1994) sugerem ainda que as determinações sejam feitas em triplicatas para cada

nível de concentração do fármaco. De acordo com estas colocações, foi conduzido o teste para avaliação da linearidade do método espectrofotométrico UV/metanol usando a MA2, à qual foram acrescentados diferentes teores de DS. Os resultados deste ensaio estão apresentados na tabela 5.

A representação gráfica sugerida pela USP 24 ed. (2000) e prevista por Britain (1996), ilustrando a proporcionalidade entre absorvâncias e concentração de DS pode ser observada na figura 8. Dentro da concentração ideal para o método e considerando o que Britain (1996) coloca em termos de coeficiente de correlação (r mais próximo de 1) e coeficiente angular (a mais próximo de zero), os valores de $r = 0,9995$ e $a = 0,0161$ obtidos conduzem a afirmação de que o método é linear.

Pasteelnick (1993), por sua vez, considera que a linearidade pode ser avaliada graficamente relacionando concentrações experimentais e concentrações adicionadas de DS. Este resultado pode ser observado na figura 7 e é concordante em termos de (r) com o gráfico apresentado na figura 8. Visualmente, é incontestável a proporcionalidade de respostas confirmando a propriedade linear do método. Esta afirmação pode ser ratificada com os resultados encontrados na tabela 6, após os cálculos sugeridos por Leite (1996) que considera um método linear àquele que apresenta um CV inferior a 2%.

Admite-se a necessidade de avaliação dos limites de detecção e quantificação, principalmente para aqueles métodos analíticos que se caracterizam pela determinação de teores de impurezas, resíduos de solventes e metais com emprego de equipamentos altamente sensíveis. Como no caso, o objetivo é a quantificação de um princípio ativo através da espectrofotometria, em concentração que corresponde a absorvâncias próximas a 0,7 e sabendo que leituras abaixo de 0,2 comportam erros experimentais grandes, pode-se considerar a determinação destes limites, uma complementação das informações até agora apresentadas.

As definições oficiais (EURACHEM, 1998; ICH, 2002, USP 25, 2002. AGENCIA..., 2003)) estabelecem limite de detecção (LD) como sendo a

detecção confiável de um nível mínimo do analisado, enquanto limite de quantificação (LQ) refere-se à avaliação da menor quantidade de uma substância com garantia de exatidão e precisão. Considerando isto e a sugestão de Britain (1996) em termos de determinação destes dois limites através de um certo número de amostras com baixas concentrações, repetidas vezes com cálculo do DP ao final, foi conduzido o experimento a partir de 10 replicatas com concentrações de 5,0; 4,0; 3,0; 2,0 e 1,0 µg/mL de DS. Os resultados obtidos podem ser observados na tabela 7, onde fica claro que à medida em que as concentrações diminuem, a exatidão (expressa pela maior concordância entre valor teórico e experimental) apresenta-se comprometida.

Em termos de precisão, representada pelo coeficiente de variação (CV), os resultados podem ser considerados bons uma vez que apresentaram-se abaixo de 3%, plenamente aceito em se tratando de espectrofotometria. No entanto, não se recomenda trabalhar com concentrações muito próximas ao limite de quantificação em situações que exigem uma determinação exata.

A figura 9 apresenta uma reta construída a partir dos dados da tabela 7 revelando um coeficiente angular (b) = 0,415. De acordo com Britain (1996), através do desvio-padrão médio (obtido e apresentado na tabela 6) e do coeficiente angular, foi possível calcular os limites de detecção e de quantificação respectivamente, 2,52 µg/mL e 8,42 µg/mL de DS. Ressalta-se que este limite de quantificação significa que o método analítico pode ser empregado neste nível de concentração, porém, deve-se considerar o comprometimento de exatidão e/ou precisão.

Resistência e robustez de um método analítico, conforme suas definições, implicam na introdução de variáveis (analista, equipamentos, reagentes, laboratórios, dias) com objetivo de avaliar o potencial interferente destes sobre os resultados analíticos. Esta circunstância pode caracterizar estudos colaborativos que não foram apreciados ou idealizados na proposta desta pesquisa. No entanto, os resultados obtidos em termos de exatidão, precisão e linearidade, reflexo de inúmeras determinações analíticas onde

algumas variáveis podem estar implícitas, asseguram a indicação e aplicabilidade do método espectrofotométrico UV/metanol para a determinação de DS em comprimidos.

6.2- Glimepirida

Na avaliação preliminar para o desenvolvimento de um método espectrofotométrico para determinação da GP, deparou-se com a falta de informações farmacopeicas. Dados sobre síntese, determinação em fluidos biológicos, farmacocinética e toxicidade são apresentados no Merck Index (1996), enquanto o PDR (1997) descreve aspectos físicos e insolubilidade em água.

O passo inicial foi a escolha de um solvente que permitisse adequada solubilidade, não interagisse com o fármaco e não absorvesse no comprimento de onda específico para este, características estas consideradas por Vogell (2002).

O solvente considerado ideal na espectrofotometria é a água, no entanto, a escolha de Altinoz e Tekeli (2001) pela dimetilformamida foi indicativa da insolubilidade da GP em água. Decidiu-se avaliar inicialmente, o comportamento da GP frente a diferentes volumes de soluções de HCl, H₂SO₄ e NaOH em diferentes concentrações, utilizando pequenas amostras (mg) do fármaco. Os primeiros resultados foram mais favoráveis à solução alcalina, o que conduziu a um experimento mais detalhado.

Foi preparada uma solução padrão de GP com concentração igual a 20,0 µg/mL em NaOH 0,1M, com aquecimento em manta até solubilização (a cerca de 90°C) e após, submetida à varredura entre 200 e 400 nm. O espectro obtido pode ser observado na figura 12.

Com base nestes resultados, decidiu-se por uma segunda experiência onde se variaram concentrações de NaOH (0,1; 0,5 e 1M) e tempos de aquecimento e os valores encontrados em absorvância neste ensaio podem ser observados na tabela 8. Os dados inicialmente obtidos a partir da solução padrão de GP permitiram estabelecer condições analíticas como:

NaOH 0,1M, aquecimento a 80-90°C em manta entre 5 e 10 minutos e λ máximo em torno de 230 nm.

Estabelecidos estes parâmetros, um novo experimento foi conduzido dentro das condições analíticas, onde foram preparadas soluções padrão de GP em NaOH 0,1M com concentrações variáveis entre 3,2 a 17,6 $\mu\text{g/mL}$. As soluções foram avaliadas a intervalos de 15 minutos e as respectivas absorvâncias encontradas nos diferentes tempos estão apresentadas na tabela 9. O gráfico ilustrado na figura 13, onde se considera absorvância e tempo de leitura, indica a solubilidade da GP e a estabilidade das soluções nas condições experimentais.

Dependendo da estrutura química de uma substância, há formação de íons quando esta é solubilizada em meio aquoso ácido ou alcalino. Esta ionização responde pela maior ou menor absorção. Respaldados neste princípio e considerando os resultados deste último experimento, pode-se admitir que os espectros obtidos representam a ionização da GP em meio alcalino e esta suposição poderá ser confirmada com a realização de ensaios específicos.

O trabalho de Altinoz e Tekeli (2001) fez referência sobre estabilidade da GP em dimetilformamida e condições de stress, comentando sem detalhes, a degradação da GP em soluções de HCl 0,1N e NaOH 0,1N.

Determinados os parâmetros analíticos, foram obtidos espectros de soluções padrão de GP em concentrações variáveis de 4,0 a 22,0 $\mu\text{g/mL}$, que podem ser visualizados na figura 14. Os resultados foram considerados satisfatórios, determinando a construção da curva de Ringbom e da curva de calibração.

A curva de Ringbom apresentada na figura 15 e também construída pelo programa *Microcal Origin®* 3.5 mostrou-se dentro dos parâmetros espectrofotométricos ideais, e a partir de seus resultados, foram escolhidas as concentrações de melhor linearidade permitindo a construção da curva de calibração. Esta pode ser observada na figura 16 e os valores referentes a absorvância e concentração estão apresentados na tabela 10. O coeficiente de correlação (r) igual a 0,9998 e o coeficiente angular (b) igual a 0,00208

obtidos garantem a validade estatística. Nas condições analíticas desenvolvidas, foi adotado como concentração ideal o valor de 15,0 µg/mL de GP correspondendo a uma absorbância próxima a 0,70 que vai de encontro aos valores aceitos para espectrofotometria (VOGEL, 2002)

Determinados os parâmetros analíticos: concentração de 15,0 µg/mL, solvente NaOH 0,1M, aquecimento a 80-90°C entre 5 e 10 minutos e máximo de absorção em 230 nm, foram avaliadas as MA1 e MA2 correspondentes à formula 1 (F1).

