

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-graduação em Fármacos e Medicamentos

Área de Produção e Controle Farmacêutico

Desenvolvimento e validação de métodos analíticos eletroforéticos e cromatográficos para determinação de fármacos para o tratamento do diabetes tipo 2.

Octávio Valentin Lourenço Agostinho

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Segunda Aurora Prado

São Paulo

2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-graduação em Fármacos e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêutico

Desenvolvimento e validação de métodos analíticos eletroforéticos e cromatográficos para determinação de fármacos para o tratamento do diabetes tipo 2.

Octávio Valentin Lourenço Agostinho

Versão Corrigida

Dissertação para obtenção do Título de Mestre
Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Segunda Aurora Prado

São Paulo

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

AA275d
d Agostinho, Octávio Valentin Lourenço
Desenvolvimento e validação de métodos analíticos eletroforéticos e cromatográficos para determinação de fármacos para o tratamento do diabetes tipo 2. / Octávio Valentin Lourenço Agostinho. - São Paulo, 2021.
107 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Prado, Maria Segunda Aurora

1. Cromatografia líquida de alta eficiência. 2. Eletroforese capilar de zona. 3. Métodos de separação. I. T. II. Prado, Maria Segunda Aurora, orientador.

Octávio Valentin Lourenço Agostinho

Desenvolvimento e validação de métodos analíticos eletroforéticos e cromatográficos para determinação de fármacos para o tratamento do diabetes tipo 2.

Comissão Julgadora
Da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof.^a Dra. María Segunda Aurora Prado

Orientadora / Presidente

1º Examinador

2º Examinador

3º Examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2021.

Dedico este trabalho aos meus pais, Aerton e Rosangela, por todo o suporte e criação que me deram ao longo da vida.

Também dedico a todos os profissionais da pesquisa acadêmica brasileira que sempre trabalharam com muita qualidade, mesmo isentos de recursos.

Dedico e presto a minha homenagem a todos os profissionais da pesquisa e saúde que estão trabalhando duro desde o início de 2020 na guerra contra o Covid-19.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, Aerton, por todo o suporte e orientação durante a minha vida pessoal e acadêmica.

A minha mãe, Rosangela, por todo o amor dado e a criação excepcional na minha vida.

Ao meu marido, Anderson, por ter me dado todo o apoio emocional durante o período deste projeto.

A minha orientadora, Prof^a Dr^a María Segunda Aurora Prado, por todo o suporte e conhecimento, pela orientação durante esses anos de trabalho, obrigado pela confiança, sempre me apoiou em todas as ideias e projetos.

A Professora Veni Maria Andres Felli, que me deu a grande oportunidade de ingressar em seu laboratório fazendo iniciação científica.

Ao professor, Maxim Berezovski pela orientação e oportunidade em ter me aceito como aluno visitante em seu laboratório na Universidade de Ottawa, Canadá. Obrigado pelo grande trabalho que realizamos em parceria entre nossas universidades.

Ao meu amigo, Fernando Kaneko, que me deu muito suporte durante os períodos de IC e mestrado.

A minha grande amiga, Janaína, que sempre me ouviu e me deu os melhores conselhos pessoais e acadêmicos.

Ao meu amigo de laboratório, Frank, muitas vezes me ajudou e trouxe seu conhecimento de indústria para o nosso laboratório.

A todos os colegas de laboratório da USP, Edilson, Amanda, Franciele, Elis.

A minha grande amiga, Stefani, que sempre me apoiou em minhas escolhas e sempre trocamos grandes experiências acadêmicas.

A colega do IQ, Adriana de Macedo, que me deu todas as dicas para estudar no Canadá e me ensinou a usar o CE.

A uma grande colega, Rosania, que fez parte da FCF-USP e que me ajudou muito no meu período de IC e que infelizmente perdeu a vida para o COVID-19 em 2020.

Aos meus colegas e amigos de indústria, Michelle, Simone, Neuza, Rogério, Caio, Antônio, Aline, Débora, Dani Dias, Fer Greco, Alisson, Rodrigo, Natali, Pri, obrigado por todas as trocas de conhecimento e oportunidades.

A todos os colegas e amigos da Universidade de Ottawa, Yousuf, Vanessa, Yuchu, Lichuan, Emil, Nico, Zoran, Suttinee, Prabir, Yaroslav, obrigado pela recepção e todo o suporte no período em que eu fiquei no laboratório.

A todos os professores internos e externos a USP que sempre me deram suporte, Luana Oliveira, Luiz Carlos, Maristela Tsujita, Mariana Petroni, Katia, Felipe Rebello, Paulo Moreno, Marina Tavares.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e todos os seus colaboradores pela oportunidade.

A Universidade de Ottawa, por todo o suporte e acolhimento dado na minha chegada e estada no Canadá.

A banca examinadora, pelo tempo cedido e a avaliação do meu trabalho.

A todos os brasileiros e estrangeiros que puderam de uma forma indireta me dar esta oportunidade através de estrutura e bolsa para executar este projeto.

A todos que de uma forma direta ou indireta puderam contribuir com este trabalho.

RESUMO

AGOSTINHO, O. V. L. **Desenvolvimento e validação de métodos analíticos eletroforéticos e cromatográficos para determinação de fármacos para o tratamento do diabetes tipo 2.** 2021. 107f. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2021.

O diabetes é uma doença presente na população com altos índices de prevalência, onde o tipo 2 tem o maior percentual, e há tratamentos amplamente disponíveis na terapia medicamentosa, a qual existem muitos medicamentos. Para que os medicamentos indicados nesta terapia sejam eficazes, são necessários estudos para o desenvolvimento de métodos analíticos capazes de detectar e quantificar estes fármacos na presença de seus produtos de degradação e outros interferentes como os excipientes de sua formulação. Nesta pesquisa, foram desenvolvidos métodos analíticos utilizando as técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e eletroforese capilar (CE) para detecção e quantificação simultânea dos fármacos, metformina (Mf) e a nateglinida (Ng), que são utilizados em associação para o diabetes tipo 2. As metodologias analíticas de cromatografia líquida em microemulsão (MELC) e HPLC-HILIC foram desenvolvidas e validadas seguindo os critérios exigidos. Para os métodos desenvolvidos por MELC e HPLC-HILIC foram utilizadas as fases estacionárias, respectivamente, C18 (ACE 150 mm x 4,6 mm 5 µm) e InfinityLab Poroshell 120 (HILIC 100 mm x 2,1 mm 2,7 µm) e para CE a coluna capilar de 60 cm x 75 µm de d.i. Os métodos propostos foram lineares com coeficientes de determinação (R^2) acima de 0,99, a precisão (intra e inter-dia) DPR \leq 2,0%, a exatidão em termos de porcentagem de recuperação esteve dentro da faixa de 98% a 102%, para ambos os métodos, obteve-se robustez próximo de 1,0 e recuperações 100% \pm 2%, o limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do método por HPLC foi, respectivamente, Mf (0,001 µg.mL⁻¹ e 0,003 µg.mL⁻¹) e Ng (0,002 µg.mL⁻¹ e 0,006 µg.mL⁻¹) e do método por CE foi Mf (0,010 µg.mL⁻¹ e 0,033 µg.mL⁻¹) e Ng (0,026 µg.mL⁻¹ e 0,086 µg.mL⁻¹). Os fármacos foram detectados e o tempo de corrida de todos os métodos foi aproximadamente 10 minutos. As metodologias desenvolvidas foram desafiadas para demonstrar a seletividade dos métodos com degradação forçada em meio ácido, básico e hidrólise, que obtiveram produtos de degradação nos meios ácido e básico para HPLC e CE. Assim de acordo com os critérios estabelecidos pela

agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA), todos os métodos foram validados conforme a RDC 166/17, e são seletivos, lineares, precisos, exatos e robustos. Os métodos HPLC e CE propostos podem ser aplicados nas análises de rotina na indústria farmacêutica.

Palavras-chave: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Eletroforese Capilar, Nateglinida, Cloridrato de Metformina, Diabetes.

ABSTRACT

AGOSTINHO, O. V. L. **Development and validation of electrophoretic and chromatographic analytical methods for determining drugs for the treatment of type 2 diabetes.** 2021. 107f. School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, 2021.

Diabetes is a disease present in the population with high prevalence rates, where type 2 has the highest percentage, and treatments are widely available in drug therapy, which has many medications. For the drugs indicated in this therapy to be effective, studies are needed for the development of analytical methods capable of detecting and quantifying these drugs in the presence of their degradation products and other interferents such as the excipients of their formulation. In this research, analytical methods were developed using the techniques of high-performance liquid chromatography (HPLC) and capillary electrophoresis (CE) for simultaneous detection and quantification of drugs, metformin (Mf) and nateglinide (Ng), which are used in combination for type 2 diabetes. The analytical methodologies of liquid chromatography by microemulsion (MELC), and HPLC-HILIC, using the HILIC column as a stationary phase, were developed and validated following the required criteria. For the methods developed by MELC and HPLC, the stationary phases were used, respectively, C18 (ACE 150 mm x 4.6 mm 5 μ m) and InfinityLab Poroshell 120 (HILIC 100 mm x 2.1 mm 2.7 μ m) and for CE the capillary column of 60 cm x 75 μ m of the proposed methods were linear with determination coefficients (R^2) above 0.99, the precision (intra and inter-day) DPR \leq 2.0%, the accuracy in terms of percentage of recovery was within the range of 98% to 102%, for both methods, robustness was obtained close to 1.0 and recoveries 100% \pm 2%, the limit of detection (LQ) and limit of quantification (LQ) of the method by HPLC was, respectively, Mf (0.001 μ g.mL⁻¹ and 0.003 μ g.mL⁻¹) and Ng (0.002 μ g.mL⁻¹ and 0.006 μ g.mL⁻¹) and the method by CE was Mf (0.010 μ g.mL⁻¹ and 0.033 μ g.mL⁻¹) and Ng (0.026 μ g.mL⁻¹ and 0.086 μ g.mL⁻¹). The drugs were detected and the run time for all methods was approximately 10 minutes. The developed methodologies were challenged to demonstrate the selectivity of the methods with study of forced degradation, which obtained degradation products in the acidic and basic media for HPLC, and CE. Thus, according to the

criteria established by the national health surveillance agency (ANVISA), all methods have been validated in accordance with RDC 166/17, and are selective, linear, precise, accurate and robust. The proposed HPLC and CE methods can be applied in routine analyzes in the pharmaceutical industry.

Keywords: High Performance Liquid Chromatography, Capillary Electrophoresis, Nateglinide, Metformin Hydrochloride, Diabetes.

LISTA DE ABREVIações

- **DM:** Diabetes *Mellitus*
- **DM2:** Diabetes *Mellitus* tipo 2
- **CE:** Eletroforese Capilar
- **HPLC:** Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- **RP-HPLC:** Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa
- **MELC:** Cromatografia Líquida em Micro emulsão
- **Ng:** Nateglinida
- **Mf:** Cloridrato de Metformina
- **THF:** Tetrahidrofurano
- **cm:** centímetro
- **ICH:** *International Conference on Harmonization*
- **Inj:** injeção
- **kV:** kilovolts
- **LD:** Limite de Detecção
- **LQ:** Limite de Quantificação
- **mg:** miligramas
- **min:** minutos
- **mL:** mililitro
- **mm:** milímetro
- **mM:** milimolar
- **nm:** nanômetro
- **pH:** potencial Hidrogeniônico
- **ppm:** parte por milhão
- **UV:** Ultravioleta
- **WHO:** *World Health Organization*
- **µg:** micrograma
- **µm:** micrômetro

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Classificação dos testes e sua finalidade. Página 38.

Quadro 2: Ensaio necessários para a validação do método analítico. Página 38.

Quadro 3: Fases móveis preparadas para o desenvolvimento do método analítico por HPLC para detecção dos IFAs Ng e Mf..... Página 48.

Quadro 4: Sistemas cromatográficos avaliados no desenvolvimento do método analítico por HPLC para rastrear a Ng e Mf. Página 49.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: concentrações das soluções de Mf e respectivas áreas para a construção da curva analítica do método por HPLC baseado em microemulsão. Página 73.

Tabela 2: concentrações das soluções de Ng e respectivas áreas para a construção da curva de calibração do método por HPLC baseado em microemulsão. Página 73.

Tabela 3: resultados da curva de calibração obtidos para a análise de Mf e Ng. ... Página 74.

Tabela 4: resultados do limite de detecção e limite de quantificação de Mf e Ng. . Página 75.

Tabela 5: Resultados obtidos nas determinações da repetibilidade e precisão intermediária do método por HPLC baseado em microemulsão de Mf e Ng. Página 76.

Tabela 6: Valores de recuperação nas três concentrações avaliadas de Mf e Ng. Página 76.

Tabela 7: concentrações das soluções de Mf e respectivas áreas para a construção da curva analítica do método por CE. Página 82.

Tabela 8: concentrações das soluções de Ng e respectivas áreas para a construção da curva analítica do método por CE. Página 82.

Tabela 9: resultados da curva analítica obtidos para a análise de Mf e Ng. Página 84.

Tabela 10: resultados do limite de detecção e limite de quantificação de Mf e Ng. Página 84.

Tabela 11: Resultados obtidos nas determinações da repetibilidade e precisão intermediária do método por CE de Mf e Ng. Página 85.

Tabela 12: Valores de recuperação nas três concentrações avaliadas de Mf e Ng. Página 85.

Tabela 13: Resultados obtidos na robustez. Página 86.

Tabela 14: concentrações das soluções de Mf e respectivas áreas para a construção da curva analítica do método por HPLC HILIC. Página 88.

Tabela 15: concentrações das soluções de Ng e respectivas áreas para a construção da curva de calibração do método por HPLC HILIC. Página 89.

Tabela 16: resultados da curva analítica obtidos para a análise de Mf e Ng. Página 90.

Tabela 17: resultados do limite de detecção e limite de quantificação de Mf e Ng. Página 91.

Tabela 18: Resultados obtidos nas determinações da repetibilidade e precisão intermediária do método por HPLC HILIC de Mf e Ng. Página 91.

Tabela 19: Valores de recuperação nas três concentrações avaliadas de Mf e Ng. Página 91.

Tabela 20: Comparação de resultados entre as técnicas de MELC e CE para determinação quantitativa da metformina associada a nateglinida. Página 92.

Tabela 21: Comparação de resultados entre as técnicas de HPLC HILIC e CE para determinação quantitativa da metformina associada a nateglinida. Página 92.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estruturas químicas das Biguanidas. Página 26.
- Figura 2:** Estruturas químicas das sulfonilureias. Página 28.
- Figura 3:** Estruturas químicas das Meglitinidas. Página 29.
- Figura 4:** Estrutura química da Nateglinida. Página 30.
- Figura 5:** Estrutura química do Cloridrato de Metformina. Página 31.
- Figura 6:** Passos para desenvolvimento de método analítico. (SNYDER, 1997). .. Página 32.
- Figura 7:** Sistema de cromatografia líquida. Página 34.
- Figura 8:** Microemulsões (A) óleo em água (o/a); água em óleo (a/o). Página 34.
- Figura 9:** Sistema de eletroforese capilar. Página 36.
- Figura 10:** Princípio de separação da Eletroforese Capilar em Zona (CZE). Página 37.
- Figura 11:** Geração do EOF dentro do capilar. Página 37.
- Figura 12:** Cromatograma das soluções padrão de nateglinida ($20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e cloridrato de metformina ($20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Condições: coluna ACE C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 μm), Tampão fosfato 100 mmol L^{-1} (pH 2,6):Metanol (35:65 v/v), eluição isocrática, detecção UV em 220 nm, vazão em 1 mL min^{-1} Página 64.
- Figura 13:** Cromatograma da solução padrão de nateglinida ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$). Condições: coluna C18 Phenomenex Onyx Silica (100 mm x 4,6 mm); fase móvel: Octano 0,80%, 1-Butanol 7,60%, SDS 4,50%, Tampão fosfato 10 mmol L^{-1} (pH 6,0) 87,10%; eluição isocrática, detecção UV em 200 nm, vazão em $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ Página 64.

Figura 14: Cromatograma da solução padrão de nateglinida (20,0 µg mL⁻¹). Condições: coluna C18 Phenomenex Onyx Silica (100 mm x 4,6 mm); fase móvel: Octano 0,81%, 1-Butanol 6,61%, SDS 3,31%, Tampão fosfato 20 mmol L⁻¹ (pH 6,0) 79,27%, Metanol 10%; eluição isocrática, detecção UV em 200 nm, vazão em 0,9 mL min⁻¹. Página 66.

Figura 15: Cromatograma da solução padrão de cloridrato de metformina (20,0 µg mL⁻¹). Condições: coluna C18 Phenomenex Onyx Silica (100 mm x 4,6 mm); fase móvel: Octano 0,81%, 1-Butanol 6,61%, SDS 3,31%, Tampão fosfato 20 mmol L⁻¹ (pH 6,0) 79,27%, Metanol 10%; eluição isocrática, detecção UV em 200 nm, vazão em 0,9 mL min⁻¹. Página 67.

Figura 16: Cromatograma da solução padrão nateglinida com cloridrato de metformina (20,0 µg mL⁻¹ cada). Condições: coluna C18 Phenomenex Onyx Silica (100 mm x 4,6 mm); fase móvel: Octano 0,81%, 1-Butanol 6,61%, SDS 3,31%, Tampão fosfato 20 mmol L⁻¹ (pH 6,0) 79,27%, Metanol 10%; eluição isocrática, detecção UV em 200 nm, vazão em 0,9 mL min⁻¹. Página 68.

Figura 17: Cromatograma da solução padrão de nateglinida (20,0 µg mL⁻¹). Condições cromatográficas: coluna C18 Phenomenex Onyx Silica (100 mm x 4,6 mm); fase móvel: Octano 0,81%, 1-Butanol 6,61%, SDS 3,31%, Tampão fosfato 20 mmol L⁻¹ (pH 6,0) 89,27%; eluição isocrática, detecção UV em 220 nm, vazão em 0,9 mL min⁻¹. Página 69.

Figura 18: Cromatograma da solução padrão de cloridrato de metformina (20,0 µg mL⁻¹ cada). Condições cromatográficas: coluna C18 Phenomenex Onyx Silica (100 mm x 4,6 mm); fase móvel: Octano 0,81%, 1-Butanol 6,61%, SDS 3,31%, Tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ (pH 2,6) 89,27%; eluição isocrática, detecção UV em 200 nm, vazão em 0,9 mL min⁻¹. Página 70.

