UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Desenvolvimento de metodologias indicativas de estabilidade para
medicamentos que atuam no diabetes mellitus tipo II**

Angel Arturo Gaona Galdos

**Tese para obtenção do grau de
DOUTOR**

Orientadora:

Profa. Dra. Erika Rosa Maria Kedor-Hackmann

SÃO PAULO

2012

Angel Arturo Gaona Galdos

Desenvolvimento de metodologias indicativas de estabilidade para
medicamentos que atuam no diabetes mellitus tipo II

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Erika Rosa Maria Kedor-Hackmann
orientador/presidente

1°. examinador

2°. examinador

3°. examinador

4°. examinador

São Paulo, _____ de _____.

“Si caes es para levantarte, si te levantas es para seguir, si sigues es para llegar a donde quieres ir y si llegas es para saber que lo mejor esta por venir...”

Elbano Mendoza

*A Dios padre por darme
sabiduría y paciencia,
durante estos años; no
fueron fáciles, pero siempre
sentí tu presencia.*

*A mi hijo Sebastian y mi esposa
Mónica por la comprensión,
amor y la motivación que me
brindaron durante estos años.*

*A mis padres Florencio y
Amelia por todo el apoyo
brindado y por estar cada
dia presentes a pesar de la
distancia que nos separa.*

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora, Profa. Dra. Erika Rosa Maria Kedor-Hackmann, pela orientação, pelo apoio, pela confiança e pelo incentivo em nosso trabalho.

Aos professores Maria Inês Rocha Miritello Santoro, María Segunda Aurora Prado e Jorge Luis Seferin Martins, pelo apoio e incentivo no dia a dia no laboratório.

À Profa. Marina Franco Maggi Tavares, pelas sugestões, pelo incentivo e pela disposição brindada no decorrer deste trabalho.

Aos professores Jivaldo do Rosário Matos e Lucildes Pita Mercuri, pelo incentivo, pelo apoio e pela amizade.

Ao Prof. Anil Kumar Singh pelas sugestões no decorrer deste trabalho.

Aos colegas de Laboratório, Pedro, Alessandra, Viviane, Cinthia, Claudia e Hellen, pelo companheirismo e pelo apoio.

Aos meus colegas da Apsen Farmacêutica, pelo apoio e pela amizade no decorrer deste trabalho.

A minha colega Patricia Lika Yamaguchi pelo apoio brindado.

À funcionaria do laboratório, Iria, pela colaboração e pela amizade.

Aos funcionários David, Elizabete Paiva, Elaine Ychico e em especial ao Jorge pela colaboração e pela amizade.

À funcionaria Leila Aparecida Bonadio, da Biblioteca do Conjunto das Químicas, pela revisão das referências utilizadas nesta pesquisa.

À FAPESP, pelo apoio financeiro concedido.

A todos que, de alguma forma, colaboraram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigado.

RESUMO

GAONA GALDOS, A.A. **Desenvolvimento de metodologias indicativas de estabilidade para medicamentos que atuam no diabetes mellitus tipo II. 2012.** 156p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, 2012.

O diabetes mellitus (DM) é uma síndrome na qual o metabolismo de hidratos de carbono, gorduras e proteínas está alterado, por falta de secreção de insulina ou por diminuição da sensibilidade tissular a este hormônio. O DM pode ser do tipo I, também denominado diabetes mellitus insulino dependente (DMID), caracterizado pela falta de secreção da insulina, e do tipo II, também denominado diabetes mellitus não insulino dependente (DMNID), caracterizado pela menor sensibilidade dos tecidos efetores às ações metabólicas da insulina. Embora ainda não haja cura definitiva, há vários tratamentos disponíveis que proporcionam qualidade de vida para o paciente portador, como a administração de hipoglicemiantes orais. Nesta pesquisa, objetivou-se desenvolver métodos indicativos de estabilidade para a glibenclamida e o cloridrato de metformina. Assim, foram desenvolvidos métodos de rastreamento ortogonais utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a eletroforese capilar (CE), metodologias que foram desafiadas com os estudos da degradação forçada. Realizou-se, também, a identificação do principal produto de degradação da glibenclamida utilizando a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS). O método por HPLC teve o melhor desempenho no monitoramento dos produtos de degradação da glibenclamida, apresentando boa linearidade nas concentrações entre 0,210 e 0,360 mg/mL; com coeficiente de correlação maior de 0,99. A precisão calculada como desvio padrão relativo (DPR) foi menor de 3%, exatidão do método comprovada mediante teste de recuperação, obtendo-se valores de $100 \pm 3,0\%$. No teste de especificidade, foram detectados três potenciais produtos de degradação, com os seguintes tempos de retenção relativos (TRR) de 0,33; 0,46 e 0,83. O método CZE teve o melhor desempenho no monitoramento dos produtos de degradação do cloridrato de metformina, apresentando boa linearidade nas concentrações entre 0,210 e 0,360 mg/mL, com coeficiente de correlação maior de 0,99. A precisão, calculada como DPR, foi menor do que 5%, exatidão do método comprovada mediante o teste de recuperação, obtendo-se valores de $100 \pm 3,5\%$. No teste de especificidade, foram detectados cinco potenciais produtos de degradação com os seguintes TRRs de 0,90; 1,14; 1,35; 1,45 e 1,56.

Palavras chaves: Método indicador de estabilidade, cromatografia líquida de alta eficiência, eletroforese capilar, degradação forçada, produtos de degradação.

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a syndrome which alters the metabolism of carbohydrates, fats and proteins by lack of insulin secretion or a decrease in tissue sensitivity to insulin. Type 1 DM is also known as insulin-dependent diabetes mellitus is characterized by lack of insulin secretion. The second type of diabetes known as Type II, also called non-insulin dependent, is characterized by the reduced sensitivity of target tissues to the metabolic actions of insulin. Although there is no definitive cure, there are several treatments available that provide quality of life for the patient how treatment with oral hypoglycemic agents. This study had as objective to developed stability-indicating methods for glibenclamide and metformin hydrochloride. Thus, the techniques used in this study involved high performance liquid chromatography (HPLC) and capillary electrophoresis (CE), and both were challenged with forced degradation studies. The identification of degradation products of glibenclamide was also performed, utilizing the mass spectrometry (MS) technique. However, the HPLC technique had the best performance for monitoring the degradation products of glibenclamide, which showed a good linearity in concentrations between 0.210 - 0.360 mg/ml, with a correlation coefficient greater than 0.99. The precision was calculated as a relative standard deviation (RSD) which was less than 3%; the accuracy of the method calculated as the percent recovery was obtained with the following values: $100 \pm 3.0\%$. On the specificity were detected three potential products of degradation utilizing forced degradation, with the following relative retention times (RRT) 0.33, 0.46 and 0.83. The CZE method had the best performance to monitoring the degradation products of metformin hydrochloride, which showed good linearity of concentrations between 0.210 and 0.360 mg/ml, with a correlation coefficient greater than 0.99. The intra-day and inter-day precision calculated as DPR was less than 5%, and an accuracy of this method was achieved using the values of $100 \pm 3.5\%$. In the specificity were five potential degradation products were detected with the following TRRS: 0.90, 1.14, 1.35, 1.45 and 1.56.

Keywords: stability-indicating method, high performance liquid chromatography, capillary electrophoresis, forced degradation, degradation products.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química da glibenclamida	13
Figura 2: Estrutura química da nateglinida	11
Figura 3: Estrutura química do acarbose	12
Figura 4: Estrutura química do cloridrato de metformina	13
Figura 5: Estrutura química do maleato de rosiglitazona.....	14
Figura 6: Esquema do equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência	19
Figura 7: Aplicações da cromatografia líquida de alta eficiência	20
Figura 8: Representação esquemática do fluxo eletrosmótico	24
Figura 9: Tipos de perfis radiais de velocidade de fluxo característicos dos sistemas HPLC e CE.....	25
Figura 10: Esquema de um equipamento de eletroforese capilar	26
Figura 11: Tipos de introdução de amostra para eletroforese capilar	27
Figura 12: Frasco utilizado na degradação forçada.....	45
Figura 13: Amostra submetidas à degradação forçada por termólise.....	45
Figura 14: Amostras submetidas à degradação em banho-maria.....	46
Figura 15: Ampolas de vidro nas quais foi conduzida a fotólise.....	48
Figura 16: Espectro de absorção da glibenclamida no UV-visível.....	74
Figura 17: Espectro de absorção no infravermelho da glibenclamida.....	75
Figura 18: Análise CCD da glibenclamida	76
Figura 19: Perfil cromatográfico do sistema 1, HPLC glibenclamida.....	77
Figura 20: Perfil cromatográfico do sistema 2, HPLC glibenclamida.....	77
Figura 21: Perfil cromatográfico do sistema 6, HPLC glibenclamida.....	78
Figura 22: Eletroferograma da glibenclamida por CZE.....	79
Figura 23: Cromatograma da glibenclamida utilizando o sistema 7, MEKC.....	80
Figura 24: Cromatograma da glibenclamida utilizando o sistema 25, MEKC.....	80
Figura 25: Cromatograma da glibenclamida utilizando o sistema 34, MEKC.....	81
Figura 26: Cromatogramas da glibenclamida degradação por termólise, HPLC.....	82
Figura 27: Eletroferogramas da glibenclamida degradação por termólise, CZE.....	82
Figura 28: Eletroferogramas da glibenclamida expostos a degradação por termólise, MEKC.....	83
Figura 29: Cromatograma da glibenclamida exposta a degradação forçada por hidrólise, HPLC.....	84
Figura 30: Eletroferograma da glibenclamida exposta a degradação forçada por hidrólise, CZE.....	84
Figura 31: Cromatograma da glibenclamida exposta a degradação forçada por hidrólise MEKC.....	85
Figura 32: Cromatograma da glibenclamida exposta a degradação forçada por hidrólise ácida, HPLC.....	86
Figura 33: Eletroferograma da glibenclamida exposta a degradação forçada por hidrólise ácida, CZE.....	86
Figura 34: Cromatograma da glibenclamida exposta a degradação forçada por hidrólise ácida, MEKC.....	87
Figura 35: Cromatograma da glibenclamida exposta a degradação forçada por hidrólise básica, HPLC.....	88
Figura 36: Eletroferograma da glibenclamida exposta a degradação forçada por hidrólise básica, CZE.....	88
Figura 37: Eletroferograma da glibenclamida exposta a degradação forçada por hidrólise básica, MEKC.....	89
Figura 38: Cromatograma da glibenclamida exposta a degradação forçada por hidrólise neutra, HPLC.....	90

Figura 39: Eletroferograma da glibenclamida exposta a degradação forçada por hidrólise neutra, CZE	90
Figura 40: Cromatograma da degradação forçada da glibenclamida exposta a por hidrólise neutra, MEKC	91
Figura 41: Cromatogramas da glibenclamida (glb) , exposto a degradação por oxidação, HPLC	92
Figura 42: Eletroferogramas da glibenclamida exposto a degradação por oxidação, CZE.	92
Figura 43: Eletroferogramas da glibenclamida exposto a degradação por oxidação, MEKC.	93
Figura 44: Cromatogramas da glibenclamida expostos a fotólise, HPLC.....	93
Figura 45: Eletroferograma da glibenclamida expostos a fotólise, CZE	94
Figura 46: Eletroferograma da glibenclamida expostos a fotólise, MEKC.....	94
Figura 47: Estrutura do íon de m/z 369, produto da degradação da glibenclamida	96
Figura 48: Espectro de massa do produto de degradação PD1	96
Figura 49: Fragmentação do produto de degradação PD1	97
Figura 50: Espectro de massas da fragmentação do produto de degradação PD1.	97
Figura 51: Cromatograma da glibenclamida utilizando o sistema 1, aprimoramento.	98
Figura 52: Cromatograma da glibenclamida utilizando o sistema 2, aprimoramento.	98
Figura 53: Cromatograma da glibenclamida utilizando o sistema 3, aprimoramento	99
Figura 54: Cromatograma da glibenclamida utilizando o sistema 4, aprimoramento	99
Figura 55: Cromatograma da glibenclamida utilizando o sistema 5, aprimoramento.	100
Figura 56: Aprimoramento da metodologia	100
Figura 57: Especificidade cromatograma do padrão de glibenclamida.....	101
Figura 58: Especificidade cromatograma da amostra de glibenclamida.....	102
Figura 59: Especificidade cromatograma do placebo.....	102
Figura 60: Cromatograma do padrão da glibenclamida exposta a degradação forçada básica..	103
Figura 61: Cromatograma da amostra da glibenclamida exposta a degradação forçada básica..	104
Figura 62: Cromatograma do placebo exposta a degradação forçada básica.	104
Figura 63: Cromatograma do padrão da glibenclamida exposta a degradação forçada ácida..	105
Figura 64: Cromatograma da amostra da glibenclamida exposta a degradação forçada ácida.	105
Figura 65: Cromatograma do placebo exposto a degradação forçada ácida.....	106
Figura 66: Curva de calibração de glibenclamida para o teor	107
Figura 67: Curva de calibração de glibenclamida pra os produtos de degrdação.....	108
Figura 68: Espectro de absorção da cloridrato de metformina no UV-visível.....	111
Figura 69: Espectro de absorção no infravermelho do cloridrato de metformina.	112
Figura 70: Análise cromatográfica do cloridrato de metformina.CCD	113
Figura 71: Perfil cromatográfico do sistema 8, HPLC. cloridrato de metformina.	114
Figura 72: Perfil cromatográfico do sistema 27, HPLC cloridrato de metformina	115
Figura 73: Eletroferograma do sistema 19, CZE cloridrato de metformina..	116
Figura 74: Eletroferograma do sistema 7,.CZE cloridrato de metformina.....	117
Figura 75: Eletroferograma do sistema 31,.CZE cloridrato de metformina	117
Figura 76: Cromatograma do sistema 14, MEKC cloridrato de metformina	118
Figura 77: Cromatograma do sistema 38, MEKC cloridrato de metformina.	119
Figura 78: Cromatograma do cloridrato de metformina exposto a degradação por termólise HPLC	120
Figura 79: Eletroferograma do cloridrato de metformina exposto a degradação por termólise CZE	120

Figura 80: Eletroferograma do cloridrato de metformina exposto a degradação por termólise MEKC.	121
Figura 81: Cromatograma do cloridrato de metformina exposto a degradação por hidrólise .HPLC	121
Figura 82: Eletroferograma do cloridrato de metformina exposto a degradação por hidrólise .CZE	122
Figura 83: Eletroferograma do cloridrato de metformina exposto a degradação por hidrólise .MEKC.	122
Figura 84: Cromatograma do cloridrato de metformina exposto a degradação por hidrólise ácida.HPLC.	123
Figura 85: Eletroferograma do cloridrato de metformina exposto a degradação por hidrólise ácida.CZE	124
Figura 86: Eletroferograma do cloridrato de metformina exposto a degradação por hidrólise ácida.MEKC.....	124
Figura 87: Cromatograma do cloridrato de metformina, exposto a degradação por hidrólise básica.HPLC.	125
Figura 88: Eletroferograma do cloridrato de metformina, exposto a degradação por hidrólise básica.CZE	125
Figura 89: Eletroferograma do cloridrato de metformina, exposto a degradação por hidrólise básica.MEKC.....	126
Figura 90: Cromatograma do cloridrato de metformina exposto a degradação por hidrólise neutra HPLC.....	127
Figura 91: Eletroferograma do cloridrato de metformina exposto a degradação por hidrólise neutra.CZE	127
Figura 92: Eletroferograma do cloridrato de metformina, exposto a degradação por hidrólise neutra MEKC.....	128
Figura 93: Cromatograma do cloridrato de metformina exposto a degradação por oxidação. HPLC	128
Figura 94: Eletroferograma do cloridrato de metformina exposto a degradação por oxidação. CZE.....	129
Figura 95: Eletroferograma do cloridrato de metformina exposto a degradação por oxidação. MEKC.	129
Figura 96: Cromatograma do cloridrato de metformina exposto a degradação fotolítica. HPLC.	130
Figura 97: Eletroferograma do cloridrato de metformina, exposto a degradação por fotólise. CZE	130
Figura 98: Eletroferograma do cloridrato de metformina exposto a degradação por fotólise. MEKC	131
Figura 99: Eletroferograma correspondente ao aprimoramento da metodologia, tensão aplicada +22 kv	132
Figura 100: Eletroferograma correspondente ao aprimoramento da metodologia, tensão aplicada +18 kv,	132
Figura 101: Especificidade eletroferograma do cloridrato de metformina padrão.....	133
Figura 102: Especificidade eletroferograma do cloridrato de metformina amostra.....	134
Figura 103: Especificidade eletroferograma do placebo	134
Figura 104: Eletroferograma do padrão de cloridrato de metformina exposto a degradação básica (3 horas)	135
Figura 105: Eletroferograma do cloridrato de metformina amostra exposto a degradação básica (3 horas).....	136
Figura 106: Eletroferograma do cloridrato de metformina placebo exposto a degradação básica (3 horas).....	136

Figura 107: Eletroferograma do cloridrato de metformina padrão exposto a degradação ácida (96 horas).....	137
Figura 108: Eletroferograma da amostra do cloridrato de metformina exposto a degradação ácida (96 horas).	137
Figura 109: Eletroferograma do placebo do cloridrato de metformina exposto a degradação ácida (96 horas).	138
Figura 110: Eletroferograma do cloridrato de metformina padrão exposto a degradação oxidativa (168 horas).....	138
Figura 111: Eletroferograma do cloridrato de metformina amostra exposta a degradação oxidativa (168 horas).....	139
Figura 112: Eletroferograma do placebo do cloridrato de metformina exposto a degradação oxidativa (168 horas).....	139
Figura 113: Curva de calibração do cloridrato de metformina para o teor.....	140
Figura 114: Curva de calibração do cloridrato de metformina para os produtos de degradação..	142

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Gradiente de eluição da metodologia	50
Tabela 2: Resultados obtidos na determinação da faixa de fusão da glibenclamida.....	74
Tabela 3: Frequências de absorção das principais bandas de absorção no espectro de infravermelho da glibenclamida	75
Tabela 4: Resultados da determinação quantitativa da glibenclamida por titulação com hidróxido de sódio 0,1 M.....	76
Tabela 5: resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração do teor.. da glibenclamida.....	107
Tabela 6: Resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração dos produtos de degradação da glibenclamida	109
Tabela 7: Resultados obtidos nas determinações da repetibilidade e da precisão intermediária do método por HPLC.....	110
Tabela 8: Resultados obtidos na determinação da faixa de fusão do cloridrato de metformina	111
Tabela 9: Frequências de absorção das principais bandas de absorção no espectro de infravermelho do cloridrato de metformina.....	112
Tabela 10: Resultados da determinação quantitativa do cloridrato de metformina por titulação potenciométrica com ácido perclórico 0,1 N.....	113
Tabela 11: Resultados encontrados no aprimoramento da metodologia para mudança na tensão aplicada	131
Tabela 12: Resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração do método por CZE	141
Tabela 13: Resultados experimentais obtidos na linearidade para produtos de degradação do método por CZE	141
Tabela 14: Resultados obtidos nas determinações da repetibilidade e da precisão intermediária do método específico por CZE	144

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Classificação dos testes, segundo sua finalidade.	8
Quadro 2: Ensaios necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade..	8
Quadro 3: Sistemas cromatográficos avaliados no desenvolvimento de metodologias de rastreamento para glibenclamida.	40
Quadro 4: Sistemas eletroforéticos avaliados no desenvolvimento da metodologia de rastreamento utilizando a cromatografia eletrocinética micelar para glibenclamida.	44
Quadro 5: Principais sistemas testados no aprimoramento da metodologia.	49
Quadro 6: Procedimento experimental para o teste de recuperação do método cromatográfico.	54
Quadro 7: Sistemas cromatográficos avaliados no desenvolvimento da metodologia de rastreamento para o cloridrato de metformina.	59
Quadro 8: Sistemas eletroforéticos avaliados no desenvolvimento da metodologia de rastreamento para o cloridrato de metformina utilizando a eletroforese capilar em zona (CZE).	62
Quadro 9: Sistemas eletroforéticos avaliados no desenvolvimento da metodologia de rastreamento de cloridrato de metformina utilizando a cromatografia eletrocinética micelar (MEKC).	65
Quadro 10: Procedimento experimental para o teste de recuperação do método por CZE.	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ_{EOF}	mobilidade eletroforética
μ_{OBS}	mobilidade eletrosmótica observada
ANVISA	agência nacional de vigilância sanitária
A_s	fator de assimetria
CCD	cromatografia em camada delgada
C_E	concentração molar do soluto na fase estacionária
CE	eletroforese capilar
CE-MS	eletroforese capilar acoplada a espectrometria de massa
CG	cromatografia gasosa
C_M	concentração molar do soluto na fase móvel
CZE	eletroforese capilar de zona
<i>d.i.</i>	diâmetro interno
DM	diabetes mellitus
DP	desvio padrão
DPR	desvio padrão relativo
E	campo elétrico
EOF	fluxo eletrosmótico
FDA	food drug administration
GF254	sílica gel com fluorescência a 254 nm
GLB	glibenclamida
HILIC	cromatografia com interações hidrofílicas
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
HPTLC	cromatografia planar de alta eficiência
ICH	International Conference on Harmonisation
IV	infravermelho
K_c	constante de distribuição
kV	kilovoltios
<i>k</i>	fator de retenção
LC-MS	cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa
LD	limite de detecção
LQ	limite de quantificação
mAU	miliunidades de absorvância
<i>m/z</i>	relação massa/carga
MEEKC	cromatografia capilar eletrocinética micelar por microemulsão
MEKC	cromatografia eletrocinética micelar
MET	cloridrato de metformina
N	pratos teóricos
NIRS	espectroscopia de refletância no infravermelho
OMS	Organização mundial da saúde
P.I.	padrão interno
PAR	razão das áreas dos picos
PD	produto de degradação
PDA	detector de arranjo de diodos
pH	logaritmo negativo da atividade do íon hidrogênio
pK_a	logaritmo negativo da constante de dissociação do tampão
PTFE	politetrafluoretileno (teflon)

PVDF	fluoreto de polivinilideno
q	carga do íon
R_s	resolução
r^2	coeficiente de determinação
r	coeficiente de correlação
SDS	dodecil sulfato de sódio
TEA	triethylamina
TRR	tempo relativo de retenção
t_M	tempo morto
t_R	tempo de retenção
u	velocidade linear média do movimento das moléculas na fase móvel
u_x	velocidade de migração
UPLC	cromatografia líquida de ultra eficiência
USP	united states pharmacopoeia
UV-VIS	ultravioleta visível
$\bar{V}$	velocidade linear media de migração do soluto
V_E	volume da fase estacionária
V_{EOF}	velocidade do fluxo eletrosmótico
V_{EP}	velocidade eletroforética
V_M	volume da fase móvel
V_{OBS}	velocidade eletroforética observada
$W_{1/2}$	largura do pico na metade da sua altura máxima
α	fator de separação
ϵ	constante dielétrica do tampão
η	viscosidade do tampão
λ	comprimento de onda
ζ	potencial zeta

SUMÁRIO

1	REVISÃO DA LITERATURA	3
1.1	Métodos indicativos de estabilidade	3
1.1.1	Geração da amostra.....	3
1.1.2	Desenvolvimento da metodologia.....	6
1.1.3	Validação da metodologia	7
1.2	Hipoglicemiantes orais	9
1.2.1	Histórico	9
1.2.2	Classificação dos hipoglicemiantes orais.....	10
1.3	Técnicas utilizadas no desenvolvimento de metodologias indicativas de estabilidade	14
1.3.1	Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	15
1.3.2	Eletroforese capilar (CE)	21
2	OBJETIVOS	30
3	MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1	Materiais.....	31
3.1.1	Substâncias de referência	31
3.1.2	Amostras	31
3.1.3	Placebos	31
3.1.4	Solventes e reagentes.....	32
3.1.5	Soluções e tampões.....	32
3.1.6	Equipamentos	34
3.1.7	Consumíveis e outros materiais.....	35
3.2	Métodos	35
3.2.1	Glibenclamida.....	37
3.2.2	Cloridrato de metformina	55
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
4.1	Glibenclamida.....	74
4.1.1	Determinação qualitativa e quantitativa da glibenclamida matéria-prima	74
4.1.2	Desenvolvimento de metodologias analíticas de rastreamento	76
4.1.3	Degradação forçada da glibenclamida	81
4.1.4	Degradação por termólise	82
4.1.5	Identificação dos produtos de degradação forçada mediante espectrometria de massas	95

4.1.6	Aprimoramento da metodologia desenvolvida	98
4.1.7	Validação da metodologia desenvolvida utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	101
4.2	Cloridrato de metformina	111
4.2.1	Determinação qualitativa e quantitativa do cloridrato de metformina matéria-prima	111
4.2.2	Desenvolvimento de metodologias analíticas de rastreamento	113
4.2.3	Degradação forçada do cloridrato de metformina	119
4.2.4	Aprimoramento da metodologia desenvolvida	131
4.2.5	Validação da metodologia desenvolvida utilizando a eletroforese capilar em zona (CZE)	133
5	CONCLUSÕES.....	145
6	PERSPECTIVAS FUTURAS	146
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	147

INTRODUÇÃO

O diabetes está na lista das cinco doenças de maior índice de morte no mundo – e está chegando cada vez mais perto do topo da lista. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 180 milhões de pessoas tenham diabetes – e que este número possa dobrar até 2030. Atualmente, mais de 1 milhão de pessoas morrem de diabetes, sendo 80% em países em desenvolvimento.

O diabetes, quando não tratado adequadamente, pode implicar em complicações, como ataque cardíaco, derrame cerebral, insuficiência renal, problemas na visão, amputação dos pés e lesões de difícil cicatrização, dentre outras complicações. Embora ainda não haja cura definitiva para o diabetes, há vários tratamentos disponíveis que, quando seguidos de forma regular, proporcionam saúde e qualidade de vida para o paciente portador. Um desses tratamentos se refere ao uso dos hipoglicemiantes orais.

Para que os hipoglicemiantes orais cumpram sua função, deve-se garantir sua estabilidade, para que não sofram alterações. Estas podem traduzir-se em perda da potência e em formação de produtos de degradação, o que pode conferir-lhes aumento da toxicidade. A diminuição/ausência de efeito terapêutico pode ser mais ou menos grave, dependendo da substância ativa do medicamento.

Devido aos avanços tecnológicos ocorridos na síntese de novos fármacos, nas últimas décadas, houve necessidade do aprimoramento de metodologias rápidas e simples que tracem o perfil de impurezas nos fármacos. Isolar e identificar impurezas são um constante desafio, porque, muitas vezes, estas são estruturalmente desconhecidas e presentes em número e quantidades aleatórias, encontrando-se, na maioria dos casos, em pequena concentração e frequentemente apresentando estruturas similares àquelas do composto ativo.

A fim de contribuir para o conhecimento da estabilidade desta classe de fármacos foram utilizados o cloridrato de metformina e a glibenclâmida, dois dos fármacos mais prescritos mundialmente para o tratamento do diabetes mellitus tipo II e dois dos três medicamentos incluídos na categoria dos

hipoglicemiantes orais na Relação Nacional de Medicamentos (RENAME 2012).

Um método indicativo de estabilidade é um procedimento analítico utilizado para detectar a diminuição do princípio ativo devido à degradação do composto. De acordo às diretrizes da Food and Drug Administration (FDA), estes métodos são definidos como procedimentos analíticos validados, que medem com exatidão e precisão o princípio ativo livre de potenciais interferências, como excipientes, impurezas e/ou produtos de degradação. A FDA também recomenda que os estudos de estabilidade se realizem utilizando este tipo de métodos.

A aplicação desses métodos é de grande importância, pois trata-se da correta condução dos estudos de estabilidade de medicamentos, de forma que eles sejam eficazes e seguros para o consumo da população. Somente após o resultado da aplicação destes estudos, pode-se ter certeza da estabilidade do produto durante o período de validade.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Métodos indicativos de estabilidade

Os estudos de estabilidade são utilizados para verificar se o produto permanece completamente efetivo, enquanto são mantidas as condições recomendadas de armazenamento indicadas para cada produto. A vida de prateleira dos medicamentos é determinada nas condições de armazenamento, sob temperatura e umidade controladas. Para estabelecer a vida de prateleira ou o prazo de validade, devem ser observados dois aspectos. Primeiro, determinar a potência ou a quantidade do princípio ativo: é simples entender que uma perda significativa na quantidade de princípio ativo torna o medicamento menos efetivo. Segundo, determinar os produtos de degradação ou impurezas que aparecem como resultado do envelhecimento. Esta determinação é mais difícil, porque se devem prever os produtos de degradação que poderiam estar presentes e determinar todos os produtos de degradação, que aparecem em concentrações maiores que 0,1% da substância ativa⁷⁰.

Um produto de degradação é uma molécula que resulta de uma mudança no ingrediente ativo, provocada pelo passar do tempo, como resultado do armazenamento (por exemplo: termólise, oxidação, hidrólise, fotólise). Reações do ingrediente ativo com excipientes ou componentes da embalagem geram também produtos de degradação⁷⁰.

Para se antecipar a esta difícil tarefa de monitorar produtos de degradação, é necessário o desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade. Há três condições necessárias para se desenvolver estes métodos: geração da amostra, desenvolvimento da metodologia e validação desta.

1.1.1 Geração da amostra

As condições de estresse da substância ativa devem resultar em uma degradação de aproximadamente 10 a 15%, que representa um valor razoável⁶¹. As condições específicas (intensidade e duração) usadas dependem das características químicas de cada substância. Um composto não necessariamente sofrerá degradação com um determinado tipo de estresse e,

nesse caso, não são aconselhadas condições mais drásticas para esse tipo de degradação⁶¹. A seguir, são relatados os tipos de estresse.

1.1.1.1 Hidrólise

A degradação das substâncias ativas que envolvem alguma reação com água é denominada reação de hidrólise. Stewart e Tucker⁷⁵ indicam que reações de hidrólise e oxidação são os tipos de degradação mais comuns que incidem sobre os medicamentos.

As reações de hidrólise são tipicamente catalisadas por ácidos e bases. Para induzir potenciais reações de degradação (hidrólise) devem ser utilizadas soluções em ampla gama de pH. Na hidrólise ácida, os ácidos mais utilizados são o clorídrico e o sulfúrico, na concentração de 0,1 a 1 M; quando as substâncias ativas não são solúveis nestas soluções ácidas, pode-se utilizar um co-solvente apropriado. A amostra ainda pode ser aquecida por um tempo definido, com o intuito de acelerar a degradação⁸.