Os resultados obtidos com estas matrizes podem ser observados na figura 17 e fica evidente a sobreposição dada pela lactose, um dos excipientes utilizados nesta formulação. Seu espectro isolado revela absorvância entre 0,2 e 0,3 decorrente da coloração acastanhada desenvolvida após o aquecimento em meio alcalino.

Wade e Weller (1994) consideraram que a estabilidade da lactose pode ser comprometida quando da exposição à umidade e estocagem desenvolvendo coloração escura, que pode ser acelerada com o calor e ainda pela presença de solução alcalina. No presente trabalho, fica justificada a situação de escurecimento das soluções decorrente do uso de NaOH 0,1M e aquecimento originando hidroximetilfurfural.

A capacidade da espectrofotometria derivada (ED) em eliminar a interferência de excipientes foi avaliada, e assim, através do programa UVPC®, instalado no computador conectado ao espectrofotômetro, foram obtidos espectros derivados de primeira ordem apresentados na figura 18. Pode-se facilmente perceber que a solução de lactose submetida às condições analíticas e avaliada na derivada de primeira ordem apresenta leituras mínimas no intervalo de 240-250 nm, indicando possibilidades de eliminação de sua interferência.

A MA2, nesta mesma faixa de leitura, apresentou valores com tendência a anulação. Pode-se observar ainda que a solução da MA1, submetida às mesmas condições analíticas, apresentou comportamento semelhante ao padrão significando possibilidade de determinação do fármaco. Diante das informações dadas por Hackmann, Beneton e Santoro

(1991), Consiglieri (1992) e Hidalgo (2001) e destes resultados, considerou-se a adoção do método "zero-crossing" para a análise de GP em comprimidos .

Para a aplicação da ED, experimentalmente, foram avaliados diferentes parâmetros com variação de $\Delta\lambda$, assentamento das ordenadas e ordem da derivada. Os que revelaram melhor resolução de espectro foram $\Delta\lambda = 4,0$ nm, assentamento de ordenadas entre +0,5 e -0,5, derivada de 1ª ordem utilizando a velocidade de varredura do aparelho (igual a 3800 nm/min). Foi observado que o ponto de anulação na primeira derivada corresponde ao máximo de absorção do espectro original (entre 229-230 nm).

Para detalhamento das informações, a partir do espectro original da solução padrão de GP (figura 12), foi obtido o espectro derivado apresentado na figura 19. A figura 20 apresenta os espectros derivados obtidos a partir da figura 14 (onde constam os espectros diretos das soluções padrão de GP em diferentes concentrações). Fica evidente a presença de um máximo e um mínimo com ponto de anulação em 230 nm, o que caracteriza um espectro de primeira ordem e ainda é confirmada a proporcionalidade entre concentração de GP e $d^1A/d\lambda$ (LEVILLAIN, FOMPEYDIE, 1986; HACKMANN, BENETON e SANTORO, 1991).

Para a construção da curva de calibração na derivada de primeira ordem, foram preparadas 10 soluções padrão com concentração variável entre 4,0-22,0 $\mu\text{g/mL}$ de GP. Na faixa de leitura entre 240 e 250 nm, foram obtidos valores de derivadas em 244; 246 e 251 nm, onde foram observadas as maiores amplitudes. Nas tabelas 11, 12 e 13 estão registradas as concentrações e os respectivos valores de primeira derivada que permitiram a construção das curvas de calibração, apresentadas nas figuras 21, 22 e 23 relacionadas aos 3 comprimentos de onda adotados. As equações de reta obtidas apresentaram valores estatisticamente válidos com coeficientes de correlação em torno de 0,999, coeficientes angulares entre 0,001 e 0,003 e valores de *a* não significativos .

Uma segunda fórmula (F2) foi elaborada onde quantidade e tipo de lactose foram modificados, acrescentando ainda o PVP. Dentro das condições analíticas estabelecidas, procedeu-se a uma avaliação dos excipientes presentes na F2. O espectro direto apresentado na figura 24 revela absorvâncias mínimas dos excipientes explotab, PVP, celulose e estearato de magnésio ao contrário da lactose. Com a aplicação da primeira derivada, pode-se perceber pela figura 25 a anulação dos primeiros excipientes enquanto permanecem significativos os valores referentes à lactose. Os valores obtidos com leituras em 230, 244, 246 e 251 nm estão descritos na tabela 14.

O comportamento das MAs 2-F2 submetidas às condições analíticas estabelecidas pode ser observado nas figuras 26 e 27. Estes resultados conduziram a uma avaliação mais detalhada da interferência da lactose e, para tanto, foram preparadas misturas onde concentrações fixas de GP padrão foram associadas a três diferentes quantidades de lactose em proporção de 50-100-150% do valor declarado por comprimido. Os resultados da análise das nove preparações podem ser observados nas figuras 28-33 e na tabela 15.

Resguardado algum erro experimental, o comportamento das misturas em termos de absorbância e de valores de primeira derivada podem ser considerados muito semelhantes, não indicando que a variação na quantidade de lactose em relação ao padrão responde pela maior ou menor influência. Nestes gráficos, o espectro derivado da solução de lactose apresentou valores mínimos, principalmente em 251 nm ($d^1A/d\lambda = 0,0002$), representando um bom indicio de eliminação da sua interferência.

Considerando um potencial interferente do PVP, reproduziu-se um experimento nos moldes do desenvolvido para a lactose. Os resultados obtidos com estas misturas podem ser observados nas figuras 34-39 e na tabela 16, que garantiram a ausência de interferência do PVP na determinação da GP segundo as condições analíticas desenvolvidas. Os valores de primeira derivada nos três comprimentos de onda adotados podem ser considerados insignificantes.

Com os dados de que não é a quantidade de lactose que determina maior ou menor interferência, decidiu-se preparar nova formulação (F3) semelhante a F1 em termos de quantidade dos excipientes, alterando apenas o tipo de lactose. Os resultados em termos de espectros obtidos com as MAs 2-F3 podem ser observados nas figuras 40 e 41 e os valores encontrados em termos de absorvância e derivada de primeira ordem estão descritos na tabela 17. Os espectros derivados de primeira ordem destas matrizes revelaram-se mais próximos à anulação nos três comprimentos de onda escolhidos, mais significativos para MA2^{2mg} – F3 e MA2^{4mg} – F3.

Segundo Lachman, Lieberman e Kanig (2001), são características importantes de um diluente a não interação com fármacos, permitir velocidade de liberação adequada de princípio ativo, possibilitar a compressão direta além de ser de baixo custo. Neste sentido a lactose se destaca como um diluente na produção de comprimidos. No entanto, neste trabalho constatada a interferência da lactose no método direto, decidiu-se pela sua substituição por um outro diluente, respeitando características farmacotécnicas (WADE, WELLER, 1994).

Foram selecionados outros dois diluentes: carbonato de magnésio e cellactose®, uma mistura de lactose e celulose, utilizada para compressão direta (WADE, WELLER, 1994) e assim, novas matrizes analíticas foram preparadas. A fórmula contendo cellactose em quantidade de 141mg/comprimido, substituindo inteiramente a lactose foi denominada fórmula 4 (F4). A fórmula 5 (F5) apresentou na sua composição celulose e carbonato de magnésio enquanto que a fórmula 6 (F6) associou celulose, cellactose e carbonato de magnésio.

Inicialmente foram submetidos individualmente às condições analíticas os dois novos excipientes. Os espectros direto e derivado podem ser observados nas figuras 42 e 43, respectivamente, e os valores em absorvância e $d^1A/d\lambda$ estão apresentados na tabela 18. Pode-se perceber claramente a ausência de interferência do carbonato de magnésio nos dois espectros. Em relação à cellactose, a derivada de primeira ordem aponta anulação em torno de 250 nm.

Na sequência, foram submetidas ao método as MAs 2 das três novas formulações, e os espectros direto e derivado estão representados nas figuras 44 e 45, respectivamente.

As MAs 2-F4 e F6, que apresentam cellactose (em maior e menor proporção) determinaram comportamento e leituras de absorvância muito semelhantes àqueles obtidos com lactose, e por consequência, os espectros de primeira ordem também. O menor valor na derivada de primeira ordem para estas duas fórmulas foi observado em 251 nm. A ausência de sobreposição do carbonato de magnésio em relação ao padrão de GP, observado no espectro direto, foi reafirmada pelo espectro derivado que revelou valores de derivada de primeira ordem (0,0084; 0,0056; 0,0011) muito próximos a zero nos três comprimentos de onda utilizados. Os valores em absorvância e derivada deste experimento estão representados na tabela 19.

As MAs 1 das fórmulas F4, F5 e F6 foram na sequência avaliadas e pode-se observar pela figura 46 (espectro direto) a semelhança de comportamento da F5 com o padrão de GP, enquanto que as fórmulas F4 e F6 mostraram espectros muito parecidos com aqueles obtidos com a lactose. Após a aplicação da derivada de primeira ordem, registrada na figura 47, os espectros das três formulações acompanharam o padrão de GP com muita proximidade de resultados, principalmente em 251 nm. Mais uma vez, este ponto mostra-se significativo para a quantificação de GP, onde não se observa a interferência dos excipientes. Os valores em absorvância e derivadas de primeira ordem referentes a estas figuras estão registrados na tabela 20.