Figura 19: Cromatograma da solução padrão de nateglinida (20 µg mL⁻¹) e cloridrato de metformina (20 µg mL⁻¹). Condições: coluna C18 (ACE 150 mm x 4,6 mm 5 µm); fase móvel: Octano 0,80%, 1-Butanol 7,60%, SDS 4,50%, Tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ (pH 6,0) 62,10%, Isopropanol 15,00%, THF 10,00%; eluição isocrática, detecção UV em 200 nm, vazão em 1,0 mL min⁻¹. Página 71.

Figura 20: Cromatograma da solução padrão de nateglinida (20 µg mL⁻¹) e cloridrato de metformina (20 µg mL⁻¹). Condições: coluna C18 (ACE 150 mm x 4,6 mm 5 µm); fase móvel: Octano 0,80%, 1-Butanol 7,60%, SDS 4,50%, Tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ (pH 6,0) 57,10%, Isopropanol 15,00%, THF 15,00%; eluição isocrática, detecção UV em 200 nm, vazão em 1,0 mL min⁻¹. Página 72.

Figura 21: Curva analítica do Mf. Página 74.

Figura 22: Curva analítica da Ng. Página 74.

Figura 23: Eletroferograma da solução padrão de Mf ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) e Ng ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$). Condições: coluna capilar (60 cm x $75 \mu\text{m}$ I.D.); Eletrólito: tetraborato de sódio 25 mm (pH 9,0), detecção UV em 220 nm, Tensão + 20kV e injeção por pressão 35 mBar / 5 segundos. Página 77.

Figura 24: Eletroferograma da solução padrão de Mf ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) submetida a degradação em condição ácida. Condições: coluna capilar (60 cm x $75 \mu\text{m}$ I.D.); Eletrólito: Tetraborato de sódio 25 mm (pH 9,0), detecção UV em 220 nm, Tensão + 20kV e injeção por pressão 35 mBar / 5 segundos. Página 78.

Figura 25: Eletroferograma da solução padrão de Mf ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) submetida a degradação em condição básica. Condições: coluna capilar (60 cm x $75 \mu\text{m}$ I.D.); Eletrólito: Tetraborato de sódio 25 mm (pH 9,0), detecção UV em 220 nm, Tensão + 20kV e injeção por pressão 35 mBar / 5 segundos. Página 79.

Figura 26: Eletroferograma da solução padrão de Ng ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) submetida a degradação em condição ácida. Condições: coluna capilar (60 cm x $75 \mu\text{m}$ I.D.); Eletrólito: Tetraborato de sódio 25 mm (pH 9,0), detecção UV em 220 nm, Tensão + 20kV e injeção por pressão 35 mBar / 5 segundos. Página 80.

Figura 27: Eletroferograma da solução padrão de Ng ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) submetida a degradação em condição básica. Condições: coluna capilar (60 cm x $75 \mu\text{m}$ I.D.); Eletrólito: Tetraborato de sódio 25 mm (pH 9,0), detecção UV em 220 nm, Tensão + 20kV e injeção por pressão 35 mBar / 5 segundos. Página 81.

Figura 28: Curva de calibração do Mf. Página 83.

Figura 29: Curva de calibração da Ng. Página 83.

Figura 30: Cromatograma da solução padrão de nateglinida ($20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Condições cromatográficas: coluna Poroshell 120 HILIC (100 mm x 2,1 mm) $2,7 \mu\text{m}$; fase móvel: Acetonitrila e Tampão formiato de amônia (95:5); eluição isocrática, detecção UV em 220 nm, vazão em $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ Página 87.

Figura 31: Cromatograma da solução padrão de metformina ($20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Condições cromatográficas: coluna Poroshell 120 HILIC (100 mm x 2,1 mm) $2,7 \mu\text{m}$; fase móvel: Acetonitrila e Tampão formiato de amônia (95:5); eluição isocrática, detecção UV em 220 nm, vazão em $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ Página 87.

Figura 32: Cromatograma da solução padrão de nateglinida e metformina ($20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ cada). Condições cromatográficas: coluna Poroshell 120 HILIC (100 mm x 2,1 mm) $2,7 \mu\text{m}$; fase

móvel: Acetonitrila e Tampão formiato de amônia (95:5); eluição isocrática, detecção UV em 220 nm, vazão em 0,8 mL min⁻¹. Página 88.

Figura 33: Curva analítica da Mf. Página 89.

Figura 34: Curva analítica da Ng. Página 90.

SUMÁRIO

1.	<u>INTRODUÇÃO</u>	21
2.	<u>REVISÃO DA LITERATURA</u>	23
3.	<u>OBJETIVOS</u>	42
4.	<u>MATERIAIS E MÉTODOS</u>	43
7.	<u>REFERÊNCIAS</u>	95

1. INTRODUÇÃO

O diabetes está entre as doenças que mais levam o indivíduo portador a óbito, estima-se que cerca de 382 milhões de pessoas acometidas por esta doença e o número que foi projetado para 2040 poderá ser superior a 642 milhões de pessoas. Esta doença apresenta-se de algumas formas, sendo a mais comum diabetes tipo 2 que chega a mais de 90% dos casos. Os tratamentos mais indicados inicialmente para o diabetes é a mudança do hábito de vida, incluindo uma dieta adequada e a prática de exercícios físicos, e a terapia medicamentosa.

A terapia medicamentosa é composta por diversas substâncias que são indicadas caso a caso. A substância mais utilizada para o diabetes e que está na lista de medicamentos essenciais da Organização Mundial de Saúde (OMS) é a metformina (Mf).

A metformina é um medicamento da classe das biguanidas, onde melhora o controle glicêmico através do aumento da sensibilidade a insulina e diminuição da absorção intestinal da glicose. Este fármaco as vezes é prescrito em associação com outros, como a nateglinida (Ng).

A nateglinida, também um medicamento utilizado para o diabetes, secretagogo da insulina, o qual promove a redução do nível de glicose no sangue após as refeições. Este ativo não é utilizado isoladamente, sempre em associação com outro medicamento.

Para que esses medicamentos sejam fabricados com qualidade e cumpram com o seu mecanismo de ação, deve-se garantir que os medicamentos estejam estáveis durante sua validade, não perdendo sua potência e gerando produtos de degradação possivelmente tóxicos. Com isso são desenvolvidas metodologias analíticas seletivas e que possuam alta detectabilidade e que eluem a substância de interesse dos seus produtos de degradação, impurezas, excipientes ou outros interferentes.

Alguns métodos foram reportados para a determinação de Ng e Mf isoladamente e/ou com outros fármacos em diversas matrizes. A Ng é determinada em formulações farmacêuticas e IFA utilizando HPLC com detecção UV pelas farmacopeias (United States Pharmacopeia, 2020) (British Pharmacopoeia, 2020) (European Pharmacopoeia, 2020). Também é determinado em formulações farmacêuticas utilizando HPLC com detecção UV (MADHAVI et al., 2008) e em

amostras biológicas utilizando HPLC com detecção UV (SANKALIA et al., 2007) (PANI et al., 2012); e eletroforese capilar (CE) (YAN et al., 2004).

Foram encontradas metodologias na literatura para a determinação do Mf em preparações farmacêuticas e fluidos biológicos utilizando HPLC com detecção UV (ABURUZ et al., 2003) (ABURUZ et al., 2005) (CHENG, 2001) (HUUPPONEN et al., 1992) (KEAL et al., 1986) (KHAN et al., 2011) (SONI et al., 2012) (YUEN et al., 1998) (ZARGHI et al., 2003), CE (SONG et al., 1998) (WEI et al., 2009) (YARDIMCI et al., 2005) e entre outras.

Métodos indicativos de estabilidade foram pouco reportados para a técnica de HPLC e não reportados para a técnica de CE para as substâncias de interesse.

A condução de método analítico por CE é importante para futuras implementações dentro do controle de qualidade de fármacos e medicamentos como uma técnica alternativa a outras já aplicadas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Diabetes

Diabetes ou diabetes mellitus (DM) é um distúrbio metabólico caracterizado pela perda total ou parcial da secreção de insulina e / ou resistência à ação da insulina, levando a um estado crônico de hiperglicemia no sangue. O DM pode ter etiologia múltipla e quase inevitavelmente envolver alguma forma de desregulação no metabolismo de carboidratos, gorduras e / ou proteínas. Se não for tratado de forma adequada, o DM leva a complicações, incluindo disfunção orgânica e, eventualmente, morte. (ADA, 2018)

Os sintomas clássicos apresentados por pacientes com DM incluem sede, poliúria, visão turva, perda de peso inexplicada, cetoacidose e condições hiperosmolares. Infelizmente para quem sofre de DM, a hiperglicemia pode não levar à manifestação desses sintomas e complicações e danos aos tecidos costumam ocorrer antes do diagnóstico. A característica patológica mais comum do DM crônico / grave é a retinopatia que pode levar à cegueira, nefropatia e / ou insuficiência renal, e neuropatia e disfunções autonômicas que levam a úlceras de membros e amputação. A ligação entre diabetes e complicações cardiovasculares também foi bem estabelecida e os portadores de DM estão sob maior risco de doenças periféricas, vasculares e cerebrovasculares. Essas mudanças patológicas, tanto em nível molecular, celular e sistêmico. (Taba'k, 2012) (ADA,2018)

As causas subjacentes do diabetes são a produção insuficiente de insulina devido à destruição das células β pancreáticas, resistência à insulina ou uma combinação de ambas. Para isso, diversos processos patogênicos estão envolvidos, levando ao desenvolvimento de anormalidades no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas. Historicamente, o DM foi classificado como Diabetes Mellitus Insulino Dependente (DMID) ou Diabetes Mellitus Não Insulino Dependente (DMNID). (WHO, 2016).

A classificação do DM é agora, no entanto, principalmente baseada na etiologia da doença como segue:

- Diabetes tipo 1 (DT1): Inclui formas imunomediadas ou idiopáticas de destruição de células β , que leva à deficiência absoluta de insulina. A

resistência à insulina não é comum aqui e, portanto, a dependência total da insulina administrada externamente é necessária para manter a vida.

- Diabetes tipo 2 (DT2): envolve uma perda progressiva da secreção de insulina das células β , muitas vezes associada à resistência à insulina. A doença geralmente tem um início na idade adulta que pode começar com o corpo sendo insensível à insulina e alguma forma de deficiência de insulina. A etiologia do DT2 tem um componente muito forte de predisposição genética.
- Diabetes tipo 3: esta categoria inclui uma ampla gama de tipos específicos de diabetes resultantes de alguma forma de defeitos genéticos na ação da insulina ou em doenças. Os exemplos incluem as síndromes de diabetes monogênicas, como diabetes neonatal e diabetes do jovem na maturidade, doenças do pâncreas exócrino com fibrose cística como causa bem estabelecida e diabetes induzido por drogas/produtos químicos, incluindo o uso prolongado de glicocorticóide após transplante de órgão, tratamento da AIDS etc.
- Diabetes tipo 4: diabetes mellitus gestacional (DMG) frequentemente diagnosticado durante o segundo ou terceiro trimestre da gravidez. (ADA, 2018)

Com a etiologia do DM e seus principais fatores de risco, incluindo a obesidade, bem estabelecidos nos últimos anos, a classificação padronizada e os critérios diagnósticos foram publicados pela Organização Mundial da Saúde (OMS). (ABTEMARIAM, 2019)

De acordo com a atual classificação baseada na etiologia, a principal causa de DT1 é a destruição das células β das ilhotas pancreáticas, onde os pacientes são propensos a cetoacidose. Isso inclui a destruição autoimune mediada de células β e outras formas chamadas de DT1 idiopática, onde nem a patogênese nem as causas são conhecidas. Quando a causa específica da destruição das células β é identificada, como nos casos de fibrose cística, defeitos mitocondriais etc., elas não são classificadas como DT1. Para evitar cetoacidose, coma e morte, os pacientes com DT1 precisam de administração de insulina. Uma característica comum do DT1 é a detecção de anticorpos como marcadores dos processos de destruição de células β autoimunes, incluindo anti-GAD (autoanticorpos de descarboxilase do ácido glutâmico) ou anticorpos de insulina. Nos casos de DT2 idiopática que é comumente expresso em não-caucasianos, no entanto, os marcadores do processo autoimune podem não ser evidentes. (ABTEMARIAM, 2019) (ADA, 2018)

Ao contrário do DT1, a deficiência de insulina no DT2 é relativa e não absoluta e, portanto, a resistência à insulina desempenha um papel importante. Considerando que algum grau de produção de insulina é mantido na DT2, esses sujeitos não precisam de tratamento com insulina para sobreviver pelo menos no primeiro estágio da doença. Por esta mesma razão, a hiperglicemia resultante em DT2 pode não ser grave o suficiente para causar sintomas perceptíveis ou iniciar a detecção clínica precoce. O sintoma comum de DT1, cetoacidose, também não é comum em DT2. Como resultado, os pacientes com DT2 podem estar sob alto risco de desenvolver complicações macro e microvasculares. Um dos fatores de risco comuns para DT2 que surgiu nas últimas décadas é a obesidade e/ou gordura abdominal. (Diabetes UK, 2018) (WHO, 2016)

A associação de DT2 com predisposição familiar e/ou genética foi estabelecida e diferenças na etiologia e gravidade das doenças entre os diferentes grupos raciais/étnicos foram relatadas. Em pacientes obesos com DT1, por exemplo, a resistência à insulina também pode ser comum, enquanto em DT2, os pacientes podem ter um nível ainda mais alto de insulina no sangue em comparação com indivíduos normais, mas o nível excessivo de glicose exigiria um nível ainda maior de produção de insulina que não pode ser atendida devido à disfunção das células β . Consequentemente, o nível aumentado de resistência à insulina exige mais produção de insulina que não pode ser sustentada pelas células β pancreáticas. Em alguns casos de DT2, a sensibilidade normal à insulina juntamente com a secreção de insulina prejudicada também é identificada. No DT2, o tratamento farmacológico geralmente em combinação com mudanças no estilo de vida, como perda de peso e medidas dietéticas, bem como atividade física, são necessários para controlar as doenças. (ADA, 2018) (WHO, 2016)

2.2. Tratamento para o diabetes

O tratamento atual do DT2 visa manter o controle glicêmico adequado, seja com dieta hipocalórica, aumento da prática de exercícios físicos ou uso de medicações (ARAÚJO et al., 2000).

Para o tratamento existem diversos agentes com mecanismos distintos, são eles:

Biguanidas: o exemplo clássico de biguanidas, frequentemente chamadas de sensibilizadores de insulina, é a metformina, que atualmente é empregada como o principal antidiabético oral de primeira linha para o tratamento de DT2. A introdução da metformina como um medicamento antidiabético na década de 1950 foi interessante do ponto de vista histórico, onde compostos derivados de plantas atuam como a espinha dorsal das descobertas de medicamentos modernos. A classe de compostos baseados no esqueleto de guanidina como agente antidiabético veio do uso medicinal da *Galega officinalis* (família Fabaceae) na Europa e em outros lugares durante séculos. A planta é conhecida pelo seu nome comum como galega, arruda-de-cabra, lilás francês, fitch italiano ou erva-professora. Sua região nativa é a Europa, a Ásia principalmente as regiões temperadas e o Paquistão, mas tem sido amplamente difundida em todo o mundo para usos, incluindo cultivo de forragem, planta ornamental, planta apícola e como esterco. A planta agora também é vista como uma erva daninha invasora e tóxica tanto para humanos quanto para animais, daí seu nome, arruda-da-cabra. (ABTEMARIAM, 2019) (PIERA-MARDEMOOTO et al., 2018)

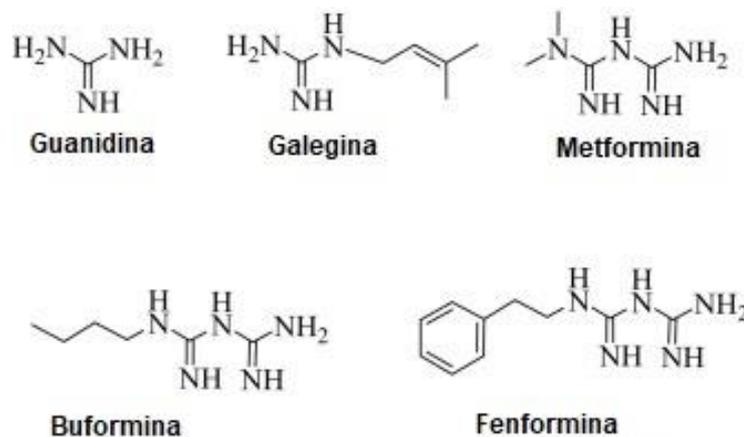


Figura 1: Estruturas químicas das Biguanidas.