Na hidrólise básica, são mais utilizados os hidróxidos de metais alcalinos, como NaOH, LiOH ou KOH, na concentração de 0,1 a 1 M. Para certas substâncias ativas, que são parcialmente solúveis ou insolúveis, também pode-se fazer uso de um co-solvente apropriado e da temperatura para acelerar a degradação, dependendo da sensibilidade térmica da substância.

1.1.1.2 Oxidação

Reações desse tipo de degradação são tipicamente de auto-oxidação; ou seja, a reação é iniciada por um radical iniciador. Reações com radical iniciador começam com a fase de iniciação, envolvendo a formação de radicais, seguida pela fase de propagação e, eventualmente, uma fase terminal. A cinética de reação frequentemente segue uma curva em forma de “S”, quando é plotada a degradação *versus* tempo¹⁶.

A degradação por oxidação pode ser realizada sob atmosfera de oxigênio ou na presença de peróxido de hidrogênio. O uso de oxigênio é um modelo mais realista. Também podem ser utilizados radicais livres como iniciadores da oxidação; geralmente, um radical livre iniciador, junto ao peróxido de hidrogênio, vai gerar produtos de degradação observados em estudos de estabilidade em tempo real⁸.

1.1.1.3 Degradação térmica

Entende-se por degradação térmica o mecanismo de degradação que envolve aumento da temperatura, conduzindo à termólise da substância ativa. Esta degradação pode ser avaliada utilizando temperaturas maiores do que as usadas nos ensaios de estabilidade acelerada, em geral maiores que 50 °C. A duração de exposição é dependente da sensibilidade da substância ativa. Quando o aumento da temperatura produz uma mudança de fase, é recomendado utilizar condições menos drásticas¹⁶.

As diretrizes da ICH sugerem também utilizar temperaturas 10 °C maiores do que aquelas utilizadas nos estudos de estabilidade acelerada⁴².

1.1.1.4 Degradação por fotólise

Este tipo de degradação resulta da exposição à luz ultravioleta ou visível, no intervalo de comprimento de onda entre 300 e 800 nm. Exposições a radiações menores que 300 nm não são necessárias, já que produtos farmacêuticos não são expostos a essa radiação durante seu ciclo de vida¹⁶.

Estes estudos devem ser conduzidos de acordo com as diretrizes da ICH⁴³. As opções I e II podem ser utilizadas. Para estudos de degradação forçada, as amostras devem ser expostas, pelo menos duas vezes, conforme às diretrizes da ICH com relação ao tempo, para garantir a adequada exposição da amostra⁸.

A norma ICH Q1B permite duas opções para as fontes de luz:

Opção I – Lâmpadas únicas:

- Lâmpada fluorescente modelo D65 ou
- Lâmpada de haleto metálico ou
- Lâmpada de xenônio

Opção II – Dois conjuntos de lâmpadas:

- Lâmpada fluorescente UV próximo (Ultravioleta próximo) e
- Lâmpada fluorescente branca fria.

A opção I utiliza lâmpadas únicas que emitem as energias de UVA (Ultravioleta A) e visível ao mesmo tempo; desta forma, a quantidade de energia irradiada é fixa. Como os requisitos de exposição para energia fotópica

(iluminação diurna) e UVA são independentes, uma quantidade de energia irradiada fixa para ambas, por uma única fonte luminosa, causará sobre-exposição das doses (Visível ou UVA). Esta quantidade de energia irradiada varia de acordo com o tipo de lâmpada e sua respectiva potência. Para que o teste de fotoestabilidade alcance o mínimo requerido, a sobre-exposição para a energia UVA é de aproximadamente 540 W-h/m^2 , para lâmpadas de xenônio, e de 2.500 W-h/m^2 , para lâmpadas de haleto metálico. Isto corresponde a 270% e a 1.250% de sobre-exposição, respectivamente. No caso da lâmpada fluorescente modelo D65, a irradiação de UVA é baixa, enquanto a da região visível será sobre-exposta. É ideal que a energia luminosa visível e UVA sejam controladas independentemente. Este problema é somente minimizado utilizando-se dois conjuntos de lâmpadas fluorescentes, ou seja, a Opção II.

1.1.2 Desenvolvimento da metodologia

A fim de avaliar a estabilidade de um composto, é necessário um método apropriado. O desenvolvimento de um método indicativo de estabilidade é um dilema do tipo “o ovo ou a galinha?”. Isto é, como desenvolver um método para detectar produtos de degradação, quando não se sabe quais são os produtos de degradação.

Ao desenvolver um método indicador de estabilidade, é útil pensar sobre o que constituiria um método ideal. Um método ideal permitirá a quantificação exata do ativo, bem como de seus produtos de degradação. Embora isso pareça simples, é quase impossível desenvolver um método ideal no início do desenvolvimento de uma metodologia da qual pouco se conhece sobre seus produtos de degradação potenciais. Afinal, uma das razões para a realização da degradação forçada é descobrir os potenciais produtos de degradação²⁹.

Em muitos casos, pode ser impossível desenvolver um método ideal; no entanto, a utilização de métodos ortogonais (mecanismos de separação diferentes) frequentemente dá resultado adequado nesses casos⁷⁶.

Além da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) existem outras técnicas analíticas que podem ser utilizadas para o desenvolvimento destas metodologias, como a cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC), a eletroforese capilar (CE) e a cromatografia gasosa (CG)^{14,15}.

A CE é uma técnica complementar à HPLC; o maior benefício desta técnica é que o mecanismo de separação é diferente, apresentando seletividade diferente

1.1.3 Validação da metodologia

Em geral, existem duas etapas na validação de métodos indicativos de estabilidade. A primeira etapa ocorre quando a substância ativa é submetida a estudos de degradação forçada. O foco principal da validação nessa etapa está no estabelecimento da especificidade, seguido por outros parâmetros, como exatidão, precisão, linearidade, intervalo, robustez, etc. Os limites de detecção e quantificação são também determinados para os produtos de degradação, para ajudar no estabelecimento do balanço de massas.

Na segunda etapa, quando o método é estendido à formulação farmacêutica ou a outro tipo de matrizes, a ênfase se limita a provar a pertinência dos parâmetros estabelecidos, na presença de excipientes ou de outros constituintes da formulação. Neste caso, só parâmetros de importância crítica, como especificidade, exatidão e precisão, seriam revalidados¹⁸. Na validação do método indicativo de estabilidade, métodos diferentes apresentam necessidades diferentes de validação.

A Farmacopeia dos Estados Unidos da América⁷⁹ (USP 35) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária¹² (ANVISA) reconhecem quatro categorias de métodos analíticos (Quadro 1) e definem as características que deveriam ser validadas para cada tipo de método (Quadro 2). O método indicativo de estabilidade é incluído na categoria 2: métodos analíticos para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas⁷⁹.

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

Quadro 1: Classificação dos testes, segundo sua finalidade.

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

Quadro 2: Ensaios necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.

* pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

** se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da precisão intermediária.

1.2 Hipoglicemiantes orais

1.2.1 Histórico

Em contraste com os estudos sistemáticos que levaram ao isolamento da insulina, as sulfonamidas foram descobertas acidentalmente. Em 1942, Janbon e colaboradores observaram que algumas sulfonamidas causavam hipoglicemia em animais de laboratório. Essas observações foram logo ampliadas e a 1-butil-3-sulfonilureia (carbutamida) tornou-se a primeira sulfonilureia clinicamente útil para o tratamento do diabetes. Esse composto foi posteriormente retirado do mercado, devido aos efeitos adversos sobre a medula óssea. No início da década de 1950, foram efetuados estudos clínicos da tolbutamida, o primeiro agente amplamente utilizado desse grupo, administrada a pacientes com diabetes mellitus (DM) tipo 2. Desde essa época, cerca de 20 agentes diferentes dessa classe foram utilizados no mundo inteiro³⁵.

Em 1997, o primeiro agente de uma nova classe de secretagogos da insulina oral, denominada meglitinidas (derivados do ácido benzoico), foi aprovado para uso clínico. Esse agente, denominado repaglinida, ganhou ampla aceitação como terapia de ação rápida antes das refeições, para limitar a hiperglicemia pós-prandial³⁵.

No início do século passado, constatou-se que uma planta (*Galega officinalis*, *galega*), utilizada no tratamento do diabetes na Europa, nos tempos medievais, continha guanidina. A guanidina tem propriedades hipoglicemiantes, porém é altamente tóxica para uso clínico. Durante a década de 1920, as biguanidas foram investigadas para uso no diabetes, porém, foram abandonadas após a descoberta da insulina. Posteriormente, constatou-se que o antimalárico cloroguanida exercia ação hipoglicemiante fraca. Pouco depois da introdução das sulfonilureias, as primeiras biguanidas tornaram-se disponíveis para uso clínico. Entretanto, a fenformina, o primeiro fármaco desse grupo, foi retirado do mercado nos EUA e na Europa, devido ao aumento frequente da acidose láctica associada ao seu uso. Outra biguanida, a metformina, foi extensamente utilizada na Europa sem efeitos adversos significativos e, em 1995, foi aprovada para uso nos EUA³⁵.

As tiazolidinedionas foram introduzidas, em 1997, como segunda classe importante de “sensibilizadores da insulina”. Esses agentes ligam-se a

receptores proliferadores ativados do peroxissoma (principalmente PPAR), resultando em aumento da captação de glicose no músculo e na redução de sua produção endógena. O primeiro desses agentes, a troglitazona, foi retirado do mercado nos EUA, em 2000, devido à sua associação com hepatotoxicidade. O maleato de rosiglitazona teve também sua venda proibida na Europa pela EMEA e nos Estados Unidos e sua venda foi restrita, pelos riscos cardiovasculares que apresenta. No Brasil a Anvisa determinou a retirada do medicamento das farmácias e drogarias, cancelando seu registro em 2010. O outro agente dessa classe, a pioglitazona, não foi associado a estes riscos e é utilizado atualmente no mundo todo³⁵.

1.2.2 Classificação dos hipoglicemiantes orais

1.2.2.1 Sulfonilureias

As sulfonilureias são tradicionalmente divididas em dois grupos ou duas gerações de agentes. O primeiro grupo de sulfonilureias inclui tolbutamida, acetoxamida, tolazamida e clorpropamida. Foi descoberta uma segunda geração de sulfonilureias hipoglicemiantes, constituída pelos fármacos glibenclamida, glipizida, gliclazida e glimepirida, que são consideravelmente mais potentes do que os agentes do 1º grupo. As sulfonilureias provocam hipoglicemia ao estimular a liberação de insulina das células β do pâncreas^{35,56}.

Glibenclamida

A glibenclamida é um hipoglicemiante usado no tratamento do diabetes mellitus tipo II. Quimicamente, é *benzamide, 5-chloro-N-[2-[4-[[[(cyclohexylamino)carbonyl]amino]-sulfonyl]phenyl]ethyl]-2-methoxy-*.

1-[[p-[2-(5-Chloro-o-anisamido)ethyl]phenyl]sulfonyl]-3-cyclohex-ylurea. Sua fórmula molecular é $C_{23}H_{28}ClN_3O_5S$, com massa molecular de 494,0 mol/g^{35,79,31,23}.

Figura 1: Estrutura química da glibenclamida.

A glibenclamida é determinada em preparações farmacêuticas e em amostras biológicas, utilizando-se a HPLC com detecção UV^{6,44,51,54,55,67}, detecção fluorimétrica³, cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC)¹⁹, CCD⁷⁸, cromatografia líquida acoplada a detector de massas (LC-MS)^{11,24}, espectrofotometria UV^{21,30} e métodos indicativos de estabilidade²⁰.

1.2.2.2 Meglitinidas

As meglitinidas constituem uma nova classe de secretagogos da insulina. A repaglinida, primeiro membro do grupo, foi aprovada para uso clínico pela FDA em 1998. Esses fármacos modulam a liberação de insulina pelas células β ao regular o efluxo de potássio através dos canais de potássio. Ao contrário das sulfonilureias, as meglitinidas não exercem nenhum efeito direto sobre a exocitose da insulina^{35,56}.

Nateglinida

A nateglinida pertence ao grupo das meglitinidas usadas no diabetes mellitus tipo II. Quimicamente, é *D-phenylalanine, N-[[trans-4-(1-methylethyl)cyclohexyl]carbonyl]-*; (-)-*N-[(trans-4-Isopropylcyclohexyl) carbonyl-D-phenylalanine*. Sua fórmula molecular é $C_{19}H_{27}NO_3$, com massa molecular de 317,42 mol/g⁷⁹.

Figura 2: Estrutura química da nateglinida.

A nateglinida é determinada em amostras biológicas utilizando a HPLC com detecção UV⁶⁴ e CE⁸².

1.2.2.3 Inibidores da α -glicosidase

Apenas os monossacarídeos, como a glicose e a frutose, podem ser transportados da luz intestinal para a corrente sanguínea. Por conseguinte, os amidos complexos, oligossacarídeos e dissacarídeos, devem ser decompostos em moléculas de monossacarídeos individuais para serem absorvidos no duodeno e na porção superior do jejuno. Essa digestão é facilitada por enzimas entéricas, incluindo a α -amilase pancreática e as α -glicosidases, que estão fixadas à borda em escova das células intestinais. A acarbose e o miglitol, que são inibidores competitivos das α -glicosidases intestinais, modulam a digestão pós-prandial e a absorção do amido e dos dissacarídeos^{35,56}.

Acarbose

A acarbose pertence ao grupo das α -glicosidases com administração oral utilizada no diabetes não-insulinodependente. Quimicamente, é a *D-glucose, O-4,6-dideoxy-4-[[[1S-(1 α ,4 α ,5 β ,6 α)]-4,5,6-trihydroxy-3-(hydroxymethyl)-2-cyclohexen-1-yl]amino]- α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-O- α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-.O-4,6-Dideoxy-4-[[[1S,4R,5S,6S)-4,5,6-trihydroxy-3-(hydroxymethyl)-2-cyclohexen-1-yl]amino]- α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-O- α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucose. Sua fórmula molecular é C₂₅H₄₃NO₁₈, com massa molecular de 645,60 mol/g^{23,79}.*

Figura 3: Estrutura química do acarbose.

Acarbose em comprimidos foi determinada quantitativamente utilizando-se HPLC e CE²⁶. Para a determinação da acarbose e de seu principal metabólito, em amostras biológicas de urina humana, foi utilizada a CZE, empregando detector de fluorescência induzida por *laser*, após a derivatização com 7-aminonaftaleno-1,3-ácido disulfônico⁶⁰.

1.2.2.4 Biguanidas

A metformina e a fenformina foram introduzidas em 1957 e a buformina, em 1958. A metformina, administrada isoladamente ou em combinação com uma sulfonilureia, melhora o controle glicêmico e as concentrações de lipídios em pacientes que respondem de modo insatisfatório à dieta ou à sulfonilureia isoladamente. A ação desses fármacos sobre a redução da glicemia não depende da presença de células β funcionais do pâncreas, mas da redução dos níveis de glicose, primariamente diminuindo a produção hepática de glicose e aumentando a ação da insulina no músculo e no tecido adiposo^{35,56}.

Cloridrato de metformina

O cloridrato de metformina, pertencente ao grupo das biguanidas é usado no diabetes mellitus tipo II. Quimicamente é, *Imidodicarbonimidic diamide, N,N-dimethyl-, monohydrochloride. 1,1-Dimethylbiguanide monohydrochloride*. Sua fórmula molecular é $C_4H_{12}ClN_5$, com massa molecular de 165,63 mol/g^{23,31,79}.

Figura 4: Estrutura química do cloridrato de metformina.

Foram encontradas metodologias na literatura para a determinação de metformina, em preparações farmacêuticas e fluidos biológicos; dentre as quais, a HPLC com detecção UV^{1,2,,25,41,47,48,73,84,85}, com detecção de fluorescência⁵⁷, cromatografia com interações hidrofílicas (HILIC)^{5,74}, CE^{72,81,83},

LC-MS^{40,80}, espectrofotometria UV-visível^{4,13,38}, métodos indicativos de estabilidade^{7,37,45}, RMN³³, HPTLC^{39,46,53} e determinação condutométrica⁶⁸

1.2.2.5 Tiazolidinedionas

As tiazolidinedionas constituem uma classe de agentes antidiabéticos orais recentemente introduzidos, que potencializam a sensibilidade dos tecidos-alvos à insulina. Foram utilizadas três tiazolidinedionas na prática clínica (troglitazona, rosiglitazona e pioglitazona). Sua ação principal consiste em diminuir a resistência à insulina, aumentando a captação no metabolismo da glicose no músculo e no tecido adiposo^{35,56}.

Maleato de rosiglitazona

O maleato de rosiglitazona pertence ao grupo das tiazolidinedionas; é administrado por via oral e utilizado no diabetes não-insulinodependente. Quimicamente, é *(±)*-5-[*p*-[2-(Methyl-2-pyridylamino)ethoxy]benzyl]-2,4-thiazolidinedionemaleate(1:1); *(RS)*-5-[[4-(2-[Methyl(2-pyridinyl) amino]ethyl)oxy)phenyl]methyl]-1,3-thiazolidine-2,4-dione *(Z)*-2-butenedioate. Sua fórmula molecular é C₂₂H₂₃N₃O₇S, com massa molecular de 473,43 mol/g⁷⁹.

Figura 5: Estrutura química do maleato de rosiglitazona.

A análise da rosiglitazona em preparações farmacêuticas e plasma humano foi realizada por HPLC, com detecção UV^{65,52,58,34,49}, HPTLC⁶³, CCD³⁶ e CE-MS⁸⁶.

1.3 Técnicas utilizadas no desenvolvimento de metodologias indicativas de estabilidade

As técnicas escolhidas para a elaboração deste trabalho foram a HPLC e CE, por representarem, atualmente, as técnicas mais utilizadas no desenvolvimento de métodos indicadores de estabilidade.

1.3.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A cromatografia é um processo analítico para separação de substâncias em mistura, com fundamento nas diferentes velocidades de migração dessas substâncias, em razão das afinidades relativas pelas duas fases: a fase móvel e a fase estacionária²⁸.

Nas separações cromatográficas, a amostra é transportada por uma fase móvel, que pode ser um gás, um líquido ou um fluido supercrítico. Essa fase móvel é então forçada, através de uma fase estacionária imiscível fixa, e colocada na coluna ou em uma superfície sólida. As duas fases são escolhidas, de modo que os componentes da amostra se distribuam entre a fase móvel e a estacionária em vários graus⁶⁹.

A HPLC emprega pequenas colunas, recheadas de materiais especialmente preparados, e uma fase móvel, que é eluída sob altas pressões. A HPLC tem capacidade de realizar separações e análises quantitativas de grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostra, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade²⁸.

No início do desenvolvimento da cromatografia líquida, os cientistas perceberam que a eficiência da coluna podia ser aumentada através da diminuição do tamanho da partícula da fase estacionária. Entretanto, somente no final dos anos 1960 foi desenvolvida a tecnologia para a produção e o uso de fases estacionárias com partículas de diâmetro de 3 a 10 μm . Esta técnica exigiu equipamentos sofisticados, operando a altas pressões, que contrastavam acentuadamente com as colunas simples de vidro da clássica cromatografia líquida de fluxo por gravidade. O nome cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é empregado para distinguir esses procedimentos mais novos dos métodos antigos⁶⁹.

A HPLC é a mais usada de todas as técnicas analíticas de separação. As razões para a popularidade do método são a sua sensibilidade, a fácil adaptação para determinações quantitativas acuradas, a sua adequação à separação de espécies não-voláteis ou termicamente frágeis e, acima de tudo,

a sua ampla aplicabilidade a substâncias de grande interesse para a indústria, para muitos campos da ciência e para o público⁶⁹.

1.3.1.1 Princípios de separação

1.3.1.1.1 Velocidade de eluição de solutos

A eficiência de uma coluna cromatográfica em separar dois solutos depende, em parte, das velocidades relativas nos quais os dois eluem.

A constante de distribuição K_c , que representa as concentrações de soluto nas fases móvel e estacionária, respectivamente, pode ser calculada pela equação 1⁶⁹:

$$K = c_E / c_M \quad \text{Equação 1}$$

onde:

c_E = concentração molar do soluto na fase estacionária;

c_M = concentração molar do soluto na fase móvel.

A velocidade linear média de migração do soluto V e a velocidade linear média do movimento das moléculas da fase móvel (u) podem ser calculadas pelas equações 2 e 3, respectivamente⁶⁹:

$$\bar{V} = L / t_R \quad \text{Equação 2}$$

$$u = L / t_M \quad \text{Equação 3}$$

onde:

L = comprimento da coluna;

t_R = tempo de retenção;

t_M = tempo morto.

Para relacionar o tempo de retenção de um soluto com a sua constante de distribuição, expressa-se a velocidade de migração como uma fração da velocidade da fase móvel, mediante a equação 4⁶⁹:

$$u_x = u (1/1 + KV_E/V_M)$$

Equação 4

onde:

V_E = volume da fase estacionária;

V_M = volume da fase móvel.

O fator de retenção k' é um parâmetro importante para descrever as velocidades de migração dos solutos nas colunas. Para um soluto A, o fator de retenção pode ser calculado pela equação 5^{69,71}:

$$k'_A = t_{RA} - t_M / t_M$$

Equação 5

Idealmente, as separações são feitas em condições nas quais os fatores de retenção dos solutos em uma mistura caem no intervalo entre 2 e 10.

O fator de separação α de uma coluna para duas espécies A e B pode ser calculado pela equação 6^{69,71}:

$$\alpha = (t_R)_B - t_M / (t_R)_A - t_M$$

Equação 6

onde

$(t_R)_B$ = tempo de retenção da espécie B retida mais fortemente;

$(t_R)_A$ = tempo de retenção da espécie A retida menos fortemente ou que elui mais rapidamente.

A resolução R_s é uma medida da habilidade de uma coluna em separar dois componentes e pode ser calculado pela equação 7^{69,71}:

$$R_s = 2 ((t_R)_B - (t_R)_A) / (W_A + W_B)$$

Equação 7

W_A = largura da base do pico menos retido;

W_B = largura da base do pico mais retido..

A assimetria (A_s) é uma das formas mais comuns de se avaliar o alargamento dos picos, sendo uma medida da dispersão dos componentes da amostra no sistema cromatográfico. A assimetria pode ser calculada pela equação 8^{69,71}:

$$A_s = CB / CA$$

Equação 8

1.3.1.1.2 Eficiência da coluna

Dois termos são amplamente usados em medidas quantitativas de eficiência de coluna cromatográfica: altura equivalente a um prato teórico H e número de pratos teóricos N . Os dois termos estão relacionados pela equação 9⁶⁹:

$$N = L / H$$

Equação 9

onde:

L = comprimento da coluna empacotada.

A eficiência da coluna cromatográfica aumenta à medida que o número de pratos torna-se maior e a altura do prato diminui. A eficiência em termos de número de pratos pode variar de algumas centenas a milhares. Altura dos pratos variando de poucos décimos a um milésimo de centímetro ou ainda menores não é rara⁶⁹.

Para calcular o número de pratos N , pode usar-se a equação 10^{69,71}:

$$N = 5.54 (t_R / W_{1/2})^2$$

Equação 10

onde

$W_{1/2}$ = largura do pico na metade da sua altura máxima.

O número de pratos N e a altura do prato H são amplamente usados na literatura e pelos fabricantes de instrumentos como medidas de eficiência das colunas⁶⁹.

1.3.1.2 Instrumentação

O equipamento da HPLC consta dos seguintes componentes^{28, 69,71} (Figura 6):

Figura 6: Esquema do equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (Cortesia de Perkin Elmer-Elmer Corporation, Norwalk, CT.)

- Reservatório de fase móvel e sistema de tratamento de solventes.
- Sistema de bombeamento.
- Sistema de injeção de amostras.
- Colunas para cromatografia líquida.
- Detectores.
- Computador que registra e integra os cromatogramas.

1.3.1.3 Aplicações da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

As diversas aplicações da cromatografia líquida de alta eficiência estão baseadas nos tipos de fase estacionária, que implicam em quatro mecanismos diferentes, mediante a simples troca de coluna e de fase móvel^{28,69,71} (Figura 7):

Figura 7: Aplicações da cromatografia líquida de alta eficiência (D.L. Saunders, in Chromatography, 3rd. Ed., E. Heftmann, Ed., 81. New York: Van Nostrand Reinhold, 1975).

- Cromatografia líquido-sólido ou por adsorção.
- Cromatografia de partição.
 - Cromatografia líquido-líquido.
 - Cromatografia de fase ligada.
- Cromatografia por exclusão.
- Cromatografia por troca iônica.

1.3.1.4 Vantagens e limitações

As principais vantagens são²⁸:

- Menor tempo de análise, devido à alta eficiência da coluna e à vazão rápida da fase móvel através da coluna.
- Alta resolução, pela possibilidade de análise de misturas complexas.
- Resultados quantitativos de fácil execução e grande precisão.
- Boa sensibilidade pelo uso de detectores que permitem medidas em nanogramas.
- Versatilidade: pode ser aplicada a compostos orgânicos e inorgânicos, amostras líquidas ou sólidas, iônicas ou covalentes.
- Automatização conseguida com o emprego de microcomputadores conjugados ao sistema cromatográfico.

As principais limitações são²⁸:

- Alto custo de instrumentação, representando alto investimento.
- Alto custo de operação pelo custo elevado das fases móveis de alto grau de pureza e pela contínua reposição das fases estacionárias.
- Falta de detector que seja simultaneamente universal e sensível.

1.3.2 Eletroforese capilar (CE)

A eletroforese capilar (CE) é uma versão instrumental da eletroforese, desenvolvida e usada a partir dos anos 1980, tornando-se um importante método de separação usado por químicos e profissionais de ciências da vida⁶⁹.

A eletroforese capilar é definida como o transporte de partículas ou solutos eletricamente carregados num meio líquido sob a influência de um campo elétrico¹⁷.

A CE oferece várias vantagens, entre elas: alta eficiência, separações rápidas e relativamente econômicas, pequenos volumes de injeção de amostra,

pequenas quantidades de reagentes e possibilidade de se analisar simultaneamente compostos polares e não-polares^{9,17}.

1.3.2.1 Princípios de separação

Os princípios de separação da amostra aqui descritos são aplicados à eletroforese capilar em zona.

A velocidade do fluxo eletrosmótico¹⁷ (V_{EOF}) pode ser calculada pela equação 11:

$$v_{EOF} = \epsilon \zeta E / 4 \pi \eta$$

Equação 11

onde:

V_{EOF} : velocidade do fluxo eletrosmótico;

ϵ : constante dielétrica do tampão;

ζ : potencial zeta;

E : campo elétrico em volts cm^{-1} ;

η : viscosidade do tampão.

A mobilidade eletrosmótica¹⁷ (μ_{EOF}) do tampão é dada pela equação 12:

$$\mu_{EOF} = \epsilon \zeta / 4 \pi \eta$$

Equação 12

A mobilidade eletrosmótica é dependente somente das características do tampão, isto é, constante dielétrica, viscosidade, pH e concentração (à qual influencia o potencial zeta), sendo independente da tensão aplicada¹⁷.

Sob a influência de um campo elétrico, um soluto eletricamente carregado migra, através do eletrólito, com velocidade eletroforética¹⁷ (V_{EP} , cm s^{-1}) (equação 13). A separação é atingida porque os solutos migram através do capilar a diferentes velocidades.

$$v_{EP} = \mu_{EP} E$$

Equação 13

onde:

μ_{EP} : mobilidade eletroforética;

E: campo elétrico.

A mobilidade eletroforética¹⁷ para os íons esféricos é dada pela equação 14:

$$\mu_{EP} = q/6\pi\eta r$$

Equação 14

onde:

μ_{EP} = mobilidade eletroforética em $\text{cm}^2/\text{V.s}$;

q = carga do íon;

η = viscosidade do eletrólito;

r = raio do soluto.

Pode-se observar, na equação 14, que quanto maior for a razão carga/tamanho (q/r), maior será a mobilidade eletroforética para determinada tensão e tampão e, portanto, maior a velocidade eletroforética (equação 13).

A velocidade eletroforética é dependente tanto da mobilidade eletroforética como da tensão aplicada. Por outro lado, a mobilidade eletroforética está relacionada apenas às propriedades do soluto e do tampão, sendo independente da tensão aplicada¹⁷.

A velocidade do soluto é influenciada pela sua mobilidade eletrosmótica e pelo fluxo eletrosmótico. A velocidade eletroforética observada¹⁷ (v_{OBS}) é dada pela equação 15:

$$v_{OBS} = v_{EP} + v_{EOF}$$

Equação 15

onde:

v_{EOF} : velocidade do fluxo eletrosmótico, em cm/s ;

v_{EP} : velocidade eletroforética.

A mobilidade eletroforética observada¹⁷ (μ_{OBS}) do soluto é dada pela sua mobilidade eletroforética e pela mobilidade eletrosmótica (equação 16):

$$\mu_{\text{OBS}} = \mu_{\text{VEF}} + \mu_{\text{EOF}} \quad \text{Equação 16}$$

O fluxo eletrosmótico (EOF) é o fluxo normalmente direcionado do ânodo para o cátodo; nestas condições, os analitos são separados de acordo com a mobilidade de cada íon. A aplicação de uma tensão através do capilar preenchido com tampão causa um fluxo que bombeia os íons ao longo do capilar, este fluxo ocorre em função da ionização dos grupos silanóis no interior do capilar. Quando em contato com o eletrólito, os grupos silanóis (Si-OH) da parede interna do capilar são ionizados a silanoatos (Si-O-) em pH maior do que 3; já em pH menor do que 3, a ionização dos grupos silanóis é pequena ou não existe^{9,66}.

Os grupos silanoatos atraem cátions carregados positivamente, provenientes do tampão, que formam uma camada interna de cátions (camada fixa) perto da parede do capilar; estes cátions não são suficientes para neutralizar todas as cargas negativas; assim, uma segunda camada de cátions é formada (camada móvel), estas duas camadas formam uma dupla camada difusa de cátions; quando uma tensão é aplicada, a camada móvel é puxada no sentido do cátodo carregado negativamente. Esta força que transporta as espécies iônicas ao longo do capilar é denominada fluxo eletrosmótico⁶⁶.

Figura 8: Representação esquemática do fluxo eletrosmótico
(http://www.chemkeys.com/bra/md/mds_11/elecav_4/fluele_2/fluele_2.htm).

A formação do EOF a partir das paredes do capilar origina um perfil radial de velocidade planar que contrasta com o perfil radial de velocidade parabólica observado nos sistemas de alta pressão, como a HPLC, o que contribui significativamente para a elevada eficiência dos picos obtidos⁶⁶.