O comportamento dos corantes utilizados na identificação das três dosagens de GP foi avaliado conforme o item 4.2.2.14 e os espectros obtidos podem ser observados nas figuras 48 e 49. Embora o corante vermelho-ponceau (VP) tenha determinado uma sobreposição ao padrão de GP no espectro direto, com a aplicação da derivada, isto foi solucionado. Os valores em absorvância e primeira derivada referente a este experimento estão apresentados na tabela 21.

Ao se considerar os teores de GP presentes nos comprimidos correspondentes a 1mg, 2mg e 4mg e as quantidades de corantes utilizados por comprimido, decidiu-se por uma avaliação experimental, reduzindo estes valores em 10 vezes. Os ensaios foram conduzidos conforme o item 4.2.2.15, e apresentados nas figuras 50 e 51, onde os melhores resultados em termos de ausência de interferência podem ser comprovados com os valores de absorvância e primeira derivada apresentados na tabela 22.

Além de desenvolver metodologias analíticas e validá-las, outro propósito desta pesquisa é avaliar o potencial interferente de excipientes sobre a análise quantitativa de fármacos. Com os resultados até aqui apresentados, pode-se considerar que a interferência da lactose sobre a determinação de GP nas condições da metodologia desenvolvida pode ser resolvida com a aplicação da espectrofotometria derivada.

Considerando as últimas informações em relação à utilização de carbonato de magnésio e teores reduzidos em 10 vezes dos corantes utilizados, foram preparadas outras MAs correspondentes à fórmula 7 (F7). As avaliações das MAs² F7 nas três dosagens de GP podem ser observadas nas figuras 52-57 e os valores em absorvância e $d^1A/d\lambda$ obtidos estão apresentados na tabela 23. Pode-se observar que os placebos apresentam valores de 1ª derivada mínimos na faixa de 240-250 nm, o que indica determinação do fármaco presente na MA1 de maneira adequada.

Diante disto, as respectivas MA1-F7 foram analisadas utilizando nove replicatas, objetivando determinar exatidão e precisão. Os espectros direto e derivado de primeira ordem estão representados nas figuras 58-63.

Considerando conceitos oficiais de exatidão que expressam a concordância de valor experimental com valor declarado e de precisão, representada pelo CV (PASTEELNICK, 1993; LEITE, 1996; EURACHEM, 1998; USP 25 ed, 2002; ICH, 2002), os resultados apresentados na tabela 24 indicam a aplicabilidade da espectrofotometria derivada para o doseamento de GP em comprimidos nas condições descritas.

Como a exatidão está relacionada ao teste de recuperação (GARFIELD, 1994; EURACHEM, 1998; ICH, 2002; USP 25, 2002), este foi

conduzido de acordo com o item 4.2.2.18. Os resultados obtidos em 230 nm conforme tabela 25 revelaram percentuais de recuperação dentro dos limites esperados (97-101%) (GARFIELD, 1994; EURACHEM, 1998; ICH, 2002). Em relação aos valores obtidos com a espectrofotometria derivada apresentados na tabela 26, destacaram-se significativamente as determinações em 246 nm (99-104%).

A linearidade do método avaliada a partir da MA2 ^{4mg} -F7 (figura 64) nos moldes da MA2-DS pode ser observada pelos resultados constantes na tabela 27 e pelas retas construídas e apresentadas nas figuras 65 e 66. Segundo Britain (1998) e Pastelnick (1993), coeficiente de correlação (r) próximo a 1 e coeficiente linear (a) próximo de zero indicam a proporcionalidade entre resultado de teste e concentrações analisadas significando que o método é linear, contemplando assim, uma das exigências para a validação de uma metodologia analítica.

O mesmo procedimento para cálculo dos fatores de linearidade segundo Leite (1996), estão descritos na tabela 28 confirmando mais uma vez a propriedade linear da metodologia proposta com leitura em 230 nm para a GP.

Ainda na avaliação deste atributo, a figura 67 apresenta os espectros derivados das 5 diferentes concentrações utilizadas para o teste da linearidade na primeira derivada. Nas tabelas 29, 31 e 33 estão descritos os valores obtidos com a primeira derivada, respectivamente a 244, 246 e 251 nm. Com estes dados foram construídas as retas de calibração (figuras 68-73) que apresentaram coeficientes de correlação e a concordantes com recomendações de Pastelnick (1993) e Britain (1998). As tabelas 30, 32 e 34 apresentam os valores referentes aos fatores de linearidade e CV segundo recomendação de Leite (1996).

Mesmo considerando que as matrizes utilizadas até aqui podem não apresentar uma uniformidade em função da quantidade do modo de preparação (bancada), os resultados podem ser considerados significativos em termos de exatidão, precisão e linearidade.

Para uma evidência de aplicabilidade rotineira do método diante de formulações diferentes, foram preparadas as MAs 1 e 2 correspondentes à fórmula 8, caracterizada pela ausência dos corantes.

Com o auxílio do método “zero-crossing” (onde se conhecendo o ponto de anulação da substância interferente, pode-se perfeitamente avaliar o fármaco), foram inicialmente analisadas as MAs 2 –F8 e os resultados encontrados podem ser observados nas figuras 74 e 75. Os valores em absorvâncias e da derivada de primeira ordem podem ser visualizados na tabela 35 e são indicativos de anulação dos placebos na faixa de 244 a 250 nm.

Baseados nestes dados, as respectivas MAs1-F8 foram submetidas ao método conforme descrição do item 4.2.2.21 e os espectros diretos e derivados obtidos estão representados nas figuras 76-81. A análise de nove replicatas está de acordo com o que recomenda Leite (1996), possibilitando uma boa visão estatística dos dados. Pode-se observar na tabela 36 que com essa formulação, os valores correspondentes ao teor de GP nos quatro comprimentos de onda adotados atendem às exigências em termos de exatidão, assim como os valores de CV, que por sua vez expressam a precisão.

Os ensaios de recuperação do padrão, a partir da MA1 - F8, foram desenvolvidos conforme o item 4.2.2.22 e os percentuais de recuperação obtidos conforme tabela 37 (96,5-101,5%) podem ser considerados indicativos de boa exatidão. Em relação às derivadas de primeira ordem (tabela 38), os resultados percentuais de recuperação (96,5-103%) também foram satisfatórios nos três comprimentos de onda empregados.

A linearidade do método foi inicialmente avaliada em 230 nm, a partir da MA2^{4 mg}-F8, reproduzindo os ensaios descritos no item 4.2.2.19. Com os resultados apresentados na tabela 39 e 40 e figuras 83 e 84 (onde se destacam $r=0,9999$ e a muito próximo de zero) pode-se afirmar que o método, dentro das condições analíticas, é linear.

A linearidade também foi avaliada em termos de derivada de primeira ordem nos 3 comprimentos de onda empregados e pode ser visualizada na

figura 85. Com os valores apresentados nas tabelas 41,43 e 45 foram construídas retas para determinação de r e a correspondentes a 244, 246 e 251 nm. Os resultados podem ser considerados indicativos de que o método é linear bem como os resultados apresentados nas tabelas 42,44 e 46 onde estão apresentados os fatores de linearidade e respectivos coeficientes de variação, conforme sugestão de Leite (1996).

Em complementação aos principais atributos exigidos para o método analítico – exatidão, precisão e linearidade, foram avaliados os limites de detecção e quantificação, conforme descrição do item 4.2.2.24.

Pinto, Ferrarini e Gatti (2003), comentaram que estabelecida a linearidade, através da qual o método pode ser considerado suficientemente sensível para detectar o analito, a verificação experimental dos limites de detecção e quantificação constitui-se em “*um refino justificável*” contribuindo para obtenção de resultados seguros e confiáveis.

A partir da MA1^{4mg}-F8 foram preparadas soluções com sete teores decrescentes de GP, conforme sugestão de Britain (1998). Foram analisadas nove replicatas de cada solução e os espectros diretos e derivados obtidos podem ser observados nas figuras 92-105. Considerando a reduzida quantidade de princípio ativo a ser analisado e o número de replicatas preparadas implicando em erros experimentais, os resultados em termos de teores de GP (representando exatidão) apresentados nas tabelas 47-50 confirmam a afirmação feita anteriormente de que leituras abaixo de 0,2 de absorvância comportam erros significativos, comprometendo exatidão e/ou precisão. Como era de se esperar, os maiores valores de CV (indicativos de precisão) são aqueles referentes aos menores teores do fármaco.