O princípio ativo do *Galega officinalis* que atribui ao seu efeito antidiabético é a guanidina **Figura 1** que se apresenta na planta como galegina (1-(3-metil-2-buten-1-il) guanidina). Como um produto natural, a guanidina pode ser obtida pela degradação da guanina e, portanto, a característica única de sua presença na *Galega officinalis*, reside na incorporação da unidade de isopreno da via de biossíntese dos terpenóides na estrutura da galegina **Figura 1**. Embora a galegina seja menos tóxica do que a

guanidina, seus estudos clínicos como agente antidiabético durante as décadas de 1920 e 1930 não tiveram sucesso, exceto o estudo que levou à descoberta das biguanidas como uma classe de compostos antidiabéticos. (ABTEMARIAM, 2019) (INZUCCHI et al., 2014)

Sulfonilureias: são um grupo de agentes antidiabéticos atualmente empregados como opções de tratamento de segunda linha para a DT2. Seu efeito de redução da glicose no sangue está relacionado à sua capacidade de aumentar a secreção de insulina das células β pancreáticas, bloqueando os canais KATP. Ao inibir os canais de potássio das células β pancreáticas, eles causam a despolarização da membrana, levando à abertura dos canais de cálcio voltagem-dependentes. O aumento subsequente na concentração intracelular de Ca^{2+} desencadeia a exocitose de insulina. Por isso, são considerados medicamentos com ação dos secretagogos da insulina. O mecanismo exato de como as sulfonilureias agem nos canais KATP das células β pancreáticas também foi estabelecido e está ligado ao canal que possui dois componentes: o poro transmembrana através do qual fluem os íons de potássio e a subunidade reguladora (SUR-1). O SUR-1 atua como um receptor para sulfonilureias e a ligação receptor-ligante desencadeia o fechamento dos canais de ATP sensíveis ao potássio. (ABTEMARIAM, 2019) (ADA, 2018) (LEE et al., 2014) (SEINO, 2012)

Suas características são resumidas da seguinte forma:

- Além de estimular a secreção de insulina, eles suprimem a gliconeogênese no fígado;
- Diminuir a quebra de lipídios em ácidos graxos;
- Reduz a depuração da insulina no fígado;
- Usado como monoterapia de segunda linha ou em combinação com outros medicamentos antidiabéticos orais (exceto os secretagogos de ação rápida) ou insulina;
- As sulfonilureias de primeira geração (por exemplo, acetohexamida, clorpropamida, tolazamida e tolbutamida) têm meia-vida mais longa, maior risco de hipoglicemia e início de ação mais lento em comparação com a segunda geração;
- Sulfonilureias de segunda geração (por exemplo, glipizida, glimepirida e gliburida / glibenclamida) sendo mais potentes e de perfil mais seguro são agora a opção preferida com a glimepirida comumente prescrita. Glibenclamida, glipizida e glimepirida são conhecidos por se ligarem aos receptores SUR-2 A e B e podem não

ser recomendados para pacientes cardíacos de alto risco, como aqueles com doença arterial coronariana;

- A maioria das sulfonilureias é metabolizada no fígado e eliminada pelo rim e, portanto, deve ser evitada por pacientes com doenças renais ou hepáticas avançadas. Portanto, essas drogas podem não ser recomendadas uma vez que a TFG cai abaixo de 40 mL/min. (ABTEMARIAM, 2019) (LEE et al., 2014)

As estruturas das sulfonilureias são mostradas na **Figura 2** e geralmente representam um dos fármacos mais antigas introduzidas no mundo.

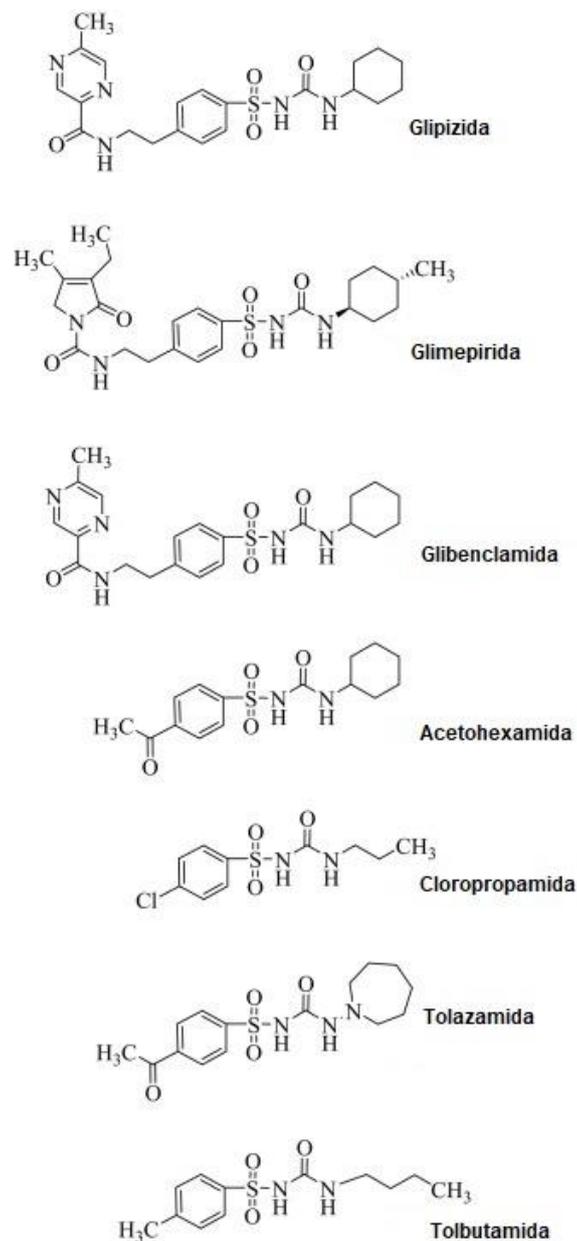


Figura 2: Estruturas químicas das sulfonilureias.

Meglitinidas: são representadas por repaglinida e nateglinida (**Figura 3**). Eles têm muito em comum com a sulfonilureia pelo fato de serem secretagogos e mediar seu efeito ligando-se ao receptor de sulfonilureia (SUR-1) nas células β pancreáticas. Seu efeito de receptor mais fraco e, portanto, duração de ação mais curta como secretagogos de insulina, e dependência de concentração mais alta de glicose para estimular a liberação de insulina os torna uma alternativa mais fraca para as sulfonilureias. Geralmente apresentam um início de ação rápido e meia-vida curta, e são usados para direcionar a hiperglicemia pós-prandial sem o risco de hipoglicemia retardada. Portanto, eles têm como alvo principal a primeira fase da secreção de insulina estimulada por glicose das células β pancreáticas, que é suprimida em pacientes com DM2. É importante notar também que a fase inicial da liberação de insulina também está associada à supressão da gliconeogênese (pela insulina) no fígado durante o estado pós-prandial. A nateglinida é um derivado da d-fenilalanina com início de ação ainda mais curto do que a repaglinida, e essas características significam a necessidade de dosagem múltipla. Foi observada a rápida absorção de repaglinida após administração oral imediatamente antes das refeições para atingir o pico de concentração plasmática em 1 hora. Em comparação com as sulfonilureias, eles têm menor risco de hipoglicemia e ganho de peso e geralmente podem induzir uma redução na HbA1c de 1–2% como monoterapia. (ABTEMARIAM, 2019) (Canadian Diabetes Association Clinical Practice Guidelines E., 2016) (HARE et al., 2010)

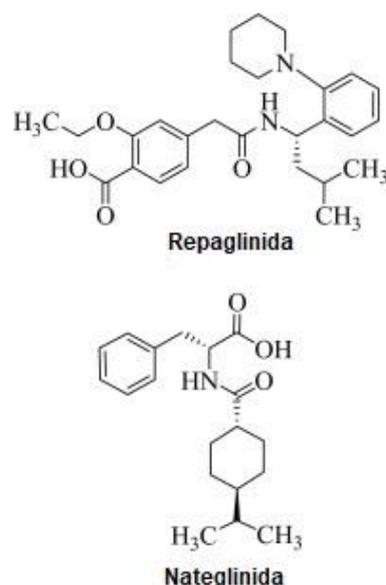


Figura 3: Estruturas químicas das Meglitinidas

A última classe desenvolvida foram os inibidores da enzima cotransportadora de sódio/glicose-2, representados por dapaglifozina, canaglifozina, empaglifozina, ipraglifozina, dentre outros. Estes têm ação independente da secreção ou ação de insulina, atuam nos rins inibindo a recaptção tubular da glicose para o sangue, aumentando a glicosúria. (KIM & BABU, 2012).

2.2.1. Nateglinida

Nateglinida é um derivado de aminoácido que reduz os níveis de glicose no sangue e estimula a secreção de insulina. Quimicamente, que é formulada como (-)-N-[(trans-4-isopropilciclohexil) carbonil-d-fenilalanina. Sua fórmula molecular é $C_{19}H_{27}NO_3$ e sua massa molar é 317,429 g/mol e é utilizado no tratamento de diabetes mellitus tipo 2 (USP, 2010).

As propriedades farmacocinéticas da nateglinida não estão alteradas em indivíduos mais idosos, com insuficiência hepática ligeira a moderada e com insuficiência renal. Verifica-se uma diminuição de 49% na concentração máxima da nateglinida em doentes diabéticos dependentes de diálise (INFARMED, 2006).

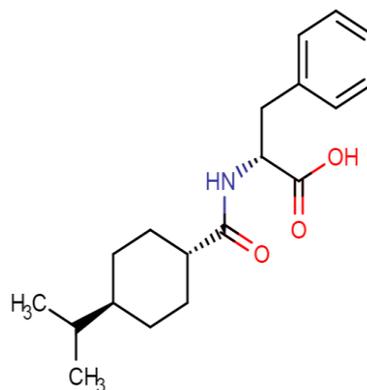


Figura 4: Estrutura química da Nateglinida
(Fonte: <https://chemicalize.com>)

O mecanismo de ação da nateglinida é semelhante ao das sulfonilureias, residindo a sua diferença nas propriedades farmacocinéticas. Em diversos estudos revelou ter um início rápido de ação e duração curta de efeito. Tem surgido alguns trabalhos que sugerem que as alterações macrovasculares associadas à diabetes mellitus tipo 2 se

correlacionam com a hiperglicemia pós-prandial, havendo vantagem em fármacos que a diminuíssem. Nos diabéticos, esta hiperglicemia pós-prandial dever-se-ia a uma incapacidade das células beta dos ilhéus de Langerhans em segregar insulina. Existem alguns estudos que sugerem algum efeito da nateglinida, demonstrando que este fármaco restabelece a fase precoce ou primeira fase de secreção de insulina durante uma refeição (INFARMED, 2006).

2.2.2. Cloridrato de Metformina

A metformina é um agente anti-hiperglicêmico oral usado para tratar DT2, pertencente a classe de medicamentos orais para diabetes biguanidas. A metformina não tem um efeito direto sobre as células beta pancreáticas, mas reduz a glicose no sangue, reduzindo a produção de glicose hepática e melhorando a utilização periférica da glicose (por exemplo, no músculo). Aumenta a sensibilidade muscular à insulina e aumenta o metabolismo da glicose muscular. A metformina é usada para diminuir a produção hepática de glicose, diminuir a absorção intestinal de glicose e melhorar a sensibilidade à insulina, aumentando a captação e utilização periférica de glicose. Assim, reduz as necessidades de insulina sem qualquer efeito direto para aumentar a secreção de insulina. Também pode aumentar os receptores de insulina nos tecidos. Em doses terapêuticas, a metformina não causa hipoglicemia. (MARCK et al., 2021)

Sua fórmula estrutural é 1,1-dimetilbiguanida e molecular $C_4H_{11}N_5$, e sua massa molar é 129,167 g/mol.

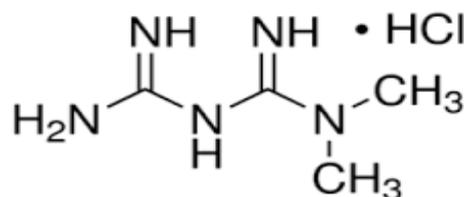


Figura 5: Estrutura química do Cloridrato de Metformina
(Fonte: www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/phr1084?lang=en®ion=US)

2.3. Desenvolvimento de métodos analíticos

Todos os dias, tem-se a necessidade de desenvolver um método analítico por separação. Considerando que abordagens individuais podem exibir uma diversidade considerável, o desenvolvimento do método muitas vezes segue uma série de etapas, descritas na **Figura 6**.

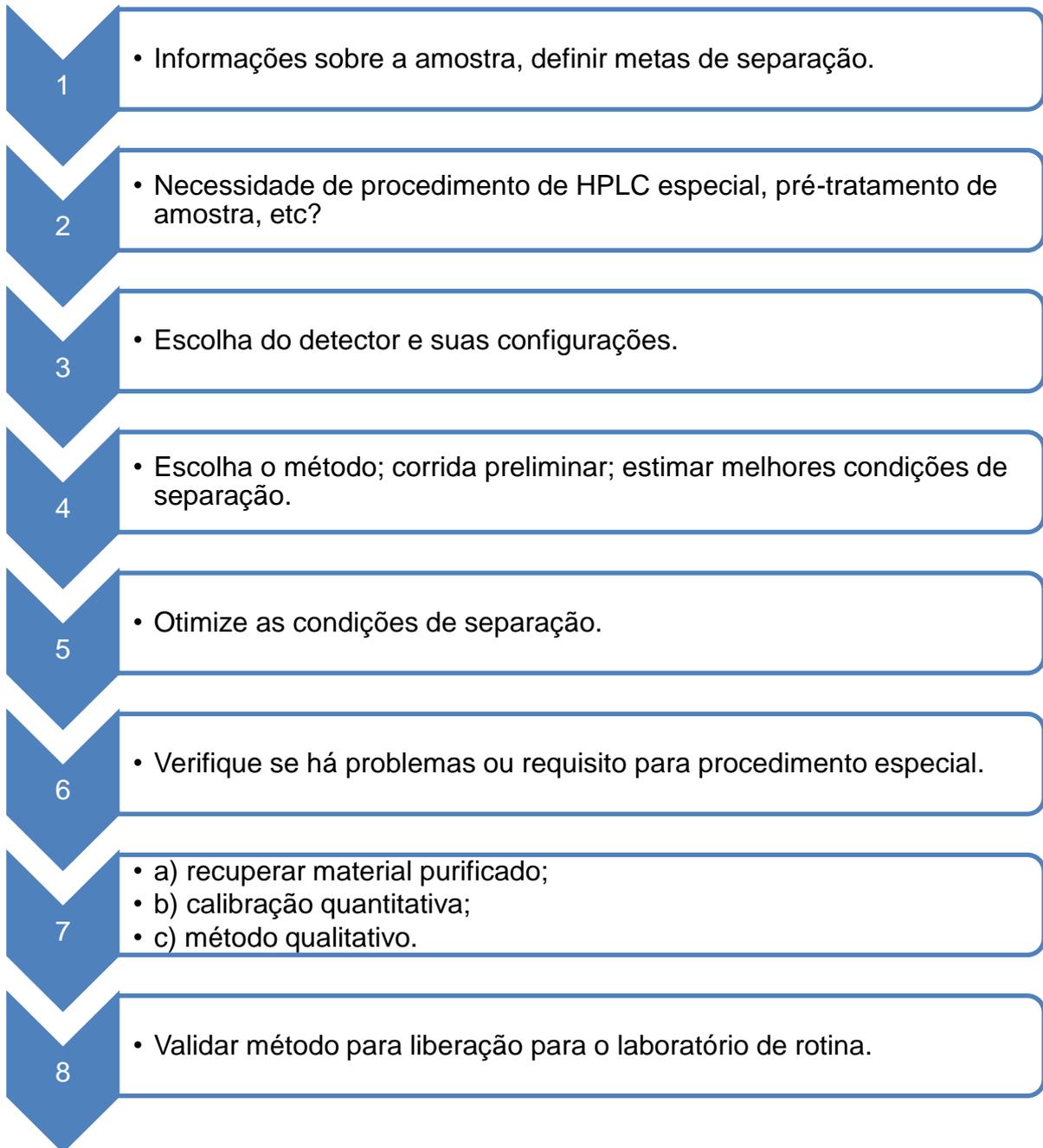


Figura 6: Passos para desenvolvimento de método analítico. (SNYDER, 1997)

Existe hoje uma boa compreensão prática da separação e como isso varia com a amostra e com as condições experimentais. Alguma abordagem sistemática para o desenvolvimento do método deve ser baseada neste conhecimento do processo. Na maioria dos casos, uma separação desejada pode ser alcançada facilmente com apenas alguns experimentos. Em outros casos, uma considerável quantidade de experimentação pode ser necessária. Uma boa estratégia de desenvolvimento de método deve exigir apenas quantas execuções experimentais forem necessárias para alcançar o resultado desejado. (SNYDER, 1997)

Idealmente, cada experimento contribuirá para o resultado para que não haja corridas perdidas. Normalmente, isso requer que os resultados de cada execução sejam avaliados antes de prosseguir com o próximo experimento. As vezes as estruturas químicas dos componentes da amostra são conhecidas, outras vezes este não é o caso. O desenvolvimento do método deve ser o mais simples possível, mas deve permitir o uso de ferramentas sofisticadas, se estiverem disponíveis. (SNYDER, 1997) (SANCHEZ et al., 2018)

2.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia líquida é uma técnica analítica para separação de substâncias em misturas, com fundamento nas diferentes velocidades de migração dessas substâncias, em relação das afinidades relativas pelas duas fases: a fase móvel e a fase estacionária. (COLLINS et al., 1995)

Nas separações por HPLC a amostra é eluída pela fase móvel, que pode ser solvente, tampões ou a mistura deles, que através de uma fase estacionária tem interação com a amostra realizando a eluição dos analitos de interesse. (HOLLER, 2009)

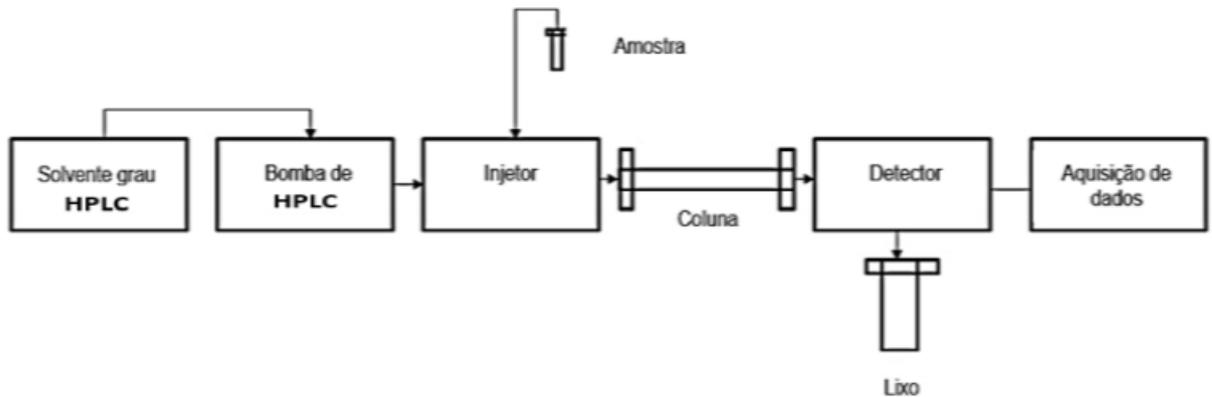


Figura 7: Sistema de cromatografia líquida.

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 sensibilidade (COLLINS et al., 1995).

2.4.1. Cromatografia Líquida baseada em Microemulsão

As microemulsões são definidas como uma mistura, termodinamicamente estável e isotrópica de óleo e água. A tensão interfacial entre óleo e água é diminuída pela adição de surfactante frequentemente em combinação com co-surfactante. O dodecil sulfato de sódio (SDS) é um surfactante comum e amplamente utilizado e os álcoois de cadeia média, como butanol ou pentanol, são co-surfactantes comumente usados. Estes são classificados em dois tipos como óleo em água (o / a) em que a gota de óleo é dispersa na fase de água e água em óleo (a / o) em que a gota de água é dispersa na fase de óleo.