Figura 9: Tipos de perfis radiais de velocidade de fluxo característicos dos sistemas HPLC e CE.
(http://www.chemkeys.com/bra/md/mds_11/elec4p_4/fluele_2/fluele_2.htm.)

1.3.2.2 Instrumentação

Os componentes principais do aparelho são: um capilar de diâmetro estreito (25-100 μm), que passa através do centro ótico de um sistema de detecção conectado a um dispositivo de aquisição de dados; uma fonte de alta tensão; um sistema de introdução de amostra com amostrador automático, conectado a um computador que registra e integra os eletroferogramas.

Os capilares são revestidos externamente por um polímero de poliimida, que confere alta flexibilidade ao capilar, tornando-o resistente a possíveis quebras. Estes capilares possuem normalmente de 20 a 100 cm de comprimento. O volume de injeção da amostra varia de 1 a 20 nL⁹.

Diversos tipos de detectores são utilizados em eletroforese capilar. A maioria dos métodos de CE emprega detectores baseados em absorções nas regiões UV e UV-VIS. Outros sistemas de detecção em CE incluem fluorescência induzida a laser, espectrometria de massas, amperometria, radiometria e espectrometria de Raman. Os mesmos critérios aplicados para os detectores em HPLC também são aplicados em CE, ou seja, sensibilidade, seletividade, intervalo linear de concentração e habilidade para fornecer resultados qualitativos^{9, 17}.

Figura 10: Esquema de um equipamento de eletroforese capilar (Eletroforese capilar acoplada à espectrometria com plasma: uma ferramenta eficiente para a especiação. Gervasio et al.).

1.3.2.3 Introdução da amostra

A introdução da amostra no capilar pode ser realizada por injeção hidrodinâmica e eletrocinética. A injeção hidrodinâmica é realizada por pressão, vácuo e por gravidade (sifonamento). Na injeção da amostra por pressão, a extremidade do capilar é submersa no reservatório que contém a solução da amostra, uma diferença de pressão é aplicada e a amostra é introduzida no capilar. A injeção por vácuo pode ser feita pela aplicação do vácuo no reservatório destino, enquanto o extremo do capilar está mergulhado no reservatório da amostra. Na injeção por gravidade, o capilar mergulhado no reservatório da amostra é mecanicamente elevado acima do nível do reservatório que contém o eletrólito, permitindo a introdução da amostra no capilar^{9,17}.

Para efetuar-se a injeção eletrocinética, o capilar e o ânodo são mergulhados no reservatório que contém a amostra. A tensão aplicada provoca a migração dos íons da amostra dentro do capilar, devido à mobilidade eletroforética. A quantidade da amostra injetada depende da mobilidade eletroforética dos solutos, do fluxo eletrosmótico (EOF), da tensão aplicada, do tamanho do capilar e da concentração do soluto^{9,17}.

A vantagem da injeção hidrodinâmica é que a quantidade do soluto injetada é constante, independente da sua própria mobilidade, ao contrário do que acontece quando se procede à injeção eletrocinética^{9,17}.

Figura 11: Tipos de introdução de amostra para eletroforese capilar (http://www.chemkeys.com/bra/md/mds_11/elecap_4/instru_2/instru_2.htm).

1.3.2.4 Classificação da eletroforese capilar

Os principais modos de CE desenvolvidos e atualmente aplicados incluem a eletroforese capilar de zona (CZE), a cromatografia capilar eletrocinética micelar (MEKC), a cromatografia capilar eletrocinética micelar por microemulsão (MEEKC), a eletroforese capilar em gel e a eletroforese por focalização isoelétrica.

1.3.2.4.1 Eletroforese capilar em zona (CZE)

Na eletroforese capilar por zona, a composição do tampão é constante na região da separação. O potencial aplicado faz com que os diferentes componentes iônicos da mistura migrem de acordo com a sua própria mobilidade e se separem em zonas que podem ser completamente resolvidas ou apresentar superposição parcial. A situação é análoga à eluição em cromatografia em coluna, na qual as regiões da fase móvel estão localizadas entre zonas contendo os analitos separados⁶⁹.

1.3.2.4.2 Cromatografia capilar eletrocinética micelar (MEKC)

Em 1984, Terabe e colaboradores introduziram a MEKC. Neste tipo de CE, a solução tampão contém um tensoativo que atua de maneira similar à fase estacionária de uma coluna de fase reversa em HPLC. O tensoativo é introduzido dentro do capilar em concentração acima da concentração micelar crítica. As micelas carregadas atuam como fase estacionária. Portanto, os compostos mais hidrofóbicos permanecem mais tempo na micela carregada negativamente e, conseqüentemente, eluem por último. Os compostos mais hidrofílicos não são solubilizados na micela, sendo separados de acordo com a mobilidade eletroforética. O dodecil sulfato de sódio (SDS) e o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) são os tensoativos mais empregados em cromatografia capilar eletrocinética micelar (MEKC)⁹,

1.3.2.5 Vantagens e limitações da CE

A eletroforese capilar apresenta as seguintes vantagens¹⁷:

- Separações de alta eficiência: utiliza colunas de até um milhão de pratos. A eficiência da separação está diretamente relacionada à mobilidade do soluto à alta voltagem utilizada na separação.
- Utiliza colunas capilares duradouras, o mesmo capilar pode ser utilizado para separações e análises de compostos polares, compostos não-polares, compostos quirálicos e biomoléculas de alta massa molecular.
- São requeridos volumes de injeção pequenos de amostras, na ordem de nanolitros (1 a 20 nL).
- São utilizadas quantidades pequenas de reagentes.
- As análises podem ser realizadas em grande intervalo de pH, podendo-se caracterizar o comportamento de analitos fortemente ácidos ou básicos.
- Podem ser analisados diferentes tipos de amostras pelos diversos tipos de eletroforese capilar.
- É utilizada para a determinação de constantes de dissociação, pontos isoeletrônicos de proteínas ácidas e básicas.
- A quantificação da amostra é feita em poucos minutos.

- A análise é realizada à temperatura ambiente.
- As análises são econômicas, pelo baixo consumo de reagentes em comparação com HPLC.

A maior desvantagem da CE é que não estão disponíveis os injetores de volume fixo e, portanto, a precisão da injeção pode ser mais pobre do que com HPLC, a menos que sejam empregados um padrão interno e altas concentrações da amostra^{9,17}.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral

- ✓ Este trabalho tem como objetivo geral o desenvolvimento de metodologias indicativas de estabilidade para fármacos que atuam no tratamento do diabetes tipo II.

Objetivos específicos

Como objetivos específicos, buscaram-se:

- ✓ Identificar qualitativamente a glibenclamida e o cloridrato de metformina matérias-primas, segundo os documentos oficiais.
- ✓ Determinar quantitativamente a glibenclamida e o cloridrato de metformina matérias-primas, segundo os documentos oficiais.
- ✓ Desenvolver métodos de rastreamento ortogonais utilizando as técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência e de eletroforese capilar para estes fármacos.
- ✓ Verificar a estabilidade intrínseca dos fármacos, frente a condições de degradação forçada, como termólise, hidrólise, oxidação e fotólise.
- ✓ Avaliar o desempenho dos métodos de rastreamento desenvolvidos para detectar os produtos de degradação gerados nos fármacos estudados.
- ✓ Identificar os produtos de degradação majoritários, por aplicação da técnica de espectrometria de massas.
- ✓ Otimizar as metodologias escolhidas para cada substância.
- ✓ Validar estas metodologias indicativas de estabilidade para a glibenclamida e o cloridrato de metformina em formulações farmacêuticas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Substâncias de referência

- Glibenclamida (Sigma®, lote 068K1888), pureza 100%, validade 30.05.2013.
- Cloridrato de metformina (Sigma®, lote S71577-099), pureza 97%, validade 23.11.2014.

3.1.2 Amostras

- Glibenclamida matéria-prima (Pharma Nostra, lote 06040636A), pureza 99,71%, validade Janeiro/2011.
- Cloridrato de metformina matéria-prima (Embrafarma, lote MT-12060608, pureza 99,9%, validade Maio/2013.
- Glibenclamida 5 mg com 30 comprimidos - Medley - genérico.
- Metformina 850 mg com 60 comprimidos - Biosintetica - genérico.

3.1.3 Placebos

O placebo foi formulado com os mesmos excipientes utilizados na formulação comercial utilizada na validação da metodologia. A fórmula empregada na preparação do placebo da glibenclamida foi a seguinte:

- Glibenclamida 5,00 mg (3,13%)
- Lactose monoidratada 133,28 mg (83,37%)
- Amido de milho 16,09 mg (10,00%)
- Talco 1,61 mg (1,00%)
- Dióxido de silício 2,41 mg (1,50%)
- Esterato de magnésio 1,61 mg (1,00%)

A fórmula do placebo do cloridrato de metformina foi a seguinte:

- Cloridrato de metformina 850,00 mg (95,88%)
- Povidona 26,14 mg (2,95%)
- Esterato de magnésio 5,58 mg (0,63%)
- Hipromelose 4,78 mg (0,54%)

3.1.4 Solventes e reagentes

- 1-Butanol, p.a. (Sigma Aldrich®).
- Acetato de sódio triidratado, p.a. (Carlos Erba®).
- Acetonitrila, grau cromatográfico (J. T. Baker®).
- Ácido acético glacial, p.a. (Merck®).
- Ácido bórico, grau analítico (Cinética Química® Ltda.).
- Ácido clorídrico, p.a. (Merck®).
- Ácido orto-fosfórico, p.a. (Merck®).
- Água ultrapurificada através do sistema Direct-Q® 3 UV (Millipore®).
- Álcool metílico, grau cromatográfico (J. T. Baker®).
- Carbonato de amônio, p.a. (Synth®).
- Cicloexano, p.a. (Malinckrodt®).
- Cloreto de sódio p.a., (Fmaia®).
- Diclorometano, grau cromatográfico (Tedia®).
- Dodecil sulfato de sódio, p. a. (Sigma®).
- Etanol, grau cromatográfico (Merck®).
- Ferricianeto de Potássio, p.a. (Merck®).
- Fosfato de sódio monobásico mono hidratado, para eletroforese (Sigma®).
- Fosfato de sódio dibásico, p. a.(Sigma®).
- Heptanossulfonato de sódio p.a. (J. T. Baker®).
- Hidróxido de sódio, p.a. (Merck®).
- Imidazol, grau analítico (Merck®).
- Nitroprusiato de sódio, p.a. (Merck®).
- Peróxido de hidrogênio, p.a. (Merck).
- Tetraborato de sódio decaidratado, grau analítico (Merck®).
- Trietilamina, para síntese (Merck®).

3.1.5 Soluções e tampões

- Solução tampão de acetato de sódio 100 mmol/L: foram pesados 1,3608 g de acetato de sódio triidratado, transferidos para balão volumétrico de 100 mL e dissolvidos em água ultrapura Milli-Q, com ajuda de aparelho de ultrassom.

- Solução de ácido bórico 100 mmol/L: foram pesados 0,6183 g de ácido bórico, transferidos para balão volumétrico de 100 mL e dissolvidos em água ultrapura Milli-Q, com ajuda de aparelho de ultrassom.
- Solução tampão carbonato de amônio 100 mmol/L: foram pesados 0,9609 g de carbonato de amônio, transferidos para balão volumétrico de 100 mL e dissolvidos com água ultrapura Milli-Q com ajuda de aparelho de ultrassom.
- Solução de dodecil sulfato de sódio 100 mmol/L: foram pesados 2,8838 g de dodecil sulfato de sódio, transferidos para balão volumétrico de 100 mL e dissolvidos com água ultrapura Milli-Q com ajuda de aparelho de ultrassom.
- Solução tampão fosfato monobásico 100 mmol/L: foram pesados 1,3799 g de fosfato de sódio monobásico, transferidos para balão volumétrico de 100 mL e dissolvidos em água ultrapura Milli-Q com ajuda de aparelho de ultrassom.
- Solução tampão cloreto de sódio 8,5 mmol/L + heptanossulfonato de sódio 2,5 mmol/L pH 3,85: foram pesados 1,0 g de cloreto de sódio e 1,0 g de heptanossulfonato de sódio e foram transferidos para béquer de 2.000 mL e acrescentou-se 1.800 mL de água ultrapura Milli-Q e dissolvidos com ajuda de aparelho de ultrassom por 10 minutos, retirou e ajustou-se o pH para 3,85 com ácido fosfórico e transferiu-se para balão volumétrico de capacidade de 2.000 mL e completou-se com água ultrapura.
- Solução tampão fosfato dibásico 100 mmol/L: foram pesados 1,4196 g de fosfato de sódio dibásico, transferidos para balão volumétrico de 100 mL e dissolvidos em água ultrapura Milli-Q com ajuda de aparelho de ultrassom.
- Solução de imidazol 100 mmol/L: foram pesados 0,6808 g de imidazol, transferidos para balão volumétrico de 100 mL e dissolvidos em água ultrapura Milli-Q com ajuda de aparelho de ultrassom.
- Solução tampão tetraborato de sódio 100 mmol/L: foram pesados 3,8137 g de tetraborato de sódio, transferidos para balão volumétrico de 100 mL e dissolvidos com água ultrapura Milli-Q com ajuda de aparelho de ultrassom.
- Solução tampão trietilamina 100 mmol/L: foram medidos 0,70 mL de trietilamina, transferidos para balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com água ultrapura Milli-Q.

- Solução tampão borato 100 mmol/L (pH 9,0): foram transferidos 50 mL de tampão tetraborato de sódio 100 mmol/L para a mesma quantidade de ácido bórico na concentração de 100 mmol/L.

3.1.6 Equipamentos

- Aparelho para determinação de ponto de fusão marca Stuart Scientific SMP1.
- Aparelho para banho de ultrassom, modelo Q335D marca Quimis.
- Balança analítica, modelo AB204, marca Mettler Toledo.
- Banho-maria, modelo 31416, marca Nova Etica.
- Bomba de vácuo, modelo Q-355B2 marca Quimis.
- Câmara de fotoestabilidade, modelo FARMA 424, marca Nova Etica.
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência, marca Shimadzu, composto pelos seguintes módulos: dois sistemas de bombeamento de solvente, ambos do modelo LC-ADvp; sistema de degaseificação on-line, modelo DGU-14A; injetor automático com *loop* de volume variável (de 0,1 µL a 50 µL), modelo SIL-10ADvp; forno para coluna, modelo CTO-10ACvp; detector com arranjo de diodos UV-Vis, modelo SPD-M10Avp; controlador de sistema, modelo SCL-10Avp; operado em conjunto com o *software* Class-VP, versão 5.032, para aquisição e tratamento de dados;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (Surveyor-Thermo Electron), com detector de arranjo de diodos (PDA-Surveyor) e com amostrador automático (Surveyor-Autosampler);
- Espectro de massas íon trap (armadilha de íons) LCQ Deca XP MAX, equipado com fonte de ionização do tipo *electrospray* e controlado pelo *software* Finnigan Xcalibur 1.4 SR1, marca Finnigan (Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts, EUA);
- Espectrofotômetro de UV-Vis, modelo UV-1601, operado em conjunto com o *software* Personal Spectroscopy Software (UVPC), versão 3.91 marca Shimadzu;
- Espectrômetro de infravermelho, serie Michelson MB, modelo MB-100, operado em conjunto com o *software* GRAMS/AI, versão 7.00, marca Bomem;
- Estufa de secagem, modelo 315-SE, marca Fanem;

- Medidor de pH, marca Digimed, modelo DM-21, equipado com eletrodo combinado de pH, marca Digimed, modelo DME-CV1;
- Purificador de água, modelo Direct-Q®3 UV marca Millipore;
- Sistema de eletroforese capilar modelo P/ACE 5510, Beckman and Coulter Instruments, Fullerton, CA (USA), equipado com detectores UV-Vis, arranjo de diodos e fluorescência induzida por *laser*, operado em conjunto com o *software* 32 Karat 8.0 para aquisição e tratamento de dados.

3.1.7 Consumíveis e outros materiais

- Capilar de sílica fundida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, EUA), revestidos externamente com poliimida, com comprimento total de 40,2 cm e 75 µm de diâmetro interno.
- Coluna cromatográfica Bondclone® C18, 300 x 3,9 mm, tamanho de partícula 10 µm, Phenomenex®.
- Coluna cromatográfica Synergi-Polar® RP, 250 x 3,9 mm, tamanho de partícula 5 µm, Phenomenex®.
- Coluna cromatográfica Luna® Amino, 150 x 3,9 mm, tamanho de partícula 5 µm, Phenomenex®.
- Coluna cromatográfica Kinetex PFP 100Å 150 x 2,1 mm, tamanho de partícula 2,6µm, Phenomenex.
- Filtro HPLC KrudKatcher Ultra InLine, Phenomenex.
- Membranas filtrantes HPDV, com 47 mm de diâmetro e poro de 0,45 µm, marca Millipore®.
- Unidade filtrante FG Millex em polietileno c/membrana em politetrafluoretileno (PTFE) com 13 mm de diâmetro e poro de 0,22 µm, marca Millipore®.
- Unidade filtrante FG Millex em polietileno c/membrana em HPVP com 13 mm de diâmetro e poro de 0,45 µm, marca Millipore®.

3.2 Métodos

O desenvolvimento de metodologias indicativas de estabilidade nesta pesquisa foi planejado para cumprir as etapas que estão apresentadas no esquema a seguir:

3.2.1 Glibenclamida

3.2.1.1 Determinação qualitativa e quantitativa da glibenclamida matéria-prima

3.2.1.1.1 Ponto de fusão

A glibenclamida (matéria-prima) foi colocada em um tubo capilar de vidro com uma das extremidades selada. Começou-se o aquecimento a razão de 5 °C/min.; quando a temperatura ficou 10 °C abaixo do início da fusão (teórico), reduziu-se a velocidade de aquecimento a cerca de 1 °C/min. O ensaio foi realizado em triplicata³¹.

3.2.1.1.2 Espectrofotometria ultravioleta/visível

Foram pesados 50,0 mg de glibenclamida (matéria-prima), transferidos para balão volumétrico de 50 mL, dissolvidos em metanol, com a ajuda de banho de ultrassom, e completados com o mesmo solvente. Desta solução, transferiu-se uma alíquota de 10 mL para um balão de 100 mL, acrescentaram-se 1,0 mL de uma solução de ácido clorídrico (3 M) e o volume foi completado com metanol. Obteve-se a concentração final de 100 µg/mL de glibenclamida. O espectro de absorção desta solução foi determinado na faixa de 230 a 350 nm³¹.

3.2.1.1.3 Espectrometria no infravermelho

Foi misturada uma quantidade da glibenclamida (matéria-prima) com sal de brometo de potássio. Esta mistura foi triturada e prensada, a fim de ser identificada espectroscopicamente. O espectro foi comparado com espectros relatados na literatura^{31,79}.

3.2.1.1.4 Cromatografia em camada delgada

Examinou-se, por cromatografia em camada delgada, a glibenclamida, usando-se uma placa revestida com sílica gel contendo indicador de fluorescência a 254 nm.

Solução teste: dissolveram-se 10 mg da glibenclamida (matéria-prima) em 10 mL de uma mistura de volumes iguais de metanol e diclorometano e se completou o volume com a mistura.

Solução de referência: dissolveram-se 10 mg de glibenclamida padrão em uma mistura de volumes iguais de metanol e diclorometano e diluíram-se a 10 mL com o mesmo solvente.

Aplicaram-se, separadamente, 10 µL de cada solução na placa cromatográfica, desenvolvendo-os sobre um caminho de 10 cm, usando, como fase móvel, uma mistura de álcool etílico, ácido acético glacial, cicloexano e diclorometano 5:5:45:45 v/v/v/v, respectivamente. Examinou-se com luz ultravioleta a 254 nm³¹.

3.2.1.1.5 Determinação do teor de glibenclamida

Dissolveram-se 400 mg de glibenclamida (matéria-prima) em 100 mL de álcool etílico com ajuda de calor. Titulou-se com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 M, utilizando 1,0 mL de fenolftaleína como indicador. Cada mL de hidróxido de sódio 0,1M equivale a 49,40 mg de glibenclamida³¹.

3.2.1.2 Desenvolvimento de metodologias analíticas de rastreamento

Um método indicativo de estabilidade ideal é capaz de resolver o pico do ativo de seus produtos de degradação e destes entre si, de modo que todos os produtos de degradação sejam detectados e se estabeleçam seus fatores de resposta relativos com referência ao ativo. Uma vez que é difícil desenvolver um método que satisfaça todos estes requisitos no início do desenvolvimento, o foco foi desenvolver métodos de rastreamento ortogonais que tivessem a probabilidade de resolução e detecção de um conjunto diversificado de produtos de degradação com tempos de análise amplos, o que poderia dar resultado nestes casos.

3.2.1.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Foi preparada uma solução estoque de glibenclamida padrão na concentração de 1,0 mg/mL; para isso, foram pesados 10,0 mg de glibenclamida, transferidos para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com metanol. Esta solução foi mantida na geladeira durante o período do desenvolvimento da metodologia. Para cada dia de trabalho, transferiu-se uma alíquota de 0,2 mL da solução estoque para tubo “Eppendorf”

com capacidade de 2,0 mL e acrescentaram-se 1,80 mL de metanol. Esta solução foi filtrada através de filtro 0,45 µm PVDF Millipore® e injetada no sistema cromatográfico. Todas as fases móveis testadas foram preparadas diariamente, filtradas através de membrana HV 0,45 µm Millipore® e sonicadas durante 30 minutos. Os sistemas cromatográficos avaliados podem ser vistos na Quadro 3.

Sistema	Fase estacionária	Modo	Fase móvel	pH	Temp. (°C)	λ (nm)	Vazão (mL.min ⁻¹)	Volume de injeção (µL)
01	Coluna C18**	Gradiente	Metanol: Água 5 a 100%	---	25	220	1,0	20
02	Coluna C18**	Gradiente	Acetonitrila: Água 5 a 100%	---	25	220	1,0	20
03	Coluna C18**	Gradiente	Metanol: Água 10-100%	3,50*	25	220	1,0	20
04	Coluna C18**	Gradiente	Metanol: TEA 20 mmol/L 20 a 100%.	5,60*	25	220	1,0	20
05	Coluna Fenil-Polar***	Gradiente	Acetonitrila: Água 5 a 100%	---	25	220	1,0	20
06	Coluna Fenil-Polar***	Gradiente	Acetonitrila: Água 5 a 100%	3,35*	25	220	1,0	20

Quadro 3: Sistemas cromatográficos avaliados no desenvolvimento de metodologias de rastreamento para glibenclamida.

* O pH foi ajustado com ácido fosfórico 10%

** Coluna cromatográfica Bondclone® C18, 300 x 3,9 mm, tamanho de partícula 10 µm, Phenomenex®.

*** Coluna cromatográfica Synergi-Polar® RP, 250 x 3,9 mm, tamanho de partícula 5 µm, Phenomenex®.

3.2.1.2.2 Eletroforese capilar (CE)

3.2.1.2.2.1 Eletroforese capilar em solução livre (CZE)

Foi preparada uma solução estoque de glibenclamida padrão na concentração de 1,0 mg/mL; para isso, foram pesados 10,0 mg de glibenclamida, transferidos para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com metanol. Esta solução foi mantida na geladeira durante o período do desenvolvimento da metodologia. Para cada dia de trabalho, transferiu-se uma alíquota de 0,2 mL da solução estoque para tubo “Eppendorf” com capacidade de 2,0 mL e se acrescentaram 1,80 mL de metanol. Esta solução foi filtrada através de filtro 0,45 µm PVDF Millipore® e injetada no sistema eletroforético.

No início de cada dia de análise, o capilar foi acondicionado com hidróxido de sódio 0,1 mol/L durante 30 minutos; em seguida, com água Milli-Q durante 15 minutos e, por último, com o eletrólito de corrida por 30 minutos. Entre cada corrida o capilar foi lavado com hidróxido de sódio durante 0,5 minutos; em seguida, com água Milli-Q durante 1,5 minutos e com eletrólito de corrida por 1,5 minutos. Na troca de eletrólitos, o novo eletrólito a ser testado foi acondicionado pelo período de 10 minutos

3.2.1.2.2.2 Cromatografia eletrocínética micelar (MEKC)

Foi preparada uma solução estoque de glibenclamida padrão na concentração de 1,0 mg/mL; para isso, foram pesados 10,0 mg de glibenclamida, transferidos para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com metanol. Esta solução foi mantida na geladeira durante o período do desenvolvimento da metodologia. Para cada dia de trabalho, transferiu-se uma alíquota de 0,2 mL da solução estoque para tubo *Eppendorf* com capacidade de 2,0 mL e se acrescentaram 1,80 mL de água ou eletrólito ou metanol. A solução foi filtrada através de filtro 0,45 µm PVDF Millipore® e injetada no sistema eletroforético. Todos os eletrólitos foram preparados diariamente e filtrados através de unidade filtrante de 0,45 µm Millipore® (PVDF). Os sistemas eletroforéticos avaliados podem ser vistos no Quadro 4.

Ao se iniciar cada dia de análise, o capilar foi acondicionado com hidróxido de sódio 0,1 mol/L durante 30 minutos; em seguida, com água Milli-Q durante 15 minutos e, por último, com o eletrólito de corrida por 30 minutos. Entre cada corrida analítica, o capilar foi lavado com hidróxido de sódio durante 0,5 minutos, depois com água Milli-Q durante 1,5 minutos e eletrólito de corrida por 1,5 minutos. Na troca de eletrólitos, o novo eletrólito a ser testado foi acondicionado pelo período de 10 minutos

Sistema	Eletrólito	pH	Tensão (kV)	Injeção (psi/s)	T (°C)	λ (nm)	Segunda diluição
1	Tampão tetraborato de sódio 10 mmol/L: Dodecil sulfato de sódio 30 mmol/L	9,28	+15,0	0,3/3	25	225	água
2	Tampão tetraborato de sódio 10 mmol/L: Dodecil sulfato de sódio 30 mmol/L	9,28	+15,0	0,3/3	25	225	eletrólito
3	Tampão tetraborato de sódio 10 mmol/L: Dodecil sulfato de sódio 30 mmol/L	9,28	+15,0	0,3/3	25	225	metanol
4	Tampão tetraborato de sódio 20 mmol/L: Dodecil sulfato de sódio 30 mmol/L	9,25	+15,0	0,3/3	25	225	água
5	Tampão tetraborato de sódio 20 mmol/L: Dodecil sulfato de sódio 30 mmol/L	9,25	+15,0	0,3/3	25	225	eletrólito
6	Tampão tetraborato de sódio 20 mmol/L: Dodecil sulfato de sódio 30 mmol/L	9,25	+15,0	0,3/3	25	225	metanol
7	Tampão tetraborato de sódio 20 mmol/L: Dodecil sulfato de sódio 30 mmol/L	9,25	+15,0	0,5/5	25	225	água
8	Tampão tetraborato de sódio 20 mmol/L: Dodecil sulfato de sódio 30 mmol/L	9,25	+15,0	0,5/5	25	225	eletrólito
9	Tampão tetraborato de sódio 20 mmol/L: Dodecil sulfato de sódio 30 mmol/L	9,25	+15,0	0,5/5	25	225	metanol
10	Tampão borato 10 mmol/L: Tampão fosfato de sódio dibásico 20 mmol/L: SDS 20 mmol/L: acetonitrila 10%	9,00	+10,0	0,5/5	25	225	água
11	Tampão borato 20 mmol/L: Tampão fosfato de sódio dibásico 10 mmol/L: SDS 20 mmol/L: acetonitrila 10%	9,00	+10,0	0,5/5	25	225	água

12	Tampão borato 20 mmol/L: Tampão fosfato de sódio dibásico 20 mmol/L: SDS 20 mmol/L	9,00	+10,0	0,5/5	25	225	água
13	Tampão borato 20 mmol/L: Tampão fosfato de sódio dibásico 20 mmol/L: SDS 20 mmol/L: acetonitrila 10%	7,15	+10,0	0,5/5	25	225	água
14	Tampão borato 20 mmol/L: Tampão fosfato de sódio dibásico 20 mmol/L: SDS 20 mmol/L: acetonitrila 10%	8,70	+10,0	0,5/5	25	225	água
15	Tampão borato 20 mmol/L : Tampão fosfato de sódio dibásico 20 mmol/L: SDS 20 mmol/L: acetonitrila 10%	9,00	+10,0	0,5/5	25	225	água
16	Tampão borato 20 mmol/L: Tampão fosfato de sódio dibásico 20 mmol/L: SDS 20 mmol/L: acetonitrila 10%	9,00	+10,0	0,5/5	25	225	eletrólito
17	Tampão borato 20 mmol/L : Tampão fosfato de sódio dibásico 20 mmol/L: SDS 30 mmol/L: acetonitrila 10%	9,00	+15,0	0,5/5	25	225	água
18	Tampão borato 20 mmol/L : Tampão fosfato de sódio dibásico 20 mmol/L: SDS 30 mmol/L: acetonitrila 10%	9,00	+12,0	0,5/5	25	225	água
19	Tampão borato 20 mmol/L: Tampão fosfato de sódio dibásico 20 mmol/L: SDS 30 mmol/L: acetonitrila 10%	9,00	+10,0	0,5/5	25	225	água
20	Tampão borato 20 mmol/L: Tampão fosfato de sódio dibásico 20 mmol/L: SDS 30 mmol/L: acetonitrila 10%	9,00	+10,0	0,5/5	25	225	eletrólito
21	Tampão borato 20 mmol/L: Tampão fosfato de sódio dibásico 20 mmol/L: SDS 30 mmol/L: acetonitrila 10%	9,00	+10,0	0,5/5	25	225	metanol
22	Tampão borato 20 mmol/L: Tampão fosfato de sódio dibásico 20 mmol/L: dodecil sulfato de sódio (SDS) 50 mmol/L	8,90	+15,0	0,3/3	25	225	água
23	Tampão borato 20 mmol/L: Tampão fosfato de sódio dibásico 20 mmol/L: SDS 50 mmol/L	8,90	+10,0	0,3/3	20	225	água
24	Tampão borato 20 mmol/L: Tampão fosfato de sódio dibásico 20 mmol/L: SDS 50 mmol/L	8,90	+13,0	0,3/3	20	225	água

25	Tampão borato 20 mmol/L: Tampão fosfato de sódio dibásico 20 mmol/L: SDS 50 mmol/L	8,90	+10,0	0,5/5	25	225	água
26	Tampão borato 20 mmol/L: Tampão fosfato de sódio dibásico 20 mmol/L: SDS 50 mmol/L	8,90	+12,0	0,3/3	25	225	água
27	Tampão borato 20 mmol/L: Tampão fosfato de sódio dibásico 20 mmol/L: SDS 50 mmol/L	8,90	+10,0	0,3/3	30	225	água
28	Tampão borato 20 mmol/L: Tampão fosfato de sódio dibásico 20 mmol/L: SDS 50 mmol/L	8,90	+10,0	0,3/3	30	225	eletrólito
29	Tampão borato 20 mmol/L: Tampão fosfato de sódio dibásico 20 mmol/L: SDS 50 mmol/L	8,90	+10,0	0,3/3	30	225	metanol
30	Tampão borato 20 mmol/L: Tampão fosfato de sódio dibásico 20 mmol/L: SDS 50 mmol/L	8,90	+10,0	0,3/3	35	225	água
31	Tampão borato 20 mmol/L: Tampão fosfato de sódio dibásico 20 mmol/L: SDS 50 mmol/L	8,90	+10,0	0,3/3	35	225	eletrólito
32	Tampão borato 20 mmol/L: Tampão fosfato de sódio dibásico 20 mmol/L: SDS 50 mmol/L	8,90	+10,0	0,3/3	35	225	metanol
33	Tampão borato 20 mmol/L: Tampão fosfato de sódio dibásico 20 mmol/L: SDS 50 mmol/L: acetonitrila 10%	8,90	+13,0	0,3/3	20	225	água
34	Tampão borato 20 mmol/L: Tampão fosfato de sódio dibásico 20 mmol/L: SDS 50 mmol/L: acetonitrila 10%	8,90	+15,0	0,3/3	20	225	água
35	Tampão borato 20 mmol/L: Tampão fosfato de sódio dibásico 20 mmol/L: SDS 50 mmol/L: acetonitrila 10%	8,90	+15,0	0,3/3	25	225	eletrólito
36	Tampão borato 20 mmol/L: Tampão fosfato de sódio dibásico 20 mmol/L: SDS 50 mmol/L: Metanol 5%	8,90	+13,0	0,3/3	20	225	água

Quadro 4: Sistemas eletroforéticos avaliados no desenvolvimento da metodologia de rastreamento utilizando a cromatografia eletrocinética micelar para glibenclamida.