As figuras 106-109 ilustram as retas construídas a partir de concentrações teóricas e absorvâncias médias ou valores médios de $d^1A/d\lambda$ determinadas nos diferentes comprimentos de onda permitindo, assim, o cálculo do coeficiente angular (b). Estes foram relacionados aos desvios-padrões médios e de acordo com as fórmulas apresentadas no item 4.2.1.8 foram obtidos os limites de detecção e quantificação para a GP nos

comprimentos de onda 230, 244, 246 e 251 nm. Enquanto que na espectrofotometria direta o valor mínimo quantificável da MA 1-F8 com exatidão e precisão foi igual a 7,28 µg/mL de GP, os valores obtidos na primeira derivada em 244 e 246 nm exigem concentrações mínimas próximas a 14,0 µg/mL, garantindo valores de amplitude adequados e seguros. Em relação a 251 nm fica evidente que todas as soluções analisadas apresentam amplitude menor, indicando a necessidade de se trabalhar com concentrações maiores. O valor em torno de 19,0 µg/mL de GP determinado no limite de quantificação vem confirmar esta situação.

A recomendação de se evitar a análise de fármacos em concentrações próximas do limite de quantificação conduziu a decisão de verificar o comportamento linear de outra reta de calibração em um intervalo mais abrangente que aquele apresentado na figura 5.

Para tanto, foram preparadas soluções padrão com concentrações entre 3,0 e 30,0 µg/mL de GP, cujos espectros de absorção podem ser visualizados na figura 110. Com as absorvâncias determinadas em 230 nm (conforme tabela 51) e as respectivas concentrações, construiu-se uma nova reta de calibração que pode ser observada na figura 111. Da mesma maneira, foram calculadas e construídas as retas de calibração referentes à primeira derivada em 244, 246 e 251 nm. Estes valores podem ser vistos nas tabelas 52, 53 e 54 e representados nas figuras 113, 114 e 115. Nos quatro comprimentos de onda, as equações de reta determinadas e apresentadas nas páginas 206 e 207 mostraram resultados em termos de coeficiente de correlação, coeficiente angular e significância de *a* estatisticamente satisfatórios, confirmando os dados anteriormente obtidos com concentração de 15,0 µg/mL de GP. Desta forma, fica garantida a leitura de GP nos quatro comprimentos de onda com concentração de 20,0 µg/mL de GP sem comprometimento de exatidão, precisão e linearidade nas condições analíticas estabelecidas.

Considerando que o cálculo do limite de quantificação destacou o valor de 19,55 µg/mL de GP como o limite mínimo quantificável com garantia de exatidão e precisão, um experimento foi conduzido de maneira a

conhecer o desvio-padrão e coeficiente de variação de 9 alíquotas de uma solução padrão contendo 20,0 µg/mL de GP. Os resultados, considerados muito satisfatórios, podem ser observados na tabela 55, assegurando leituras confiáveis na espectrofotometria direta e derivada nesta faixa de concentração, respeitadas as condições analíticas descritas.

Com base em todas as informações sobre os métodos direto e derivado para análise de GP em comprimidos, as amostras comerciais com dosagem de 4 mg de GP disponíveis no Brasil, identificadas como AR (amostra referência) e AS (amostra similar) foram submetidas à análise quantitativa descrita neste trabalho. Os espectros direto e derivado estão apresentados nas figuras 116 a 119 e revelaram um comportamento muito semelhante àqueles onde a lactose se faz presente. Além disto, visualmente a solução destas amostras quando aquecidas em NaOH 0,1M mostraram-se amareladas, condição esta muito semelhante àquela observada com as soluções provenientes de formulações que apresentavam lactose em sua composição.

Nas tabelas 56 e 57 podem ser observados os valores médios em termos de absorvância e derivadas de primeira ordem das amostras comerciais analisadas segundo os métodos descritos. A tabela 58 por sua vez, apresenta os resultados estatisticamente significativos encontrados para as duas amostras comerciais, destacando valores em termos de exatidão e precisão para as leituras da derivada de primeira ordem em 251 nm. A anulação da lactose em 251 nm já foi observada na tabela 15.

Diante destes resultados onde a influência da lactose nas condições de análise estabelecidas pode ser eliminada, e considerando a definição de especificidade (BRITAIN, 1998; EURACHEM, 1998; ICH, 2002; USP 25, 2002; PINTO, FERRARINI, GATTI, 2003), pode-se assegurar o atendimento a esta propriedade ao método espectrofotométrico derivado de primeira ordem na determinação de GP em comprimidos.

A avaliação das fórmulas 7 e 8 (carbonato de magnésio substituindo a lactose como diluente) permitiu ainda, oferecer uma alternativa de formulação farmacêutica que pode ser analisada pela espectrofotometria

direta com leituras em 229-230 nm em concentração na faixa de 15,0 a 20,0 µg/mL de GP com garantia de exatidão, precisão e linearidade.

O potencial interferente de analistas, equipamentos, lotes de reagentes, laboratórios, dias, temperatura entre outros é entendido como a capacidade do método analítico resistir a estas variações, garantindo a reprodutibilidade dos resultados (EURACHEM, 1998; USP 25, 2002; ICH, 2002). Diante da preparação de inúmeras soluções que levaram a inúmeras análises em diferentes dias, em diferentes condições ambientais e as variações inerentes do próprio analista (que podem ser ilustradas com as variações nas leituras de padrão), pode-se assegurar que os métodos apresentados também são resistentes.

Utilização de solução de NaOH 0,1M sem implicação maior de toxicidade, economicamente acessível, uso de equipamento existente na maioria dos laboratórios de controle de qualidade, segurança analítica garantida pela técnica espectrofotométrica aliada aos programas de computador que permitem cálculos automáticos de derivada, não exigência de procedimento mais sofisticado para separação de excipientes, anulação da interferência dada pela lactose e atendimento aos principais requisitos exigidos para a validação de metodologia analítica permitem considerar o método espectrofotométrico derivado proposto, como metodologia alternativa para a determinação de GP em comprimidos que apresentam lactose como um dos excipientes.

São incontestáveis a necessidade e a importância de procedimentos objetivando a validação em todos os setores de uma indústria, com destaque àqueles relacionados aos métodos analíticos. Uma vez desenvolvidos e validados, sua aplicação permitirá ao final do processo produtivo, a obtenção de um medicamento seguro e terapeuticamente eficaz.

O desenvolvimento de uma metodologia analítica para aplicação rotineira implica obrigatoriamente nos procedimentos de validação dentro das exigências oficiais e os métodos espectrofotométricos descritos se enquadram neste princípio. Pinto, Ferrarini e Gatti (2003) reconhecendo as *"dificuldades conceituais quanto aos parâmetros de validação, e*

adicionalmente, no delineamento e operacionalização das validações” descreveram um roteiro prático para a validação de cromatografia de alta eficiência.

Considerando esta exposição; os objetivos deste trabalho que foram alcançados com resultados muito satisfatórios; o guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (AGENCIA...,2003) direcionado a técnicas cromatográficas, espera-se que os procedimentos analíticos descritos possam ser utilizados como um roteiro na validação de metodologias espectrofotométricas, destinadas ao controle de qualidade de medicamentos e matérias primas.

*“Não terás dois pesos na tua bolsa,
um grande e um pequeno,
não terás duas medidas em tua casa,
uma grande e uma pequena,
terás somente pesos exatos e justos,
para que se prolonguem teus dias na terra do Senhor teu Deus que te dá.”*

Deuteronômio 25:13-15

7. CONCLUSÕES

Dentro das condições analíticas descritas neste trabalho, pode-se concluir que em relação a:

7.1 – *Diclofenaco sódico*:

- a) a análise dos excipientes comumente empregados na produção de comprimidos de DS, através do método espectrofotométrico no ultravioleta, não revelou interferência na quantificação do fármaco;
- b) a exatidão da metodologia analítica pode ser reconhecida nos valores expressos em termos de teor analisado e teste de recuperação;
- c) a precisão do método pode ser confirmada com os coeficientes de variação encontrados e variáveis entre 0,18 e 0,99%;
- d) o coeficiente de correlação obtido ($r = 0,9999$) assim como os demais procedimentos empregados para avaliar a linearidade, permitem afirmar que o método é linear;
- e) os limites de detecção e quantificação encontrados garantem a análise do fármaco em comprimidos de maneira segura, exata e precisa, utilizando concentrações iguais a 15,0 µg/mL de DS;
- f) a quantificação de DS presente em amostras comerciais de comprimidos pode ser conduzida, empregando o método espectrofotométrico no UV, utilizando o metanol como solvente, constituindo-se em mais uma alternativa analítica segura e confiável.