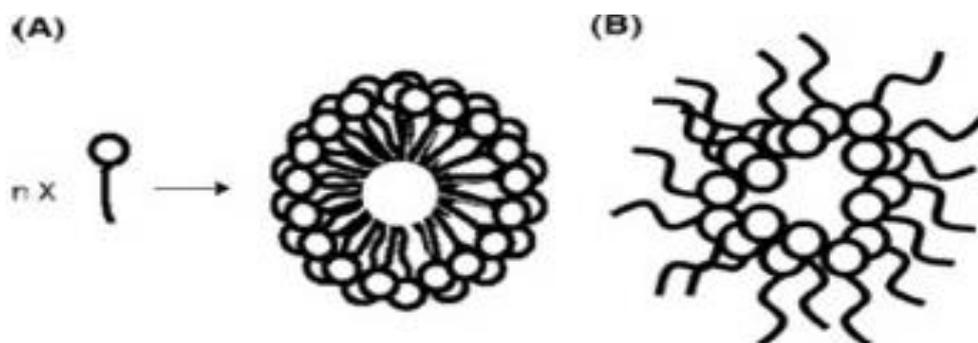


Figura 8: Microemulsões (A) óleo em água (o/a); água em óleo (a/o).

Microemulsões o/a ou a/o, ambas têm sido usadas como fases móveis para separação em cromatografia líquida de alto desempenho em microemulsão (ME-HPLC), uma técnica para separar, resolver, detectar e quantificar solutos dentro de uma determinada amostra. Essa nova técnica tem aplicação considerável nos campos da química analítica e controle de qualidade. Microemulsões a/o foram usadas pela primeira vez como eluentes para HPLC em 1986 e cromatografia líquida baseada em microemulsão o/w (MELC) usando colunas de fase reversa (RP) apareceram pela primeira vez na literatura em 1992. Desde então, tem havido um aumento recente de interesse nesta área com novas aplicações e desenvolvimentos.

2.5. Eletroforese Capilar

A palavra eletroforese é originada do grego *electro*, eletricidade; *phóresis*, transporte. Assim, a técnica de eletroforese é definida como uma técnica de separação baseada na diferença de migração de compostos iônicos ou ionizáveis na presença de um campo elétrico. (SPUDEIT, 2012).

A instrumentação básica da eletroforese capilar (CE) consiste em um aparelho semelhante ao da **Figura 9**. Um capilar de abertura estreita (20–200 μm I.D.) é preenchido com uma solução eletrolítica (eletrólito, BGE) e uma alta voltagem é aplicada entre as duas extremidades do capilar. Embora não seja estritamente necessário, a maioria dos instrumentos comerciais permite o controle da temperatura do capilar. (AMEZQUETA et al., 2020)

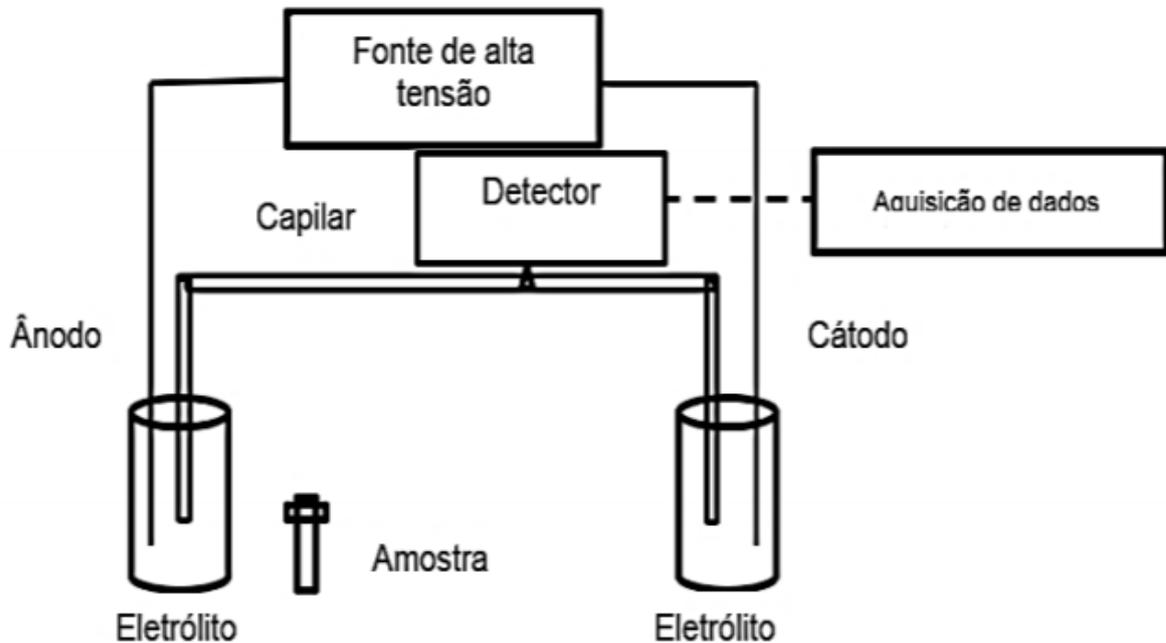


Figura 9: Sistema de eletroforese capilar

Quando o campo elétrico é aplicado através do líquido, os íons na amostra migram através do capilar em diferentes taxas e direções de acordo com seu tamanho e o sinal de sua carga. Se a amostra for colocada na extremidade anódica do capilar, os cátions carregados positivamente migrarão em direção ao eletrodo carregado negativamente (cátodo) e os ânions carregados negativamente migrarão em direção ao eletrodo carregado positivamente (ânodo). As taxas de migração dependerão da relação carga / tamanho, ou seja, íons menores irão migrar mais rápido do que íons maiores com a mesma carga, e íons de carga mais alta irão migrar mais rápido do que íons com carga mais baixa, se eles forem do mesmo tamanho (**Figura 10**). Os compostos neutros não serão atraídos ou repelidos pelos eletrodos e se moverão todos juntos na taxa do fluxo eletrosmótico (EOF). (AMEZQUETA et al., 2020)

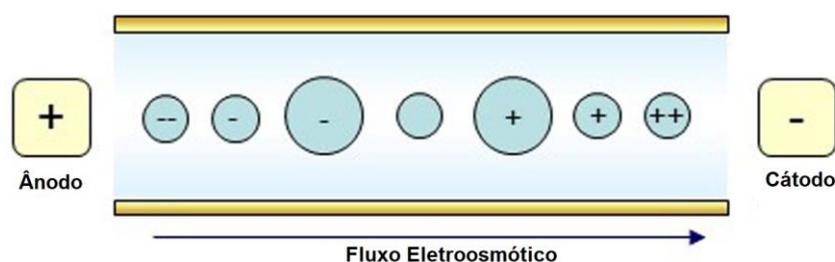


Figura 10: Princípio de separação da Eletroforese Capilar em Zona (CZE)

Um dos processos fundamentais que impulsionam a CE é a eletroosmose. Este fenômeno é consequência da carga superficial na parede dos capilares de sílica fundida. Os grupos silanol carregados negativamente em contato com o tampão atraem os íons carregados positivamente do tampão, criando uma dupla camada elétrica (**Figura 11**). Quando uma tensão é aplicada, os cátions solvatados na parte difusa da camada dupla migram em direção ao cátodo, o que provoca um fluxo líquido de solução tampão na direção do eletrodo negativo, denominado EOF. (AMEZQUETA et al., 2020)

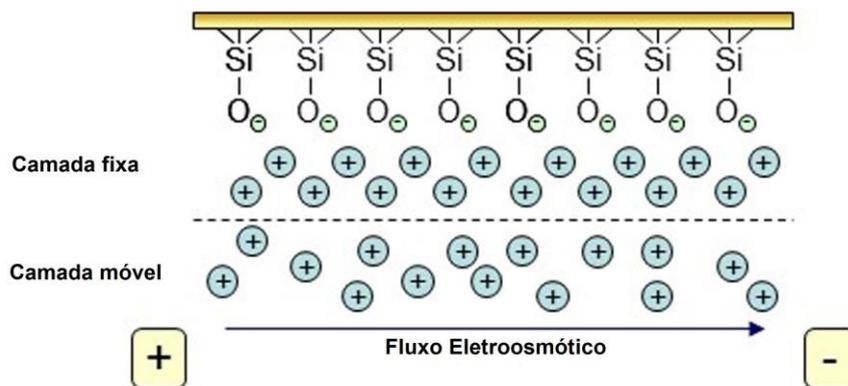


Figura 11: Geração do EOF dentro do capilar.

2.6. Validação de Métodos Analíticos

A validação é o processo de provar que um método analítico é aceitável para seu propósito pretendido. Isso significa que o objetivo final do processo de validação é fornecer evidências de que o método está pronto para obter resultados confiáveis. A validação analítica é realizada para garantir que todas as medições futuras na análise de rotina serão próximas o suficiente do valor verdadeiro desconhecido para o conteúdo do analito na amostra. É absolutamente importante não misturar os termos métodos analíticos e bioanalíticos, pois ambos servem a propósitos diferentes e cobrem parâmetros diferentes para seus procedimentos de validação específicos.

Quando um laboratório se interessa em realizar um novo procedimento analítico, uma das etapas mais importantes é a sua validação. A necessidade de os laboratórios usarem um método de análise totalmente validado agora é universalmente aceita e / ou necessária em muitos setores de análise.

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 e sua finalidade.

Parâmetro Avaliado	Identificação	Teste de Impurezas		Doseamento
		Quantitativo	Ensaio Limite	-dissolução (quantificação) -uniformidade de conteúdo -potência
Exatidão	não	sim	não	Sim
Precisão Repetibilidade	não	sim	não	Sim
Precisão Intermediária	não	sim ⁽¹⁾	não	sim ⁽¹⁾
Seletividade ⁽²⁾	sim	sim	sim	sim
Limite de Detecção	não	não ⁽³⁾	sim	não
Limite de quantificação	não	sim	não	não ⁽³⁾
Linearidade	não	sim	não	sim
Intervalo	não	sim	não	sim

Quadro 2: Parâmetros a serem considerados na validação analítico.

(1) Nos casos em que foi conduzida a reprodutibilidade, não é necessário conduzir a precisão intermediária.

(2) Nos casos de ensaios de identificação, pode ser necessária a combinação de dois ou mais procedimentos analíticos para atingir o nível necessário de discriminação.

(3) Pode ser necessário em alguns casos.

De acordo com a Farmacopeia Americana, validação de métodos analíticos “é o processo pelo qual é estabelecido, por estudos de laboratório, que as características executadas do método satisfazem os requisitos para as aplicações analíticas praticadas”. As características analíticas típicas usadas na validação de métodos são:

exatidão, precisão, seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, intervalo de aceitação, robustez ou resistência e conformidade do sistema (PINTO et al., 2003).

2.6.1. Parâmetros para a Validação

2.6.1.1. Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise. A linearidade é obtida a partir da curva de calibração que representa a resposta em função da concentração (ICH, 2005).

2.6.1.2. Precisão/Repetitividade

A precisão é o grau de repetitividade entre os resultados de análises individuais (ICH, 2005). As análises podem ser realizadas em três níveis de concentrações (baixa, média e alta) em triplicata. A precisão intermédia pode ser realizada em três dias diferentes. A precisão é expressa em termos de porcentagem do desvio padrão relativo (%RSD).

2.6.1.3. Seletividade

A seletividade do método é definida como a capacidade do método de medir e diferenciar o analito de componentes que possam estar presentes na amostra, tais como impurezas, compostos de degradação ou componentes do veículo (ICH, 2005).

2.6.1.4. Limites de Detecção e Quantificação

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, no método de análise empregado sob as condições experimentais estabelecidas. Enquanto o limite de quantificação (LQ) representa a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob condições experimentais estabelecidas.

Os LD e LQ serão, matematicamente, calculados pelo método que se baseia no desvio padrão médio (DP) da resposta de diferentes concentrações próximas ao suposto limite de detecção e na inclinação (I) da curva padrão. Realiza-se através da análise quantitativa de três amostras em triplicada, cada uma, em concentrações baixas, usando as Equações (ICH, 2005).

2.6.1.5. Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância com os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; ICH, 2005). São analisadas amostras em três níveis de concentrações (baixa, média e alta) em triplicata. A exatidão será determinada a partir da relação percentual entre a concentração média experimental e a concentração teórica.

2.6.1.6. Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal. Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método às variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento (ICH, 2005). Os parâmetros da análise de robustez serão voltagem, temperatura, comprimento de onda e tampão.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo geral desenvolver e validar métodos analíticos de separação utilizando as técnicas de HPLC e CE para determinar simultaneamente os fármacos Ng e Mf em presença dos seus produtos de degradação.

3.2. Objetivos Específicos

- Degradar os IFAs e medicamentos após serem submetidos a condições de estresse;
- Desenvolver os métodos analíticos por HPLC e CE para quantificação simultânea da Ng e Mf em medicamentos e na presença dos produtos de degradação;
- Validar os métodos desenvolvidos atendendo os parâmetros exigidos pelas diretrizes da ANVISA, ICH e da Farmacopeia Americana (USP);
- Aplicar os métodos desenvolvidos e validados na quantificação simultânea dos IFAs, Ng e Mf, em formulações (comprimidos) de diversos fabricantes e concentrações.
- Comparar estatisticamente os métodos desenvolvidos e validados (CE e HPLC).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Substâncias Químicas de Referência

- Nateglinida
- Cloridrato de metformina

4.1.2. Solventes e Reagentes

- 1-Butanol grau HPLC;
- Água Purificada grau MilliQ;
- Ácido acético glacial;
- Ácido orto-fosfórico;
- Ácido clorídrico;
- Acetato de etila;
- Acetonitrila grau HPLC;
- Dodecil sulfato de sódio;
- Fosfato de sódio monobásico;
- Fosfato de sódio dibásico;
- Hidróxido de Sódio;
- Isopropanol grau HPLC;
- Metanol grau HPLC;
- Octano;
- Peróxido de Hidrogênio.
- Tetraborato de sódio

4.1.3. Equipamentos

- Cromatógrafo Modelo HP Agilent 1100® com bomba quartenária, degaseificador online, amostrador automático, aquecedor/resfriador de coluna e detector tipo UV e DAD (Diode-Array Dectector), equipamento com software EzChrom OpenLab® para processamento dos dados;
- UHPLC Thermofischer Ultimate 3000 com bomba quartenária, desgaseificador, forno, injetor automático e detectores de arranjo de diodos (DAD), comprimentos de ondas variável (VWD) e detector corona (CAD) (USA) e software Chromilion;
- Sistema de Eletroforese Capilar Capel 205 - LUMEX®;
- Espectrometro de massas Thermo Scientific™ Q Exactive Plus™ with AP-MALDI;
- Balança analítica Mettler Toledo®, modelo AB204;
- Aparelho MilliQ-Plus, Milipore® para obtenção de água;
- Agitador tipo vórtex AP56 – Phoenix; centrífuga 3-18K – Sigma;
- Banho-maria com circulação, Marconi;
- Banho ultra-sônico com aquecimento modelo 800A;
- pHmêtro digital modelo PG1800.

4.2. Métodos

4.2.1. Desenvolvimento de método analítico para determinação simultânea de Mf e Ng utilizando a técnica de cromatografia líquida baseada em micro emulsão (MELC)

Foi realizada uma análise crítica dos trabalhos publicados na literatura para verificar as condições analíticas e determinação quantitativas em HPLC com propósito de desenvolver metodologia mais simples e mais rápida. Foram realizados levantamentos sobre as características químicas, físico-químicas das substâncias em estudo tais como solubilidade, pKa, LogP. Também foram avaliadas a composição, a força cromatográfica, a seletividade da fase móvel, necessidade de utilização de tampão, coluna mais adequada. Desta forma, encontramos a melhor condição analítica para a separação, identificação e quantificação dos fármacos otimizando o tempo de corrida deles.

4.2.1.1. Preparo das soluções

Solução estoque de Nateglinida

Foi pesado analiticamente 2,0 mg do padrão de Ng e transferido para um balão volumétrico de 2,0 mL, adicionando-se 1,0 mL de metanol grau HPLC para solubilizar a substância. Após a total solubilização, o volume foi completado para 2,0 mL com água deionizada (Milli-Q®). Obteve-se uma concentração de 1,0 mg mL⁻¹ e foi armazenada sob refrigeração (2 à 8°C), e diluída apropriadamente no momento da análise.

Solução estoque de Metformina

Foi pesado analiticamente 2,0 mg do padrão de Mf e transferido para um balão volumétrico de 2,0 mL, adicionando-se 1,0 mL de metanol grau HPLC para solubilizar

a substância. Após a total solubilização, o volume foi completado para 2,0 mL com água deionizada (Milli-Q®). Obteve-se a concentração de 1,0 mg/mL e está armazenada sob refrigeração (2 à 8°C), e diluída apropriadamente no momento da análise.

Solução padrão de trabalho de Nateglinida

Foi pipetada uma alíquota de 40,0 µL da solução estoque de Ng e transferida para um balão volumétrico de 2,0 mL. Logo foi completado o volume com a fase móvel adicionado em seguida o balão volumétrico foi colocado no Vortex até a completa homogeneização da solução. Foi filtrada em membrana Millipore® de 0,45 µm e transferida para um vial. Obteve-se uma concentração de 20,0 µg mL⁻¹.

Solução padrão de trabalho de Metformina

Foi pipetada uma alíquota de 40,0 µL da solução estoque de Mf e transferida para um balão volumétrico de 2,0 mL. Logo foi completado o volume com a fase móvel em seguida o balão volumétrico foi colocado no Vortex até a completa homogeneização da solução. Foi filtrada em membrana Millipore® de 0,45 µm e transferida para um vial. Obteve-se uma concentração de 20,0 µg mL⁻¹.

Solução padrão de trabalho de Nateglinida e Metformina

Foram pipetadas alíquotas de 40,0 µL da solução estoque de Ng e 40 µL da solução estoque de Mf e transferidas para um balão volumétrico de 2,0 mL. Logo foi completado o volume com a fase móvel preparada para o método, em seguida o balão volumétrico foi colocado no Vortex até a completa homogeneização da solução. Foi filtrada em membrana Millipore® de 0,45 µm e transferida para um vial. Obteve-se uma concentração de 20,0 µg mL⁻¹.