3.2.1.3 Degradação forçada da glibenclamida

3.2.1.3.1 Degradação por termólise

Foram preparadas três amostras, nas quais foram pesadas 4,5 mg de matéria-prima de glibenclamida, as quais foram transferidos para três frascos de 15 mL; em seguida, estes frascos foram rotulados e lacrados, como está retratado na Figura 12.

Figura 12: Frasco utilizado na degradação forçada.

Os frascos foram colocados em estufa a 70 °C por 7, 14 e 21 dias (Figura 13); após esses períodos, adicionaram-se aos frascos 15 mL de metanol, obtendo-se concentração de 0,30 mg/mL. Esta solução foi homogeneizada, filtrada, através de unidade filtrante 0,45 µm Millipore® (millex PVDF), e, por último, injetou-se nos equipamento de cromatografia e de eletroforese capilar.

Figura 13: Amostra submetidas à degradação forçada por termólise.

3.2.1.3.2 Degradação por hidrólise

Foram pesados 4,5 mg de matéria-prima de glibenclamida, os quais foram transferidos para frasco de 15 mL. Em seguida, adicionaram-se ao frasco 5 mL de água. O frasco foi colocado em banho-maria, a 70°C durante, uma semana (Figura 14). Posteriormente, a solução foi diluída com 10 mL de metanol, para se obter concentração de 0,30 mg/mL. Esta solução foi homogeneizada, filtrada, através de unidade filtrante 0,45 µm Millipore® (millex PVDF), e, por último, injetou-se a solução nos equipamento de cromatografia e de eletroforese capilar.

Figura 14: Amostras submetidas à degradação em banho-maria.

3.2.1.3.3 Degradação por hidrólise ácida

Foram pesados 4,5 mg de matéria-prima de glibenclamida, os quais foram transferidos para frasco de 15 mL. Em seguida, adicionaram-se ao frasco 5 mL HCl 0,1 M. O frasco foi colocado em banho-maria a 70°C durante uma semana. Posteriormente, a solução foi diluída com 10 mL de metanol, para se obter a concentração de 0,30 mg/mL. Esta solução foi homogeneizada, filtrada, através de unidade filtrante 0,45 µm Millipore® (millex PVDF), e, por último, injetou-se a solução nos equipamento de cromatografia e de eletroforese capilar.

Na segunda etapa da degradação forçada, a glibenclamida foi exposta a HCl 0,1 mol/L em banho-maria a 70°C durante 2 horas.

3.2.1.3.4 Degradação por hidrólise básica

Foram pesados 4,5 mg de matéria-prima de glibenclamida, os quais foram transferidos para frasco de 15 mL. Em seguida, adicionaram-se ao frasco 5 mL de NaOH 0,1 M. O frasco foi colocado em banho-maria a 70°C durante uma semana. Posteriormente, a solução foi diluída com metanol, para se obter a concentração de 0,30 mg/mL. Esta solução foi homogeneizada, filtrada, através de unidade filtrante 0,45 µm Millipore® (millex PVDF), e, por último, injetou-se a solução nos equipamento de cromatografia e de eletroforese capilar.

3.2.1.3.5 Degradação por hidrólise neutra

Foram pesados 4,5 mg de matéria-prima de glibenclamida, os quais foram transferidos para frasco de 15 mL. Em seguida, adicionaram-se ao frasco 5 mL solução tampão fosfato dibásico 100 mmol/L (Na_2HPO_4) pH 8,0. O frasco foi colocado em banho-maria a 70°C durante uma semana. Posteriormente, a solução foi diluída com metanol, para se obter uma concentração de 0,30 mg/mL. Esta solução foi homogeneizada, filtrada, através de unidade filtrante 0,45 µm Millipore® (millex PVDF), e, por último, injetou-se a solução nos equipamento de cromatografia e de eletroforese capilar.

3.2.1.3.6 Degradação por oxidação

Foram pesados 4,5 mg de matéria-prima de glibenclamida, os quais foram transferidos para frasco de 15 mL. Em seguida, adicionaram-se aos frascos 5 mL de peróxido de hidrogênio 0,3% (H_2O_2). O frasco foi colocado em ambiente protegido da luz durante uma semana. Posteriormente, a solução foi diluída com metanol, para se obter a concentração de 0,30 mg/mL. Esta solução foi homogeneizada, filtrada, através de unidade filtrante 0,45 µm Millipore® (millex PVDF), e, por último, injetou-se a solução nos equipamento de cromatografia e de eletroforese capilar.

3.2.1.3.7 Degradação por fotólise

Foram pesados 4,5 mg de matéria-prima de glibenclamida, os quais foram transferidos para frasco ampola de 15 mL, em seguida estes frascos foram lacrados. Os frascos foram expostos à condição ICH, opção 2, por 60 horas,

sob temperatura de $25 \pm 0,5$ °C. Manteve-se o controle protegido da luz com papel alumínio durante o mesmo período. Em seguida, adicionaram-se aos frascos 15 mL de metanol, obtendo-se a concentração de 0,30 mg/mL. Esta solução foi homogeneizada, filtrada, através de unidade filtrante 0,45 μ m Millipore® (millex PVDF), e, por último, injetou-se a solução nos equipamento de cromatografia e de eletroforese capilar.

Figura 15: Ampolas de vidro nas quais foi conduzida a fotólise.

3.2.1.4 Identificação dos produtos de degradação forçada mediante espectrometria de massas

A determinação e a identificação do fármaco e seus produtos de degradação, originados durante a degradação forçada, foram realizadas por meio de um sistema de cromatografia líquida (Thermo, EUA), acoplado a um sistema de espectrometria de massa (Thermo, EUA), aplicando ionização por *electrospray* no modo positivo (ESI(+)), com analisador ion trap. As separações em HPLC-MS foram realizadas com uma coluna HPLC Kinetex 2,6 μ m PFP 100 Å 150 x 2,1 mm I.D., equipada com filtro HPLC KrudKatcher Ultra InLine. Foi utilizado gradiente de eluição de (A) água ultrapura em combinação com (B) acetonitrila, ambas com pH de 3,35 (ajustado com ácido acético). O gradiente foi programado do seguinte modo: início com 95%A/5%B, enquanto a

concentração aumentava linearmente até 0%A/100%B em 60 minutos, com fluxo de 0,3 mL/min. A análise e o processamento dos dados foram realizados por meio do *software* Xcalibur 2.0 (Thermo Electron, EUA).

3.2.1.5 Aprimoramento da metodologia desenvolvida

Com o objetivo de diminuir o tempo de análise da metodologia, esta foi otimizada a partir de mudanças no perfil do gradiente.

Os principais sistemas que foram testados estão descritos no quadro 5.

Sistema 1		Sistema 2		Sistema 3		Sistema 4		Sistema 5	
t (min)	% (ACN)	t (min)	% (ACN)	t (min)	% (ACN)	t (min)	% (ACN)	t (min)	% (ACN)
0	5	0,00	30	0,00	30	0,00	30	0,00	30
60	100	9,50	43	6,00	38	5,00	38	5,00	38
61	5	14,00	60	11,00	60	11,00	70	10,00	70
75	5	21,00	60	18,00	60	16,00	70	14,00	70
		22,00	30	19,00	30	17,00	30	15,00	30
		28,00	30	25,00	30	23,00	30	20,00	30

Quadro 5: Principais sistemas testados no aprimoramento da metodologia.

ACN: Acetonitrila

3.2.1.6 Validação da metodologia desenvolvida utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Preparação da solução estoque de glibenclamida

Foram pesados 60 mg de glibenclamida padrão e transferidos para um balão volumétrico de 100 mL. Foram adicionados 75 mL de acetonitrila e transferidos para banho ultrassom por 30 minutos para completa solubilização. Completou-se o volume com o mesmo solvente e obteve-se a concentração de 0,60 mg/mL de glibenclamida.

Condições Cromatográficas

Foram utilizados os seguintes parâmetros:

- ✓ Fase estacionária: coluna Synergi Polar Phenomenex 150 x 4,6 mm; 5 µm de diâmetro interno.
- ✓ Fase móvel:
 - Canal A: tampão de acetato de amônio 0,005M

- Canal B: acetonitrila
- ✓ Eluição: gradiente

Tabela 1: Gradiente de eluição da metodologia

Tempo (minutos)	% de Acetonitrila
0,01	30
5,00	38
10,00	70
14,00	70
15,00	30
20,00	30

- ✓ Vazão da fase móvel: 1,40 mL/min.
- ✓ Temperatura da coluna: 25 °C
- ✓ Volume de injeção: 10 µL
- ✓ Comprimento de onda: 225 nm
- ✓ Tempo de corrida: 20 minutos

3.2.1.6.1 Especificidade

A especificidade de um método analítico representa sua capacidade em determinar de forma inequívoca, o analito na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, tais como outros ingredientes ativos, impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.

Pesquisa de interferentes a partir do placebo

Foram pesados cerca de 480,0 mg do placebo de glibenclamida comprimidos para balão volumétrico de 50,0 mL, adicionaram-se 30,0 mL de acetonitrila e sonificados por 10 minutos; em seguida, foram completados com o mesmo solvente. Após, foram filtrados em membrana PVDF de porosidade 0,45 µm. Esta solução foi injetada ao equipamento em triplicata.

Pesquisa de interferentes a partir do teste da degradação forçada

O teste de estresse foi realizado para avaliar possíveis degradações no produto que possam interferir na quantificação do pico de interesse e que possam ser detectadas utilizando métodos indicativos de estabilidade.

Para avaliação do teste de estresse, o padrão, a amostra e o placebo foram submetidos às seguintes condições: reação com NaOH 0,1 M; reação com HCl 0,1 M; reação com H₂O₂; aquecimento e fotoestabilidade.

As amostras submetidas às condições de estresse foram avaliadas nos tempos inicial, 24, 48, 120 e 168 horas. O estudo foi interrompido no momento em que houve decomposição de 10 a 30% do ativo. Caso não ocorra degradação no período máximo de 7 dias, o ativo tem que ser considerado estável.

3.2.1.6.2 Linearidade para o teor

Foram transferidas alíquotas de 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 e 6,0 mL da solução estoque padrão (glibenclamida 0,60 mg/mL) para balões volumétricos de 10,0 mL. Depois, foram completados os volumes de cada balão com acetonitrila. Obtiveram-se concentrações finais de 0,210; 0,240; 0,270; 0,30; 0,330 e 0,360 mg/mL de glibenclamida.

A linearidade do método para glibenclamida foi construída a partir dos resultados encontrados.

3.2.1.6.3 Linearidade para os produtos de degradação

A linearidade do método para os produtos de degradação da glibenclamida, foi planejada para adequar aos limites, indicados na guia do ICH Q3B(R2); estes limites foram calculados a partir da dose máxima diária de administração da glibenclamida, a saber::

- Limite de notificação: 0,3 µg/ml (0,1%)
- Limite de quantificação: 0,6 µg/mL (0,2%)
- Limite de qualificação: 1,5 µg/mL (0,5%)

Para isto, foi transferida uma alíquota de 1,0 mL da solução estoque padrão (glibenclamida 0,60 mg/mL) para balão volumétrico de 100,0 mL e se completou a volume com acetonitrila. Em seguida, foram transferidas alíquotas de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 mL para balões de 20,0 mL e após, foram completados os volumes de cada balão com o mesmo solvente. Obtiveram-se concentrações finais de 0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5 e 1,8 µg/mL de glibenclamida.

A linearidade do método para os produtos de degradação da glibenclamida, foi construída a partir dos resultados encontrados.

3.2.1.6.4 Limite de detecção (DL) e limite de quantificação (QL)

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) para o método cromatográfico foram determinados através do desvio padrão da curva de calibração (DP) e da inclinação (I) da curva de calibração.

Foram efetuadas três leituras para cada concentração e calculado o desvio padrão dos resultados obtidos na linearidade.

O cálculo para o LD e o LQ foi realizado pelas seguintes equações:

$$LD = (DESVIO PADRÃO/INCLINAÇÃO DA CURVA) \times 3,3$$

Equação 17

$$LQ = (DESVIO PADRÃO/INCLINAÇÃO DA CURVA) \times 10$$

Equação 18

3.2.1.6.5 Precisão do sistema

3.2.1.6.5.1 Concentração do teor

Foi tomada uma alíquota de 10,0 mL da solução padrão de glibenclamida (0,60 mg/mL) para um balão volumétrico de 20 mL. O volume foi completado com acetonitrila. Obteve-se concentração final de 0,30 mg/mL de glibenclamida (100,0%). Esta concentração teste foi injetada 10 vezes no sistema.

3.2.1.6.5.2 Concentração de quantificação do produto de degradação

Foi transferida uma alíquota de 1,0 mL da solução estoque padrão (glibenclamida 0,60 mg/mL) para balão volumétrico de 100,0 mL e se completou a volume com acetonitrila. Em seguida, foi transferida alíquota de 2,0 mL para balão volumétrico de 20,0 mL e após foi completado o volumes do balão com o mesmo solvente. Obteve-se concentração final de 0,60 µg/mL de glibenclamida. Esta concentração teste foi injetada 10 vezes no sistema.

3.2.1.6.6 Precisão do método

3.2.1.6.6.1 Repetibilidade

Pesou-se quantitativamente cerca de 480,0 mg da amostra (corresponde a 15 mg de glibenclamida) para balão volumétrico de 50,0 mL, adicionaram-se 30,0 mL de acetonitrila, sonicou-se por 30 minutos e em seguida, completou-se o volume com o mesmo solvente. Apos, filtrou-se em membrana PVDF de porosidade 0,45 µm. Obteve-se concentração final de 0,30 mg/mL de glibenclamida. O procedimento foi repetido seis vezes e as leituras para cada repetição foram em triplicata.

3.2.1.6.6.2 Precisão intermediária

Foram preparadas três concentrações da amostra de glibenclamida comprimidos (20% acima e abaixo da concentração nominal). Para isto, foram pesados 384,0; 480,0 e 576,0 mg para balões volumétricos de 50,0 mL; adicionaram-se 30,0 mL de acetonitrila e sonicou-se os balões por 30 minutos; em seguida, completou-se o volume com o mesmo solvente. Obtiveram-se concentrações finais de 0,240; 0,300 e 0,360 mg/mL de glibenclamida. Em seguida, filtrou-se em membrana PVDF de porosidade 0,45 µm. O procedimento foi repetido três vezes para cada concentração e as leituras para cada concentração foram em triplicata. O mesmo procedimento foi realizado em três dias consecutivos.

3.2.1.6.7 Exatidão

A exatidão foi avaliada através de 9 determinações em 3 níveis de concentração, sendo 80%, 100% e 120% da concentração teórica, cobrindo, assim, a faixa de trabalho. Para isto, foram pesadas massas de placebo para balões volumétricos de 50,0; em seguida, foram transferidas quantidades da solução estoque de glibenclamida padrão para os balões contendo o placebo, conforme quadro 6. O mesmo procedimento foi realizado em três dias consecutivos e as leituras para cada concentração foram em triplicata.

% da concentração teórica	Massa do placebo (mg)	Alíquota da solução estoque (mL)	Volume final (mL)	Concentração teórica (mg/mL)
80	384,0	20,0	50,0	0,240
100	480,0	25,0	50,0	0,300
120	576,0	30,0	50,0	0,360

Quadro 6: Procedimento experimental para o teste de recuperação do método cromatográfico.

3.2.2 Cloridrato de metformina

3.2.2.1 Determinação qualitativa e quantitativa do cloridrato de metformina matéria-prima

3.2.2.1.1 Ponto de fusão

O cloridrato de metformina (matéria-prima) foi colocado em um tubo capilar de vidro com uma das extremidades selada. Começou-se o aquecimento à razão de 5 °C/min.; quando a temperatura ficou 10 °C abaixo do início da fusão (teórico), reduziu-se a velocidade de aquecimento a cerca de 1 °C/min. O ensaio foi realizado em triplicata^{23,31}.

3.2.2.1.2 Espectrofotometria ultravioleta/visível

Foram pesados 5,0 mg de cloridrato de metformina (matéria-prima), transferidos para balão volumétrico de 50 mL e dissolvidos em água. Desta solução, tirou-se uma alíquota de 5 mL, transferiu-se para um balão de 50 mL e completou-se o volume com água. Obteve-se concentração final de 10 µg/mL de cloridrato de metformina. O espectro de absorção desta solução foi determinado na faixa de 210 a 350 nm^{23,31}.

3.2.2.1.3 Espectrometria no infravermelho

Foi misturada uma quantidade de cloridrato de metformina (matéria-prima) com o sal brometo de potássio. Esta mistura foi triturada e prensada a fim de ser identificada espectroscopicamente. O espectro foi comparado com espectros relatados na literatura^{23,31}.

3.2.2.1.4 Cromatografia em camada delgada

Examinou-se, por cromatografia em camada delgada, o cloridrato de metformina, usando-se uma placa revestida com sílica gel contendo indicador de fluorescência a 254 nm.

Solução teste: Dissolveram-se 20 mg do cloridrato de metformina (matéria-prima) em 5 mL de água.

Solução de referência: Dissolveram-se 20 mg de cloridrato de metformina padrão em 5 mL de água.

Aplicaram-se, separadamente, 5 μ L de cada solução na placa cromatográfica, desenvolveu-se sobre um caminho de 15 cm, usando como fase móvel uma mistura de 10 volumes de ácido acético glacial, 40 volumes de butanol e 50 volumes de água. Foi revelada a placa com uma mistura de uma solução de iguais volumes de nitroprussiato de sódio (100g/L), ferricianeto de potássio (100 g/L) e uma solução de hidróxido de sódio (100 g/L) preparada 20 minutos antes de ser utilizada^{23,31}.

3.2.2.1.5 Determinação do teor do cloridrato de metformina

Dissolveram-se 100 mg de cloridrato de metformina (matéria-prima) em 4 mL de ácido fórmico anidro. Acrescentaram-se 80 mL de acetonitrila e titulou-se imediatamente com uma solução de ácido perclórico 0,1 N. Determinou-se o ponto final potenciometricamente, usando-se eletrodo para soluções não-aquosas. Cada mL de ácido perclórico 0,1 N equivale a 16,56 mg de cloridrato de metformina^{23,31}.

3.2.2.2 Desenvolvimento de metodologias de rastreamento ortogonais

3.2.2.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Foi preparada uma solução estoque de cloridrato de metformina padrão na concentração de 1,0 mg/mL; para isso, foram pesados 10,0 mg do padrão, transferidos para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com água; esta solução foi mantida na geladeira durante o período do desenvolvimento da metodologia. Para cada dia de trabalho, transferiu-se uma alíquota de 0,2 mL da solução estoque para tubo *Eppendorf* com capacidade de 2,0 mL e acrescentaram-se 1,80 mL de água. Esta solução foi filtrada, através de filtro 0,45 μ m Millipore®, e injetada no sistema cromatográfico. Todas as fases móveis testadas foram preparadas diariamente, filtradas através de membrana hidrofílica 0,45 μ m Millipore® (HV) e sonicadas durante 30 minutos. Os sistemas cromatográficos avaliados podem ser vistos no Quadro 7.

Sistema	Modo	Fase estacionária	Fase móvel	pH	T (°C)	λ (nm)	Volume de injeção (mL/min)	Vazão (mL/min)
1	Gradiente	Coluna Amino	Metanol: Água 70 a 10% 60 min	---	25	220	40	1,00
2	Gradiente	Coluna Amino	Metanol: Água 90 a 10% 60 min	---	25	220	40	1,00
3	Gradiente	Coluna Amino	Metanol: Água 30 a 100% 60 min	---	25	220	40	1,00
4	Gradiente	Coluna Amino	Metanol: TEA 20 mmol/L 10 a 100% 60 min	6,50	25	220	20	1,00
5	Gradiente	Coluna C18	Metanol: Água 5 a 100% 60 min	---	25	230	20	1,00
6	Gradiente	Coluna C18	Acetonitrila: Água 5 a 100% 60 min	---	25	230	20	1,00
7	Gradiente	Coluna C18	Metanol: TEA 20 mmol/L 10 a 100% 60 min	4,50	25	230	20	0,80
8	Gradiente	Coluna C18	Metanol: TEA 20 mmol/L 20 a 100% 60 min	5,60	25	230	20	1,00
9	Gradiente	Coluna C18	Metanol: TEA 20 mmol/L 10 a 100% 60 min	6,00	25	230	20	1,00
10	Gradiente	Coluna C18	Metanol: TEA 20 mmol/L 10 a 100% 60 min	6,00	25	230	20	0,80
11	Gradiente	Coluna C18	Metanol: TEA 20 mmol/L 30 a 100% 60 min	6,00	25	230	20	0,80
12	Gradiente	Coluna C18	Metanol: TEA 20 mmol/L 10 a 10% em 5 min. 10 a 100% até 60 min	6,00	25	230	20	0,80
13	Gradiente	Coluna C18	Metanol: TEA 20 mmol/L 10 a 100% 60 min.	7,00	25	230	20	1,00
14	Gradiente	Coluna C18	Metanol: TEA 20 mmol/L 10 a 100% 60 min	7,00	25	230	20	0,80
15	Gradiente	Coluna Fenil- Polar	Acetonitrila: Água 5 a 100% 60 min	---	25	230	20	1,00

CONTINUA

16	Isocrático	Coluna Fenil-Polar	Metanol: Água 70:30%	---	25	230	20	1,00
17	Isocrático	Coluna Fenil-Polar	Metanol: Água 80:20%	3,00	25	230	20	1,00
18	Isocrático	Coluna Fenil-Polar	Metanol: Água 90:10%	3,00	25	230	20	1,00
19	Isocrático	Coluna Fenil-Polar	Metanol: Água 80:20%	3,30	25	230	20	1,00
20	Gradiente	Coluna Fenil-Polar	Acetonitrila: Água 5 a 100% 60 min	3,35	25	230	20	1,00
21	Isocrático	Coluna Fenil-Polar	Metanol: Água 70:30%	3,53	25	230	20	0,80
22	Isocrático	Coluna Fenil-Polar	Metanol: Água 30:70%	3,53	25	230	20	1,00
23	Isocrático	Coluna Fenil-Polar	Metanol: Água 70:30%	3,53	25	230	20	1,00
24	Isocrático	Coluna Fenil-Polar	Metanol: Água 60:40%	3,53	25	230	20	1,00
25	Isocrático	Coluna Fenil-Polar	Metanol: Água 80:20%	3,53	25	230	20	1,00
27	Gradiente	Coluna Fenil-Polar	Metanol: TEA 2,5 mmol/L 80 a 80% em 15 min. 80 a 10% até 30 min.	3,50	25	230	20	1,00
28	Isocrático	Coluna Fenil-Polar	Metanol: TEA 2,5 mmol/L 90 :10%	3,50	25	230	20	1,00
29	Isocrático	Coluna Fenil-Polar	Metanol: TEA 5,0 mmol/L 90:10%	3,61	25	230	20	1,00
30	Isocrático	Coluna Fenil-Polar	Metanol: TEA 5,0 mmol/L 80:20%	3,61	25	230	20	1,00
31	Gradiente	Coluna Fenil-Polar	Metanol: TEA 2,5 mmol/L 90 a 90% em 10 min. 90 a 10% até 60 min.	3,62	25	230	20	1,00
32	Isocrático	Coluna Fenil-Polar	Metanol: TEA 2,5 mmol/L 90 :10%	3,65	25	230	20	1,00
33	Isocrático	Coluna Fenil-Polar	Metanol: TEA 2,5 mmol/L 80:20%	3,65	25	230	20	1,00
34	Gradiente	Coluna Fenil-Polar	Metanol: Água 5 a 100% 60 min.	4,35	25	230	20'	1,00

CONTINUA

35	Isocrático	Coluna Fenil-Polar	Metanol: Água 50:50%	4,35	25	230	20	1,00
36	Isocrático	Coluna Fenil-Polar	Metanol: Água 70:30%	4,35	25	230	20	1,00
37	Gradiente	Coluna Fenil-Polar	Acetonitrila: Água 10 a 100% 60 min	5,55	25	230	20	1,00
38	Gradiente	Coluna Fenil-Polar	Acetonitrila: Água 20 a 100% 60 min	5,55	25	230	20	1,00
39	Gradiente	Coluna Fenil-Polar	Acetonitrila: Água 60 a 100% 60 min	5,55	25	230	20	1,00
40	Gradiente	Coluna Fenil-Polar	Acetonitrila: Água 90 a 10% 60 min	5,55	25	230	20	1,00
41	Gradiente	Coluna Fenil-Polar	Metanol: Água 10 a 100% 60 min	5,6	25	230	20	1,00
42	Gradiente	Coluna Fenil-Polar	Metanol: Água 90 a 10% 60 min	5,60	25	230	20	1,00
43	Gradiente	Coluna Fenil-Polar	Metanol: Água 70 a 10% 60 min	5,60	25	230	20	1,00
44	Gradiente	Coluna Fenil-Polar	Metanol: Água 50 a 10% 60 min	5,60	25	230	20	1,00
45	Gradiente	Coluna Fenil-Polar	Metanol: TEA 20 mmol/L 10 a 100% 60 min.	6,00	25	230	20	1,00
46	Gradiente	Coluna Fenil-Polar	Metanol: TEA 20 mmol/L 20 a 100% 60 min.	6,00	25	230	20	1,00
47	Gradiente	Coluna Fenil-Polar	Metanol: TEA 20 mmol/L 5 a 100% 60 min.	6,00	25	230	20	1,00
48	Gradiente	Coluna Fenil-Polar	Metanol: TEA 20 mmol/L 5 a 100% 60 min.	6,00	25	230	20	0,80
49	Gradiente	Coluna Fenil-Polar	Metanol: TEA 20 mmol/L 5 a 100% 60 min.	7,50	25	230	20	1,00

Quadro 7: Sistemas cromatográficos avaliados no desenvolvimento da metodologia de rastreamento para o cloridrato de metformina.

3.2.2.2.2 Eletroforese capilar (CE)

3.2.2.2.2.1 Eletroforese capilar em zona (CZE)

Foi preparada uma solução estoque de cloridrato de metformina padrão na concentração de 1,0 mg/mL; para isso, foram pesados 10,0 mg do padrão, transferidos para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com água. Esta solução foi mantida na geladeira durante o período do desenvolvimento da metodologia. Para cada dia de trabalho, transferiu-se uma alíquota de 0,2 mL da solução estoque para tubo *Eppendorf* com capacidade de 2,0 mL e se acrescentaram 1,80 mL de água. Esta solução foi filtrada, através de filtro 0,45 µm Millipore®, e injetada no sistema eletroforético. Todos os eletrólitos foram preparados diariamente e filtrados através de membrana hidrofílica 0,45 µm Millipore® (HV). Os sistemas eletroforéticos avaliados podem ser vistos na Tabela 9.

No início de cada dia de análise, o capilar foi acondicionado com hidróxido de sódio 0,1 mol/L durante 30 minutos; em seguida, com água Milli-Q, durante 15 minutos, e, por último, com o eletrólito de corrida por 30 minutos. Entre cada corrida analítica, o capilar foi lavado com hidróxido de sódio durante 0,5 minutos, em seguida, com água Milli-Q durante 1,5 minutos e eletrólito de corrida por 1,5 minutos. Na troca de eletrólitos, o capilar foi acondicionado pelo período de 10 minutos com o novo eletrólito a ser testado.