7.2 – *Glimepirida*

- a) o fármaco apresenta-se solúvel em solução de NaOH 0,1M após aquecimento entre 80-90°C em manta entre 5 e 10 minutos;

- b) as soluções padrão de GP submetidas às condições analíticas apresentaram-se estáveis até 2 horas;
- c) os coeficientes de correlação encontrados na espectrofotometria direta (230 nm) e espectrofotometria derivada de primeira ordem (244, 246 e 251 nm) iguais a 0,999 indicaram proporcionalidade de respostas entre concentrações e leituras caracterizando boa linearidade;
- d) com exceção da lactose, os demais excipientes empregados na preparação da matrizes analíticas não apresentaram interferência na quantificação de GP padrão;
- e) a influência da lactose sobre a análise de GP pode ser eliminada com a aplicação da espectrofotometria derivada de primeira ordem e leitura em 251 nm onde apresenta ponto de anulação;
- f) a aplicação dos métodos direto e derivado às MAs 1-F8 revelou valores em termos de teor de GP (102-103%) e CV (0,457-0,914), confirmando a exatidão e precisão dos métodos;
- g) os testes de recuperação aplicados às MAs 1- F8 confirmaram a exatidão dos métodos direto e derivado;
- h) os diferentes procedimentos conduzidos para avaliar a linearidade dos métodos a partir da MA2-F8, garantiram resultados que caracterizam os métodos como lineares;
- i) os limites de detecção e quantificação encontrados asseguram a determinação de GP pelos métodos direto (230 nm) e derivado (244 e 246 nm), utilizando concentrações próximas a 15,0 µg/mL sem comprometimento da exatidão e precisão. Análises de GP pelo método espectrofotométrico derivado (251 nm) requerem no entanto, concentrações acima de 20,0 µg/mL de GP;
- j) a análise das amostras comerciais de comprimidos de GP (4 mg) pela espectrofotometria derivada de primeira ordem em 251 nm revelou teores de 105,05 e 103,8% de GP, com garantia de exatidão e precisão expressa pelos CV encontrados (0,716 e 0,453%).

8 . REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-HAY, M.H.; KORANY, M.A.; BEDAIR, M.M.; GAZY, A.A. Colorimetric determination of seven nonsteroidal antiinflammatory drugs using 2 nitrophenylhydrazine hydrochloride. *Anal. Lett.*, Monticello, v.23, n.2, p. 281-294, 1990.
- ABERG, A.; WESTBOM, L.; KÄLLÉN, B. Congenital malformations among infants whose mothers had gestational diabetes or preexisting diabetes. *Early Hum. Dev.*, Amsterdam, v.61, p.85-95, 2001.
- ADEYEYE, C. M.; LI, P. Diclofenac sodium. *Anal. Profiles Drug Subst.* New York, v.19, p.123-144, 1990.
- AGENCIA Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação em vigilância sanitária. Resolução RE nº 889 de 29 de maio de 2003. Disponível em <http://e-legis.bvs.br/public> . Acesso em 11.09.2003.
- ALTINOZ, S.; TEKELI, D. Analysis of glimepiride by using derivative UV spectrophotometric method. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, Amsterdam, v.24, p.507-515, 2001.
- AMIN, A.S. Pyrocatechol violet in pharmaceutical analysis. Part I. A spectrophotometric method for the determination of some β -lactam antibiotics in pure and in pharmaceutical dosage forms. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, Amsterdam, v.56, p.211-218, 2001.
- ANACLETO, T.A; MELO, P.P. Perfil de utilização de diclofenaco parenteral em unidade de atendimento imediato do município de Betim – MG. *Pharm. Bras.*, Brasília, n.20, p.69-73, 2000.

ASSOCIAÇÃO Protetora dos diabéticos de Portugal - O que é a diabetes. Tratamento da diabetes. O que há de novo. Disponível em <http://www.apdp.pt/por> Acesso em: 13 mar. 2002.

AVENTIS. Amaryl (glimepiride). Disponível em: <http://www.aventispharmaindia.com/presskitsAmaryl.htm>. Acesso em: 13 mar. 2002.

BAGGIO, L. L.; DRUCKER, D.J. Incretin hormones and the treatment of type 2 diabetes. Disponível em: <http://medscape.com>. Acesso em 19.09.2004.

BALCERZAK, M.; WYRZYKOWSKA, E. Extraction preconcentration of platinum and ruthenium using high molecular weight amines prior to simultaneous determination by derivative spectrophotometry. *Analisis*, Paris, v.27, p.829-834, 1999.

BANQUE de Données Automatisée sur les médicaments. GLIMEPIRIDE. Disponível em: <http://www.biam2.org/www/Sub5151.htm>. Acesso em: 11 dez. 2001.

BARROS, C. B.; HIRATA, Y. I. Validação de métodos analíticos. São Paulo, CPTI – Tecnologia & Desenvolvimento, 1998. 77 p. (apostila)

BERNARDI, A.; JACQUES-SILVA, M.C. Antiinflamatórios não esteróides: usos clássicos e perspectivas no tratamento do câncer. *Infarma*, Brasília, v.14, n.11/12, p.40-43, 2003.

BHATIA, M.; DHANESHWAR, S.R. Simultaneous spectrophotometric determination of diclofenac sodium, chloxazone and paracetamol from combined dosage forms. *Indian Drugs*, Mumbai, v.32, n.9, p.446-450, 1995.

BHATIA, M.S.; KASHEDIKAR, S.G.; CHATURVEDI, S.C. Three simple spectrophotometric methods for simultaneous estimation of diclofenac sodium and paracetamol from tablets. *Indian Drugs*, Mumbai, v.33, n.5, p.213-218, 1996.

- BLAUG, S.M.; HUANG, W. Interaction of dextroamphetamine sulfate with spray-dried lactose. *J. Pharm. Sci.*, New York, v.61, n.11, p.1770-1775, 1972.
- BLOOMGARDEM, Z.T. New Technologies in insulin delivery: inhaled insulin. Disponível em: <http://medscape.com>. Acesso em 19.09.2004
- BOTELLO, J.C.; PÉREZ-CABALLERO, G. Spectrophotometric determination of diclofenac sodium with methylene blue. *Talanta*, Amsterdam, v.42, n.1, p.105-108, 1995.
- BRITISH pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationery Office, 1999. p.494-495.
- BRITTAİN, G.H. Validação de métodos não cromatográficos. *Pharm. Technol.*, São Paulo, v.2, n.3, p.4-9, 1998.
- BUTT, Z.; FSADNI, P.S.. Diclofenac-gentamicin combination eye drops compared with corticosteroid-antibiotic combination eye drops after cataract surgery. Disponível em: <http://medscape.com>. Acesso em 19.08.2004.
- CAAR, G.P.R.; WAHLICH, J.C.; TANNER, R.J.N. Analytical validation. In CARTWRIGHT, A.C.; MATTHEWS, B.R., eds. *International pharmaceutical product registration: aspects of quality, safety and efficacy*. New York: Ellis Horwood, 1994. p.247-285. (Ellis Horwood series in pharmaceutical technology).
- CAPITÁIN-VALLVEY, L.F.; NAVAS, N.; ORBE, I.; AVIDAD, R. Simultaneous determination of tartrazine and brilliant bleu in cosmetic products by first-derivative spectrophotometry. *Analisis*, Paris, v.23, p.448-451, 1995.
- CARREIRA, L.A.; RIZK, M.; EL-SHABRAWY, Y.; ZAKHARI, N.A.; TOUBAR, S.S. Europium (III) ion probe spectrofluorometric determination of diclofenac sodium. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, Amsterdam, v.13, pt.11, p.1331-1337, 1995.

- CARVALHO, W. A. Analgésicos, antipiréticos e antiinflamatórios. IN: SILVA, P. *Farmacologia*. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. cap.46, p.431-455.
- CENTERWATCH - Drugs approved by the FDA. Drug name: amaryl (glimepiride). Disponível em: <http://www.centerwatch.com/patient/drugs/dru11.html>. Acesso em: 13 mar. 2002.
- CHACRA, A.R.; LERARIO, D.D.G. Novos avanços na terapia do diabetes do tipo 2. Disponível em <http://www.socesp.org.br>. Acesso em: 07 dez. 2001.
- CHAWLA, J.L.; SODHI, R.A.; SANE, R.T. Simultaneous determination of chlorzoxazone, paracetamol and diclofenac sodium by different chromatografic techniques. *Indian Drugs*, Mumbai, v.33, n.4, p.171-178, 1996.
- CHERTOW, B. Advances in diabetes for the milennium: vitamins and oxidants stress in diabetes and its complications. . Disponível em: <http://medscape.com>. Acesso em 10.08.2004.
- CIURCZAK, E. Espectroscopia UV-VIS em análises farmacêuticas. *Pharm. Techonol.*, São Paulo, v.3, n.6, p.12-16, 1999.
- CLARKE'S isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids, and post-mortem material. 2.ed. London: Pharmaceutical Press, 1986. p.533-534; 638-639.
- CLÍNICA diabetológica Dr. Antuña de Alaiz . Finalizado el período de reclutamiento del estudio Atlantus. Disponível em: http://www.clinidiabet.com/es/nuestraclinica/03_noticias/2003. Acesso em: 5 dez. 2003.
- COMISSÃO Interentidade de Vigilância Sanitária. Validação – guia de referências básicas. São Paulo, CIEVS, 1998. 19 p. (apostila)

CONSELHO Federal de Farmácia – Medicamentos em observação.