4.2.1.2. Preparo da Fase Móvel

Foram testadas diversas formulações de fase móvel, e verificadas as que tinham maior poder de eluição dos analitos de interesse. No preparo da fase móvel utilizou-se tampão fosfato com diferentes concentrações e pH. Levou-se em consideração estudos realizados e consultados na literatura para o preparo. A primeira solução tampão consistiu em uma concentração de 20 mmol L⁻¹ de fosfato de sódio com pH 6 e a segunda solução tampão consistiu em uma concentração de 10 mM fosfato de sódio com pH 2,6. Todas as preparações realizadas e utilizadas para o desenvolvimento deste método constam no **Quadro 3**.

4.2.1.3. Condições Cromatográficas

As condições cromatográficas estudadas para desenvolver este método foram escolhidas através do estudo prévio das características químicas e físico-químicas dos fármacos em questão. Todos os sistemas utilizados para o desenvolvimento deste método constam no **Quadro 4**.

Sistemas (Fase Móvel (%))									
	01	02	03	04	05	06	07	08	09
Octano	0,81	0,81	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80
1-Butanol	6,61	6,61	7,60	7,60	7,60	7,60	7,60	7,60	7,60
SDS	3,31	3,31	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50
Tampão pH 6,0 (20 mmol L⁻¹)	89,27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Tampão pH 2,6 (10 mmol L⁻¹)	0,00	89,27	87,10	67,10	62,10	57,10	52,10	62,10	57,10
Isopropanol	0,00	0,00	0,00	20,00	25,00	25,00	25,00	15,00	15,00
Tetrahidrofurano	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,00	10,00	10,00	15,00

Quadro 3: Fases móveis preparadas para o desenvolvimento do método analítico por HPLC para detecção dos IFAs Ng e Mf.

Sistema	Fase estacionaria	Modo	Fase móvel	Temperatura (°C)	Λ (nm)	Vazão (mL/min)	Volume de injeção (μ L)
01	Coluna C18 *	Isocrático	01	30	200	0,9	20
02	Coluna C18 *	Isocrático	02	30	200	0,9	20
03	Coluna C18 *	Isocrático	03	30	200	1,0	20
04	Coluna C18 *	Isocrático	04	30	200	1,0	20
05	Coluna C18 *	Isocrático	05	30	200	1,0	20
06	Coluna C18 **	Isocrático	06	30	200	1,0	20
07	Coluna C18 **	Isocrático	07	30	200	1,0	20
08	Coluna C18 *	Isocrático	08	30	200	1,0	20
09	Coluna C18 **	Isocrático	08	30	200	1,0	20
10	Coluna C18 **	Isocrático	09	30	200	1,0	20

Quadro 4: Sistemas cromatográficos avaliados no desenvolvimento do método analítico por HPLC para determinação a Ng e Mf.

*Coluna C18 (Phenomenex Onyx Silica - 100 mm x 4,6 mm)

** Coluna C18 (ACE - 4,6 mm x 150 mm, 5 μ m)

4.2.1.4. Degradação forçada do Cloridrato de Metformina

Para a condição dos testes de degradação forçada, foram utilizadas as soluções estoques de Mf.

Degradação em meio ácido

Foi pipetada uma alíquota de 500 µL da solução estoque de Mf e transferida para um microtubo de 2 mL. Logo foi adicionado cerca de 100 µL de HCl 0,1 M, em seguida o microtubo foi colocado no Vortex até a completa homogeneização da solução. O microtubo foi colocado em banho-maria a 50 °C durante 48 horas. Após o período, foi adicionado 400 µL de FM preparada para o método. A solução foi homogeneizada e filtrada com filtro PVDF 0,45 µm.

Esta solução tem a concentração de 0,500 mg/mL.

Degradação em meio básico

Foi pipetada uma alíquota de 500 µL da solução estoque de Mf e transferida para um microtubo de 2 mL. Logo foi adicionado cerca de 100 µL de NaOH 0,1 M, em seguida o microtubo foi colocado no Vortex até a completa homogeneização da solução. O microtubo foi colocado em banho-maria a 50 °C durante 48 horas. Após o período, foi adicionado 400 µL de FM preparada para o método. A solução foi homogeneizada e filtrada com filtro PVDF 0,45 µm.

Esta solução tem a concentração de 0,500 mg/mL.

Degradação por hidrólise

Foi pipetada uma alíquota de 500 µL da solução estoque de Mf e transferida para um microtubo de 2 mL. Logo foi adicionado cerca de 100 µL de água ultrapura, em seguida o microtubo foi colocado no Vortex até a completa homogeneização da solução. O microtubo foi colocado em banho-maria a 50 °C durante 48 horas. Após o período, foi adicionado 400 µL de FM preparada para o método.

Esta solução tem a concentração de 0,500 mg/mL.

4.2.1.5. Degradação forçada da Nateglinida

Para a condição dos testes de degradação forçada, foram utilizadas as soluções estoques de Ng.

Degradação em meio ácido

Foi pipetada uma alíquota de 500 µL da solução estoque de Ng e transferida para um microtubo de 2 mL. Logo foi adicionado cerca de 100 µL de HCl 0,1 M, em seguida o microtubo foi colocado no Vortex até a completa homogeneização da solução. O microtubo foi colocado em banho-maria a 50 °C durante 48 horas. Após o período, foi adicionado 400 µL de FM preparada para o método. A solução foi homogeneizada e filtrada com filtro PVDF 0,45 µm.

Esta solução tem a concentração de 0,500 mg/mL.

Degradação em meio básico

Foi pipetada uma alíquota de 500 µL da solução estoque de Ng e transferida para um microtubo de 2 mL. Logo foi adicionado cerca de 100 µL de NaOH 0,1 M, em seguida o microtubo foi colocado no Vortex até a completa homogeneização da solução. O microtubo foi colocado em banho-maria a 50 °C durante 48 horas. Após o período, foi adicionado 400 µL de FM preparada para o método. A solução foi homogeneizada e filtrada com filtro PVDF 0,45 µm.

Esta solução tem a concentração de 0,500 mg/mL.

Degradação por hidrólise

Foi pipetada uma alíquota de 500 µL da solução estoque de Ng e transferida para um microtubo de 2 mL. Logo foi adicionado cerca de 100 µL de água ultrapura,

em seguida o microtubo foi colocado no Vortex até a completa homogeneização da solução. O microtubo foi colocado em banho-maria a 50 °C durante 48 horas. Após o período, foi adicionado 400 µL de FM preparada para o método.

Esta solução tem a concentração de 0,500 mg/mL.

4.2.2. Desenvolvimento de método analítico para determinação simultânea de Mf e Ng utilizando a técnica de CE

Para o desenvolvimento deste método foram realizados levantamentos sobre as características químicas, físico-químicas das substâncias em estudo tais como solubilidade, pKa, LogP.

4.2.2.1. Preparo das soluções

Solução estoque de Metformina

Foi pesado analiticamente 10,0 mg do padrão de Mf e transferido para um balão volumétrico de 10 mL, adicionando-se Água ultrapura (Milli-Q) para solubilizar a substância. Após a total solubilização, o volume foi completado para 10 mL com o mesmo solvente. Esta solução tem a concentração de 1,0 mg/mL e está armazenada sob refrigeração (2 à 8°C), e diluída apropriadamente no momento da análise.

Solução estoque de Nateglinida

Foi pesado analiticamente 10,0 mg do padrão de Ng e transferido para um balão volumétrico de 10 mL, adicionando-se Metanol grau HPLC para solubilizar a substância. Após a total solubilização, o volume foi completado para 10 mL com Água ultrapura (Milli-Q). Esta solução tem a concentração de 1,0 mg/mL e está armazenada sob refrigeração (2 à 8°C), e diluída apropriadamente no momento da análise.

Solução padrão de trabalho de Metformina

Foi pipetada alíquota de 100 µL da solução estoque de Mf e transferida para um microtubo de 2 mL. Logo foi adicionado 900 µL do eletrólito preparado para o método, m seguida o microtubo foi colocado no Vortex até a completa homogeneização da solução.

Esta solução tem a concentração de 0,100 mg/mL.

Solução padrão de trabalho de Nateglinida

Foi pipetada alíquota de 100 μL da solução estoque de Ng e transferida para um microtubo de 2 mL. Logo foi adicionado 900 μL do eletrolito preparado para o método, em seguida o microtubo foi colocado no Vortex até a completa homogeneização da solução.

Esta solução tem a concentração de 0,100 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Solução padrão de trabalho de Metformina e Nateglinida

Foi pipetada alíquota de 100 μL da solução estoque de Mf e 100 μL da solução estoque de Ng e transferida para um microtubo de 2 mL. Logo foi adicionado 800 μL do eletrólito preparado para o método, em seguida o microtubo foi colocado no Vortex até a completa homogeneização da solução.

Esta solução tem a concentração de 0,100 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

4.2.2.2. Preparo da solução tampão de corrida

Solução tampão tetraborato de sódio 25 mM pH 9,5

Foram pesados 4,7672 g de tetraborato de sódio e transferidos para balão volumétrico de 500 mL, dissolvidos em água ultrapura e a solução foi filtrada através de membrana 0,22 μm .

4.2.2.3. Condições do método

Tampão: Tetraborato de sódio 25mM pH 9,5

Pressão de injeção: 5s 35mbar

Voltagem: 20 kV

Capilar: 60 cm (75 μm ID)

Temperatura do capilar: 20 °C

Comprimento de onda: 220 nm

4.2.2.4. Degradação forçada do Cloridrato de Metformina

Para a condição dos testes de degradação forçada, foram utilizadas as soluções estoques de Mf.

Degradação em meio ácido

Foi pipetada uma alíquota de 500 μL da solução estoque de Mf e transferida para um microtubo de 2 mL. Logo foi adicionado cerca de 100 μL de HCl 0,1 M, em seguida o microtubo foi colocado no Vortex até a completa homogeneização da solução. O microtubo foi colocado em banho-maria a 50 °C durante 48 horas. Após o período, foi adicionado 400 μL do eletrólito preparado para o método. A solução foi homogeneizada e filtrada com filtro PVDF 0,45 μm .

Esta solução tem a concentração de 0,500 mg/mL.

Degradação em meio básico

Foi pipetada uma alíquota de 500 μL da solução estoque de Mf e transferida para um microtubo de 2 mL. Logo foi adicionado cerca de 100 μL de NaOH 0,1 M, em seguida o microtubo foi colocado no Vortex até a completa homogeneização da solução. O microtubo foi colocado em banho-maria a 50 °C durante 48 horas. Após o período, foi adicionado 400 μL do eletrólito preparado para o método. A solução foi homogeneizada e filtrada com filtro PVDF 0,45 μm .

Esta solução tem a concentração de 0,500 mg/mL.

Degradação por hidrólise

Foi pipetada uma alíquota de 500 μL da solução estoque de Mf e transferida para um microtubo de 2 mL. Logo foi adicionado cerca de 100 μL de água ultrapura, em seguida o microtubo foi colocado no Vortex até a completa homogeneização da solução. O microtubo foi colocado em banho-maria a 50 °C durante 48 horas. Após o período, foi adicionado 400 μL do eletrólito preparado para o método.

Esta solução tem a concentração de 0,500 mg/mL.

4.2.2.5. Degradação forçada da Nateglinida

Para a condição dos testes de degradação forçada, foram utilizadas as soluções estoques de Ng.

Degradação em meio ácido

Foi pipetada uma alíquota de 500 µL da solução estoque de Ng e transferida para um microtubo de 2 mL. Logo foi adicionado cerca de 100 µL de HCl 0,1 M, em seguida o microtubo foi colocado no Vortex até a completa homogeneização da solução. O microtubo foi colocado em banho-maria a 50 °C durante 48 horas. Após o período, foi adicionado 400 µL do eletrólito preparado para o método. A solução foi homogeneizada e filtrada com filtro PVDF 0,45 µm.

Esta solução tem a concentração de 0,500 mg/mL.

Degradação em meio básico

Foi pipetada uma alíquota de 500 µL da solução estoque de Ng e transferida para um microtubo de 2 mL. Logo foi adicionado cerca de 100 µL de NaOH 0,1 M, em seguida o microtubo foi colocado no Vortex até a completa homogeneização da solução. O microtubo foi colocado em banho-maria a 50 °C durante 48 horas. Após o período, foi adicionado 400 µL do eletrólito preparado para o método. A solução foi homogeneizada e filtrada com filtro PVDF 0,45 µm.

Esta solução tem a concentração de 0,500 mg/mL.

Degradação por hidrólise

Foi pipetada uma alíquota de 500 µL da solução estoque de Ng e transferida para um microtubo de 2 mL. Logo foi adicionado cerca de 100 µL de água ultrapura, em seguida o microtubo foi colocado no Vortex até a completa homogeneização da

solução. O microtubo foi colocado em banho-maria a 50 °C durante 48 horas. Após o período, foi adicionado 400 µL do eletrólito preparado para o método.

Esta solução tem a concentração de 0,500 mg/mL.

4.2.3. Desenvolvimento de método analítico para determinação simultânea de Mf e Ng utilizando a técnica de HPLC (HILIC)

Estudou-se as condições analíticas mais adequadas a separação simultânea dos dois analitos escolhidos utilizando uma coluna de fase reversa com grupamentos químicos polares para retenção de moléculas como a metformina.

4.2.3.1. Preparo das soluções

Solução estoque de Metformina

Foi pesado analiticamente 10,0 mg do padrão de Mf e transferido para um balão volumétrico de 10 mL, adicionando-se Água ultrapura (Milli-Q) para solubilizar a substância. Após a total solubilização, o volume foi completado para 10 mL com o mesmo solvente. Esta solução tem a concentração de 1,0 mg/mL e está armazenada sob refrigeração (2 à 8°C), e diluída apropriadamente no momento da análise.

Solução estoque de Nateglinida

Foi pesado analiticamente 10,0 mg do padrão de Ng e transferido para um balão volumétrico de 10 mL, adicionando-se Metanol grau HPLC para solubilizar a substância. Após a total solubilização, o volume foi completado para 10 mL com Água ultrapura (Milli-Q). Esta solução tem a concentração de 1,0 mg/mL e está armazenada sob refrigeração (2 à 8°C), e diluída apropriadamente no momento da análise.

Solução padrão de trabalho Metformina

Foi pipetada alíquota de 100 µL da solução estoque de Mf e transferida para um microtubo de 2 mL. Logo foi adicionado 900 µL do eletrólito preparado para o

método, em seguida o microtubo foi colocado no Vortex até a completa homogeneização da solução. Esta solução tem a concentração de 0,100 mg/mL.

Solução padrão de trabalho Nateglinida

Foi pipetada alíquota de 100 μ L da solução estoque de Ng e transferida para um microtubo de 2 mL. Logo foi adicionado 900 μ L do eletrólito preparado para o método, em seguida o microtubo foi colocado no Vortex até a completa homogeneização da solução. Esta solução tem a concentração de 0,100 mg.mL⁻¹.

Solução padrão de trabalho Metformina e Nateglinida

Foi pipetada alíquota de 100 μ L da solução estoque de Mf e 100 μ L da solução estoque de Ng e transferida para um microtubo de 2 mL. Logo foi adicionado 800 μ L do eletrólito preparado para o método, em seguida o microtubo foi colocado no Vortex até a completa homogeneização da solução. Esta solução tem a concentração de 0,100 mg. mL⁻¹.

4.2.3.2. Preparo da fase móvel

Tampão Formiato de amônia 10 mM pH 8,5

Pesar analiticamente 0,63 g de formiato de amônia, transferir para um béquer e adicionar cerca de 950 mL de água ultrapura, homogeneizar e ajustar o pH. Transferir o líquido para um balão volumétrico de 1 L e ajustar o volume com água ultrapura. Filtrar a mistura em membrana de 0,22 μ m.

Fase móvel

A fase móvel consistirá em acetonitrila e tampão formiato de amônia 10 mM pH 8,5 95/5 (v/v). Homogeneizar e deixar em banho ultrassom por 10 minutos.

4.2.3.3. Condições do método

Fase móvel: Acetonitrila e Tampão formiato de amônia (95:5) (Isocrático)

Coluna: Poroshell 120 HILIC (100 mm x 2,1 mm) 2,7 μm

Tempo de corrida: 10 minutos

Temperatura: 25 °C

Temperatura do amostrador: ambiente

Vazão: 0,8 mL.min⁻¹

Comprimento de onda: 220 nm

4.2.3.4. Degradação forçada do Cloridrato de Metformina

Para a condição dos testes de degradação forçada, foram utilizadas as soluções estoques de Mf.

Degradação em meio ácido

Foi pipetada uma alíquota de 500 μL da solução estoque de Mf e transferida para um microtubo de 2 mL. Logo foi adicionado cerca de 100 μL de HCl 0,1 M, em seguida o microtubo foi colocado no Vortex até a completa homogeneização da solução. O microtubo foi colocado em banho-maria a 50 °C durante 48 horas. Após o período, foi adicionado 400 μL da fase móvel preparada para o método. A solução foi homogeneizada e filtrada com filtro PVDF 0,45 μm .

Esta solução tem a concentração de 0,500 mg/mL.

Degradação em meio básico

Foi pipetada uma alíquota de 500 μL da solução estoque de Mf e transferida para um microtubo de 2 mL. Logo foi adicionado cerca de 100 μL de NaOH 0,1 M, em seguida o microtubo foi colocado no Vortex até a completa homogeneização da solução. O microtubo foi colocado em banho-maria a 50 °C durante 48 horas. Após o

período, foi adicionado 400 µL da fase móvel preparada para o método. A solução foi homogeneizada e filtrada com filtro PVDF 0,45 µm.

Esta solução tem a concentração de 0,500 mg/mL.

Degradação por hidrólise

Foi pipetada uma alíquota de 500 µL da solução estoque de Mf e transferida para um microtubo de 2 mL. Logo foi adicionado cerca de 100 µL de água ultrapura, em seguida o microtubo foi colocado no Vortex até a completa homogeneização da solução. O microtubo foi colocado em banho-maria a 50 °C durante 48 horas. Após o período, foi adicionado 400 µL da fase móvel preparada para o método.

Esta solução tem a concentração de 0,500 mg/mL.

4.2.3.5. Degradação forçada da Nateglinida

Para a condição dos testes de degradação forçada, foram utilizadas as soluções estoques de Ng.