Sistema	Eletrólito	pH	Tensão (kV)	Injeção (psi/s)	T (°C)	λ (nm)	Segunda diluição
1	Tampão acetato de sódio 20 mmol/L	4,05	+15,0	0,3/3	25	233	água
2	Tampão acetato de sódio 20 mmol/L	4,05	+15,0	0,3/3	25	233	eletrólito
3	Tampão acetato de sódio 20 mmol/L	4,05	+20,0	0,3/3	25	233	água
4	Tampão acetato de sódio 20 mmol/L	4,05	+20,0	0,3/3	25	233	eletrólito
5	Tampão acetato de sódio 20 mmol/L	4,05	+30,0	0,3/3	25	233	água
6	Tampão acetato de sódio 20 mmol/L	4,05	+30,0	0,3/3	25	233	eletrólito
7	Tampão acetato de sódio 50 mmol/L	4,00	+15,0	0,5/5	25	233	água
8	Tampão acetato de sódio 50 mmol/L	4,00	+18,0	0,5/3	25	233	água
9	Tampão acetato de sódio 50 mmol/L	4,00	+18,0	0,5/3	25	233	eletrólito
10	Tampão acetato de sódio 50 mmol/L	4,00	+20,0	0,3/3	25	233	água
11	Tampão acetato de sódio 60 mmol/L	4,00	+18,0	0,3/3	25	233	água
12	Tampão acetato de sódio 60 mmol/L	4,00	+18,0	0,3/3	25	233	eletrólito
13	Tampão acetato de sódio 70 mmol/L	4,00	+12,0	0,3/3	25	233	água
14	Tampão acetato de sódio 70 mmol/L	4,00	+12,0	0,3/3	25	233	eletrólito
15	Tampão acetato de sódio 70 mmol/L	4,00	+15,0	0,5/3	25	233	água
16	Tampão acetato de sódio 70 mmol/L	4,00	+15,0	0,5/3	25	233	eletrólito
17	Tampão fosfato de sódio monobásico monoidratado 20 mmol/L	2,00	+20,0	0,3/3	25	233	água
18	Tampão fosfato de sódio monobásico monoidratado 20 mmol/L	2,00	+30,0	0,3/3	25	233	água
19	Tampão fosfato de sódio monobásico monoidratado 20 mmol/L	4,10	+25,0	0,3/3	25	233	água
20	Tampão fosfato de sódio monobásico monoidratado 20 mmol/L	4,10	+30,0	0,3/3	25	233	água
21	Tampão fosfato de sódio monobásico monoidratado 20 mmol/L	4,10	+30,0	0,3/3	25	233	eletrólito

22	Tampão cloridrato de iombina 20 mmol/L	7,00	+15,0	0,3/3	25	233	água
23	Tampão cloridrato de iombina 20 mmol/L	7,00	+15,0	0,5/5	25	233	água
24	Solução de trietilamina 20 mmol/L	2,00	+18,0	0,3/3	25	233	água
25	Solução de trietilamina 20 mmol/L	2,00	+25,0	0,5/3	25	233	água
26	Solução de trietilamina 20 mmol/L	2,00	+30,0	0,3/3	25	233	água
27	Solução de trietilamina 20 mmol/L	2,00	+30,0	0,5/3	25	233	água
28	Solução de trietilamina 20 mmol/L	2,00	+30,0	0,5/3	25	233	eletrólito
29	Solução de trietilamina 40 mmol/L	2,30	+15,0	0,3/3	25	233	água
30	Solução de trietilamina 40 mmol/L	2,30	+20,0	0,3/3	25	233	água
31	Solução de trietilamina 40 mmol/L	2,30	+22,0	0,3/3	25	233	eletrólito

Quadro 8: Sistemas eletroforéticos avaliados no desenvolvimento da metodologia de rastreamento para o cloridrato de metformina utilizando a eletroforese capilar em zona (CZE).

3.2.2.2.2 Cromatografia eletrocínética micelar (MEKC)

Foi preparada uma solução estoque de cloridrato de metformina padrão na concentração de 1,0 mg/mL; para isso, foram pesados 10,0 mg do padrão, transferidos para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com água; esta solução foi mantida na geladeira durante o período do desenvolvimento da metodologia. Para cada dia de trabalho, transferiu-se uma alíquota de 0,2 mL da solução estoque para tubo *Eppendorf* com capacidade de 2,0 mL e se acrescentaram 1,80 mL de água ou eletrólito. Esta solução foi filtrada, através de filtro 0,45 µm Millipore®, e injetada no sistema eletroforético. Todos os eletrólitos foram preparados diariamente e filtrados através de unidade filtrante de 0,45 µm Millipore® (HV). Os sistemas eletroforéticos avaliados podem ser vistos no Quadro 9.

No início de cada dia de análise, o capilar foi acondicionado com hidróxido de sódio 0,1 mol/L durante 30 minutos; em seguida, com água Milli-Q, durante 15 minutos, e, por último, com o eletrólito de corrida por 30 minutos. Entre cada corrida analítica, o capilar foi lavado com hidróxido de sódio durante 0,5

minutos; em seguida, com água Milli-Q, durante 1,5 minutos, e eletrólito de corrida por 1,5 minutos. Na troca de eletrólitos, o eletrólito a ser testado foi acondicionado pelo período de 10 minutos.

Sistema	Eletrólito	pH	Tensão (kV)	Injeção (psi/s)	T (°C)	λ (nm)	Segunda diluição
1	Tampão acetato de sódio 20 mmol/L: dodecil sulfato de sódio 30 mmol/L	7,00	+20,0	0,5/5	25	233	água
2	Tampão acetato de sódio 30 mmol/L: dodecil sulfato de sódio 20 mmol/L	7,00	+20,0	0,5/5	25	233	água
3	Tampão borato 20 mmol/L: dodecil sulfato de sódio 20 mmol/L	9,00	+20,0	0,5/5	25	233	água
4	Tampão borato 20 mmol/L: dodecil sulfato de sódio 30mmol/L	9,00	+20,0	0,5/5	25	233	água
5	Tampão borato 20 mmol/L: Tampão fosfato de sódio dibásico 20 mmol/L: dodecil sulfato de sódio 50 mmol/L	8,90	+13,0	0,3/3	20	233	água
6	Tampão carbonato de amônio 20 mmol/L: dodecil sulfato de sódio 30 mmol/L	9,50	+10,0	0,3/3	25	233	água
7	Tampão carbonato de amônio 20 mmol/L: dodecil sulfato de sódio 30 mmol/L	9,50	+20,0	0,3/3	25	233	água
8	Tampão carbonato de amônio 20 mmol/L: dodecil sulfato de sódio 30 mmol/L	9,50	+20,0	0,3/3	25	233	água
9	Tampão tetraborato de sódio 10 mmol/L: dodecil sulfato de sódio 30 mmol/L	8,66	+20,0	0,3/3	25	233	água
10	Tampão tetraborato de sódio 10 mmol/L: dodecil sulfato de sódio 30 mmol/L	8,66	+23,0	0,3/3	25	233	água
11	Tampão tetraborato de sódio 10 mmol/L: dodecil sulfato de sódio 30 mmol/L	8,70	+20,0	0,5/5	25	233	água
12	Tampão tetraborato de sódio 10 mmol/L: dodecil sulfato de sódio 30 mmol/L	9,00	+20,0	0,3/3	25	233	água
13	Tampão tetraborato de sódio 10 mmol/L: dodecil sulfato de sódio 30 mmol/L	9,00	+23,0	0,3/3	25	233	água

CONTINUA

14	Tampão tetraborato de sódio 10 mmol/L: dodecil sulfato de sódio 30 mmol/L	9,30	+10,0	0,3/3	25	233	água
15	Tampão tetraborato de sódio 10 mmol/L: dodecil sulfato de sódio 30 mmol/L	9,30	+20,0	0,3/3	25	233	água
16	Tampão tetraborato de sódio 10 mmol/L: dodecil sulfato de sódio 30 mmol/L	9,30	+23,0	0,3/3	25	233	água
17	Tampão tetraborato de sódio 10 mmol/L: dodecil sulfato de sódio 40 mmol/L	8,67	+20,0	0,3/3	25	233	água
18	Tampão tetraborato de sódio 10 mmol/L: dodecil sulfato de sódio 40 mmol/L	8,67	+20,0	0,3/3	25	233	eletrólito
19	Tampão tetraborato de sódio 10 mmol/L: dodecil sulfato de sódio 40 mmol/L	8,67	+20,0	0,5/5	25	233	eletrólito
20	Tampão tetraborato de sódio 10 mmol/L: dodecil sulfato de sódio 40 mmol/L	8,70	+20,0	0,5/5	25	233	água
21	Tampão tetraborato de sódio 10 mmol/L: dodecil sulfato de sódio 40 mmol/L	8,70	+20,0	0,5/5	25	233	eletrólito
22	Tampão tetraborato de sódio 10 mmol/L: dodecil sulfato de sódio 40 mmol/L	8,70	+20,0	0,5/8	25	233	eletrólito
23	Tampão tetraborato de sódio 10 mmol/L: dodecil sulfato de sódio 40 mmol/L	8,90	+20,0	0,3/3	25	233	eletrólito
24	Tampão tetraborato de sódio 10 mmol/L: dodecil sulfato de sódio 40 mmol/L	9,00	+20,0	0,5/5	25	233	água
25	Tampão tetraborato de sódio 10 mmol/L: dodecil sulfato de sódio 40 mmol/L	9,00	+20,0	0,5/5	25	233	eletrólito
26	Tampão tetraborato de sódio 10 mmol/L: dodecil sulfato de sódio 50 mmol/L	8,70	+20,0	0,5/5	25	233	eletrólito
27	Tampão tetraborato de sódio 10 mmol/L: dodecil sulfato de sódio 50 mmol/L	9,00	+20,0	0,3/3	25	233	eletrólito
28	Tampão tetraborato de sódio 10 mmol/L: dodecil sulfato de sódio 50 mmol/L: 10% acetonitrila	9,00	+15,0	0,3/3	25	233	eletrólito
29	Tampão tetraborato de sódio 10 mmol/L: dodecil sulfato de sódio 50 mmol/L: 10% acetonitrila	9,00	+20,0	0,3/3	25	233	eletrólito

30	Tampão tetraborato de sódio 10 mmol/L: dodecil sulfato de sódio 40 mmol/L	8,70	+20,0	0,5/5	25	233	eletrólito
31	Tampão tetraborato de sódio 10 mmol/L: dodecil sulfato de sódio 40 mmol/L	8,70	+20,0	0,5/5	25	233	eletrólito
32	Tampão tetraborato de sódio 20 mmol/L: dodecil sulfato de sódio 30 mmol/L	9,55	+10,0	0,3/3	25	233	eletrólito
33	Tampão tetraborato de sódio 20 mmol/L: dodecil sulfato de sódio 40 mmol/L	8,50	+15,0	0,5/5	25	233	eletrólito
34	Tampão tetraborato de sódio 20 mmol/L: dodecil sulfato de sódio 40 mmol/L	8,50	+20,0	0,5/5	25	233	eletrólito
35	Solução de trietilamina 10 mmol/L: dodecil sulfato de sódio 40 mmol/L	8,70	+20,0	0,5/5	25	233	eletrólito
36	Solução de trietilamina 20 mmol/L: dodecil sulfato de sódio 30 mmol/L	11,70	+7,0	0,5/5	25	233	água
37	Solução de trietilamina 20 mmol/L: dodecil sulfato de sódio 30 mmol/L	11,70	+7,0	0,5/5	25	233	água
38	Solução de trietilamina 20 mmol/L: dodecil sulfato de sódio 30 mmol/L	11,70	+15,0	0,5/5	25	233	água
39	Solução de trietilamina 20 mmol/L: dodecil sulfato de sódio 40 mmol/L	11,70	+15,0	0,5/5	25	233	água

Quadro 9: Sistemas eletroforéticos avaliados no desenvolvimento da metodologia de rastreamento de cloridrato de metformina utilizando a cromatografia eletrocínica micelar (MEKC).

3.2.2.3 Degradação forçada do cloridrato de metformina

3.2.2.3.1 Degradação por termólise

Foram preparadas três amostras, nas quais foram pesadas 4,5 mg de matéria-prima de cloridrato de metformina, os quais foram transferidos para três frascos de 15 mL, em seguida, estes frascos foram rotulados e lacrados. Após, os frascos foram colocados em estufa a 70°C por 7, 14 e 21 dias; depois desses períodos, adicionaram-se aos frascos 15 mL de água, obtendo-se a concentração de 0,3 mg/mL. Esta solução foi homogeneizada, filtrada, através de unidade filtrante 0,45 µm Millipore® (millex PVDF), e, por último, injetou-se a solução nos equipamentos de cromatografia e de eletroforese capilar.

3.2.2.3.2 Degradação por hidrólise

Foram pesados 4,5 mg de matéria-prima de cloridrato de metformina, os quais foram transferidos para frasco de 15 mL. Em seguida, adicionaram-se aos frascos 5 mL de água. O frasco foi colocado em banho-maria a 70°C durante uma semana. Posteriormente, a solução foi diluída com água, para se obter a concentração de 0,3 mg/mL. Esta solução foi homogeneizada, filtrada, através de unidade filtrante 0,45 µm Millipore® (millex PVDF), e, por último, injetou-se a solução nos equipamentos de cromatografia e de eletroforese capilar.

3.2.2.3.3 Degradação por hidrólise ácida

Foram pesados 4,5 mg de matéria-prima de cloridrato de metformina, os quais foram transferidos para frasco de 15 mL. Em seguida, adicionaram-se ao frasco 5 mL de HCl 0,1 M, que foi colocado em banho-maria a 70°C durante uma semana. Posteriormente, a solução foi diluída com água, para se obter uma concentração de 0,3 mg/mL. Esta solução foi homogeneizada, filtrada, através de unidade filtrante 0,45 µm Millipore® (millex PVDF), e, por último, injetou-se a solução nos equipamentos de cromatografia e de eletroforese capilar.

3.2.2.3.4 Degradação por hidrólise básica

Foram pesados 4,5 mg de matéria-prima de cloridrato de metformina, os quais foram transferidos para frasco de 15 mL. Em seguida, adicionaram-se ao frasco 5 mL de NaOH 0,1 M, e este foi colocado em banho-maria a 70°C durante 3 horas. Posteriormente, a solução foi diluída com água, para se obter a concentração de 0,3 mg/mL. Esta solução foi homogeneizada, filtrada, através de unidade filtrante 0,45 µm Millipore® (millex PVDF), e, por último, injetou-se a solução nos equipamentos de cromatografia e de eletroforese capilar.

3.2.2.3.5 Degradação por hidrólise neutra

Foram pesados 4,5 mg de matéria-prima de cloridrato de metformina, os quais foram transferidos para frasco de 15 mL. Em seguida, adicionaram-se

aos frascos 5 mL de solução tampão fosfato dibásico 100 mmol/L (Na_2HPO_4) pH 8,0; este frasco foi colocado em banho-maria a 70°C durante uma semana. Posteriormente, a solução foi diluída com água, para se obter uma concentração de 0,3 mg/mL. Esta solução foi homogeneizada, filtrada, através de unidade filtrante 0,45 μm Millipore® (millex PVDF), e, por último, injetou-se a solução nos equipamentos de cromatografia e de eletroforese capilar.

3.2.2.3.6 Degradação por oxidação

Foram pesados 4,5 mg de matéria-prima de cloridrato de metformina, os quais foram transferidos para frasco de 15 mL. Em seguida, adicionaram-se aos frascos 5 mL de solução de peróxido de hidrogênio 0,3% (H_2O_2). Em seguida, o frasco foi colocado em ambiente protegido da luz durante uma semana. Posteriormente, a solução foi diluída com água, para se obter uma concentração de 0,3 mg/mL. Esta solução foi homogeneizada, filtrada, através de unidade filtrante 0,45 μm Millipore® (millex PVDF), e, por último, injetou-se a solução nos equipamentos de cromatografia e de eletroforese capilar.

3.2.2.3.7 Degradação por fotólise

Foram pesados 4,5 mg de matéria-prima de cloridrato de metformina, os quais foram transferidos para frasco de 15 mL, em seguida este frasco foi lacrado. O frasco foi exposto à luz por 60 horas para atingir 1,2 milhão luz h^{-1} (conforme recomendado pela ICH, no protocolo Q1B), sob a temperatura de $25^\circ\text{C} \pm 0,5$. Manteve-se o controle protegido da luz durante o mesmo período. Em seguida, adicionaram-se aos frascos 15 mL de água, obtendo-se a concentração de 0,3 mg/mL. Esta solução foi homogeneizada, filtrada, através de unidade filtrante 0,45 μm Millipore® (millex PVDF), e, por último, injetou-se a solução nos equipamento de cromatografia e de eletroforese capilar.

3.2.2.4 Aprimoramento da metodologia desenvolvida

O aprimoramento da metodologia permitiu melhorar a resolução entre os picos encontrados na degradação forçada ácida e o pico do cloridrato de metformina.

A resolução é uma medida quantitativa de separação de dois componentes consecutivos num eletroferograma, calculada a partir da distância que separa os máximos dos picos divididos pela média das larguras de suas respectivas bases.

$$\text{Resolução} = \frac{2 (t_{Rb} - t_{Ra})}{W_a + W_b} \quad \text{Equação 7}$$

Onde:

t_{Rb} = tempo de retenção do composto b

t_{Ra} = tempo de retenção do composto a

W_a = largura da base do composto a

W_b = largura da base do composto b

Para isso, foram realizados testes mudando o comprimento do capilar e também a tensão do método. O critério de aceitação foi uma resolução maior ou igual a 1,5; o que corresponde à separação completa.

3.2.2.5 Validação da metodologia desenvolvida utilizando a eletroforese capilar em zona (CZE)

Preparação da solução padrão estoque de cloridrato de metformina

Foram pesados 75 mg de cloridrato de metformina e transferidos para um balão volumétrico de 100 mL. Foram adicionados 70 mL de água ultrapura e transferidos para banho ultrassom por 10 minutos para completa dissolução. Completou-se o volume com o mesmo solvente e obteve-se a concentração de 0,75 mg/mL de cloridrato de metformina.

Preparação da solução padrão estoque de cloridrato de ioimbina (padrão interno)

Foram pesados 50 mg de cloridrato de ioimbina e transferidos para um balão volumétrico de 200 mL. Foram adicionados 150 mL de água ultrapura, para completa dissolução; em seguida, foi completado o volume com o mesmo solvente. Obteve-se a concentração de 0,250 mg/mL de cloridrato de ioimbina.

PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO

Na padronização do método, foram utilizados os seguintes parâmetros:

- Coluna capilar: sílica fundida 40,2 cm de comprimento total (30,0 cm até o detector), 75 µm d.i.
- Eletrólito: solução de trietilamina 40 mmol/L com pH 2,3 ajustado com ácido o-fosfórico 10%.
- Tensão: +18 kV.
- Detecção UV: 200 nm.
- Temperatura: 25°C.
- Injeção pressão: 0,3psi/s.

3.2.2.5.1 Especificidade

Pesquisa de interferentes a partir do placebo

Pesaram-se aproximadamente 15,6 mg de placebo, transferidos para balão volumétrico de 50 mL e adicionados 35 mL de água ultrapura. Homogeneizou-se em banho de ultrassom por 15 minutos e completou-se o volume com água ultrapura. Filtrou-se, através de filtro PVDF 0,45 µm, descartando-se os primeiros 2 mL do filtrado. Esta solução foi injetada no equipamento em triplicata.

Pesquisa de interferentes a partir do teste de estresse

O teste de estresse foi realizado para avaliar possíveis degradações no produto que possam interferir na quantificação do pico de interesse e que possam ser detectados utilizando métodos indicativos de estabilidade.

Para avaliação do teste de estresse, o padrão, a amostra e o placebo foram submetidos às seguintes condições: reação com NaOH 0,1 M; reação com HCl 0,1 M; reação com H₂O₂; termólise e fotoestabilidade.

As amostras submetidas às condições de estresse foram avaliadas nos tempos inicial, 24, 48, 96 e 168 horas. O estudo foi interrompido no momento em que houve uma decomposição de 10 a 30% do ativo. Quando não teve degradação no período máximo de 7 dias, o ativo foi considerado estável.

3.2.2.5.2 Linearidade para o teor

Foram transferidas alíquotas de 2,80; 3,20; 3,60; 4,00; 4,40 e 4,80 mL da solução estoque padrão de cloridrato de metformina (0,750 mg/mL) para balões volumétricos de 10,0 mL; em seguida, transferiram-se alíquotas de 4,0 mL da solução estoque de padrão interno cloridrato de ioimbina (0,250 mg/mL) para cada balão. Depois, foram completados os volumes de cada balão com água. Obtiveram-se concentrações finais de 0,210; 0,240; 0,270; 0,300; 0,330 e 0,360 mg/mL de cloridrato de metformina e 0,100 mg/mL de cloridrato de ioimbina (padrão interno em cada balão volumétrico).

A linearidade do método para cloridrato de metformina teor foi construída a partir dos resultados da razão das áreas dos picos (cloridrato de metformina/cloridrato de ioimbina).

3.2.2.5.3 Linearidade para os produtos de degradação

A linearidade do método para os produtos de degradação do cloridrato de metformina, foi planejada para adequar aos limites, indicados na guia do ICH Q3B(R2), estes limites foram calculados a partir da dose máxima diária de administração do cloridrato de metformina, a saber::

- Limite de notificação: 0,15 µg/ml (0,05%)
- Limite de quantificação: 0,30 µg/mL (0,10%)
- Limite de qualificação: 0,45 µg/mL (0,15%)

Para isto, pesou-se quantitativamente cerca de 20,0 mg de padrão de cloridrato de metformina para balão volumétrico de 2.000 mL, adicionados 1.500 mL de água ultrapurificada e homogeneizados até a completa solubilização, em seguida, completou-se o volume com o mesmo solvente. Obteve-se a concentração de 0,010 mg/mL de cloridrato de metformina.

Da solução anterior descrita, foram transferidas alíquotas de 0,75; 1,00; 1,25; 1,75 e 2,25 mL para balões volumétricos de 50,0 mL; em seguida, transferiram-se alíquotas de 20,0 mL da solução do padrão interno (cloridrato de ioimbina 0,250 mg/mL) para cada balão. Depois, foram completados os volumes de cada balão com água. Obtiveram-se concentrações finais de 0,15; 0, 20; 0,25; 0,35 e 0,45 µg/mL de cloridrato de metformina e 100 µg/mL de cloridrato de ioimbina (padrão interno em cada balão volumétrico).

A linearidade do método para a concentração dos produtos de degradação foi construída a partir dos resultados da razão das áreas dos picos (cloridrato de metformina/cloridrato de ioimbina).

3.2.2.5.4 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) para o método eletroforético foram determinados através do desvio padrão (DP) e da inclinação (I) da curva de calibração.

Foram efetuadas três leituras para cada concentração e calculado o desvio padrão dos resultados obtidos na linearidade.

O cálculo para o LD e LQ foi realizado pelas seguintes equações⁷²:

$$LD = (DESVIO PADRÃO/INCLINAÇÃO DA CURVA) \times 3,3$$

Equação 17

$$LQ = (DESVIO PADRÃO/INCLINAÇÃO DA CURVA) \times 10$$

Equação 18

3.2.2.5.5 Precisão do sistema

3.2.2.5.5.1 Concentração do teor

Foi transferida uma alíquota de 4,0 mL da solução estoque padrão do cloridrato de metformina (0,750 mg/mL) para um balão volumétrico de 10 mL. Foram adicionados 4,0 mL do padrão interno (0,250 mg/mL) e o volume foi

completado com água ultrapura. Obteve-se concentração final de 0,30 mg/mL de cloridrato de metformina (100,0%). Esta concentração teste foi injetada 10 vezes no sistema

3.2.2.5.5.2 Concentração de quantificação do produto de degradação

Pesou-se quantitativamente cerca de 20,0 mg de padrão de cloridrato de metformina para balão volumétrico de 2.000 mL, foram adicionados 1.500 mL de água ultrapurificada e homogeneizados até a completa solubilização; em seguida, completou-se o volume com o mesmo solvente.

Da solução descrita anteriormente, transferiu-se uma alíquota de 1,50 mL da solução padrão (cloridrato de metformina 0,010 mg/L) para balão volumétrico de 50,0 mL; em seguida, transferiu-se uma alíquota de 20,0 mL da solução do padrão interno (cloridrato de ioimbina 0,250 mg/mL) para o balão. Depois, foi completado o volume do balão com água. Obteve-se concentração final de 0,30 µg/mL de cloridrato de metformina e 100 µg/mL de cloridrato de ioimbina (padrão interno em cada balão volumétrico). Esta concentração teste foi injetada 10 vezes no sistema.

3.2.2.5.6 Precisão do método

3.2.2.5.6.1 Repetibilidade

Pesou-se quantitativamente cerca de 15,60 mg da amostra de cloridrato de metformina comprimidos de 850 mg (corresponde a 15,0 mg de cloridrato de metformina), para balão volumétrico de 50,0 mL, foram adicionados 20,0 mL do padrão interno (0,250 mg/mL), sonificados por 15 minutos e; em seguida, completou-se o volume com o mesmo solvente. Obtiveram-se concentrações finais de 0,300 mg/mL de cloridrato de metformina e 0,100 mg/mL de padrão interno. O procedimento foi repetido seis vezes e as leituras para cada repetição foram em triplicata.

3.2.2.5.6.2 Precisão intermediária

Foram preparadas três concentrações da amostra do cloridrato de metformina comprimidos (20% acima e abaixo da concentração nominal). Para isto, foram pesados 12,5; 15,6 e 18,8 mg para balões volumétricos de 50,0 mL,

adicionados 20,0 mL do padrão interno (0,250 mg/mL), sonicados por 15 minutos e; em seguida, completou-se o volume com o mesmo solvente. Obtiveram-se concentrações finais de 0,240; 0,300 e 0,360 mg/mL de cloridrato de metformina e 0,100 mg/mL de padrão interno para cada balão. Em seguida, filtrou-se em membrana PVDF de porosidade 0,45 μm . O procedimento foi repetido três vezes para cada concentração e as leituras para cada concentração foram em triplicata. O mesmo procedimento foi realizado em três dias consecutivos.

3.2.2.5.6.3 Exatidão

A exatidão foi avaliada através de nove determinações em três níveis de concentração, sendo 80%, 100% e 120% da concentração teórica, cobrindo, assim, a faixa de trabalho. Para isto, foram pesadas massas de placebo para balões volumétricos de 50,0 mL e, em seguida, transferiram-se quantidades da solução estoque padrão do cloridrato de metformina e da solução estoque do cloridrato de ioimbina (padrão interno) para os balões contendo o placebo, conforme o Quadro 10. As soluções foram filtradas e injetadas no equipamento de eletroforese capilar. Os testes de exatidão foram realizados em triplicata.

Solução padrão estoque cloridrato do cloridrato de metformina (mg/mL)	Solução padrão interno estoque do cloridrato de ioimbina (mg/mL)	Concentração final		Volume final
		cloridrato de metformina	cloridrato de ioimbina	
0,750	0,250			
Alíquotas (mL)		(mg/mL)		(mL)
16,0	20,0	0,240	0,100	50,0
20,0	20,0	0,300	0,100	50,0
24,0	20,0	0,360	0,100	50,0

Quadro 10: Procedimento experimental para o teste de recuperação do método por CZE.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Glibenclamida

4.1.1 Determinação qualitativa e quantitativa da glibenclamida matéria-prima

4.1.1.1 Ponto de fusão

A determinação do ponto de fusão da glibenclamida (matéria-prima) indicou transição para o estado líquido à temperatura de 172,5 °C, como descrito na Tabela 2. Este valor encontra-se na faixa descrita nos documentos oficiais^{27,59}.

Tabela 2: Resultados obtidos na determinação da faixa de fusão da glibenclamida

Réplicas	Ponto de fusão (°C)
Primeira	173,5
Segunda	172,0
Terceira	172,0
Média	172,5

4.1.1.2 Espectrofotometria ultravioleta/visível

O espectro de absorção da glibenclamida matéria-prima (100 µg/mL) no UV, apresentado na Figura 16, mostra 2 picos de absorvância a 274,4 e 300,3 nm. O pico de maior absorvância encontra-se em 300,3 nm, como está descrito na literatura oficial³¹.

Figura 16: Espectro de absorção da glibenclamida no UV-Visível (100 µg/mL).

4.1.1.3 Espectrometria no infravermelho

O espectro de absorção infravermelho da glibenclamida (matéria-prima) é apresentado na Figura 17 e as atribuições das principais bandas de absorção constam na Tabela 3:

Tabela 3: Frequências de absorção das principais bandas de absorção no espectro de infravermelho da glibenclamida

Frequência (cm ⁻¹)	Atribuição
3363 e 3313	Estiramento do grupo ureia (N-H)
1515	Estiramento do grupo amido da ureia
1333	Corresponde ao grupo (SO ₂ -N-)
1163	Corresponde à função (SO ₂)

Figura 17: Espectro de absorção no infravermelho da glibenclamida.

4.1.1.4 Cromatografia em camada delgada

A identificação por cromatografia em camada delgada (CCD), apresentada na Figura 18, permitiu comparar a substância de referência da glibenclamida com a matéria-prima da mesma substância. Esta comparação foi realizada de acordo com as especificações da Farmacopeia Europeia 7.0³¹.

Figura 18: Análise cromatográfica da glibenclamida Condições: fase fixa: sílica gel GF254; eluente: etanol, ácido acético glacial, ciclohexano e diclorometano 5:5:45:45 (v/v/v/v)

4.1.1.5 Determinação do teor de glibenclamida

A determinação quantitativa da glibenclamida (matéria-prima) foi realizada mediante titulação, como é recomendado pela Farmacopeia Europeia³¹, obtendo-se pureza de 99,20%; como é apresentado na Tabela 14.

Tabela 4: Resultados da determinação quantitativa da glibenclamida por titulação com hidróxido de sódio 0,1 M

Réplicas	Teor (mg)	Teor (%)
Primeira	395,2	98,8
Segunda	400,1	100,0
Terceira	395,2	98,8
Média	396,8	99,2

4.1.2 Desenvolvimento de metodologias analíticas de rastreamento

4.1.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Para o desenvolvimento da metodologia para determinação da glibenclamida, foi utilizada a técnica no modo de fase reversa. Nos ensaios preliminares foram utilizadas fases estacionárias apolares (C18 e Fenil-Polar) e

fases móveis relativamente polares (metanol:água e acetonitrila:água) com diferentes pH.

Quando foi utilizada a fase estacionária C18 com a fase móvel composta de metanol/água, o pico apresentou alargamento da banda, o qual foi diminuído ajustando o pH desta fase móvel para 3,50; como mostrado na Figura 19

Figura 19: Perfil cromatográfico do sistema 3. Condições: coluna Bondclone C18 Phenomenex®; fase móvel: álcool metílico (B): água (A); pH 3,50 (ajustado com ácido o-fosfórico); vazão 1,0 mL/min; volume injetado 20 μ L; temperatura: 25 °C; detecção UV: 225 nm.; eluição em gradiente linear (10 a 100% de B em 60 minutos).

Diminuição do tempo de retenção foi encontrada quando se trabalhou com a fase móvel (acetonitrila:água) sem ajuste do pH, como é mostrado pela Figura 20.

Figura 20: Perfil cromatográfico do sistema 2. Condições: coluna Bondclone C18 Phenomenex®; fase móvel: acetonitrila (B): água (A); vazão 1,0 mL/min; volume injetado 20 μ L; temperatura: 25 °C; detecção UV: 225 nm.; eluição em gradiente linear (5 a 100% de B em 60 minutos).