Disponível em: <http://www.cff.org.br/revistas/33/boletim.pdf>. Acesso em: 5 de dez. 2003.

CONSIGLIERI, V.O. *Doseamento de vitamina B6 por espectrofotometria derivada no ultravioleta*. São Paulo, 1992. 162p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

DAVIS, S.N.; GARNER, D.K. Insulina, hipoglicemiantes orais e a farmacologia do pâncreas endócrino. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E., eds. *Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica*. 10.ed. Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill, 2003. cap.61, p.1263-1289.

DAVIS, S.N.; GRANNER, D.K. Insulin, oral hypoglycemic agents, and the pharmacology of the endocrine pancreas. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E., eds. *Goodman & Gilman's: the pharmacological basis of therapeutics*. 10.ed. New York: McGraw-Hill, 2001. cap.61, p.1679-1714.

DeFRONZO, R, A. Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidaemia and atherosclerosis. *Netherlands J. of Medicine*, Amsterdam, v. 50, p. 191-197, 1997.

DIABETESNET - Medications: sulfonylureas. Disponível em: http://www.diabetesnet.com/diabetes_treatments/sulfonylureas.php. Acesso em: 4 mar. 2002.

DICLOFENACO injetável pode causar necrose tecidual. *Farmacêutico – CRF/PR*, Curitiba, n.65, 2003. p.6.

DUX, J.P. *Handbook of quality assurance for the analytical chemistry laboratory*. New York: Van Nostrand Reinhold, 1990. p.197.

EL SADEK, M. Spectrophotometric determination of diclofenac sodium in the presence of its impurities via chalcone formation. *Egypt. J. Pharm. Sci.*, Cairo, v.32, n.3/4, p.457-463, 1991.

- ERK, N.; ONUR, F. Simultaneous determination of benazepril hydrochloride and hydrochlorothiazide in tablets by spectrophotometric methods. *Analisis*, Paris, v.25, p.161-163, 1997.
- EURACHEM guide. The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics. Teddington: LGC, 1998. 61p.
- EYJOLFSSON, R. Lisinopril-lactose incompatibility. *Drug Dev. Ind Pharm.*, New York, v.24, n.8, p.797-798, 1998.
- FERREIRA, A.B.H. *Aurélio século XXI: o dicionário da língua portuguesa*. 3.ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1999.
- FRAZÃO, J. Nova insulina tem efeito de 24 horas. *Folha de São Paulo*, São Paulo, 21 ago. 2003. p.4. [Folha equilíbrio].
- GABBE, S.; HILL, L.; SCHMIDT, L.; SCHULKIN, J. Management of diabetes by obstetrician-gynecologists. *Obstet. Gynecol.*, New York, v.91, n.5, pt.1, p.643-647, 1998.
- GAMA, M.P.R. Tratamento do diabetes mellitus não insulino dependente (DMNID). Disponível em: [http:// www.endocrino.com/news/vol1](http://www.endocrino.com/news/vol1) Acesso em: 13 mar. 2002.
- GARFIELD, F.M. *Quality assurance principles for analytical laboratories*. Arlington: Association of Official Analytical Chemistry International, 1994. p.74-81.
- GELBHAR BERTHOLDI, K.; BUENO, F.; BERGOLD, A.M. Doseamento de fluoxetina por CLAE em diferentes formulações. *Acta Farm. Bonaerense*, Buenos Aires, v.20, n.3, p.209-214, 2001.
- GEOCITIES - Diclofenaco sódico. Disponível em: http://www.geocities.com/cimbelem/atualize_se.htm. Acesso em: 5 set. 2003.

- GOWDA, B.G.; MELWANKI, M.B.; SEETHARAMAPPA, J. Spectrophotometric determination of certain vicinal dihydroxibenzene derivatives in pharmaceutical preparations. *Anal. Sci.*, Tokyo, v.17, p.533-534, 2001.
- HACKMANN, E.R.M.; BENETON, S.A.; SANTORO, M.I.R.M. Espectrofotometria derivada na análise de fármacos em medicamentos. *Rev. Port. Farm.*, Lisboa, v.41, n.1, p.7-13, 1991.
- HANAEE, J. Simultaneous determination of acetoaminophen and codeine in pharmaceutical preparations by derivative spectrophotometry. *Pharm. Acta Helv.*, Zurich, v.72, p.239-241, 1997.
- HARMEL, A. P. Macrovascular disease risk in patients with type 2 diabetes; beyond statins use. . Disponível em: <http://medscape.com>. Acesso em 19.09.2004.
- HASSAN, S.S.M.; ABDEL-AZIZ, R.M.; ABDEL-SAMAD, S. Plastic membrane electrode for selective determination of diclofenac (Voltaren) in pharmaceutical preparation. *Analyst*, Letchworth, v.119, p.1993-1996, 1994.
- HERNANDEZ-HIERO, A.; GONZALEZ, R.J. Agentes farmacológicos actuales em el tratamiento de la diabete mellitus no insulino dependiente. 2001. Disponível em: <http://www.bvs.sld.cu/revistasmgj/vol13-6-9>. Acesso em: 11 dez. 2001.
- HIDALGO, I.I.T. *Desenvolvimento de metodologia para a determinação de cetinazina em preparações farmacêuticas*. 2001. 107p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- INSTITUTO Nacional de Vigilancia de Alimentos Y medicamentos - INVIMA ACTA 04 febrero 2003. Informacion para prescribir. Disponível em:

http://www.invima.gov.co/versin1/consultas_publicas/archivos/aractaO42003.htm Acesso em: 5 set. 2003.

INTERNACIONAL Conference on harmonization of Technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Text on validation of analytical procedures Q2A. Disponível em: <http://www.ich.org/ich5q.htm#Analytical> Acesso em: 5 set. 2002.

JAGER, A.V. *Eletroforese capilar aplicada ao diagnóstico e aplicação de métodos analíticos para alguns metabólicos de controle de diabetes mellitus*. São Paulo, 2000. 104p. Dissertação de Mestrado - Instituto de Química – Universidade de São Paulo.

JARDY, A.; VIAL, J. L'apport des methods statistiques dans la maîtrise de la qualité des analyses. *Analisis*, Paris, v.27, n.6, p.511-519, 1999.

KAMATH, B.V.; SHIVRAM, K. Extractive spectrophotometric determination of diclofenac sodium from pharmaceutical preparations. *Indian J. Pharm Sci.* Mumbai, v.54, pt.2, p.81-83, 1992.

KAMATH, B.V.; SHIVRAM, K. Spectrophotometric determination of diclofenac sodium via oxidation reactions. *Anal. Lett.*, Monticello, v.25, n.5, p.903-911, 1993.

KAMATH, B.V.; SHIVRAM, K; OZA, G.P.; VANGANI, S. Use of charge transfer complexation in the spectrophotometric determination of diclofenac sodium. *Anal. Lett.*, Monticello, v.26, n.4, p.665-674, 1993.

KANNA BABU, S.; UDAY SHANKAR, P.; MADHU KUMAR, G. Spectrophotometric estimation of diclofenac sodium in pharmaceutical formulations. *East. Pharm.*, New Delhi, v.38, p.147-148, 1995.

KITSON, G.E.; HUDSON, H.E.; DICKINSON, N.A. The effects of various sugars on the stability of 2-amino-6-methyl-5-oxo-4-n-propyl-4,5-dihydro-s-triazolo[1,5-a]pyrimidine. *Pharm. Acta Helv.*, Zurich, v.51, n.6, p.181-185, 1976.

- LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANIG, J.L. *Teoria e prática na indústria farmacêutica*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. cap.11, p.538-585.
- LAURUS Health – Glimepiride: interactions with supplements. Disponível em <http://www.laurushealth.com/Library/HealthGuide/CAM/topics.asp>. Acesso em: 13 mar. 2002.
- LEHR, K.H.; DAMM, P. Simultaneous determination of the sulfonylurea glimepiride and its metabolites in human serum and urine by high-performance liquid chromatography after pre-column derivatization. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.526, n.2, p.497-505, 1990.
- LEITE, F. *Validação em análise química*. Campinas: Átomo, 1996.120 p.
- LEVILLAIN, P.; FOMPEYDIE, D. Spectrophotométrie dérivée: intérêt, limites et application. *Analisis*, Paris, v.14, n.1, p.1-29, 1986.
- LI, S.; PATAPOFF, T.W.; OVERCASHIER, D.; HSU, C.; NGUYEN, T.H.; BORCHARTDT, R.T. Effects of reducing sugars on the chemical stability of human relaxin in the lyophilized state. *J. Pharm. Sci.*, New York, v.85, n.8, p.873-877, 1996.
- MARIAUD, M.; CONTI, M.; LEVILLAIN, P. Nouvelle méthode de dosage des β -dicétones par spectrophotométrie directe et dérivée utilisant le 2,3-diaminonaphtalène comme réactif de dérivation. *Analisis*, Paris, v.23, p.87-90, 1995.
- MARINKOVIC, V.; AGBABA, D.; KARLJIKOVIC-RAJIC, K.; COMOR, J.; ZIVANOV-STAKIC, D. UV derivative spectrophotometric study of the photochemical degradation of nisoldipine. *Farmaco*, Amsterdam, v.55, p.128-133, 2000.
- MARTINDALE the extra pharmacopeia. 30.ed. London: The Pharmaceutical Press, 1993. p.10-12.