Degradação em meio ácido

Foi pipetada uma alíquota de 500 µL da solução estoque de Ng e transferida para um microtubo de 2 mL. Logo foi adicionado cerca de 100 µL de HCl 0,1 M, em seguida o microtubo foi colocado no Vortex até a completa homogeneização da solução. O microtubo foi colocado em banho-maria a 50 °C durante 48 horas. Após o período, foi adicionado 400 µL da fase móvel preparada para o método. A solução foi homogeneizada e filtrada com filtro PVDF 0,45 µm.

Esta solução tem a concentração de 0,500 mg/mL.

Degradação em meio básico

Foi pipetada uma alíquota de 500 μL da solução estoque de Ng e transferida para um microtubo de 2 mL. Logo foi adicionado cerca de 100 μL de NaOH 0,1 M, em seguida o microtubo foi colocado no Vortex até a completa homogeneização da solução. O microtubo foi colocado em banho-maria a 50 °C durante 48 horas. Após o período, foi adicionado 400 μL da fase móvel preparada para o método. A solução foi homogeneizada e filtrada com filtro PVDF 0,45 μm .

Esta solução tem a concentração de 0,500 mg/mL.

Degradação por hidrólise

Foi pipetada uma alíquota de 500 μL da solução estoque de Ng e transferida para um microtubo de 2 mL. Logo foi adicionado cerca de 100 μL de água ultrapura, em seguida o microtubo foi colocado no Vortex até a completa homogeneização da solução. O microtubo foi colocado em banho-maria a 50 °C durante 48 horas. Após o período, foi adicionado 400 μL da fase móvel preparada para o método.

Esta solução tem a concentração de 0,500 mg/mL.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Método Analítico por HPLC baseado em microemulsão

Dentre as diversas formulações e condições cromatográficas utilizadas para desenvolver o método analítico, além de utilizar RP-HPLC em modo isocrático em diversas proporções de solventes e utilizando tampões com concentrações e pH diferentes, explorou-se a cromatografia líquida baseada em microemulsão a qual foram desenvolvidas fases móveis para eluir os IFAs Ng e Mf.

A utilização da fase móvel com proporções de solventes e tampões diversos não foram capazes de reter a Mf em RP-HPLC fazendo com que o analito eluísse junto com o volume morto conforme **Figura 12**. Neste ponto, resolveu-se explorar a aplicação baseada em microemulsão.

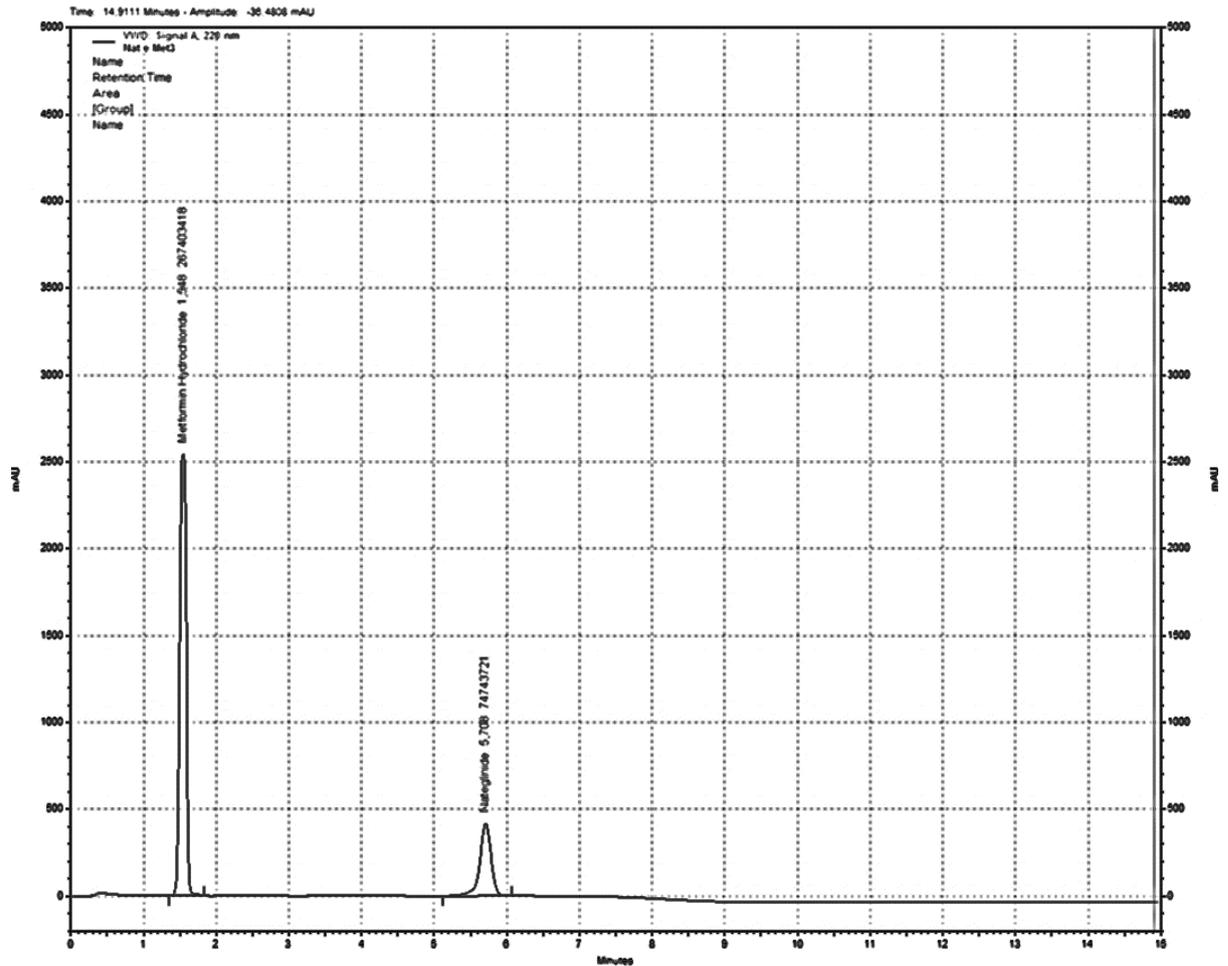


Figura 12: Cromatograma das soluções padrão de nateglinida ($20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e cloridrato de metformina ($20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Condições: coluna ACE C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 μm), Tampão fosfato 100 mmol L^{-1} (pH 2,6):Metanol (35:65 v/v), eluição isocrática, detecção UV em 220 nm, vazão em 1 mL min^{-1} .

A partir do preparo da, micro emulsão avaliou-se as fases móveis, onde foram preparados diversos sistemas. Iniciou-se as análises com micro emulsão em comprimento de onda de 200 nm e conforme apresentado na **Figura 13**.

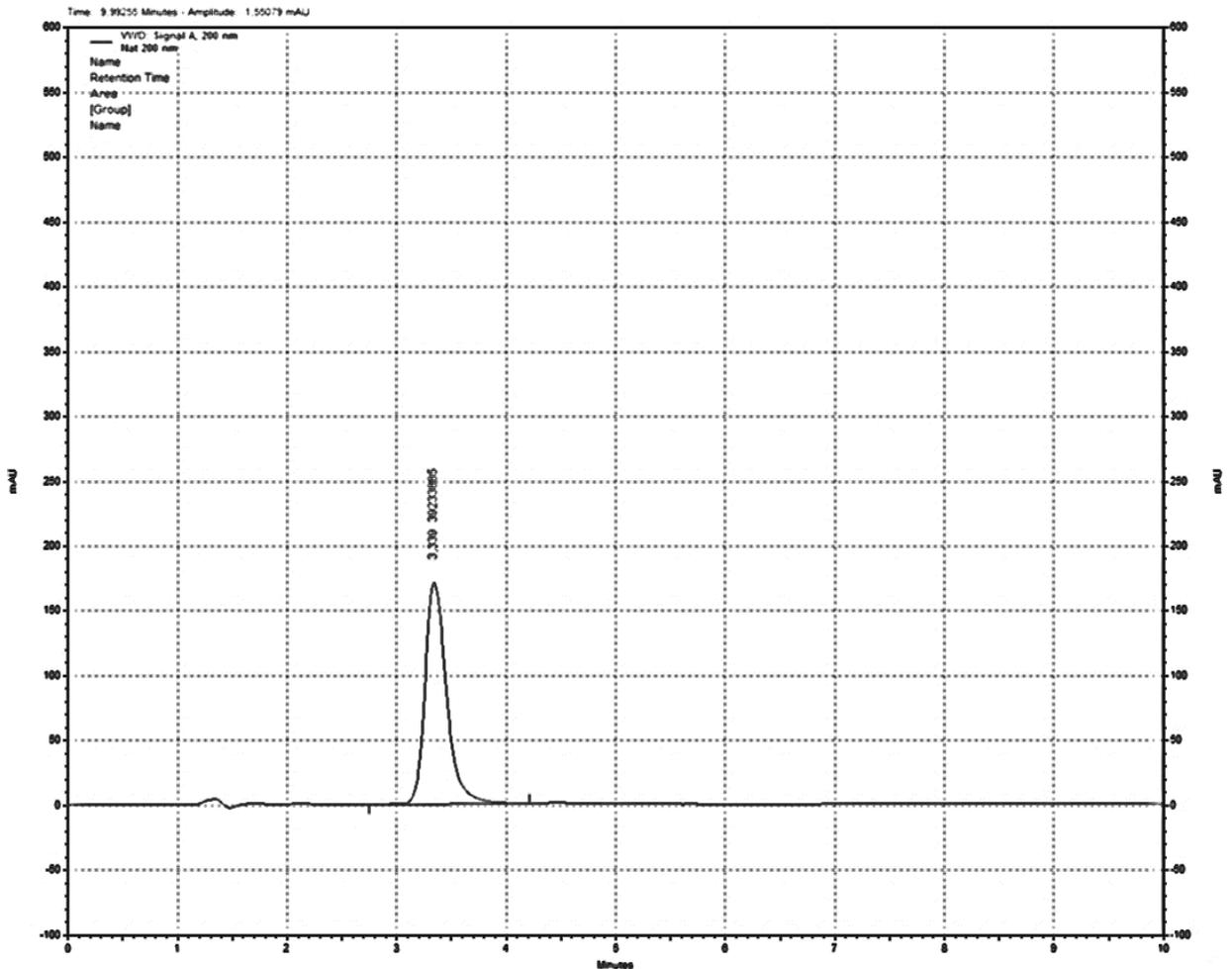


Figura 13: Cromatograma da solução padrão de nateglinida ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$). Condições: coluna C18 Phenomenex Onyx Silica (100 mm x 4,6 mm); fase móvel: Octano 0,80%, 1-Butanol 7,60%, SDS 4,50%, Tampão fosfato 10 mmol L^{-1} (pH 6,0) 87,10%; eluição isocrática, detecção UV em 200 nm, vazão em $1,0 \text{ mL min}^{-1}$.

O primeiro sistema avaliado conforme as **Figura 14, 15 e 16**, onde tem-se as injeções da Ng, Mf e os dois IFAs juntos, respectivamente, o qual o Mf passou a ser retido na fase estacionária, porém saiu no mesmo tempo de retenção que a Ng.

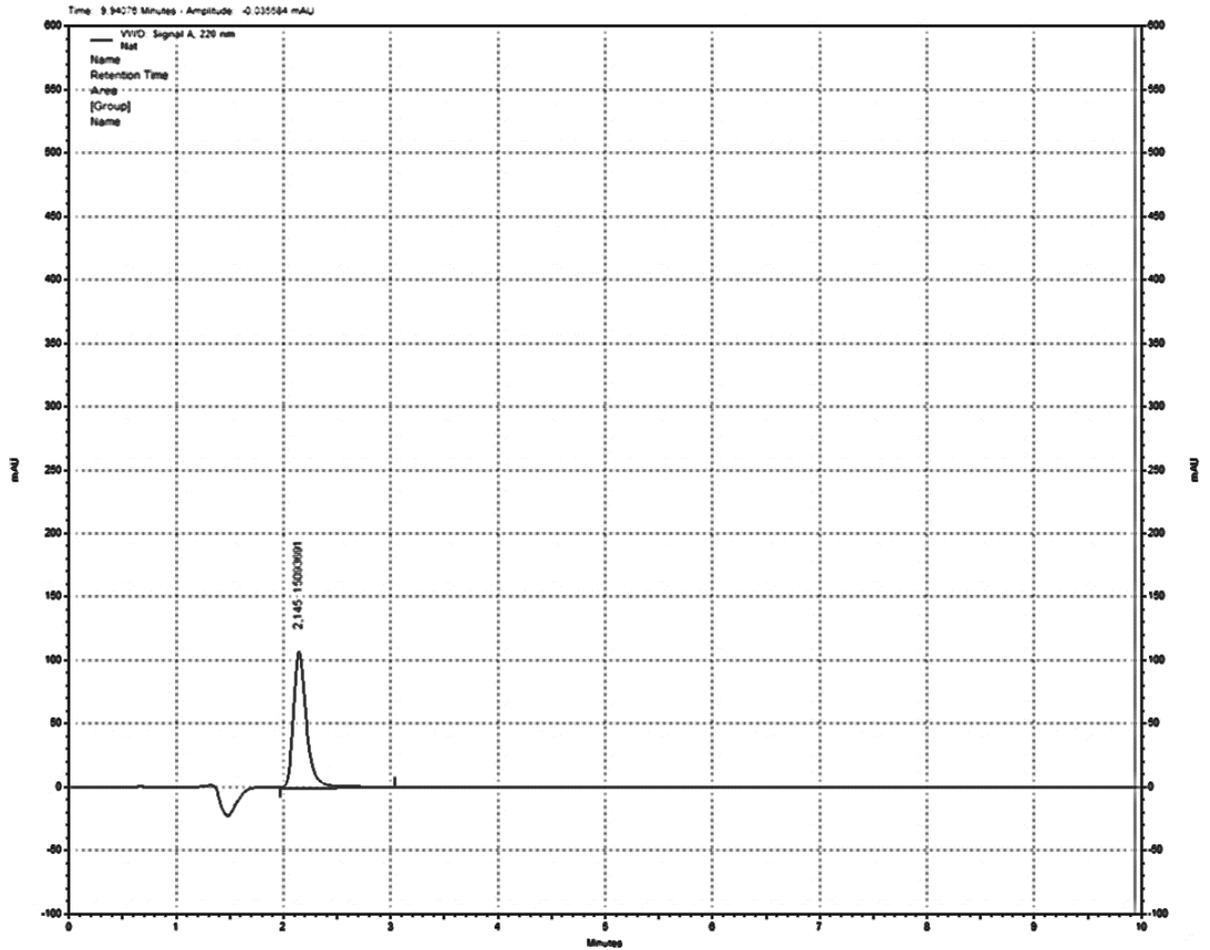


Figura 14: Cromatograma da solução padrão de nateglinida ($20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Condições: coluna C18 Phenomenex Onyx Silica (100 mm x 4,6 mm); fase móvel: Octano 0,81%, 1-Butanol 6,61%, SDS 3,31%, Tampão fosfato 20 mmol L^{-1} (pH 6,0) 79,27%, Metanol 10%; eluição isocrática, detecção UV em 200 nm, vazão em $0,9 \text{ mL min}^{-1}$.

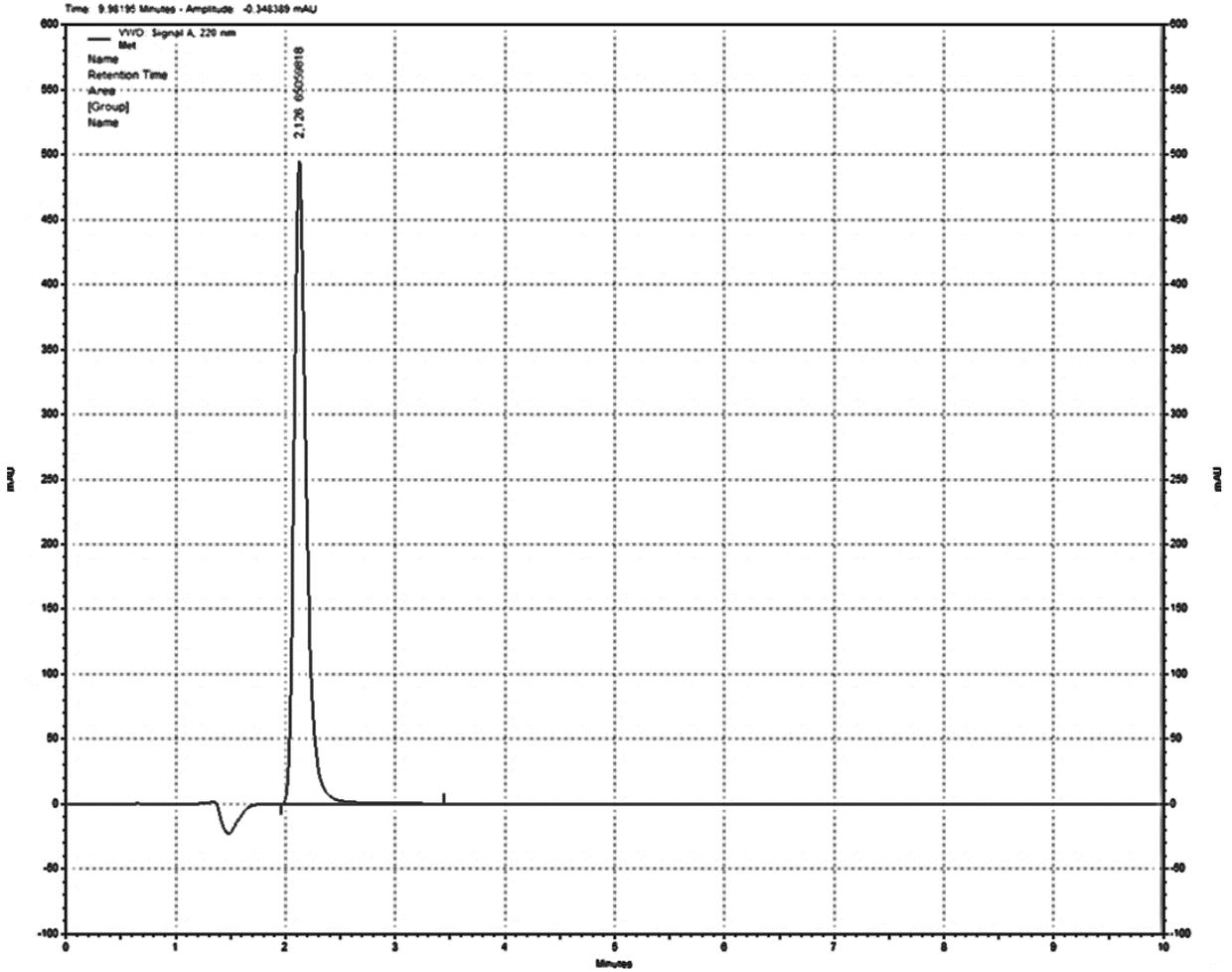


Figura 15: Cromatograma da solução padrão de cloridrato de metformina ($20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Condições: coluna C18 Phenomenex Onyx Silica (100 mm x 4,6 mm); fase móvel: Octano 0,81%, 1-Butanol 6,61%, SDS 3,31%, Tampão fosfato 20 mmol L⁻¹ (pH 6,0) 79,27%, Metanol 10%; eluição isocrática, detecção UV em 200 nm, vazão em 0,9 mL min⁻¹.