A fase estacionária fenil-polar também foi testada no desenvolvimento de metodologia para a glibenclamida. Para isto, utilizou-se a fase móvel (acetonitrila:água), sem resultados satisfatórios, porque o pico apresentou alargamento de banda. No entanto, quando o pH foi controlado, o pico não apresentou alargamento da banda, como pode ser observado pela altura do pico em comparação com os outros sistemas mostrados (Figura 21).

Figura 21: Perfil cromatográfico do sistema 6. Condições: coluna Synergi® Polar-RP Phenomenex®; fase móvel: acetonitrila (B):água (A); pH 3,35 (ajustado com ácido acético glacial); vazão 1,0 mL/min; volume injetado 20 µL; temperatura: 25°C; detecção UV: 225 nm.; eluição em gradiente (5 a 100% de B em 60 minutos).

A metodologia testada na degradação forçada foi a do sistema 6, a qual utiliza como fase estacionária a coluna a Synergi® Polar-RP Phenomenex®; fase móvel: acetonitrila (B):água (A); pH 3,35 (ajustado com ácido acético glacial).

4.1.2.2 Eletroforese capilar (CE)

4.1.2.2.1 Eletroforese capilar em zona (CZE)

A glibenclamida tem caráter ácido, com valor de pKa de 5,3. Por conseguinte, pode concluir-se que, quando em pH maior que 6,8, se apresenta predominantemente carregada negativamente e com mobilidade eletroforética em direção ao ânodo (lado contrário do detector). O planejamento da metodologia consistiu na utilização de tampão tetraborato de sódio 20 mmol/L, pH 9,6; no qual o fluxo eletrosmótico (EOF) é maior em relação à mobilidade

eletroforética da glibenclamida; assim, a glibenclamida migrou na direção do detector pela influência do EOF, como mostrado na Figura 22

Figura 22: Eletroferograma da glibenclamida por CZE. Condições: capilar de sílica fundida 40,2 cm x 75 µm d.i. (30,0 cm até detector); eletrólito: 20 mmol/L tampão tetraborato de sódio, pH 9,6; Tensão aplicada: +20 kV; temperatura 25 °C; injeção por pressão: 0,5 psi/5s em 5 segundos. Detecção UV, 225 nm.

4.1.2.2.2 Cromatografia eletrocinética micelar (MEKC)

O desenvolvimento da metodologia consistiu na utilização de dois eletrólitos; o primeiro eletrólito foi composto de tampão tetraborato de sódio e o surfactante dodecil sulfato de sódio em diferentes concentrações. Os problemas encontrados com este eletrólito foram o alargamento da banda, a falta da simetria e a presença de cauda no pico, como está retratado na Figura 23

Figura 23: Cromatograma da glibenclamida utilizando o sistema 7. Condições: capilar de sílica fundida 40,2 cm x 75 μ m d.i. (30,0 cm até detector); eletrólito: tampão tetraborato de sódio 20 mmol/L: dodecil sulfato de sódio 30 mmol/L, pH 9,25; Tensão aplicada: +15 kV; tem temperatura 25°C; injeção por pressão: 0,5 psi em 5 segundos. Detecção UV, 225 nm.

O segundo eletrólito foi composto de tampão fosfato de sódio dibásico, tampão borato e surfactante dodecil sulfato de sódio. Foram experimentadas várias concentrações deste eletrólito com diversos pH. O eletrólito que apresentou melhor desempenho foi o tampão borato 20 mmol/L : tampão fosfato de sódio dibásico 20 mmol/L e dodecil sulfato de sódio 50 mmol/L. O eletroferograma obtido com este eletrólito está retratado na Figura 24.

Figura 24: Cromatograma da glibenclamida utilizando o sistema 25. Condições: capilar de sílica fundida 40,2 cm x 75 μ m d.i. (30,0 cm até detector); eletrólito: tampão borato 20 mmol/L: fosfato de sódio dibásico 20 mmol/L: dodecil sulfato de sódio 50 mmol/L, pH 8,90; Tensão aplicada: +10 kV; temperatura 25°C; injeção por pressão: 0,5 psi em 5 segundos. Detecção UV, 225 nm

O pico da glibenclamida apresentou cauda e largura de banda, como pode ser observado na Figura 24. Para melhorar este perfil, foram experimentados

solventes orgânicos (metanol e acetonitrila). A adição de acetonitrila na concentração de 10% diminuiu a cauda, como é retratado na Figura 25

Figura 25: Cromatograma da glibenclamida utilizando o sistema 34. Condições: capilar de sílica fundida 40,2 cm x 75 µm d.i. (30,0 cm até detector); eletrólito: tampão borato 20 mmol/L: fosfato de sódio dibásico 20 mmol/L: dodecil sulfato de sódio 50 mmol/L: acetonitrila 10%, pH 8,90; Tensão aplicada: +15 kV; temperatura 25 °C; injeção por pressão: 0,3 psi em 3 segundos. Detecção UV, 225 nm.

O eletrólito selecionado para monitorar os possíveis produtos de degradação originados na etapa seguinte (degradação forçada), foi composto de tampão borato 20 mmol/L : tampão fosfato de sódio dibásico 20 mmol/L : dodecil sulfato de sódio 50 mmol/L e acetonitrila 10%.

4.1.3 Degradação forçada da glibenclamida

A degradação forçada foi utilizada para estabelecer a estabilidade intrínseca dos fármacos. Estas degradações foram realizadas em condições mais drásticas do que as usadas no estudo de estabilidade acelerada. Estas degradações consistiram em submeter o fármaco a condições drásticas de temperatura, umidade, hidrólise em amplas faixas de pH, oxidação e fotólise.

Os métodos analíticos de rastreamento desenvolvidos foram testados com as degradações forçadas do fármaco. Os testes de degradação forçada foram feitos com o fármaco isolado ou em suspensão/solução, disposto em recipientes transparentes e quimicamente inertes.

No trabalho, realizou-se o estudo de degradação forçada, com a matéria-prima da glibenclamida em solução e em estado sólido; as amostras foram acondicionadas em frascos transparentes devidamente lacrados.

4.1.4 Degradação por termólise

Após 21 dias de exposição da glibenclamida em estado sólido à temperatura de 70 °C em estufa, não foi evidenciado nenhum pico extra nas metodologias desafiadas (Figuras 26, 27 e 28).

○ HPLC

Figura 26: Cromatogramas da glibenclamida (GLB) 0,30 mg/mL, exposta à degradação por termólise: A: 7 dias; B: 14 dias e C: 21 dias. Condições: Coluna Synergi Polar-RP, 250 × 4.6 mm, i.d. 4 µm, fase móvel (acetonitrila:água, pH 3,35 ajustado com ácido acético) e eluição: gradiente linear de 5% a 100% de acetonitrila em 60 minutos, detecção UV 225 nm, temperatura 25°C e vazão 1 mL/min.

○ CZE

Figura 27: Eletroferogramas da glibenclamida (GLB) 0,3 mg/mL., exposta à degradação por termólise. A: 7 dias ; B: 14 dias, C: 21 dias. Condições: tampão tetraborato de sódio 20 mmol/L com pH 9,6; Tensão +20 kV, coluna capilar (40,2 cm x 75 µm I. D), detecção UV a 225 nm e injeção por pressão 0,5 psi/ 5 s.

Figura 28: Eletroferogramas da glibenclamida (0,3mg/mL.) exposta à degradação por termólise. A: 7 dias; B: 14 dias e C: 21 dias. Condições: eletrólito tetraborato de sódio a 20 mmol/L, fosfato de sódio dibásico 20 mmol/L, dodecil sulfato de sódio 50 mmol/L e acetonitrila 10%; pH 8,90; Tensão +15 kV; temperatura 25°C; detecção UV a 225 nm e injeção por pressão 0,5 psi/ 5 s.

4.1.4.1 Degradação por hidrólise

Após 7 dias de exposição da glibenclamida em solução à temperatura de 70°C em banho-maria, foi evidenciado o seguinte: na metodologia por HPLC, detectou-se um produto de degradação com tempo de retenção de 31,5 minutos (PD1) (Figura 29). Utilizando a eletroforese capilar, se observou que a metodologia CZE também mostrou um produto de degradação com tempo de migração de 1,8 min (PD1) que é carregado pelo fluxo eletrosmótico (deve se tratar de um composto com carga neutra) (Figura 30); por outro lado, a metodologia MEKC confirma a presença de um produto de degradação com tempo de migração de 16,0 min (PD1), mostrando boa separação da glibenclamida (Figura 31).

○ HPLC

Figura 29: Cromatograma da glibenclamida (0,3 mg/mL) exposta à degradação forçada por hidrólise (água). Picos: glibenclamida (GLB) 0,3 mg/mL.; produto de degradação (PD 1). Condições: Coluna Synergi Polar-RP, 250 × 4.6 mm, i.d. 4 µm, fase móvel (acetonitrila:água, pH 3,35 ajustado com ácido acético) eluição: gradiente linear de 5% a 100% de acetonitrila em 60 minutos, detecção UV 225 nm, temperatura 25°C e vazão 1 mL/min.

○ CZE

Figura 30: Eletroferograma da glibenclamida exposta à degradação forçada por hidrólise (água) Picos: glibenclamida (GLB) 0,3 mg/mL.; produto de degradação (PD 1). Condições: tampão tetraborato de sódio 20 mmol/L com pH 9,6; Tensão +20 kV, coluna capilar (40,2 cm x 75 µm I. D), detecção UV a 225 nm e injeção por pressão 0,5 psi/ 5 s.

○ MEKC

Figura 31: Cromatograma da glibenclamida exposta à degradação forçada por hidrólise (água). Picos: glibenclamida (GLB) 0,30 mg/mL; produto de degradação (PD 1). Condições: eletrólito tetraborato de sódio a 20 mmol/L, fosfato de sódio dibásico 20 mmol/L, dodecil sulfato de sódio 50 mmol/L e acetonitrila 10%; pH 8,90; Tensão +15 kV; temperatura 25°C; detecção UV a 225 nm e injeção por pressão 0,5 psi/ 5 s.

4.1.4.2 Degradação por hidrólise ácida

Após 7 dias de exposição da glibenclamida em solução de ácido clorídrico 0,1 mol/L à temperatura de 70°C em banho-maria, foi evidenciado o seguinte: na metodologia por HPLC (Figura 32), um pico de degradação a 31,5 minutos (PD 1). Utilizando a eletroforese capilar, observou-se que a metodologia CZE (Figura 33) mostrou um produto de degradação a 1,8 min (PD 1), o qual é carregado pelo fluxo eletrosmótico (deve se tratar de um composto com carga neutra); por outro lado, a metodologia MEKC (Figura 34) confirmou a presença de um produto de degradação a 16,0 min (PD 1). Na segunda etapa da degradação, a glibenclamida foi exposta por 3 horas à solução de HCl 0,1 mol/L à temperatura de 70°C em banho-maria; foi evidenciada a mesma formação do produto, porém com os critérios de degradação de 10 a 30% estabelecidos no planejamento da degradação.

○ HPLC

Figura 32: Cromatograma da glibenclamida exposta à degradação forçada por hidrólise ácida (HCl 0,1 M). Picos: glibenclamida (GLB) 0,3 mg/mL e o produto de degradação (PD 1). Após 7 dias de exposição a HCl 0,1 M; 70°C (A) e após 2 horas de exposição a HCl 0,1 M; 70 °C(B). Condições: Coluna Synergi Polar-RP, 250 × 4.6 mm, i.d. 4 µm, fase móvel (acetonitrila:água, pH 3,35 ajustado com ácido acético) eluição: gradiente inicial 5% e final 100% de acetonitrila em 60 minutos, detecção UV 225 nm, temperatura 25°C e vazão 1 mL/min.

○ CZE

Figura 33: Eletroferograma da glibenclamida exposta à degradação forçada por hidrólise ácida. Picos: glibenclamida (GLB) 0,3 mg/mL.; e o produto de degradação 1 (PD 1). Após 7 dias de exposição a HCl 0,1 M; 70°C (A) e após 2 horas de exposição a HCl 0,1 M; 70°C (B). Condições: tampão tetraborato de sódio 20 mmol/L com pH 9,6; Tensão +20 kV, coluna capilar (40,2 cm x 75 µm I. D), detecção UV a 225 nm e injeção por pressão 0,5 psi/ 5 s.

○ MEKC

Figura 34: Cromatograma da glibenclamida exposta à degradação forçada por hidrólise ácida. Picos: glibenclamida (GLB) 0,3 mg/mL.; PD 1. Após 7 dias de exposição a HCl 0,1 M; 70°C (A) e após 2 horas de exposição a HCl 0,1 M; 70°C (B). Condições: eletrólito tetraborato de sódio a 20 mmol/L, fosfato de sódio dibásico 20 mmol/L, dodecil sulfato de sódio 50 mmol/L e acetonitrila 10%; pH 8,90; Tensão +15 kV; temperatura 25°C; detecção UV a 225 nm e injeção por pressão 0,5 psi/ 5 s.

4.1.4.3 Degradação por hidrólise básica

Após 7 dias de exposição da glibenclamida à solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L à temperatura de 70°C em banho-maria, foi evidenciado o seguinte: a metodologia por HPLC (Figura 35) mostrou dois picos de degradação a 25,5 minutos (PD 2) e a 31,5 minutos (PD 1). Utilizando a eletroforese capilar em solução livre CZE (Figura 36), observou-se dois produtos de degradação: a 1,8 min (PD 1), o qual é carregado pelo fluxo eletrosmótico (deve se tratar de um composto com carga neutra) e a 2,9 min (PD 2); por outro lado, a metodologia MEKC (Figura 37) confirma a presença de dois produtos de degradação a 6,8 minutos (PD 2) e a 16 minutos (PD 1).

○ HPLC

Figura 35: Cromatograma da glibenclamida exposta à degradação forçada por hidrólise básica (hidróxido de sódio 0,1 M). Picos: glibenclamida (GLB), produto de degradação (PD 2) e PD 1. Condições: Coluna Synergi Polar-RP, 250 × 4.6 mm, i.d. 4 µm, fase móvel (acetona:acetonitrila:água, pH 3,35 ajustado com ácido acético) eluição: gradiente inicial 5% e final 100% de acetonitrila em 60 minutos, detecção UV 225 nm, temperatura 25°C e vazão 1 mL/min.

○ CZE

Figura 36: Eletroferograma da glibenclamida exposta à degradação forçada por hidrólise básica (hidróxido de sódio 0,1 M). Picos: glibenclamida (GLB), PD 1 e PD 2. Condições: tampão tetraborato de sódio 20 mmol/L com pH 9,6; Tensão +20 kV, coluna capilar (40,2 cm x 75 µm I. D), detecção UV a 225 nm e injeção por pressão 0,5 psi/ 5 s.

○ MEKC

Figura 37: Eletroferograma da glibenclamida exposta à degradação forçada por hidrólise básica (hidróxido de sódio 0,1 M). Picos: glibenclamida (GLB), PD 1 e PD 2. Condições: eletrólito tetraborato de sódio a 20 mmol/L, fosfato de sódio dibásico 20 mmol/L, dodecil sulfato de sódio 50 mmol/L e acetonitrila 10%; pH 8,90; Tensão +15 kV; temperatura 25°C; detecção UV a 225 nm e injeção por pressão 0,5 psi/ 5 s.

4.1.4.4 Degradação por hidrólise neutra

Após 7 dias de exposição da glibenclamida à solução tampão fosfato dibásico 0,1 mol/L (pH 8,0) à temperatura de 70°C em banho-maria, foi evidenciado o seguinte: na metodologia por HPLC (Figura 38), um pico de degradação em 31,5 (PD 1) foi originado. Utilizando a eletroforese capilar em solução livre CZE (Figura 39) também se observou um produto de degradação (PD 1) a 1,8 min; por outro lado, a metodologia MEKC (Figura 40) confirma a presença de produto de degradação 1 (16,0 min).

○ HPLC

Figura 38: Cromatograma da glibenclamida exposta à degradação forçada por hidrólise neutra (Na_2HPO_4 0,1 M). Picos: glibenclamida (GLB) 0,3 mg/mL e PD 1. Condições: Coluna Synergi Polar-RP, 250 × 4.6 mm, i.d. 4 μm , fase móvel (acetonitrila:água, pH 3,35 ajustado com ácido acético) eluição: gradiente inicial 5% e final 100% de acetonitrila em 60 minutos, detecção UV 225 nm, temperatura 25°C e vazão 1 mL/min.

○ CZE

Figura 39: Eletroferograma da glibenclamida exposta à degradação forçada por hidrólise neutra (Na_2HPO_4 0,1 M). Picos: glibenclamida (GLB) 0,3 mg/mL.; produto de degradação 1 (PD 1). Condições: tampão tetraborato de sódio 20 mmol/L com pH 9,6; Tensão +20 kV, coluna capilar (40,2 cm x 75 μm I. D), detecção UV a 225 nm e injeção por pressão 0,5 psi/ 5 s.

○ MEKC

Figura 40: Cromatograma da degradação forçada da glibenclamida exposta à hidrólise neutra (Na_2HPO_4 0,1 M). Picos: glibenclamida (GLB) 0,3 mg/mL e PD 1. Condições: eletrólito tetraborato de sódio a 20 mmol/L, fosfato de sódio dibásico 20 mmol/L, dodecil sulfato de sódio 50 mmol/L e acetonitrila 10%; pH 8,90; Tensão +15 kV; temperatura 25°C; detecção UV a 225 nm e injeção por pressão 0,5 psi/ 5 s.

4.1.4.5 Degradação por oxidação

Após 7 dias de exposição da glibenclamida à solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 0,3%) em ambiente protegido da luz, não foi evidenciado nenhum pico extra aplicando-se as metodologias desafiadas (Figuras 41, 42 e 43).

○ HPLC

Figura 41: Cromatogramas da glibenclamida (GLB) 0,3 mg/mL, exposta à degradação por oxidação (H_2O_2 0,3%). Condições: Coluna Synergi Polar-RP, 250 × 4.6 mm, i.d. 4 μm , fase móvel (acetonitrila:água, pH 3,35 ajustado com ácido acético) eluição: gradiente inicial 5% e final 100% de acetonitrila em 60 minutos, detecção UV 225 nm, temperatura 25°C e vazão 1 mL/min.

○ CZE

Figura 42: Eletroferogramas da glibenclamida (GLB) 0,3 mg/mL, exposta à degradação por oxidação (H_2O_2 0,3%). Condições: tampão tetraborato de sódio 20 mmol/L com pH 9,6; Tensão +20 kV, coluna capilar (40,2 cm x 75 μm I. D), detecção UV a 225 nm e injeção por pressão 0,5 psi/ 5 s.

○ MEKC

Figura 43: Eletroferogramas da glibenclamida (GLB) 0,3 mg/mL. exposta à degradação por oxidação (H_2O_2 0,3%). Condições: eletrólito tetraborato de sódio a 20 mmol/L, fosfato de sódio dibásico 20 mmol/L, dodecil sulfato de sódio 50 mmol/L e acetonitrila 10%; pH 8,90; Tensão +15 kV; temperatura 25°C; detecção UV a 225 nm e injeção por pressão 0,5 psi/ 5 s.

4.1.4.6 Degradação por fotólise

Após 60 horas de exposição da glibenclamida em estado sólido à fotólise, não foi evidenciado nenhum pico extra (Figuras 44, 45 e 46).

○ HPLC

Figura 44: Cromatogramas da glibenclamida (GLB) 0,3 mg/mL. exposta à fotólise (pelo período de 60 horas). Condições: Coluna Synergi Polar-RP, 250 x 4.6 mm, i.d. 4 μm , fase móvel (acetonitrila:água, pH 3,35 ajustado com ácido acético) eluição: gradiente inicial 5% e final 100% de acetonitrila em 60 minutos, detecção UV 225 nm, temperatura 25°C e vazão 1 mL/min.

○ CZE

Figura 45: Eletroferograma da glibenclamida (GLB) 0,3 mg/mL, exposta à fotólise (pelo período de 60 horas). Condições: tampão tetraborato de sódio 20 mmol/L com pH 9,6; Tensão +20 kV, coluna capilar (40,2 cm x 75 μ m I. D), detecção UV a 225 nm e injeção por pressão 0,5 psi/ 5 s.

○ MEKC

Figura 46: Eletroferograma da glibenclamida (GLB) 0,3 mg/mL. exposta à fotólise (pelo período de 60 horas). Condições: eletrólito tetraborato de sódio a 20 mmol/L, fosfato de sódio dibásico 20 mmol/L, dodecil sulfato de sódio 50 mmol/L e acetonitrila 10%; pH 8,90; Tensão +15 kV; temperatura 25°C; detecção UV a 225 nm e injeção por pressão 0,5 psi/ 5 s.

4.1.5 Identificação dos produtos de degradação forçada mediante espectrometria de massas

A glibenclamida foi submetida a diferentes condições de estresse com o intuito de elucidar os produtos de degradação presentes na degradação forçada desta molécula; para tanto, foi utilizada a técnica da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (HPLC-MS).

Na degradação forçada desta molécula, foram originados dois produtos de degradação: o produto de degradação 1 (PD 1) e o produto de degradação 2 (PD 2). O PD 1 foi identificado completamente, tanto o ion precursor como os íons fragmentados. PD 2 teve identificada sua relação massa/carga, porém, não é apresentado nesta parte porque na validação da metodologia foi originado um produto de degradação além dos já encontrados na degradação forçada básica e não foi possível diferenciar de qual composto trataria-se, pelo que deverão ser feitas análises complementares para elucidar totalmente os outros dois produtos de degradação encontrados.

○ Produto de degradação 1

No presente estudo, foi identificado o produto de degradação PD 1, formado nas seguintes degradações: hidrólise (água), hidrólise ácida, hidrólise básica e hidrólise neutra, cujo peso molecular foi de 369 (m/z) no modo ESI (+), com tempo de retenção no método cromatográfico $t_R = 31,50$ min; e tempos de migração t_M : 1,80 min no método CZE e t_M : 16,00 no método MEKC. Trata-se do composto (*4-[2-(5-chloro-2-methoxybenzamido) ethyl] benzenesulfonamide*; este produto de degradação se refere à eliminação do grupo cicloexil aminocarbonilo da glibenclamida, como pode ser visto na Figura 47. Este produto de degradação está identificado na Farmacopeia Europeia^{31,79,23} e na Farmacopeia Americana, como uma impureza da glibenclamida. O espectro de massas do PD1 está retratado na Figura 48.

Figura 47: Estrutura do íon de m/z 369, produto da degradação da glibenclamida por hidrólise.

Figura 48: Espectro de massa do produto de degradação 1 (PD1).

○ MS2

A fragmentação do íon precursor consiste na colisão deste com um gás neutro, o qual é acompanhado pelo aumento da energia interna que induz decomposição com muita probabilidade de fragmentação. Os fragmentos originados a partir do íon precursor (íon produto) são formados pela colisão que induz a dissociação. A distribuição da razão m/z dos íons resultantes do processo depende das características do íon precursor e da quantidade de energia cinética translacional que será convertida em energia vibracional interna.

A seleção por massas e a posterior fragmentação do PD1 (m/z 369) gerou os íons de m/z 169 e 141, conforme mostrado na Figura 50. As estruturas moleculares estão retratadas na Figura 49.

Figura 49: Fragmentação do produto de degradação 1 (PD1).

Figura 50: Espectro de massas da fragmentação do produto de degradação 1 (PD 1).

4.1.6 Aprimoramento da metodologia desenvolvida

Foi realizada o aprimoramento da metodologia, diminuindo o tempo de análise de 75 minutos para 20 minutos. A separação do pico da glibenclamida com os produtos de degradação foi considerada satisfatória. Nas Figuras 51 a 55, estão retratados os principais sistemas testados para o aprimoramento da metodologia.

Figura 51: Cromatograma da glibenclamida utilizando o sistema 1. Condições: Coluna Synergi Polar-RP, 250 × 4.6 mm, i.d. 4 µm, fase móvel (acetonitrila:água, pH 3,35 ajustado com ácido acético) eluição: gradiente (5 a 100% de acetonitrila em 60 minutos), detecção UV 225 nm, temperatura 25°C e vazão 1,0 mL/min.

Figura 52: Cromatograma da glibenclamida utilizando o sistema 2. Condições: Coluna Synergi Polar-RP, 250 × 4.6 mm, i.d. 4 µm, fase móvel (acetonitrila:água, pH 4,20 ajustado com ácido acético) eluição: gradiente, detecção UV 225 nm, temperatura 25°C e vazão 1,4 mL.

Figura 53: Cromatograma da glibenclamida utilizando o sistema 3. Condições: Coluna Synergi Polar-RP, 250 × 4.6 mm, i.d. 4 µm, fase móvel (acetonitrila:água, pH 4,20 ajustado com ácido acético) eluição: gradiente, detecção UV 225 nm, temperatura 25°C e vazão 1,4 mL.

Figura 54: Cromatograma da glibenclamida utilizando o sistema 4. Condições: Coluna Synergi Polar-RP, 250 × 4.6 mm, i.d. 4 µm, fase móvel (acetonitrila:água, pH 4,20 ajustado com ácido acético) eluição: gradiente, detecção UV 225 nm, temperatura 25°C e vazão 1,4 mL.

Figura 55: Cromatograma da glibenclamida utilizando o sistema 5. Condições: Coluna Synergi Polar-RP, 250 × 4.6 mm, i.d. 4 µm, fase móvel (acetonitrila:água, pH 4,20 ajustado com ácido acético) eluição: gradiente, detecção UV 225 nm, temperatura 25°C e vazão 1,4 mL.

Foi escolhido o sistema 5, por ter sido aquele que apresentou menor tempo de análise. Na Figura 56, estão retratados os tempos de retenção tanto da glibenclamida quanto dos produtos de degradação.

Figura 56: Aprimoramento da metodologia.

4.1.7 Validação da metodologia desenvolvida utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

4.1.7.1 Especificidade

A especificidade é a capacidade que um método tem de avaliar, de forma inequívoca, a substância em exame na presença de componentes que poderiam interferir em sua determinação numa mistura complexa⁷⁹.

As Figuras 57 a 59 mostram os resultados da pesquisa de interferentes a partir dos excipientes da amostra comercial e da degradação forçada: não há interferência na quantificação da glibenclamida^{16,29}. Portanto, o método demonstrou ser aplicável à quantificação da glibenclamida na amostra comercial.

Pesquisa de interferentes a partir do placebo

Figura 57: Cromatograma do padrão de glibenclamida 0,3 mg/mL. Condições: Coluna Synergi Polar-RP, 250 × 4.6 mm, i.d. 4 µm, fase móvel (acetonitrila:água, pH 4,20 ajustado com ácido acético) eluição: gradiente, detecção UV 225 nm, temperatura 25 °C, vazão 1,4 mL/min e volume de injeção 10 µL.

Figura 58: Cromatograma da amostra de glibenclamida 0,3 mg/mL. Condições: Coluna Synergi Polar-RP, 250 × 4.6 mm, i.d. 4 µm, fase móvel (acetonitrila:água, pH 4,20 ajustado com ácido acético) eluição: gradiente, detecção UV 225 nm, temperatura 25 °C, vazão 1,4 mL/ min e volume de injeção 10 µL.

Figura 59: Cromatograma do placebo da amostra de glibenclamida 0,3 mg/mL. Condições: Coluna Synergi Polar-RP, 250 × 4.6 mm, i.d. 4 µm, fase móvel (acetonitrila:água, pH 4,20 ajustado com ácido acético) eluição: gradiente, detecção UV 225 nm, temperatura 25 °C, vazão 1,4 mL/min e volume de injeção 10 µL.

O método para a determinação da glibenclamida apresentou-se seletivo, uma vez que não houve pico interferente no tempo de retenção do ativo na solução do placebo e na amostra da glibenclamida.

Pesquisa de interferentes a partir do teste de estresse

Nas análises feitas, foi verificada a degradação da glibenclamida nas condições de hidrólise básica e hidrólise ácida.

Na hidrólise básica do padrão, formaram-se três produtos de degradação; nas amostras, verificou-se a presença de mais um produto de degradação, que também formava-se no placebo; assim, a metodologia foi capaz de identificar a degradação de um excipiente da formulação.(Figuras 60,61 e 62)

Na hidrólise ácida, foi verificada a presença de um produto de degradação. Nas análises feitas com a amostra e o placebo, nos tempos e meios de degradação estabelecidos, não ocorreu formação de outros compostos de degradação.(Figuras 63, 64 e 65)

Figura 60: Cromatograma do padrão da glibenclamida exposta à degradação forçada básica. Condições: Coluna Synergi Polar-RP, 250 × 4.6 mm, i.d. 4 µm, fase móvel (acetonitrila:água, pH 4,20 ajustado com ácido acético) eluição: gradiente, detecção UV 225 nm, temperatura 25 °C, vazão 1,4 mL/min e volume de injeção 10 µL.

Figura 61: Cromatograma da amostra da glibenclamida exposta à degradação forçada básica. Condições: Coluna Synergi Polar-RP, 250 × 4.6 mm, i.d. 4 µm, fase móvel (acetonitrila:água, pH 4,20 ajustado com ácido acético) eluição: gradiente, detecção UV 225 nm, temperatura 25 °C, vazão 1,4 mL/min e volume de injeção 10 µL.

Figura 62: Cromatograma do placebo da amostra da glibenclamida exposta à degradação forçada básica. Condições: Coluna Synergi Polar-RP, 250 × 4.6 mm, i.d. 4 µm, fase móvel (acetonitrila:água, pH 4,20 ajustado com ácido acético) eluição: gradiente, detecção UV 225 nm, temperatura 25 °C, vazão 1,4 mL/min e volume de injeção 10 µL.

Figura 63: Cromatograma do padrão da glibenclamida exposta à degradação forçada ácida. Condições: Coluna Synergi Polar-RP, 250 × 4.6 mm, i.d. 4 µm, fase móvel (acetonitrila:água, pH 4,20 ajustado com ácido acético) eluição: gradiente, detecção UV 225 nm, temperatura 25 °C, vazão 1,4 mL/min e volume de injeção 10 µL.

Figura 64: Cromatograma da amostra da glibenclamida exposta à degradação forçada ácida. Condições: Coluna Synergi Polar-RP, 250 × 4.6 mm, i.d. 4 µm, fase móvel (acetonitrila:água, pH 4,20 ajustado com ácido acético) eluição: gradiente, detecção UV 225 nm, temperatura 25 °C, vazão 1,4 mL/min e volume de injeção 10 µL.

Figura 65: Cromatograma do placebo da amostra de glibenclamida exposta à degradação forçada ácida. Condições: Coluna Synergi Polar-RP, 250 × 4.6 mm, i.d. 4 µm, fase móvel (acetonitrila:água, pH 4,20 ajustado com ácido acético) eluição: gradiente, detecção UV 225 nm, temperatura 25 °C, vazão 1,4 mL/min e volume de injeção 10 µL.