MEDSCAPE. Topical NSAIDs may be useful for treating soft tissue injuries.

Disponível em: <http://medscape.com>. Acesso em 10.09.2004.

MEDYNET. El Medico interactivo – Diario electrónico de la sanidad.

Actualización médica. Nuevos antidiabéticos orales en la DM tipo 2.

Disponível

em:

<http://www.medynet.com/elmedico/bibliografia/actualizacion/diabetesl.htm>

m. Acesso em: 19 maio 2003.

MEHTA, A.C. Quality management in drugs analysis. *Analyst*, Letchworth,

v.122, p.83R-88R, 1997.

MELO, S.S. *Peroxidação lipídica no diabetes induzido pela estreptocina em*

ratos deficientes e suplementados com nicotinamida. São Paulo, 1998.

157p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas

– Universidade de São Paulo.

MERCK index . 12.ed. Nova York: Merck, 1996. p. 754-755, p.3133.

MICALIZZI, Y.C.; PAPPANO, N.B.; DeBATTISTA, N.B. First and second

derivative spectrophotometric determination of benzyl alcohol and

diclofenac in pharmaceutical forms. *Talanta*, Amsterdam, v.47, p.525-

530, 1998.

MORAIS, J. Viciados em remédios. *Superinteressante*, São Paulo, n.185,

p.42-49, 2003.

MORETTO, L.D.; MOOKHERJEA, S. A era da validação. *Pharm. Tecnol.*,

v.4,n.8, p.44-48, 2000.

MYCUSTOMPACK – Glimepiride. Disponível em:

<http://www.mycustompak.com/healthNotes/Drug/Glimepiride.htm>. Acesso

em: 8 maio 2003.

- NAGARAJA, P.; VASANTHA, R.A.; SUNITHA, K.R. A sensitive and selective spectrophotometric estimation of catechol derivatives in pharmaceutical preparations. *Talanta*, Amsterdam, v.55, p.1039-1046, 2001.
- OJEDA, C.B.; ROJAS, F.S.; PAVON, J.M.C. Recent developments in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry. *Talanta*, Amsterdam, v.42, p.1195-1214, 1995.
- OLIVEIRA, J. *Análise de condutas clínicas, fatores de risco e gastos hospitalares para o tratamento do diabetes mellitus e complicações associadas*. São Paulo, 2002. 143p. Tese de Doutorado – Faculdade de Economia e Administração – Universidade de São Paulo.
- PASCHOAL, L.R.; FERREIRA, W.A. Simultaneous determination of benzocaine and cetylpyridinium chloride in tablets by first-derivative spectrophotometric method. *Farmaco*, Amsterdam, v.55, p.687-693, 2000.
- PASTEELNICK, L.A. Analytical methods validation. In: BERRY, I.R.; NASH, R.A., eds. *Pharmaceutical process validation*. New York: Marcel Dekker, 1993. cap.13, p.411-428.
- PASTORE, K. O beijo do lagarto. *Veja*, São Paulo, 22 set. 2004. p.76.
- PATHOINDIA - Diabetes mellitus: indian scenario. Disponível em: <http://www.pathoindia.com/update4.html>. Acesso em: 30 ago. 2003.
- PDR. Generics. 3.ed. Montvale: Medical Economics, 1997. p.1468-1471.
- PINTO, T. J. A .; FERRARINI, M.; GATTI, R. M. Proposta de roteiro prático para a validação de métodos analíticos. *Farmácia e Química*, São Paulo, v.36, p.26-36, 2003.

- PISHARODY, R.; NAIR, S.M.; RAMANKUTTY, V. Prevalence and morbidity of type II diabetes mellitus and its complications: a population survey. *J. Clin. Epidemiol.*, New York, v.50, p. 8s, 1997.
- PRADO, M.S.A.; STEPPE, M.; TAVARES, M.F.M.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M.; SANTORO, M.I.R.M. Method validation for diclofenac sodium in pharmaceutical by capillary electrophoresis. *J. Cap. Elec. Microchip. Tech.*, Shelton, v. 6, n.3/4, p.125-129, 1999.
- RAMALHO, A . C. R. Insulina e hipoglicemiantes orais. IN: SILVA, P. *Farmacologia*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. cap.80, p.743-759.
- RAMESH, K.C.; GOWDA, B.G.; MELWANKI, M.B.; SEETHARAMAPPA, J.; KESHADAVAYYA, J. Extractive spectrophotometric determination of antiallergic drugs in pharmaceutical formulations using bromopyrogallol red and bromothynol blue. *Anal. Sci.*, Tokyo, v.17, p.1101-1103, 2001.
- RAMUSSEN, M. K.; BINZER, M. Non-steroidal anti-inflammatory drugs in the treatment of migraine. Disponível em: <http://medscape.com>. Acesso em 20.09.2004.
- RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. *Farmacologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 703p.
- REMGINGTON: the science and practice of pharmacy. 19.ed. Easton: Mack, 1995. p.1211.
- ROBERT II, L.J.; MORROW, J.D. Analgesic-antipyretic and antinflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.,eds. *Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica*.10.ed. Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill, 2001.cap.27, 687-731 p.
- ROBERT II, L.J.; MORROW, J.D. Analgésicos-antipiréticos: agentes antiinflamatórios e fármacos utilizados no tratamento da gota. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E., eds. *Goodman & Gilman: as bases*

- farmacológicas da terapêutica. 10.ed. Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill, 2003. cap.27, p. 517-550.
- RODENAS, V.; GARCIA, M.S.; SÁNCHEZ-PEDREÑO, C.; ALBERO, M.I. Simultaneous determination of propacetamol and paracetamol by derivative spectrophotometry. *Talanta*, Amsterdam, v.52, p.517-523, 2000.
- RUDOLPH, J.S. Validation of solid dosage forms. In: BERRY, I.R.; NASH, R.A., eds. *Pharmaceutical process validation*. New York: Marcel Dekker, 1993. cap.5, p.167-187.
- RUGGIERO, L.; ROSSI, J.S.; PROCHASKA, J.O.; GLASGOW, R.E.; DeGROOT, M.; DRYFOOS, J.M.; REED, G.R.; ORLEANS, C.T.; PROKHOROV, A.V.; KELLY, K. Smoking and diabetes: readiness for change and provider advice. *Addict. Behav.: Mol. Mankind*, Basingstoke, v.24, n.4, p.573-578, 1999.
- SÁNCHEZ HERARDO, F.; TAMEZ PÉREZ, H.E. Síndrome de Nicolau por la administracion intramusacular de diclofenaco. Disponível em:<http://www.imbiomed.com>. Acesso em 13.08.2004.
- SASTRY, C.S.P.; PRASAD TIPIRNENI, A.S.R.; SURYANARAYANA, M.V. Extractive spectrophotometric determination of some anti-inflammatory agents with methylene violet. *Analyst*, Letchworth, v.114, p.513-515, 1989.
- SASTRY, C.S.P.; TIPIRNENI, A.S.R.P.; SURYANARAYANA, M.V. Spectrophotometric analysis of some anthranilic acid derivatives and their pharmaceutical preparations. *Microchem. J.*, Amsterdam, v.39, p.277-282, 1989.
- SECO-LAGO, H.; PÉREZ-IGLESIAS, J.; FERNÁNDEZ-SOLÍS, J.M.; CASTRO-ROMERO, J.M.; GONZALEZ-RODRIGUES, V. Application of derivative spectrophotometry to simultaneous determination of lead and nickel with MEDTA. *Analisis*, Paris, v.24, p.333-335, 1996.