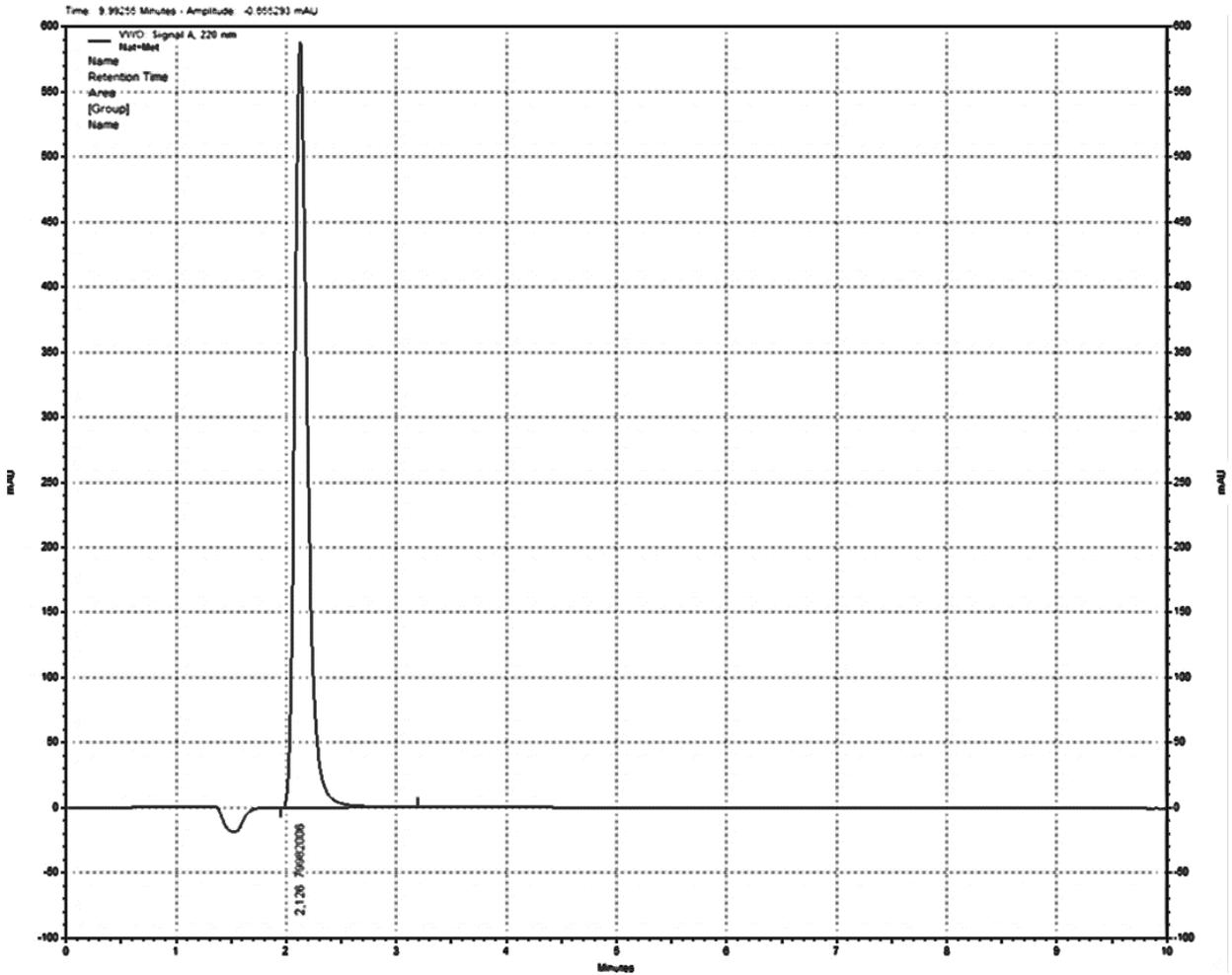


Figura 16: Cromatograma da solução padrão nateglinida com cloridrato de metformina ($20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ cada). Condições: coluna C18 Phenomenex Onyx Silica (100 mm x 4,6 mm); fase móvel: Octano 0,81%, 1-Butanol 6,61%, SDS 3,31%, Tampão fosfato 20 mmol L^{-1} (pH 6,0) 79,27%, Metanol 10%; eluição isocrática, detecção UV em 200 nm, vazão em $0,9 \text{ mL min}^{-1}$.

Alterando-se a concentração do tampão verificou-se a mudança no tempo de retenção dos dois IFAs em questão Ng e Mf. Conforme a **Figura 17** considerando-se que no primeiro cromatograma foi utilizado o Sistema 01 saindo no TR de 2,1 min e segundo cromatograma utilizou-se o sistema 02 saindo no TR de 5,4 min. As condições cromatográficas estão descritas conforme **Quadro 4**, Sistema 01 e 02, respectivamente.

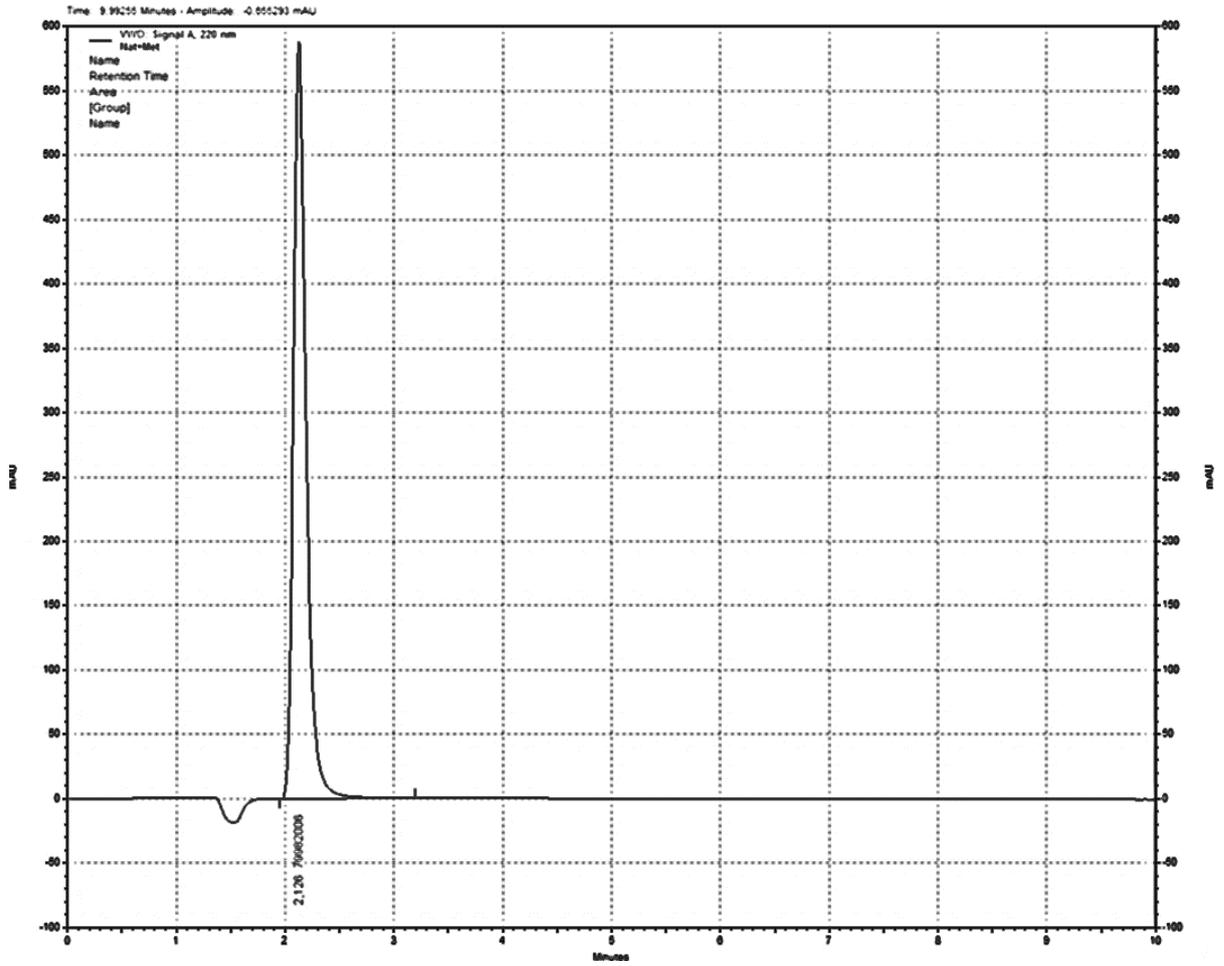


Figura 17: Cromatograma da solução padrão de nateglinida ($20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Condições cromatográficas: coluna C18 Phenomenex Onyx Silica (100 mm x 4,6 mm); fase móvel: Octano 0,81%, 1-Butanol 6,61%, SDS 3,31%, Tampão fosfato 20 mmol L^{-1} (pH 6,0) 89,27%; eluição isocrática, detecção UV em 220 nm, vazão em $0,9 \text{ mL min}^{-1}$

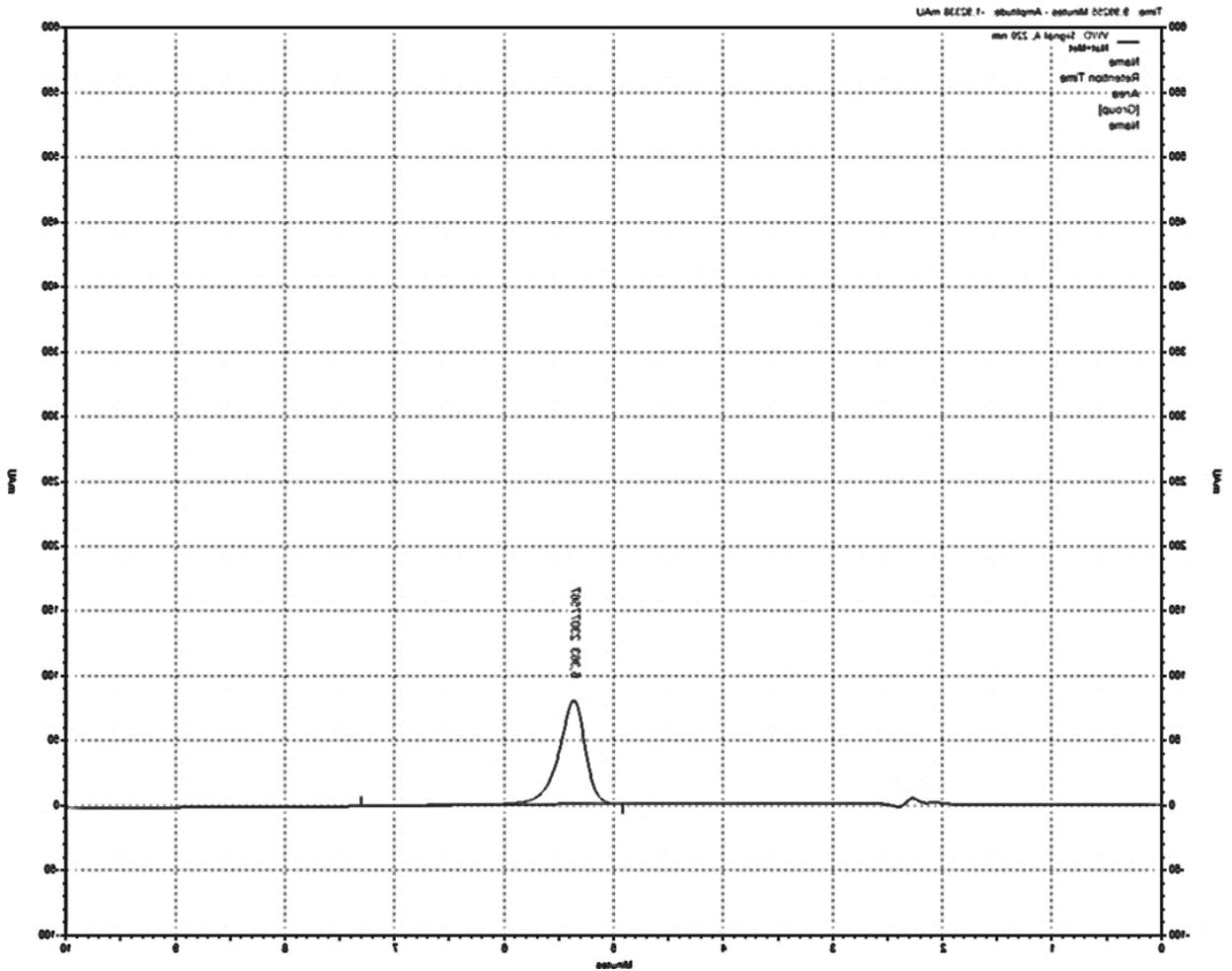


Figura 18: Cromatograma da solução padrão de cloridrato de metformina ($20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ cada). Condições cromatográficas: coluna C18 Phenomenex Onyx Silica (100 mm x 4,6 mm); fase móvel: Octano 0,81%, 1-Butanol 6,61%, SDS 3,31%, Tampão fosfato 10 mmol L^{-1} (pH 2,6) 89,27%; eluição isocrática, detecção UV em 200 nm, vazão em $0,9 \text{ mL min}^{-1}$.

A partir do momento em que foi inserido o isopropanol na formulação da fase móvel, observou-se uma pequena separação entre os dois analitos.

Trocou a fase estacionária, utilizando a Coluna C18 (ACE 150 mm x 4,6 mm 5 μm), a qual resultou em uma separação maior dos analitos, onde a Ng reteve-se mais na coluna do que o Mf conforme na **Figura 19**.

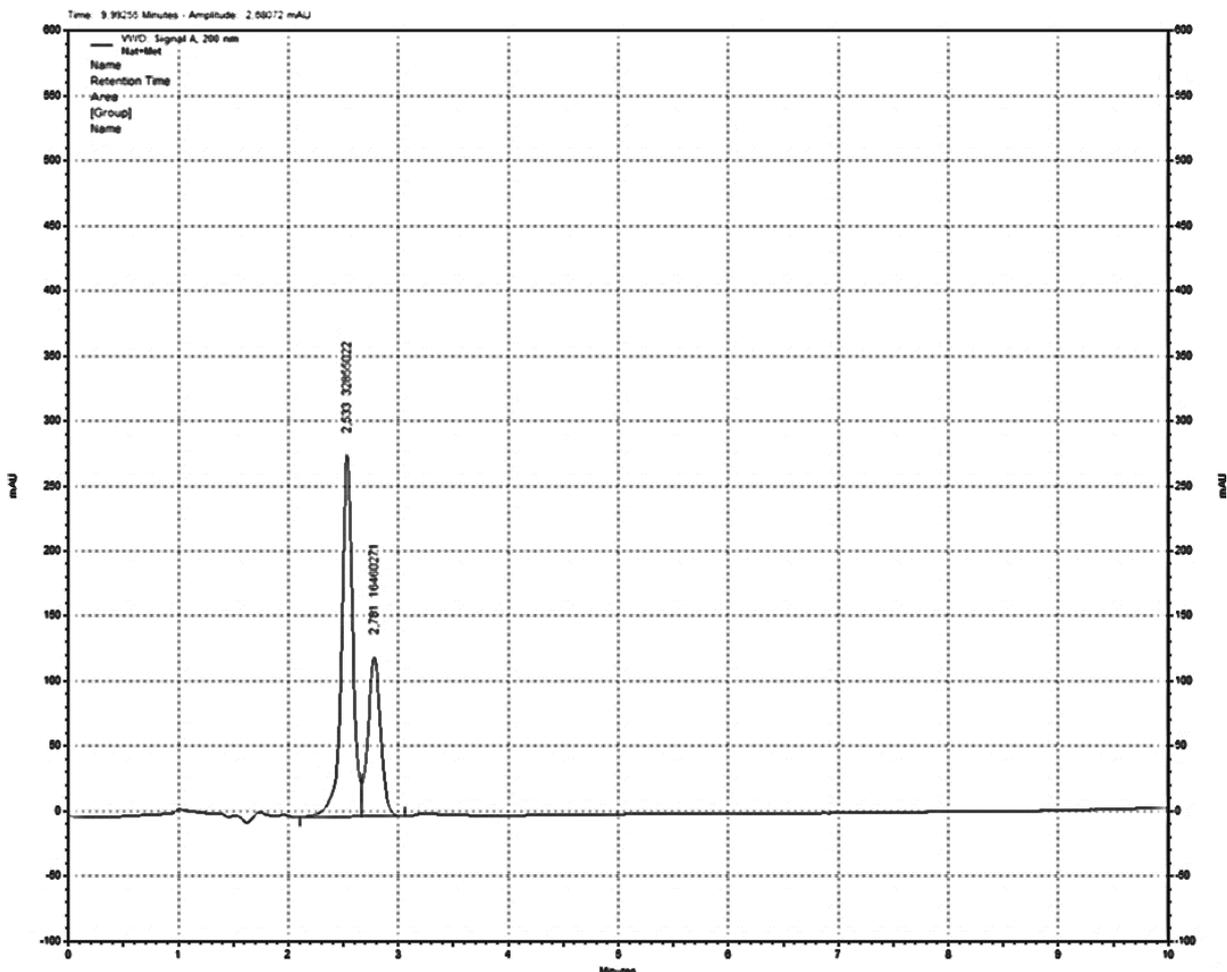


Figura 19: Cromatograma da solução padrão de nateglinida ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) e cloridrato de metformina ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$). Condições: coluna C18 (ACE 150 mm x 4,6 mm 5 μm); fase móvel: Octano 0,80%, 1-Butanol 7,60%, SDS 4,50%, Tampão fosfato 10 mmol L^{-1} (pH 6,0) 62,10%, Isopropanol 15,00%, THF 10,00%; eluição isocrática, detecção UV em 200 nm, vazão em $1,0 \text{ mL min}^{-1}$.