4.1.7.2 Linearidade para o teor

Após serem definidos os parâmetros, foi construída a curva de calibração num intervalo de concentrações de 0,210 a 0,360 mg/mL de glibenclamida (Figura 66, Tabela 5). Obteve-se linearidade, com coeficiente de correlação de $r = 0,998$.

Segundo a Anvisa¹², o coeficiente de correlação de linearidade acima de 0,99 é satisfatório^{22,77}.

Figura 66: Curva de calibração de glibenclamida na faixa de concentrações de 0,210 a 0,36 mg/mL; detecção UV 225 nm.

Tabela 5: Resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração do teor

Concentração de leitura (mg/mL)	Área do pico (mAU)
0,210	4139418,33
0,240	4796817,00
0,270	5093360,33
0,300	5738623,00
0,330	6006708,67
0,360	6569791,00
Intercepto (A)	991551
Inclinação (B)	15376566
Desvio-padrão	61740,2
Coeficiente de correlação	0,998

* Média de três leituras

4.1.7.3 Linearidade para os produtos de degradação

Após serem definidos os parâmetros, foi construída a curva de calibração num intervalo de concentrações de 0,3 a 1,8 $\mu\text{g/mL}$ de glibenclamida (Figura 67, Tabela 6). Obteve-se linearidade, com coeficiente de correlação de $r = 0,995$

Segundo a Anvisa¹², um coeficiente de correlação de linearidade acima de 0,99 e satisfatório^{22,77}.

Figura 67: Curva de calibração de glibenclamida na faixa de concentrações de 0,3 a 1,8 $\mu\text{g/mL}$.; detecção UV 225 nm.

Tabela 6: Resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração dos produtos de degradação

Concentração de leitura ($\mu\text{g/mL}$)	Área do pico (mAU)
0,3	5678,33
0,6	11841,67
0,9	17681,00
1,2	22442,00
1,5	26365,33
1,8	34816,33
Intercepto (A)	402
Inclinação (B)	18478284
Desvio-padrão	1122,67
Coeficiente de correlação	0,995

* Média de três leituras

4.1.7.4 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção foi de $0,2005 \mu\text{g/mL}$ e o limite de quantificação foi de $0,60756 \mu\text{g/mL}$.

4.1.7.5 Precisão do sistema

Dez injeções foram realizadas para demonstrar a precisão do sistema, tanto para a concentração do teor $0,300 \text{ mg/mL}$ (100%) quanto para o limite de quantificação dos produtos de degradação $0,6 \mu\text{g/mL}$ (0,2%). Os resultados indicam que o desvio padrão relativo (%DPR), para a concentração do teor, foi 0,34% e, para o limite de quantificação dos produtos de degradação, foi de 4,5%. Portanto, a precisão da injeção foi considerada satisfatória, segundo os critérios de aceitação^{22,77}.

4.1.7.6 Precisão do método

A precisão representa o grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais quando o procedimento é aplicado diversas vezes numa mesma amostra homogênea, em idênticas condições de testes. Normalmente, é expressa pelo coeficiente de variação em número significativo de amostras^{12,}

4.1.7.6.1 Repetibilidade

A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos na determinação da repetibilidade do método. Pode-se observar que o desvio-padrão relativo (%DPR) para a razão das áreas dos picos foi menor que 2%. Portanto, a precisão do método para a repetibilidade foi considerada satisfatória, segundo os critérios de aceitação^{12,22,50,77}.

4.1.7.6.2 Precisão intermediária

A Tabela 7 também apresenta os resultados obtidos na determinação da precisão intermediária. Pode-se observar que o desvio padrão relativo (%DPR), para a razão das áreas dos picos, foi menor que 3%, para as três concentrações com as quais se trabalhou nos três dias consecutivos. Portanto, a precisão do método, para a precisão intermediária, foi considerada satisfatória, segundo os critérios de aceitação^{12,22,50,77}.

Tabela 7: Resultados obtidos nas determinações da repetibilidade e da precisão intermediária do método

Glibenclamida (%)	Repetibilidade do método (%DPR)	Precisão intermediária do método (%DPR)
80,0	-----	2,95
100,0	1,72	2,34
120,0	-----	2,27

4.1.7.7 Exatidão

O teste de recuperação está relacionado com a exatidão do método, o qual traduz o grau de concordância entre os resultados encontrados pelo método e um valor aceito como referência^{12,22,50,77,79}.

Os resultados obtidos para o teste de recuperação estão na faixa de 97,54 a 102,86 %, apresentando boa recuperação¹².

4.2 Cloridrato de metformina

4.2.1 Determinação qualitativa e quantitativa do cloridrato de metformina matéria-prima

4.2.1.1 Ponto de fusão

A determinação do ponto de fusão do cloridrato de metformina (matéria-prima) indicou transição para o estado líquido à temperatura de 226°C, como descrito na Tabela 8, valor que se encontra na faixa descrita nos documentos oficiais^{27,59,79}.

Tabela 8: Resultados obtidos na determinação da faixa de fusão do cloridrato de metformina

Réplicas	Ponto de fusão (°C)
Primeira	225
Segunda	227
Terceira	226
Média	226

4.2.1.2 Espectrofotometria ultravioleta/visível

O espectro de absorção da matéria-prima do cloridrato de metformina (0,010 mg/mL) no UV, apresentado na Figura 68, mostra pico único de maior absorvância a 232,7 nm, como está descrito na literatura oficial^{23,31,79}.

Figura 68: Espectro de absorção da cloridrato de metformina no UV-Visível (10 µg/mL).

4.2.1.3 Espectrometria no infravermelho

O espectro de absorção no infravermelho (IV) do cloridrato de metformina (matéria-prima) é apresentado na Figura 69, enquanto as atribuições das principais bandas de absorção estão descritas na Tabela 9.

Tabela 9: Frequências de absorção das principais bandas de absorção no espectro de infravermelho do cloridrato de metformina

Frequências (cm ⁻¹)	Atribuição
1630	Deformação da banda N-H
1565	Estiramento assimétrico da banda NCN
1470,1440 e 1410	Deformações simétricas e assimétricas de metila
1060	Estiramento da banda C-N

Figura 69: Espectro de absorção no infravermelho do cloridrato de metformina.

4.2.1.4 Cromatografia em camada delgada

A identificação por cromatografia em camada delgada, apresentada na Figura 70, permitiu comparar a substância de referência do cloridrato de metformina com a matéria-prima da mesma substância. A principal mancha na placa cromatográfica obtida com a solução teste é similar em posição, cor e tamanho à solução de referência. Esta comparação foi realizada de acordo com as especificações da Farmacopeia Europeia³¹.

Figura 70: Análise cromatográfica do cloridrato de metformina. Condições: fase fixa: sílica gel GF 254; eluente: ácido acético glacial:1butanol:água 1:4:5 (v/v/v).

4.2.1.5 Determinação do teor do cloridrato de metformina

A determinação quantitativa do cloridrato de metformina (matéria-prima) foi realizada mediante titulação, como é recomendado pela Farmacopeia Europeia³¹, obtendo-se pureza de 98,8%.

Tabela 10: Resultados da determinação quantitativa do cloridrato de metformina por titulação potenciométrica com ácido perclórico 0,1 N

Réplicas	Teor (mg)	Teor (%)
Primeira	97,7	97,7
Segunda	99,4	99,4
Terceira	99,4	99,4
Média	98,8	98,8

4.2.2 Desenvolvimento de metodologias de rastreamento ortogonais

4.2.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

O cloridrato de metformina é uma base altamente polar ($pK_a:11,5$)⁵⁹, sendo fracamente retido em fase estacionária apolar. Ensaios com diferentes concentrações de acetonitrila e metanol com diferentes pH, indicaram que a molécula não tem retenção satisfatória com a coluna apolar C18; este fato pode ser explicado porque moléculas polares são as primeiras a eluir em fases estacionárias ligadas a grupos octadecil, porque não podem formar interações

hidrofóbicas com estas fases apolares. A Figura 71 apresenta a fraca interação da fase estacionária apolar com o cloridrato de metformina

Figura 71: Perfil cromatográfico do sistema 8. Condições: coluna Bondclone RP C18 Phenomenex®; fase móvel: metanol (B): solução de trietilamina 20 mmol/L pH 5,60 (ajustado com ácido acético glacial) (A); vazão 1,0 mL.min⁻¹; volume injetado 20 µL; temperatura: 25°C; detecção UV: 230 nm.; eluição em gradiente (20 a 100% de B em 60 minutos).

Para o desenvolvimento da metodologia, foi utilizada a fase estacionária fenil-polar, já que esta apresenta mecanismo alternativo. Este mecanismo de retenção é baseado em interações π - π , que acontecem entre as moléculas do analito e a fase estacionária (fenil-polar). Também foi verificado que o aumento na proporção do metanol incrementava o tempo de retenção do cloridrato de metformina. Quanto ao efeito do pH, quando este é incrementado, o tempo de retenção também aumenta. O pico do cloridrato de metformina até este ponto apresenta aceitável tempo de retenção para o objetivo que queríamos atingir, porém apresentava amplitude de banda inaceitável. Foi melhorada a amplitude da banda do pico, incluindo na fase aquosa da fase móvel 2,5 mmol/L de trietilamina, o que resultou em diminuição da largura de banda e também em diminuição do tempo de retenção.

As condições do método desenvolvido estão expostas na Figura 72.

Figura 72: Perfil cromatográfico do cloridrato de metformina utilizando o sistema 27. Condições: coluna Synergi® Polar-RP Phenomenex®; fase móvel: metanol (B): solução de trietilamina 2,5 mmol/L, pH 3,50 (ajustado com ácido acético glacial) (A); vazão 1,0 mL.min⁻¹; volume injetado 20 µL; temperatura: 25°C; detecção UV: 230 nm.; eluição em gradiente (80 a 80% de B em 15 minutos, 80 a 10% de B até 30 minutos).

4.2.2.2 Eletroforese capilar (CE)

4.2.2.2.1 Eletroforese capilar em zona (CZE)

O cloridrato de metformina é uma base com valor de pKa de 11,5. Por conseguinte, pode concluir-se que, quando se trabalha com pH ácidos, se apresenta predominantemente na forma protonada. Este caráter iônico faz do cloridrato de metformina uma molécula adequada para a análise por eletroforese em zona.

A fim de se obter a melhor condição, foram testados os seguintes tampões: fosfato de sódio monobásico, acetato de sódio e solução de trietilamina.

Os resultados com o tampão fosfato de sódio monobásico não foram satisfatórios, porque o pico da molécula apresentava cauda muito pronunciada em diferentes pH, como pode ser observado na Figura 73.

Figura 73: Eletroferograma do cloridrato de metformina utilizando o sistema 19. Condições: capilar de sílica fundida 40,2 cm x 75 µm d.i. (30,0 cm até detector); eletrólito: tampão fosfato de sódio monobásico 20 mmol/L, pH 4,1; Tensão aplicada: +25 kV; temperatura 25 25°C; injeção por pressão: 0,3 psi em 3 segundos. Detecção UV, 233 nm.

O tampão acetato de sódio foi o seguinte a ser testado em várias concentrações e diferentes pHs. A melhor condição foi encontrada com a concentração de 50 mmol/L de acetato de sódio e pH de 4,0, com diminuição de cauda e melhor simetria do pico. O eletrólito seguinte testado foi a solução de trietilamina com pH baixo ajustado com ácido *orto*-fosfórico; este eletrólito apresentou também melhora na diminuição de cauda e na simetria do pico. A diferença deste tampão para o acetato de sódio está no tempo de migração, que foi quase o dobro do primeiro tampão.

Estas metodologias foram consideradas alternativas para o monitoramento dos produtos de degradação originados na degradação forçada. As Figuras 74 e 75 mostram as metodologias desenvolvidas com o tampão acetato de sódio e a solução de trietilamina, respectivamente.

Figura 74: Eletroferograma do cloridrato de metformina utilizando o sistema 7. Condições: capilar de sílica fundida 40,2 cm x 75 μ m d.i. (30,0 cm até detector); eletrólito: tampão acetato de sódio 50 mmol/L, pH 4,0; Tensão aplicada: +15 kV; temperatura 25°C; injeção por pressão: 0,5 psi em 5 segundos. Detecção UV, 233 nm.

Figura 75: Eletroferograma do cloridrato de metformina utilizando o sistema 31. Condições: capilar de sílica fundida 40,2 cm x 75 μ m d.i. (30,0 cm até detector); eletrólito: solução de trietilamina 40 mmol/L, pH 2,3; Tensão aplicada: +22 kV; temperatura 25°C; injeção por pressão: 0,3 psi em 3 segundos. Detecção UV, 233 nm.

4.2.2.2.2 Cromatografia eletrocínética micelar

Para o desenvolvimento da metodologia analítica a ser testada durante a degradação forçada, utilizaram-se, na primeira etapa, diversos eletrólitos, com os seguintes tampões: carbonato de amônio, tetraborato de sódio e borato; cada um destes junto ao surfactante dodecil sulfato de sódio.

O maior problema encontrado com estes tampões foi que o pico do cloridrato de metformina apresentava significativa cauda; tentou-se diminuí-la,

testando-se diversas concentrações dos tampões citados acima, diversos valores de pH, inclusão de solventes no eletrólito e na segunda diluição do padrão (eletrólito de corrida e água). Todas estas tentativas não tiveram resultado muito positivo. O gráfico representativo deste fato está exposto na Figura 76

Figura 76: Cromatograma do cloridrato de metformina utilizando o sistema 14. Condições: capilar de sílica fundida 40,2 cm x 75 μ m d.i. (30,0 cm até detector); eletrólito: tampão tetraborato 10 mmol/L : dodecil sulfato de sódio 30 mmol/L, pH 9,30; Tensão aplicada: +10 kV; temperatura 25°C; injeção por pressão: 0,3 psi em 3 segundos. Detecção UV, 233nm.

Na segunda etapa do desenvolvimento, foram testados os tampões acetato de sódio e trietilamina, já que estes tampões foram utilizados no desenvolvimento da metodologia de eletroforese capilar em zona (CZE) com sucesso.

O eletrólito que teve melhor desempenho foi a solução de trietilamina 20 mmol/L e dodecil sulfato de sódio 30 mmol/L, com valor de pH de 11,7; com este eletrólito, se conseguiu diminuir consideravelmente a cauda e melhorar também significativamente a simetria do pico de cloridrato de metformina. A metodologia desenvolvida com este modo de eletroforese capilar está mostrada na Figura 77

Figura 77: Cromatograma do cloridrato de metformina utilizando o sistema 38. Condições: capilar de sílica fundida 40,2 cm x 75 μ m d.i. (30,0 cm até detector); eletrólito: solução de trietilamina 20 mmol/L : dodecil sulfato de sódio 30 mmol/L, pH 11,7; Tensão aplicada: +15 kV; temperatura 25°C; injeção por pressão: 0,5 psi em 5 segundos. Detecção UV, 233nm.

4.2.3 Degradação forçada do cloridrato de metformina

A degradação forçada constitui uma prova para avaliar o comportamento dos princípios ativos a se estudar em situações de estresse. O objetivo destes ensaios é obter os produtos de degradação, que potencialmente poderiam aparecer em estudos de estabilidade, e determinar se as metodologias analíticas de rastreamento desenvolvidas são seletivas e permitem a quantificação do fármaco sem interferência dos produtos de degradação formados.

A metodologia desenvolvida por HPLC não se mostrou satisfatória nos estudos de degradação forçada. Por esse motivo, foi desafiada a metodologia preconizada pela Farmacopeia Americana⁷⁹ para as substâncias relacionadas do cloridrato de metformina.

4.2.3.1 Degradação por termólise

Após 21 dias de exposição do cloridrato de metformina em estado sólido à temperatura de 70°C em estufa, não foram evidenciados picos extras nas metodologias desafiadas (Figuras 78, 79 e 80).

○ HPLC

Figura 78: Cromatograma do cloridrato de metformina (MET) 0,30 mg/mL. exposto à degradação por termólise por 21 dias. Condições: Coluna Bondclone® C18 Phenomenex®; fase móvel: tampão cloreto de sódio 8,5 mmol/L + heptanossulfonato de sódio 2,5 mmol/L : acetonitrila (90:10); vazão 1,0 mL min⁻¹; volume injetado 20 µL; temperatura: 30°C; detecção UV: 210 nm.

○ CZE

Figura 79: Eletroferograma do cloridrato de metformina (MET) 0,30 mg/mL, exposto à degradação por termólise por 21 dias. Condições: solução de trietilamina 40 mmol/L pH 2,3; Tensão +22 kV, coluna capilar (40,2 cm x 75 µm I.D.), detecção UV a 200 nm, temperatura 25 °C e injeção por pressão 0,3 psi/ 3 s.

○ MEKC

Figura 80: Eletroferograma do cloridrato de metformina (MET) 0,30 mg/mL, exposto à degradação por termólise por 21 dias. Condições: eletrólito solução de trietilamina 20 mmol/L, dodecil sulfato de sódio 30 mmol/L, pH 11,7; Tensão +15 kV, coluna capilar (40,2 cm x 75 μ m I.D.), detecção UV a 200 nm, temperatura 25°C e injeção por pressão 0,3 psi/ 3 s.

4.2.3.2 Degradação por hidrólise

Após 7 dias de exposição do cloridrato de metformina em solução (água) à temperatura de 70°C em banho-maria, não foram evidenciados picos extras nas metodologias desafiadas (Figuras 81, 82 e 83).

○ HPLC

Figura 81: Cromatograma do cloridrato de metformina (MET) 0,30 mg/mL, exposto à degradação por hidrólise (água). Condições: Coluna Bondclone® C18 Phenomenex®; fase móvel: tampão cloreto de sódio 8,5 mmol/L + heptanossulfonato de sódio 2,5 mmol/L : acetonitrila (90:10); vazão 1,0 mL min⁻¹; volume injetado 20 μ L; temperatura: 30°C; detecção UV: 210 nm.

○ CZE

Figura 82: Eletroferograma do cloridrato de metformina (MET) 0,30 mg/mL, exposto à degradação por hidrólise (água). Condições: solução de trietilamina 40 mmol/L com pH 2,3; Tensão +22 kV, coluna capilar (40,2 cm x 75 μ m I.D.), detecção UV a 200 nm, temperatura 25°C e injeção por pressão 0,3 psi/ 3 s.

○ MEKC

Figura 83: Eletroferograma do cloridrato de metformina (MET) 0,30 μ g/mL, exposto à degradação por hidrólise (água). Condições: eletrólito solução de trietilamina 20 mmol/L, dodecil sulfato de sódio 30 mmol/L, pH 11,7; Tensão +15 kV, coluna capilar (40,2 cm x 75 μ m I.D.), detecção UV a 200 nm, temperatura 25°C e injeção por pressão 0,3 psi/ 3 s.

4.2.3.3 Degradação por hidrólise ácida

Após 7 dias de exposição do cloridrato de metformina à solução de ácido clorídrico 0,1 M, à temperatura de 70°C em banho-maria, foi observado o seguinte: pela metodologia por HPLC (Figura 84), foram evidenciados três produtos de degradação. Pela metodologia utilizando a eletroforese capilar em zona (Figura 85), se observaram também a formação de três produtos de degradação. A metodologia MEKC (Figura 86) apresentou 2 produtos de degradação. As metodologias por HPLC e CZE foram as que apresentaram os melhores resultados, tanto na separação entre os picos, quanto à simetria dos mesmos.

○ HPLC

Figura 84: Cromatograma do cloridrato de metformina (MET) 0,30 mg/mL, exposto à degradação por hidrólise ácida. Condições: Coluna Bondclone® C18 Phenomenex®; fase móvel: Tampão cloreto de sódio 8,5 mmol/L + Heptanossulfonato de sódio 2,5 mmol/L : Acetonitrila (90:10); vazão 1,0 mL min⁻¹; volume injetado 20 µL; temperatura: 30°C; detecção UV: 210 nm.

○ CZE

Figura 85: Eletroferograma do cloridrato de metformina (MET) 0,30 mg/mL exposto à degradação por hidrólise ácida. Condições: solução de trietilamina 40 mmol/L com pH 2,3; Tensão +22 kV, coluna capilar (40,2 cm x 75 µm I.D.), detecção UV a 200, temperatura 25°C e injeção por pressão 0,3 psi/ 3 s.

○ MEKC

Figura 86: Eletroferograma do cloridrato de metformina (MET) 0,30 mg/mL, exposto à degradação por hidrólise ácida. Condições: eletrólito solução de trietilamina 20 mmol/L, dodecil sulfato de sódio 30 mmol/L pH 11,7; Tensão +15 kV, coluna capilar (40,2 cm x 75 µm I.D.), detecção UV a 200 nm, temperatura 25°C e injeção por pressão 0,3 psi/ 3 s.

4.2.3.4 Degradação por hidrólise básica

Após 3 horas de exposição do cloridrato de metformina a uma solução de hidróxido de sódio 0,1 M, à temperatura de 70°C em banho-maria, foi evidenciado o seguinte: pela metodologia por HPLC (Figura 87), foram detectados três produtos de degradação. Utilizando a eletroforese capilar em

zona (Figura 88), detectou-se a formação de três produtos de degradação. A metodologia MEKC (Figura 89) apresentou também três produtos de degradação.

○ HPLC

Figura 87: Cromatograma do cloridrato de metformina (MET) 0,30 mg/mL, exposto à degradação por hidrólise básica. Condições: Coluna Bondclone® C18 Phenomenex®; fase móvel: tampão cloreto de sódio 8,5 mmol/L + heptanossulfonato de sódio 2,5 mmol/L : acetonitrila (90:10); vazão 1,0 mL min⁻¹; volume injetado 20 µL; temperatura: 30°C; detecção UV: 210 nm.

○ CZE

Figura 88: Eletroferograma do cloridrato de metformina (MET) 0,30 mg/mL exposto à degradação por hidrólise básica. Condições: solução de trietilamina 40 mmol/L com pH 2,3; Tensão +22 kV, coluna capilar (40,2 cm x 75 µm I.D.), detecção UV a 200, temperatura 25°C e injeção por pressão 0,3 psi/ 3 s.

○ MEKC

Figura 89: Eletroferograma do cloridrato de metformina (MET) 0,30 mg/mL, exposto à degradação por hidrólise básica. Condições: eletrólito solução de trietilamina 20 mmol/L, dodecil sulfato de sódio 30 mmol/L, pH 11,7; Tensão +15 kV, coluna capilar (40,2 cm x 75 µm I.D.), detecção UV a 200 nm, temperatura 25°C e injeção por pressão 0,3 psi/ 3 s.

4.2.3.5 Degradação por hidrólise neutra

Após 7 dias de exposição do cloridrato de metformina à solução de fosfato de sódio dibásico 0,1 mol/L (pH 8,0), à temperatura de 70 °C em banho-maria, foi evidenciado o seguinte: pela metodologia por HPLC (Figura 90), observaram-se três picos de degradação. Utilizando a eletroforese capilar em zona (Figura 91), observou-se a formação de três produtos de degradação. A metodologia MEKC (Figura 92) apresentou dois produtos de degradação. A metodologia CZE foi a que apresentou melhores resultados tanto na separação entre os picos quanto na simetria dos mesmos.

○ HPLC

Figura 90: Cromatograma do cloridrato de metformina (MET) 0,30 mg/mL. exposto à degradação por hidrólise neutra. Condições: Coluna Bondclone® C18 Phenomenex®; fase móvel: Tampão cloreto de sódio 8,5 mmol/L + heptanossulfonato de sódio 2,5 mmol/L : acetonitrila (90:10); vazão 1,0 mL min⁻¹; volume injetado 20 µL; temperatura: 30°C; detecção UV: 210 nm.

○ CZE

Figura 91: Eletroferograma do cloridrato de metformina (MET) 0,30 mg/mL. exposto à degradação por hidrólise neutra. Condições: solução de trietilamina 40 mmol/L com pH 2,3; Tensão +22 kV, coluna capilar (40,2 cm x 75 µm I.D.), detecção UV a 200 nm, temperatura 25°C e injeção por pressão 0,3 psi/ 3 s.

○ MEKC

Figura 92: Eletroferograma do cloridrato de metformina (MET) 0,30 mg/mL, exposto à degradação por hidrólise neutra. Condições: eletrólito solução de trietilamina 20 mmol/L, dodecil sulfato de sódio 30 mmol/L, pH 11,7; Tensão +15 kV, coluna capilar (40,2 cm x 75 µm I.D.), detecção UV a 200 nm, temperatura 25°C e injeção por pressão 0,3 psi/ 3 s.

4.2.3.6 Degradação por oxidação

Após 7 dias de exposição do cloridrato de metformina à solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 0,3%, em ambiente protegido da luz, foi evidenciado o seguinte: a metodologia por HPLC (Figura 93) mostrou um pico de degradação. Pela metodologia utilizando a eletroforese capilar em zona (Figura 94) se observaram também a formação de um produto de degradação. Na metodologia MEKC (Figura 95), também identificou-se um produto de degradação.

○ HPLC

Figura 93: Cromatograma do cloridrato de metformina (MET) 0,30 mg/mL, exposto à degradação por oxidação. Condições: Coluna Bondclone® C18 Phenomenex®; fase móvel: tampão cloreto de sódio 8,5 mmol/L + heptanossulfonato de sódio 2,5 mmol/L : acetonitrila (90:10); vazão 1,0 mL min⁻¹; volume injetado 20 µL; temperatura: 30°C; detecção UV: 210 nm.

○ CZE

Figura 94: Eletroferograma do cloridrato de metformina (MET) 0,30 mg/mL exposto à degradação por oxidação. Condições: solução de trietilamina 40 mmol/L com pH 2,3; Tensão +22 kV, coluna capilar (40,2 cm x 75 µm I.D.), detecção UV a 200 nm, temperatura 25°C e injeção por pressão 0,3 psi/ 3 s.

○ MEKC

Figura 95: Eletroferograma do cloridrato de metformina (MET) 0,30 mg/mL, exposto à degradação por oxidação. Condições: eletrólito solução de trietilamina 20 mmol/L, dodecil sulfato de sódio 30 mmol/L, pH 1,7; Tensão +15 kV, coluna capilar (40,2 cm x 75 µm I.D.), detecção UV a 200 nm, temperatura 25°C e injeção por pressão 0,3 psi/ 3 s.

4.2.3.7 Degradação por fotólise

Após 60 horas de exposição do cloridrato de metformina em estado sólido à fotólise, não foram evidenciados picos extras pelas metodologias desafiadas (Figuras 96, 97 e 98), o que indica que não houve alteração no fármaco para esta degradação.

○ HPLC

Figura 96: Cromatograma do cloridrato de metformina (MET) 0,30 mg/mL. exposto à degradação fotolítica. Condições: Coluna Bondclone® C18 Phenomenex®; fase móvel: Tampão cloreto de sódio 8,5 mmol/L + heptanossulfonato de sódio 2,5 mmol/L : acetonitrila (90:10); vazão 1,0 mL min⁻¹; volume injetado 20 µL; temperatura: 30°C; detecção UV: 210 nm.

○ CZE

Figura 97: Eletroferograma do cloridrato de metformina (MET) 0,30 mg/mL, exposto à degradação por fotólise. Condições: solução de trietilamina 40 mmol/L, pH 2,3; Tensão +22 kV, coluna capilar (40,2 cm x 75 µm I.D.), detecção UV a 200 nm, temperatura 25°C e injeção por pressão 0,3 psi/ 3 s.

○ MEKC

Figura 98: Eletroferograma do cloridrato de metformina (MET) 0,30 mg/mL exposto à degradação por fotólise. Condições: eletrólito solução de trietilamina 20 mmol /L, dodecil sulfato de sódio 30 mmol/L, pH 11,7; Tensão +15 kV, coluna capilar (40,2 cm x 75 µm I.D.), detecção UV a 200 nm, temperatura 25°C e injeção por pressão 0,3 psi/ 3 s.

4.2.4 Aprimoramento da metodologia desenvolvida

Foram realizados testes mudando o comprimento do capilar e mudando a tensão aplicada. Os melhores resultados foram atingidos quando se mudou a tensão aplicada de + 22 kV para +18 kV. Na Tabela 11, estão apresentados os valores calculados da resolução entre os picos obtidos na degradação forçada ácida.

Tabela 11: Resultados encontrados no aprimoramento da metodologia para mudança na tensão aplicada

Picos	Tensão +22 kV			Tensão +18 kV		
	Tempo de retenção	Resolução		Tempo de retenção	Resolução	
Cloridrato de Metformina	2,804			3,388		
TRR* 1,06	2,979		1,40	3,604		1,73
TRR* 1,14	3,183		2,04	3,871		2,67
TRR* 1,46	4,067	7,07		4,942	8,57	

* Tempo relativo de retenção

Nas Figuras 99 e 100, estão retratados os eletroferogramas correspondentes ao aprimoramento da metodologia.

Figura 99: Eletroferograma correspondente ao aprimoramento da metodologia (mudança da tensão aplicada). Condições: solução de trietilamina 40 mmol/L com pH 2,3; Tensão **+22 kV**, coluna capilar (40,2 cm x 75 μ m I.D.), detecção UV a 200 nm, temperatura 25°C e injeção por pressão 0,3 psi/ 3 s.

Figura 100: Eletroferograma correspondente ao aprimoramento da metodologia (mudança da tensão aplicada). Condições: solução de trietilamina 40 mmol/L com pH 2,3; Tensão **+18 kV**, coluna capilar (40,2 cm x 75 μ m I.D.), detecção UV a 200 nm, temperatura 25°C e injeção por pressão 0,3 psi/ 3 s.

4.2.5 Validação da metodologia desenvolvida utilizando a eletroforese capilar em zona (CZE)

4.2.5.1 Especificidade

A especificidade é a capacidade que um método tem de avaliar, de maneira inequívoca, a substância em exame na presença de componentes que poderiam interferir com sua determinação numa mistura complexa^{12,22,50,77,79}.

As Figuras 101 a 112 apresentam os resultados da pesquisa de interferentes a partir dos excipientes da amostra comercial e da degradação forçada, o que mostrou que não houve interferência na quantificação do cloridrato de metformina. Portanto, o método demonstrou ser aplicável à quantificação do cloridrato de metformina na amostra comercial para estudos de estabilidade.

Pesquisa de interferentes a partir do placebo

Figura 101: Eletroferograma do cloridrato de metformina padrão. Condições: solução de trietilamina 40 mmol/L pH 2,3; Tensão +18 kV, coluna capilar (40,2 cm x 75 µm I.D.), detecção UV a 200 nm, temperatura 25°C e injeção por pressão 0,3 psi/ 3 s.