- SHAKYA, A.K.; JOSHI, G.K.; MISHRA, P. Spectrophotometric determination of diclofenac sodium in pharmaceutical dosage forms. *Indian J. Pharm Sci.*, Mumbai, v.54, pt.1, p.44-46, 1992.
- SITEMEDICO. Diabetes mellitus. Disponível em: http://www.sitemedico.com.br/artigos/cabrahao_sp/dm.asp. Acesso em: 7 dez. 2001.
- SUBONGKOT, S.; FRAME, D.; LESLIE, W.; DRAJER, D. Selective cyclooxygenase-2 inhibition: a target in cancer prevention and treatment. Disponível em: <http://medscape.com>. Acesso em 19.09.2004.
- SWARTZ, M.E.; KRULL, I.E. Validação de métodos cromatográficos. *Pharm Technol.*, São Paulo, v.2, n.2, p.12-20, 1998.
- TAKLA, P. G. Glibenclamide. *Anal. Profiles Drug Subst.* New York, v.10, p.338-355. 1981.
- TAMBASCIA, M.A.; COELHO, O.R. Uso de hipoglicemiantes em cardiopatas. Disponível em: <http://www.socesp.org.br>. Acesso em: 7 dez. 2001.
- TETZLAFF, R.F.; SHEPERD, R.E.; LeBLANC, A.J. The validation story: perspectives on the systematic GMP inspection approach and validation development. *Pharm. Technol.*, Duluth, v. 17, p.110-116, 1993.
- TORAL, M.I.; RICHTER, P.; LARA, N.; JAQUE, P.; SOTO, C.; SAAVEDRA, M. Simultaneous determination of chlordiazepoxide and clidinium bromide in pharmaceutical formulations by derivative spectrophotometry. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.189, p.67-74, 1999.
- UKEDA, H.; SHIMAMURA, T.; TSUBOUCHI, M.; HARADA, Y.; NAKAI, Y.; SAWAMURA, M. Spectrophotometric assay of superoxide anion formed in Maillard reaction based on highly water-soluble tetrazolium salt. *Anal. Sci.*, Tokyo, v.18, p.1151-1154, 2002.

- UNIMEDS – Como conseguir controle rigoroso (intensivo da glicose) diagnóstico e tratamento da diabetes mellitus tipo 2. Disponível em: <http://www.unimeds.com.br>. Acesso em: 7 dez. 2001.
- UNITED States Pharmacopeia. 24.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2000. p.546-547.
- UNITED States Pharmacopeia. 25.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2002. p.2256-2259.
- VOGEL, A.I. *Análise química quantitativa*. 6.ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos Científicos, 2002. cap.17, p. 353-385.
- WADE, A.; WELLER, P.J. *Handbook of pharmaceutical excipients*. 2.ed. London: The Pharmaceutical Press, 1994. 651 p.
- WATSON, D.G. *Pharmaceutical analysis: a textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists*. London: Churchill Livingstone, 1999. 337 p.
- WEISSBERG-BENCHELL, J.; ANTISDEL-LOMAGLIO, J.; SESHADRI, R. Insulin pump therapy. Disponível em: <http://www.medscape.co/viewarticle/451682?mpid=12353>. Acesso em: 14 maio 2003.
- WIRTH, D.D.; BAERTSCHI, S.W.; JOHNSON, R.A.; MAPLE, S.R.; MILLER, M.S.; HALLENBECK, D.K.; GREGG, S.M. Maillard reaction of lactose and fluoxetine hydrochloride, a secondary amine. *J. Pharm Sci.*, New York, v.87, n.1, p.31-39, 1998.
- ZAREBA, S.; MELKE, J. Spectrophotometric determination of aluminium in pharmaceutical preparations by azodyes of 1,2,4-triazole series. *Pharm. Acta Helv.*, Zurich, v.74, p.361-364, 2000.

9. ANEXOS

1- Para o cálculo da curva de calibração, além do programa Microcal ORIGIN 3.5, foi utilizado o método dos quadrados mínimos segundo o qual a melhor reta estima os valores da variável dependente de tal modo, que a soma dos quadrados dos desvios entre o valor experimental e o valor esperado é mínima.

Roteiro para cálculo:

concentração µg/mL (x)	absorvância (y)	x^2	y^2	xy
4	0,1665	16	0,027722	0,666
6	0,2500	36	0,0625	1,5
8	0,3292	64	0,1083726	2,6336
10	0,4143	100	0,1716444	4,143
12	0,5092	144	0,2529084	6,0348
14	0,5922	196	0,3507008	8,2908
16	0,6644	256	0,4414273	10,6304
18	0,7527	324	0,5665572	13,5486
20	0,8348	400	0,696891	16,696
22	0,9186	484	0,8438259	20,2092

Matriz para o cálculo da reta sendo n=10

x	y	xy
$\sum x = 130$	$\sum y = 5,42256$	$\sum xy = 84,3524$
$\bar{x} = 13$	$\bar{y} = 0,542256$	$\sum x \cdot \sum y = 705,328$
$(\sum x)^2 = 16900$	$(\sum y)^2 = 29,437135$	
$\sum x^2 = 2020$	$\sum y^2 = 3,5225498$	

$$A = S_{xx} = \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} = 330$$

$$B = S_{yy} = \sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n} = 0,5788363$$

$$C = S_{xy} = \sum xy - \frac{(\sum x \cdot \sum y)}{10} = 13,8196$$

Cálculo do coeficiente de Pearson – r

$$r = \frac{C}{\sqrt{A \cdot B}} = 0,9999$$

Cálculo do valor de b

$$b = \frac{C}{A} = 0,0418775 \quad e \quad b^2 = 0,0017537$$

Cálculo do valor de a

$$\bar{y} = a + b\bar{x}, \text{ portanto } a = \bar{y} - b\bar{x} \rightarrow a = -0,0018436$$

Teste de significância de a ; para tanto aplica-se o teste “t”:

$$S = B - (b^2 \cdot A) \quad \rightarrow \quad s = \sqrt{\frac{S}{n-2}} \quad \rightarrow$$

$$S = 0,0001153 \quad s = 0,0037947$$

$$S(a) = \frac{s \cdot \sum x^2}{n \cdot A} \quad \rightarrow \quad t(a) = \left| \frac{a}{S(a)} \right|$$

$$S(a) = 0,0023228 \quad t(a) = 0,7937$$

Sabe-se que para $P = 95\%$ e $n = 10$, o valor determinado para $t(a)$ é igual a 2,262. Como o valor encontrado foi inferior ao tabelado, conclui-se que o valor de a não é significativo e que a reta passa pela origem. Uma vez que o

teste “t” demonstrou que o valor não é significativo, o valor de b' é calculado pela seguinte expressão:

$$b' = \frac{\sum xy}{\sum x^2} \rightarrow b' = 0,0417586$$

Cálculo do erro padrão de estimativa - S_e

$$S_e = \frac{\sum y^2 - b' \cdot \sum xy}{n-1} \rightarrow S_e = 0,0000124$$

Cálculo do erro padrão de estimativa relativo - S_{er}

$$S_{er} = \frac{100 \cdot S_e}{y} \rightarrow S_{er} = 0,002285\%$$

2- Para o cálculo do Desvio Padrão (DP) e Coeficiente de Variação (CV): segue abaixo um roteiro para a determinação do coeficiente de variação e desvio padrão referente à matriz analítica MA1 dos comprimidos de diclofenaco sódico 50 mg, após aplicação do método espectrofotométrico no UV utilizando metanol e leitura em 282 nm. A concentração final de leitura foi igual a 15,0 µg/mL de DS.

replicatas	absorvância
1	0,6880
2	0,6673
3	0,6659
4	0,6742
5	0,6755
6	0,6734
7	0,6757
8	0,6704
9	0,6747
10	0,6770
média = 0,6742	

padrão	absorvância
1	0,6842
2	0,6847
3	0,6846
média = 0,6845	

A concentração de diclofenaco sódico (C_a) referente a cada replicata foi calculada pela expressão :

$$C_a = \frac{A_a}{A_p} \cdot C_p$$

onde:

A_a = absorbância da amostra

A_p = absorbância média do padrão

C_p = concentração do padrão

Para o cálculo do teor de DS em cada replicata, foi utilizada a seguinte expressão:

$$\% DS = \frac{C_a}{C_{teórica}} \cdot 100$$

onde:

C_a = concentração da amostra

$C_{teórica}$ = concentração teórica

Para os 10 valores obtidos, tem-se:

concentração (mg)	(x - X)	(x - X) ²
50,255	1,007	1,0140499
48,743	-0,505	0,255025
48,641	-0,607	0,3684493
49,247	0,001	0,000001
49,342	0,094	0,008836
49,189	-0,059	0,003481
49,357	0,109	0,011881
48,970	-0,278	0,077284
49,284	0,036	0,001296
49,452	0,207	0,042849
média (X) = 49,248		Σ = 1,7135954

$$\text{Variância (V)} = \frac{\sum (x - X)^2}{n - 1} = 0,1903$$

$$\text{Desvio Padrão (DP)} = \sqrt{V} = 0,4363$$

$$\text{Coeficiente de Variação (CV)} = \frac{100 \cdot DP}{X} = 0,886\%$$

O limite de confiança (LC) da média para 95% foi calculado como:

$$\text{LC} = X \pm t \cdot S_m$$

onde t = 2,262 para 9 graus de liberdade

$$S_m = \frac{DP}{\sqrt{n}}$$

$$S_m = 0,1379, \text{ assim}$$

$$\text{LC} = 49,248 \pm 2,262 \cdot 0,1379$$

$$\text{LC} = 49,248 \pm 0,31$$