Figura 102: Eletroferograma do cloridrato de metformina amostra. Condições: solução de trietilamina 40 mmol/L pH 2,3; Tensão +18 kV, coluna capilar (40,2 cm x 75 µm I.D.), detecção UV a 200 nm, temperatura 25°C e injeção por pressão 0,3 psi/ 3 s.

Figura 103: Eletroferograma do placebo. Condições: solução de trietilamina 40 mmol/L pH 2,3; Tensão +18 kV, coluna capilar (40,2 cm x 75 µm I.D.), detecção UV a 200 nm, temperatura 25°C e injeção por pressão 0,3 psi/3 s.

Pesquisa de interferentes a partir do teste de estresse

Nas análises feitas, foi verificada a degradação do cloridrato de metformina nas condições de hidrólise básica, hidrólise ácida e na degradação oxidativa.

Na hidrólise básica, formaram-se dois produtos de degradação no padrão; nas amostras, também verificou-se a presença destes dois produtos e, no placebo, para a mesma degradação, não ocorreu a formação de nenhum produto.

Na hidrólise ácida, foi verificada a presença de três produtos de degradação; tanto no padrão como na amostra e no placebo, não ocorreu formação de nenhum produto.

Na degradação oxidativa, também foi verificada a presença de três produtos de degradação no padrão; nas amostras, verificou-se a presença de quatro produtos de degradação e, no placebo, não ocorreu formação de nenhum produto de degradação.

Figura 104: Eletroferograma do padrão de cloridrato de metformina exposto à degradação básica (3 horas). Condições: solução de trietilamina 40 mmol/L pH 2,3; Tensão +18 kV, coluna capilar (40,2 cm x 75 µm I.D.), detecção UV a 200 nm, temperatura 25°C e injeção por pressão 0,3 psi/ 3 s.

Figura 105: Eletroferograma do cloridrato de metformina amostra exposto à degradação básica (3 horas). Condições: solução de trietilamina 40 mmol/L pH 2,3; Tensão +18 kV, coluna capilar (40,2 cm x 75 µm I.D.), detecção UV a 200 nm, temperatura 25°C e injeção por pressão 0,3 psi/ 3 s.

Figura 106: Eletroferograma do cloridrato de metformina placebo exposto à degradação básica (3 horas). Condições: solução de trietilamina 40 mmol/L pH 2,3; Tensão +18 kV, coluna capilar (40,2 cm x 75 µm I.D.), detecção UV a 200 nm, temperatura 25°C e injeção por pressão 0,3 psi/ 3 s.

Figura 107: Eletroferograma do cloridrato de metformina padrão exposto à degradação ácida (96 horas). Condições: solução de trietilamina 40 mmol/L pH 2,3; Tensão +18 kV, coluna capilar (40,2 cm x 75 µm I.D.), detecção UV a 200 nm, temperatura 25°C e injeção por pressão 0,3 psi/ 3 s.

Figura 108: Eletroferograma da amostra do cloridrato de metformina exposto à degradação ácida (96 horas). Condições: solução de trietilamina 40 mmol/L pH 2,3; Tensão +18 kV, coluna capilar (40,2 cm x 75 µm I.D.), detecção UV a 200 nm, temperatura 25°C e injeção por pressão 0,3 psi/ 3 s.

Figura 109: Eletroferograma do placebo exposto à degradação ácida (96 horas). Condições: solução de trietilamina 40 mmol/L pH 2,3; Tensão +18 kV, coluna capilar (40,2 cm x 75 µm I.D.), detecção UV a 200 nm, temperatura 25°C e injeção por pressão 0,3 psi/ 3 s.

Figura 110: Eletroferograma do cloridrato de metformina padrão exposto à degradação oxidativa (168 horas). Condições: solução de trietilamina 40 mmol/L pH 2,3; Tensão +18 kV, coluna capilar (40,2 cm x 75 µm I.D.), detecção UV a 200 nm, temperatura 25°C e injeção por pressão 0,3 psi/ 3 s.

Figura 111: Eletroferograma do cloridrato de metformina amostra exposta à degradação oxidativa (168 horas). Condições: solução de trietilamina 40 mmol/L pH 2,3; Tensão +18 kV, coluna capilar (40,2 cm x 75 µm I.D.), detecção UV a 200 nm, temperatura 25°C e injeção por pressão 0,3 psi/ 3 s.

Figura 112: Eletroferograma do placebo exposto à degradação oxidativa (168 horas). Condições: solução de trietilamina 40 mmol/L pH 2,3; Tensão +18 kV, coluna capilar (40,2 cm x 75 µm I.D.), detecção UV a 200 nm, temperatura 25°C e injeção por pressão 0,3 psi/ 3 s.

4.2.5.2 Linearidade para o teor

Após serem definidos os parâmetros, foi construída a curva de calibração num intervalo de concentrações de 0,210 a 0,360 mg/mL de cloridrato de metformina (Figura 113, Tabela 12). Obteve-se boa linearidade, com coeficiente de correlação de $r = 0,995$

Segundo Altria¹⁰, o coeficiente de correlação de linearidade acima de 0,99 e a interseção perto da origem são satisfatórios para o método de eletroforese capilar.

Figura 113: Curva de calibração do cloridrato de metformina na faixa de concentrações de 0,210 a 0,360 mg/mL; detecção UV 200 nm; padrão interno, cloridrato de ioimbina (100 µg mL⁻¹); eletroforese capilar em zona.

Tabela 12: Resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração do método específico por CZE

Concentração de leitura (mg/mL)	Relação das áreas*(A/A)**
0,2111	1,1288
0,2413	1,3865
0,2714	1,5301
0,3016	1,8767
0,3318	2,0781
0,3619	2,2510
Intercepto da curva	-0,4717
Inclinação da curva	7,6092
Desvio-padrão	0,04760
Coeficiente de correlação r	0,995

* Média de três leituras.

** Razão das áreas dos picos (cloridrato de metformina/cloridrato de ioimbina)

4.2.5.3 Linearidade para os produtos de degradação

Após serem definidos os parâmetros, foi construída a curva de calibração, num intervalo de concentrações de 0,1508 a 0,4523 µg/mL, de cloridrato de metformina (Figura 114, Tabela 13). Obteve-se linearidade, com coeficiente de correlação de $r = 0,998$.

Segundo Altria¹⁰, o coeficiente de correlação de linearidade acima de 0,99 e a interseção perto da origem são satisfatórios para o método de eletroforese capilar.

Tabela 13: Resultados experimentais obtidos na linearidade para produtos de degradação do método por CZE

Concentração de leitura (mg/mL)	Relação das áreas* (A/A)**
0,00015075	0,0008658
0,00020100	0,0010611
0,00025125	0,0014515
0,00035175	0,0021237
0,00045225	0,0026858
Intercepto da curva	-0,00012091
Inclinação da curva	6,249
Desvio-padrão	0,0000578039
Coeficiente de correlação r	0,998

* Média de três leituras.

** Razão das áreas dos picos (cloridrato de metformina/cloridrato de ioimbina)

Figura 114: Curva de calibração do cloridrato de metformina na faixa de concentrações de 0,00015 a 0,00045 mg/mL; detecção UV 200 nm; padrão interno, cloridrato de ioimbina (0,100 mg/mL); eletroforese capilar em zona.

4.2.5.4 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção foi de 0,03053 µg/mL e o limite de quantificação foi de 0,09250 µg/mL, os resultados indicam que o método utilizado apresenta limites aceitáveis para a quantificação dos produtos de degradação.

4.2.5.5 Precisão do sistema

4.2.5.5.1 Concentração do teor

Dez injeções da mistura (cloridrato de metformina e cloridrato de ioimbina) foram realizadas para demonstrar a precisão do sistema para a concentração do teor. O desvio padrão relativo (%DPR) para a razão das áreas dos picos foi de 0,710%, menor que 1%. Portanto, a precisão da injeção foi considerada satisfatória, segundo os critérios de aceitação¹⁰.

4.2.5.5.2 Concentração de quantificação do produto de degradação

Dez injeções da mistura (cloridrato de metformina e cloridrato de ioimbina) foram realizadas para demonstrar a precisão do sistema para a concentração dos produtos de degradação. O desvio padrão relativo (%DPR) para a razão das áreas dos picos foi de 7,677%, menor que 10%. Portanto, a precisão da injeção foi considerada satisfatória, segundo os critérios de aceitação²².

4.2.5.6 Precisão do método

A precisão representa o grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais quando o procedimento é aplicado diversas vezes numa mesma amostra homogênea, em idênticas condições de testes. Normalmente, é expressa pelo coeficiente de variação em número significativo de amostras^{12,22,62,77}.

4.2.5.6.1 Repetibilidade

A Tabela 14 apresenta os resultados obtidos na determinação da repetibilidade do método. Pode-se observar que o desvio padrão relativo (%DPR) para a razão das áreas dos picos foi menor que 5%. Portanto, a precisão da injeção foi considerada satisfatória, segundo os critérios de aceitação¹².

4.2.5.6.2 Precisão intermediária

A Tabela 24 também apresenta os resultados obtidos na determinação da precisão intermediária. Pode-se observar que o desvio padrão relativo (%DPR) para a razão das áreas dos picos foi menor que 5% para as três concentrações com as quais se trabalhou nos três dias consecutivos. Portanto, a precisão da injeção foi considerada satisfatória, segundo os critérios de aceitação¹².

Tabela 14: Resultados obtidos nas determinações da repetibilidade e da precisão intermediária do método específico por CZE

Cloridrato de metformina (%)	Repetibilidade do método (%DPR)	Precisão intermediária do método (%DPR)
80,0	-----	4,29
100,0	3,96	4,53
120,0	-----	4,67

4.2.5.7 Exatidão

O teste de recuperação está relacionado com a exatidão do método, o qual traduz o grau de concordância entre os resultados encontrados pelo método e um valor aceito como referência^{12, 50,22}.

Os resultados obtidos para o teste de recuperação do cloridrato de metformina, estão na faixa de 99,69 a 103,43%, apresentando boa recuperação da metodologia.

5 CONCLUSÕES

- ✓ A identificação qualitativa da glibenclamida e do cloridrato de metformina matérias-primas foi realizada de maneira satisfatória.
- ✓ A metodologia desenvolvida por cromatografia líquida de alta eficiência para a glibenclamida mostrou-se eficiente no monitoramento dos produtos de degradação desta molécula.
- ✓ Foram encontrados três produtos de degradação para a glibenclamida, utilizando a metodologia HPLC desenvolvida.
- ✓ Foi identificado o produto de degradação da glibenclamida (*4-[2-5-chloro-2-methoxybenzamido) ethyl] benzenesulfonamide*, utilizando-se a técnica hifenada LC-MS.
- ✓ A metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência com eluição em gradiente foi desenvolvida com boa separação entre a glibenclamida e seus produtos de degradação. O tempo de análise foi de menos de 15 minutos.
- ✓ A metodologia desenvolvida por eletroforese capilar em zona para o cloridrato de metformina teve boa *performance* no monitoramento dos produtos de degradação desta molécula.
- ✓ Foram encontrados cinco produtos de degradação para o cloridrato de metformina utilizando a metodologia CZE desenvolvida
- ✓ A metodologia por eletroforese capilar em zona foi desenvolvida com boa separação entre o cloridrato de metformina, seus produtos de degradação e o cloridrato de iombina (padrão interno). A metodologia permite a análise em menos de 12 minutos.
- ✓ As duas metodologias foram validadas com resultados satisfatórios.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Tendo em vista os achados deste trabalho, verifica-se, como perspectiva futura, a oportunidade de elucidar os seguintes pontos:

- a) identificar os dois produtos de degradação da glibenclamida que não foram identificados utilizando a metodologia otimizada, que foi validada com resultados satisfatórios;
- b) Identificar os produtos de degradação do cloridrato de metformina, utilizando a técnica hifenada CE-MS juntamente com o método validado que foi desenvolvido nesta pesquisa.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABURUZ, S.; MILLERSHIP, J.; MCELNAY, J. Determination of metformin in plasma using a new ion pair solid phase extraction technique and ion pair liquid chromatography. **Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.798, n.2, p.203-209, 2003..
2. ABURUZ, S.; MILLERSHIP, J.; MCELNAY, J. The development and validation of liquid chromatography method for the simultaneous determination of metformin and glipizide, gliclazide, glibenclamide or glimiperide in plasma. **Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.817, n.2, p.277-286, 2005.
3. ADAMS, W.J., SKINNER, G.S., BOMBARDT, P.A., COURTNEY, M., BREWER, J. E. Determination of glyburide in human serum by liquid chromatography with fluorescence detection. **Analytical Chemistry**, v.54, n.8, p.1287-1291, 1982.
4. ADHIKARI, L., JAGADEV, S., SAHOO, S., MURTHY, P.N. MISHRA, U.S. Developement and validation of UV-visible spectrophotometric method for simultaneous determination of pioglitazone hydrochloride, metformin hydrochloride and glipizide in its bulk and pharmaceutical dosage form. **International. Journal of ChemTech Research**, v.4, n.2, p.625-630, 2012.
5. ALI, M.S., RAFIUDDIN, S., GHORI, M., KHATRI, A.R. Simultaneous determination of metformin hydrochloride, cyanoguanidine and melamine in tablets by mixed-mode HILIC. **Chromatographia**. v.67, n. 67-68, p.517-525, 2008.
6. AL-KHAMIS, K.I., EL-SAYED, Y.M., AL-RHASOOD, K.A., AL-YAMANI, M. High-performance liquid chromatographic method for determination of glibenclamide in human plasma. **Analytical Letters**, v.27, p.1277-1293, 1994.
7. AL-RIMAWI, F. Development and validation of an analytical method for metformin hydrochloride and its related compound (1-cyanoguanidine) in tablet formulations by HPLC-UV. **Talanta**, v.79, n.5, p.1368-1371, 2009.

8. ALSANTE, K.M., ANDO, A., BROWN, R., ENSING, J., HATAJIK, T.D., KONG, W., TSUDA, Y. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p.29-37, 2007.
9. ALTRIA, K. D., ed. **Capillary electrophoresis guidebook**: principles, operation and applications. Totowa: Humana Press, 1996. 349p. (Methods in Molecular Biology, 52).
10. ALTRIA, K.D., RUDD, D.R. An overview of method validation and system suitability aspects in capillary electrophoresis. **Chromatographia**, v.41, p.325-331, 1995.
11. ANDREWS, C.L., YU, C., YANG, E., VOUREOS, P. Improved liquid chromatography–mass spectrometry performance in quantitative analysis using a nanosplitter interface. **Journal of Chromatography A**, v.1053, p.151-159, 2004.
12. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGIÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. VisaLegis. **Resolução RE n.899, de 29 de maio de 2003**. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word=>. Acesso em: 10 jul. 2012..
13. ASHOUR, S., KABBANI, R. Direct spectrophotometric determination of metformin hydrochloride in pure form and in drug formulations. **Analytical Letters**, v.36, p.361-370, 2003.
14. BAERTSCHI, S.W. ed. **Pharmaceutical stress testing**: prediction drug degradation Boca Raton, London: Taylor & Francis, 2005. 482p. (Drugs and the pharmaceutical sciences, 153).
15. BAERTSCHI, S.W.; ALSANTE, K.M.; REED, R.A. **Pharmaceutical stress testing**: predicting drug degradation. 2.ed. New York: Informa Healthcare, 2011. 624p. (Drugs and the pharmaceutical sciences, 210).
16. BAERTSCHI, S. W.; JANSEN, P. J.; ALSANTE, K.M. **A predictive tool in pharmaceutical stress testing. Predicting drug degradation**. 2.ed. Informa Healthcare, 2011. 624p.
17. BAKER, D.R. **Capillary Electrophoresis**. New York: John Wiley, 1995. 244p. (Techniques in analytical chemistry series).

18. BALSBI, M., SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods: critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.28, p.1011-1040, 2002.
19. BANDARKAR, F.S., KHATTAB, I.S. Simultaneous estimation of glibenclamide, gliclazide, and metformin hydrochloride from bulk and commercial products using a validated ultra fast liquid chromatography technique. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.33, n.20, p.1814-1830, 2010.
20. BANSAL, G.A., SINGH, M.A, JINDAL, K.C.B, SINGH, S.C. Ultraviolet-photodiode array and high-performance liquid chromatographic/mass spectrometric studies on forced degradation behavior of glibenclamide and development of a validated stability-indicating method. **Journal of AOAC International**, v.91, n.4, p.709-719, 2008.
21. BELAL, F.F., EL-DIN, M.K.S., ALY, F.A., HEFNAWY, M.M., EL-AWADY, M.I. Spectrophotometric analysis of a mixture of glyburide and metformin HCl in pharmaceutical preparations. **Der Pharma Chemica**, v.3, n.1, p.53-64, 2011.
22. BLIESNER, D.M. **Validating chromatographic methods. A practical guide.** New Jersey: Wiley Interscience, 2006. p.291
23. BRITISH Pharmacopeia 2012. London: Her Majesty's Stationery Office, 2011. p.7200.
24. CHEN, B., LIANG, Y., GUO, F., HUANG, L., DENG, F., CHEN, X., WANG, Y. Rapid, simple, specific liquid chromatographic-electrospray mass spectrometry method for the determination of glibenclamide in human plasma. **Analytical Chimica Acta**, v.514, p. 185-191, 2004.
25. CHENG, C., CHOU, C. Determination of metformin in human plasma by high-performance liquid chromatography with spectrophotometric detection. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v.762, n.1, p. 51-58, 2001.
26. CHERKAoui, S., DAALI, Y., CHRISTEN, P., VEUTHEY, J. Development and validation of liquid chromatography and capillary electrophoresis methods for acarbose determination in pharmaceutical tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.18, p.729-735, 1998.
27. CLARKE, E.G., MOFFAT, A.C., JACKSON, J.V., MOSS, M.S., WIDDOP, B., GREENFIELD, E.S.. **Clarke's isolation and identification of drugs in**

- pharmaceuticals, body fluids, and post-mortem material.** 2.ed. London: Pharmaceutical Press, 1986. 1223p.
28. COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos.** 6 ed. Campinas: UNICAMP, 1995. 279p. (Série Manuais).
 29. DOLAN, J.W. Stability-indicating assays. **LC-GC Europe**, p.274-276, 2002. Disponível em: <http://www.chromatographyonline.com/lcgc/data/articlestandard/lcgceurope/182002/17642/article.pdf>. Acesso em 20 de maio 2009.
 30. EAPEN, C., PRASANTH, V.G., RAI, A. Development of UV spectrometric method of glibenclamide (Glyburide) in bulk and pharmaceutical formulations. **International Journal of ChemTech Research**, v.4, n.1, p.356-360, 2012.
 31. EUROPEAN Pharmacopoeia 7.0. Strassbourg: Council of Europe, 2010. p.3310
 32. UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. **Guidance for Industry:** analytical procedures and method validation: chemistry, manufacturing, and controls documentation. Rockville: FDA, 2000. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm122858.pdf>. Acesso em: 2 abr.
 33. GADAPE, H.H., PARIKH, K.S. Quantitative determination and validation of metformin hydrochloride in pharmaceutical using quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy. **E-Journal of Chemistry**. v.8, n.2, p.767-781, 2011.
 34. GOMES, P., SIPPEL, J., JABLONSKI, A., STEPPE, M. Determination of rosiglitazone in coated tablets by MEKC and HPLC methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.36, p.909-913, 2004.
 35. GOODMAN, L.S., GIMAN, A.; HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. **Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapêutica.** 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana, 2000. 1647p.
 36. GUMIENICZEK, A., BERECKA, A., HOPKALA, H., MROCZEK, T. Rapid HPTLC determination of rosiglitazone in pharmaceutical formulations. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.26, p.3307-3314, 2003.
 37. HAMDAN, I.I., JABER, A.K.B., ABUSHOFFA, A.M. Development and validation of a stability indicating capillary electrophoresis method for the determination of

- metformin hydrochloride in tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.53, n.5, p.1254-1257, 2010.
38. HASSAN, S.S., MAHMOUD, W.H., ELMOSALLAMY, A.F., OTHMAN, A.M. Determination of metformin in pharmaceutical preparations using potentiometry, spectrofluorimetry and UV–visible spectrophotometry. **Analytical Chimica Acta**, v.378, p.299-311, 1999.
 39. HAVELE, S.S., DHANESHWAR, S.R. Simultaneous determination of metformin hydrochloride in its multicomponent dosage forms with sulfonyl ureas like gliclazide and glimepiride using HPTLC. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.34, n.12, p.966-980, 2011.
 40. HO, E.M., YIU, K.H., WAN, T.M., STEWART, B.D., WATKINS, K.L. Detection of anti-diabetics in equine plasma and urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.811, n.1, p.65-73, 2004.
 41. HUUPPONEN, R., OJALA-KARLSSON, P., ROURU, J., KOULE, M. Determination of metformin in plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v.583, p.270-273, 1992.
 42. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN. Quality Guidelines. View All Quality Guidelines. Q1A (R2). Stability testing of new drug substances and products. 2005. Disponível em: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1A_R2/Step4/Q1A_R2_Guideline.pdf. Acesso em: 03 abr. 2008.
 43. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN. Quality Guidelines. View All Quality Guidelines. Q1B. **Stability testing**: photostability testing of new drug substances and products. 1996. Disponível em: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1B/Step4/Q1B_Guideline.pdf. Acesso em: 12 out. 2009.
 44. JAYANTHI, M., THIRUNAVUKKARASU, S.V., NAGARAJAN, V., ELANGO VAN, S., RAJA, S. Development and validation of RP-HPLC method for determination of glibenclamide in pharmaceutical dosage forms. **International Journal of ChemTech Research**, v.4, n.2, p.593-601, 2012.

45. JOSHI, S.S., NAHIRE, R.R., SHASTRI, N.R., SURENDRANATH, K.V., SATISH, J. Validated stability-indicating RP-HPLC UV method for simultaneous determination of metformin and repaglinide. **Acta Chromatographica**. v.24, n.3, p.419-432, 2012.
46. KALE, D., KAKDE, R. Simultaneous determination of pioglitazone, metformin, and glimepiride in pharmaceutical preparations using HPTLC method. **Journal of Planar Chromatography - Modern TLC**. v.24, n.4, p.331-336, 2011.
47. KEAL, J., SOMOGYI, A. Rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic assay for metformin in plasma and urine using ion-pair extraction techniques. **Journal of Chromatography, Biomedical Applications**, v.378, p.503-508, 1986.
48. KHAN, B., ABDUL-SHAKEER, NAWAZ, S., ALTAF, A. Development and validation of type-2 diabetes drug in combination metformin and glibenclamide by HPLC. **Asian Journal of Chemistry**, v.23, n.8, p.3347-3349, 2011
49. KIM, K., PARK, J. Simple and extractionless high-performance liquid chromatographic determination of rosiglitazone in human plasma and application to pharmacokinetics in humans. **Biomedical Chromatography**, v.18, p.613-615, 2004.
50. LEITE, F. **Validação em análise química**. 5.ed. Campinas: Átomo, 2008. 360p.
51. LINDER, G., HERBERTZ, L., REINAUER, H. Bestimmung von glibenclamid mit radioimmunoassay und hochdruckflüssigkeitschromatographie im serum von diabetikern. **Laboratoriumsmedizin**, p.34-37, 1980.
52. MAMIDI, R.V., BENJAMIN, B., RAMESH, M., SRINIVAS, N.R. Simple method for the determination of rosiglitazone in human plasma using a commercially available internal standard. **Biomedical Chromatography**, v.17, p.417-420, 2003.
53. MODI, D.K., PATEL, B.H. Simultaneous determination of metformin hydrochloride and glipizide in tablet formulation by HPTLC. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.35, n.1, p.28-39, 2012.
54. NERY, C.C., PIANETTI, G.A., PIRES, M.A., MOREIRA-CAMPOS, L.M., VIANNA-SOARES, C.D. Caracterização do fármaco hipoglicemiante glibenclamida. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.44, p.61-73, 2008.

55. NIOPAS, I., DAFTSIOS, A.C.A. validated high-performance liquid chromatographic method for the determination of glibenclamide in human plasma and its application to pharmacokinetic studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.28, p. 653-657, 2002.
56. NOLTE, M.S., KARAM, J.H. Hormônios pancreáticos & fármacos antidiabéticos. In KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica & clínica**. 10.ed. Porto Alegre: AMGH, 2010. cap. 41, p.631-635
57. OHTA, M., IWASAKI, M., KAI, M., OHKURA, Y. Determination of a Biguanide, Metformin, by High-performance liquid chromatography with precolumn fluorescence derivatization. **Analytical Sciences**, v.9, p.217-220, 1993.
58. RADHAKRISHNA, T., SATYANARAYANA, J., SATYANARAYANA, A. LC determination of rosiglitazone in bulk and pharmaceutical formulation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.29, p.873-880, 2002.
59. REMINGTON: The science and practice of pharmacy 20.ed. Baltimore: Lippincott: William&Wilkins, 2000. 1554p.
60. RETHFELD, I., BLASCHKE, G. Analysis of the antidiabetic drug acarbose by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v.700, n1/2, p.249-253, 1997
61. REYNOLDS, D.W., FACCHINE, K.L., MULLANEY, J.F., ALSANTE, K.M.; HATAJIK, T.D., MOTTO, M.G. Available guidance and best practices for conducting forced degradation studies. **Pharmaceutical Technology**, v.26, n.2, p.48-54, 2002.
62. RIBANI, M., GRESPAN, B.B., COLLINS, C.H., FONTES-JARDIM, I.C., COSTA, M.F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, p.771-780, 2004.
63. SANE, R.T., FRANCIS, M., MOGHE, A., KHEDKHAR, S., ANERAIO, A. High-performance thin-layer chromatographic determination of rosiglitazone in its dosage form. **Journal of Planar Chromatography – Modern TLC**, v.15, p.192-195, 2002.
64. SANKALIA, J. M., SANKALIA, M. G., SUTARIYA, V. B., MASHRU, R. C. Nateglinide quantification in rabbit plasma by HPLC: Optimization and application to pharmacokinetic study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.44, p.193-204, 2007.

65. SANKAR, D.G., KUMAR, J.R., REDDY, M.V. UV spectrophotometric methods for the determination of anti-diabetic drugs. **Asian Journal of Chemistry**, v.16, p.537-539, 2004.
66. SANTORO, M.R., AURORA-PRADO, M.S., STEPPE, M., KEDOR-HACKMANN, E.R.M. Electroforese capilar: teoria e aplicações na análise de medicamentos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.36, p.579-611, 1994.
67. VALDES SANTURIO, J., GONZALES PORTO, E. Determination of glibenclamide in human plasma by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v.682, n.2, p.364-370, 1996.
68. SARTORI, E.R., SUAREZ, W.T., FATIBELLO-FILHO, O. Determinação condutométrica de cloridrato de metformina em formulações farmacêuticas empregando nitrato de prata como titulante. **Química Nova**, v.32, n.7, p.1947-1950, 2009.
69. HOLLER, F.J.; SKOOG, D.A., CROUCH, S.R. **Princípios de análise instrumental**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. 836p.
70. SMELA, M. J. Regulatory considerations for stability indicating analytical methods in drug substance and drug product testing. Disponível em www.americanpharmaceuticalreview.com. Acesso em: 18 out. 2009.
71. SNYDER, L.R., KIRKLAND, J.J., GLAJCH, J.L. **Practical HPLC method development**. 2. ed. New York: John Wiley, 1997. 765p.
72. SONG, J., CHEN, H., TIAN, S., SUN, Z. Determination of metformin in plasma by capillary electrophoresis using field-amplified sample stacking technique. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications** v.708, n.1/2, p.277-283, 1998.
73. SONI, L.K., NARSINGHANI, T., JAIN, M. Development and validation of rp-hplc method for simultaneous estimation of metformin hydrochloride and repaglinide in tablet dosage form. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.35, n.3, p.385-392, 2012.
74. SØRENSEN, L.K. Determination of metformin and other biguanides in forensic whole blood samples by hydrophilic interaction liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, v.26, n.1, p.1-5, 2012.

75. STEWART, P.J., TUCKER, I.G. Prediction of drug stability. Part 2 Hydrolysis. **Australian Journal of Hospital Pharmacy**, v.15, n.1, p.11-16, 1985.
76. SWARTZ, M. E., KRULL, I. S. Developing and validating stability-indicating methods. LCGC, 2005. Disponível em: <http://www.chromatographyonline.com/lcgc/article/articleDetail.jsp?id=165201>. Acesso em: 19 abr. 2009.
77. SWARTZ, M.E., KRULL, I.S. **Handbook of analytical validation**. New York: CRC Press, 2012. 206p.
78. TAKLA, P. G., JOSHI, S. R. The identification, assay and purity determination of chlorpropamide, glibenclamide and tolbutamide and their tablet preparations by thin-layer chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.1, p.189-193, 1983.
79. UNITED States Pharmacopeia: 35; National Formulary: NF30. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2011. p.4200
80. WANG, Y., TANG, Y., GU, J., FAWCETT, J. P., BAI, X. Rapid and sensitive liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for the quantitation of metformin in human plasma. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.808, p.215-219, 2004.
81. WEI, S.-Y., YEH, H.-H., LIAO, F.-F., CHEN, S.-H. CE with direct sample injection for the determination of metformin in plasma for type 2 diabetic mellitus: An adequate alternative to HPLC. **Journal of Separation Science**, v.32, n.3, p.413-421, 2009.
82. YAN, H., YAN, G., QIAO, F., CHEN, Y. Determination of nateglinide in animal plasma by micellar electrokinetic chromatography and on-line sweeping technique. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.36, p.169-174, 2004
83. YARDIMCI, C., ÖZALTIN, N. Method development and validation for the simultaneous determination of rosiglitazone and metformin in pharmaceutical preparations by capillary zone electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v.549, n.1-2, p.88-95, 2005.
84. YUEN, K. H., PEH, K.K. Simple high-performance liquid chromatographic method for the determination of metformin in human plasma. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v.710, n. 1/2, p. 243-246, 1998. [short communication].

85. ZARGHI, A., FOROUTAN, S.M., SHAFATI, A., KHODDAM, A. Rapid determination of metformin in human plasma using ion-pair HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.31, p.197-200, 2003.
86. ZNALEZIONA, J.A., MAIER, V.B., RANC, V.A., ŠEVČÍK, J.A. Determination of rosiglitazone and metformin in human serum by CE-ESI-MS. **Journal of Separation Science**, v.34, n.10, p.1167-1171, 2011.