Com a finalidade de obter uma melhor separação dos analitos foi adicionado o tetraidrofurano (THF), pois este solvente tem baixa polaridade, o que resultaria na separação dos analitos. Realizou-se preparações com diversas proporções de Isopropanol e THF conforme descrito no **Quadro 01**. A melhor condição cromatográfica se obteve com a microemulsão foi com coluna C18 (ACE 150 mm x 4,6 mm 5 μm); fase móvel: Octano 0,80%, 1-Butanol 7,60%, SDS 4,50%, Tampão fosfato 10 mmol L^{-1} (pH 6,0) 57,10%, Isopropanol 15,00%, THF 15,00%; eluição isocrática, detecção UV em 200 nm, vazão em $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ (Figura 08), onde podemos observar uma boa separação de Mf e Ng.

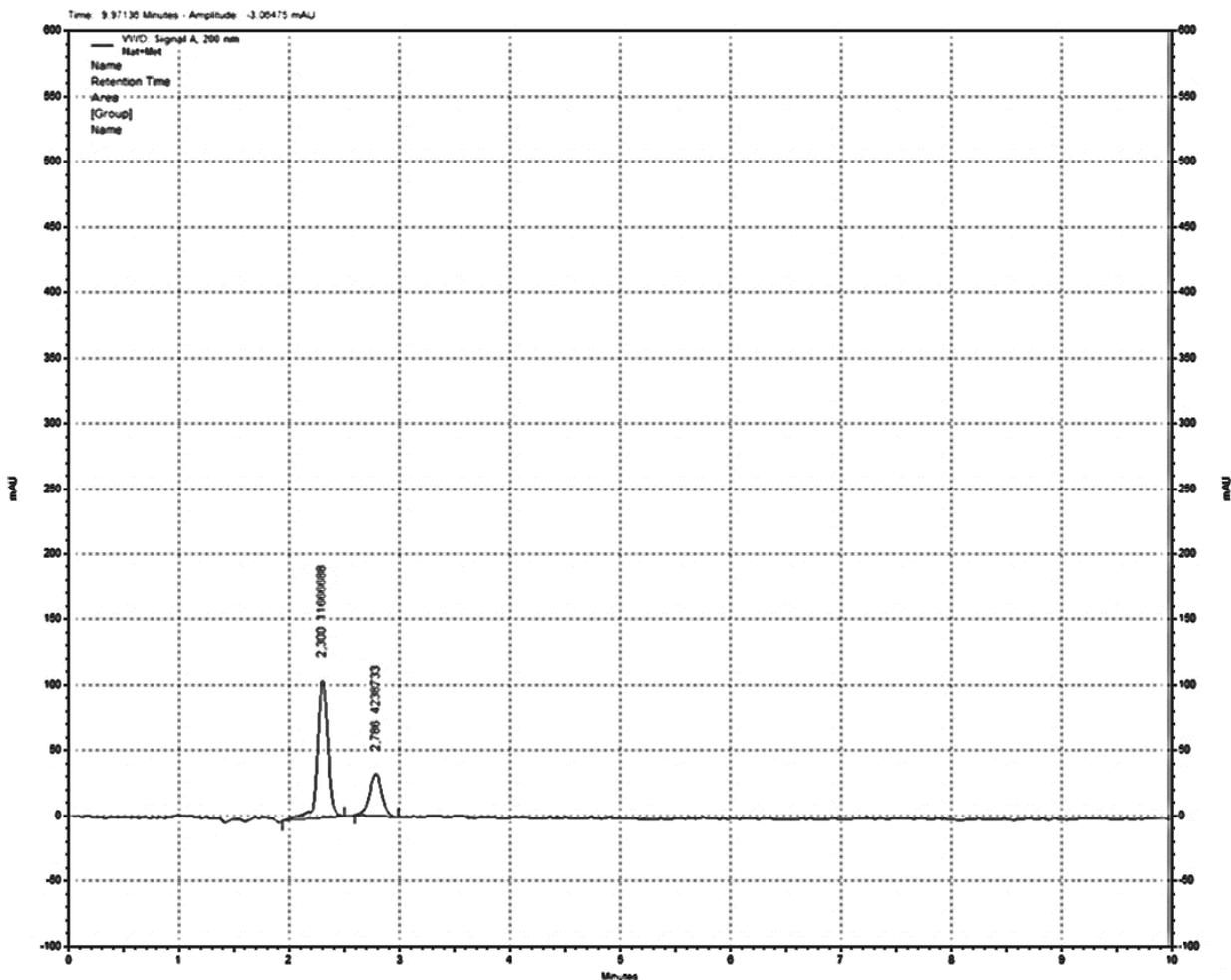


Figura 20: Cromatograma da solução padrão de nateglinida ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) e cloridrato de metformina ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$). Condições: coluna C18 (ACE 150 mm x 4,6 mm 5 μm); fase móvel: Octano 0,80%, 1-Butanol 7,60%, SDS 4,50%, Tampão fosfato 10 mmol L^{-1} (pH 6,0) 57,10%, Isopropanol 15,00%, THF 15,00%; eluição isocrática, detecção UV em 200 nm, vazão em $1,0 \text{ mL min}^{-1}$.

5.1.1. Validação analítica do método de HPLC baseada em microemulsão.

5.1.1.1. Seletividade

A seletividade do método foi realizada através da degradação forçada das substâncias em condições descritas na literatura, como a hidrólise ácida, hidrólise básica e oxidação.

5.1.1.2. Linearidade

Foi avaliada a faixa de trabalho entre 16 e 24 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dos fármacos em questão. Os resultados dos estudos de linearidade de Mf está demonstrado na **Tabela 1** e de Ng está demonstrado na **Tabela 2**.

Tabela 1: concentrações das soluções de Mf e respectivas áreas para a construção da curva analítica do método por HPLC baseado em microemulsão.

Solução	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Áreas*
1	16	654821
2	18	700214
3	20	755483
4	22	812453
5	24	857456

*: média de três determinações.

Tabela 2: concentrações das soluções de Ng e respectivas áreas para a construção da curva de calibração do método por HPLC baseado em microemulsão.

Solução	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Média das áreas
1	16	1284571
2	18	1451286
3	20	1682436
4	22	1912542
5	24	2108572

As curvas analíticas com os dados de Mf e Ng estão demonstrados, respectivamente, a seguir na **Figura 22 e 23** e **Tabela 3**.

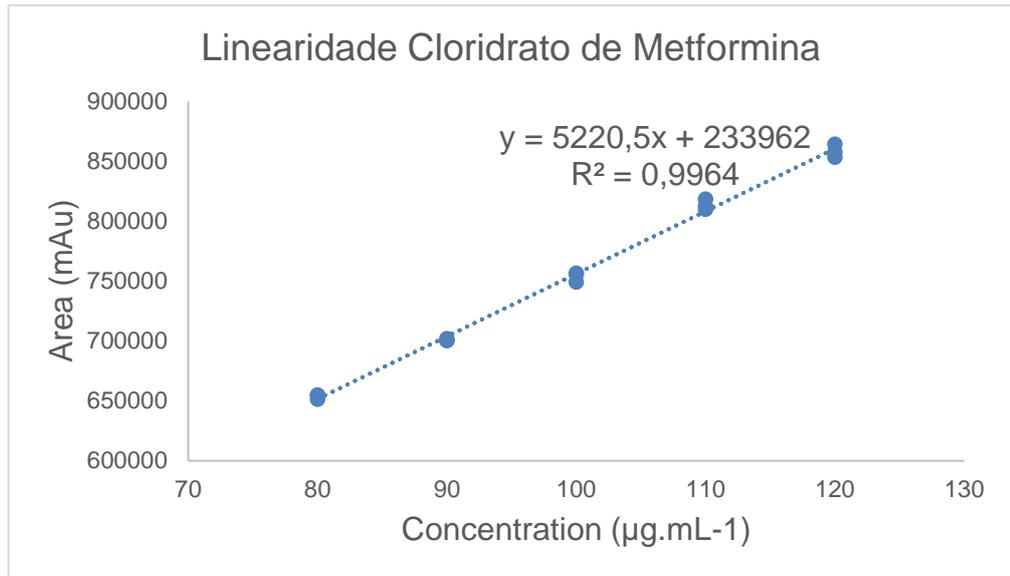


Figura 21: Curva analítica do Mf.

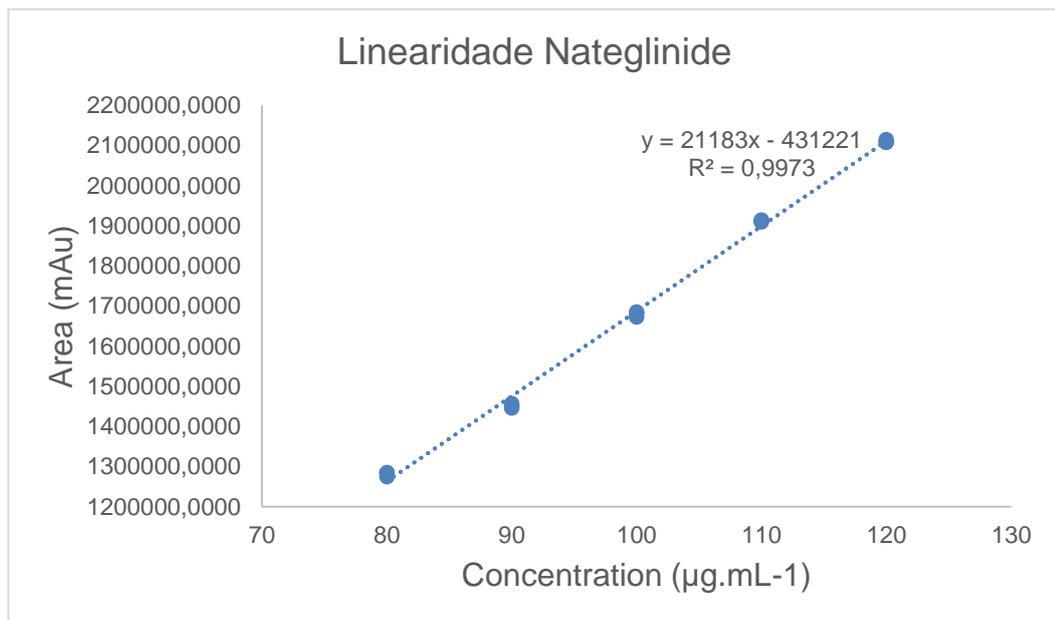


Figura 22: Curva analítica da Ng.

Tabela 3: resultados da curva de calibração obtidos para a análise de Mf e Ng.

Parâmetros da curva analítica	Cloridrato de Metformina	Nateglinida
Coeficiente de correlação (r)	0,9964	0,9973
Equação da reta ($y = ax + b$)	$y = 5220,5x + 233962$	$y = 21183x - 431221$

Desvio Padrão Relativo (DPR %)	2,03	4,12
Intercepto	233962	- 431221
Inclinação	5220,5	21183
Faixa de concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	16 a 24	16 a 24
Número de pontos	5	5

Os coeficientes de correlação foram maiores a 0,990 demonstrando haver uma correlação entre concentração e área dos fármacos de interesse. A linearidade realizada para este método cumpriu com os requisitos requeridos pelos compêndios oficiais para ambas as substâncias.

5.1.1.3. Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção e o limite de quantificação de Mf e Ng estão representados na **Tabela 4**.

Tabela 4: resultados do limite de detecção e limite de quantificação de Mf e Ng.

	Metformin	Nateglinide
LOD ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,001	0,002
LOQ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,003	0,006

5.1.1.4. Precisão repetibilidade e intermediária

A **Tabela 5** representa os resultados obtidos da repetibilidade e precisão intermediária do método analítico por HPLC baseado em microemulsão. Observa-se que nos resultados obtidos, calculou-se o %DPR das substâncias em questão e o resultado foi menor que 5%, portanto a precisão das amostras injetadas foi considerada satisfatórias conforme critérios de aceitação.

Tabela 5: Resultados obtidos nas determinações da repetibilidade e precisão intermediária do método por HPLC baseado em microemulsão de Mf e Ng.

	Cloridrato de Metformina	Nateglinida
Repetibilidade (%DPR)	0,388	0,345
Precisão intermediária (%DPR)	0,147	0,377

5.1.1.5. Exatidão

A exatidão foi realizada com o preparo de amostras com uma concentração baixa, média e alta (80%, 100% e 120%) em triplicata, onde foram determinadas no equipamento de HPLC e dentro da faixa linear do método, traduzindo o grau de concordância entre os resultados na **Tabela 6**.

Tabela 6: Valores de recuperação nas três concentrações avaliadas de Mf e Ng.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)	
	Cloridrato de Metformina	Nateglinida
80	101,0	100,5
100	100,8	98,6
120	101,1	100,1

5.1.1.6. Robustez

O parâmetro de robustez foi avaliado no desenvolvimento do método, onde foram modificados deliberadamente alguns parâmetros cromatográficos e não foram observadas diferenças significativas nas respostas analíticas de Mf e Ng.

5.2. Método analítico por CE

Para o desenvolvimento do método analítico para quantificar os fármacos Mf e Ng levou-se em consideração suas características químicas, como a de Mf que é uma

base com valor de pKa 11,5, em pH ácido esta substância se apresenta na forma protonada fazendo o cloridrato de metformina uma molécula adequada para CZE. A Ng tem um valor de pKa 4,0 e em pH básico se apresenta ionizada negativamente. Em pH ácido a nateglinida encontra se neutra saindo com o fluxo eletrosmótico. Portanto, foi usado um pH básico com o intuito de separar os dois fármacos simultaneamente, assim como demonstrado na **Figura 23** a seguir.

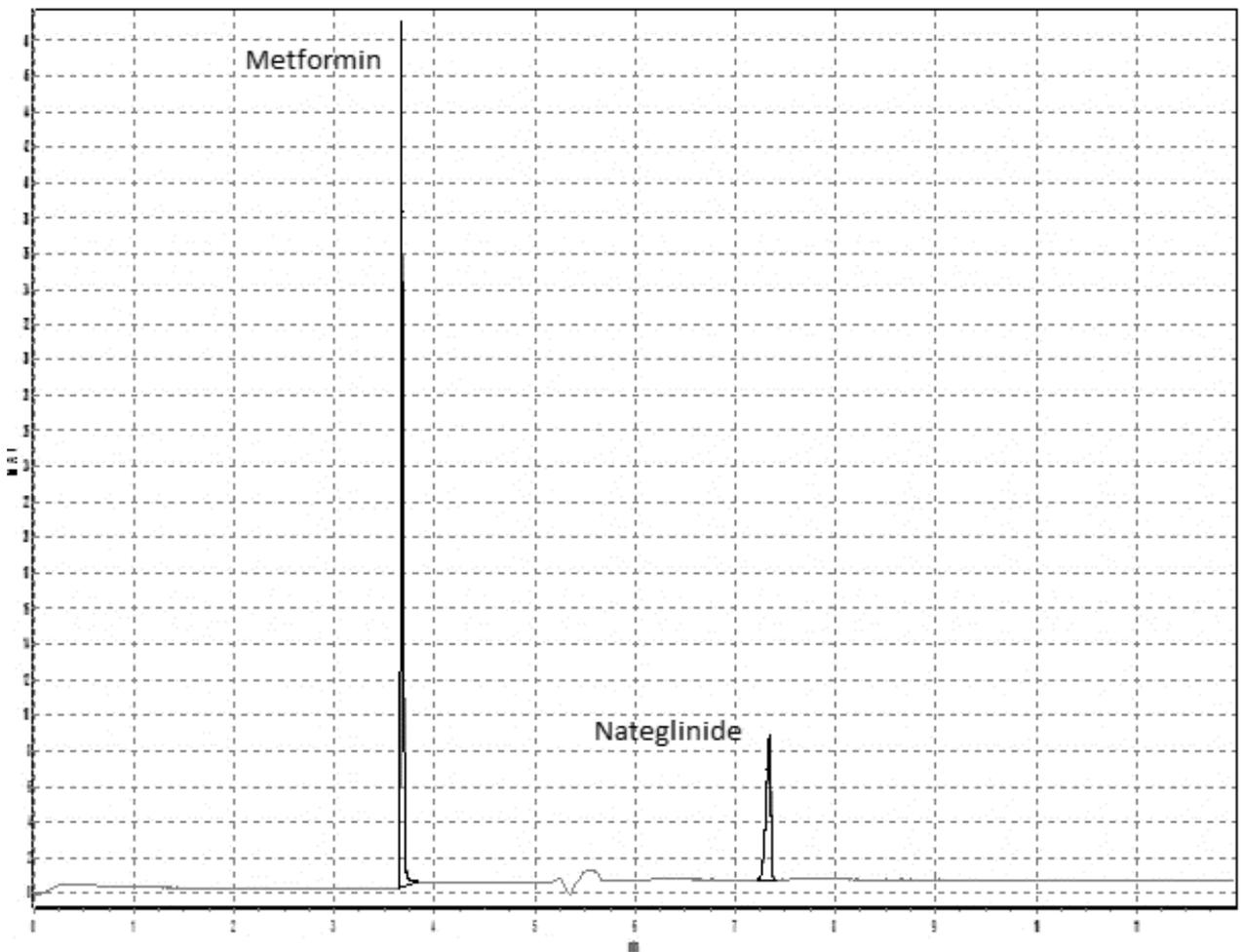


Figura 23: Eletroferograma da solução padrão de Mf ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) e Ng ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$). Condições: coluna capilar (60 cm x $75 \mu\text{m}$ I.D.); Eletrólito: tetraborato de sódio 25 mm (pH 9,0), detecção UV em 220 nm, Tensão + 20kV e injeção por pressão 35 mBar / 5 segundos.

Foi desenvolvido um método, o qual foi utilizado como eletrólito o tampão tetraborato de sódio 25 mm em um pH 9,0, posteriormente a validação seguindo os parâmetros escritos pela RDC 166/17 da ANVISA.

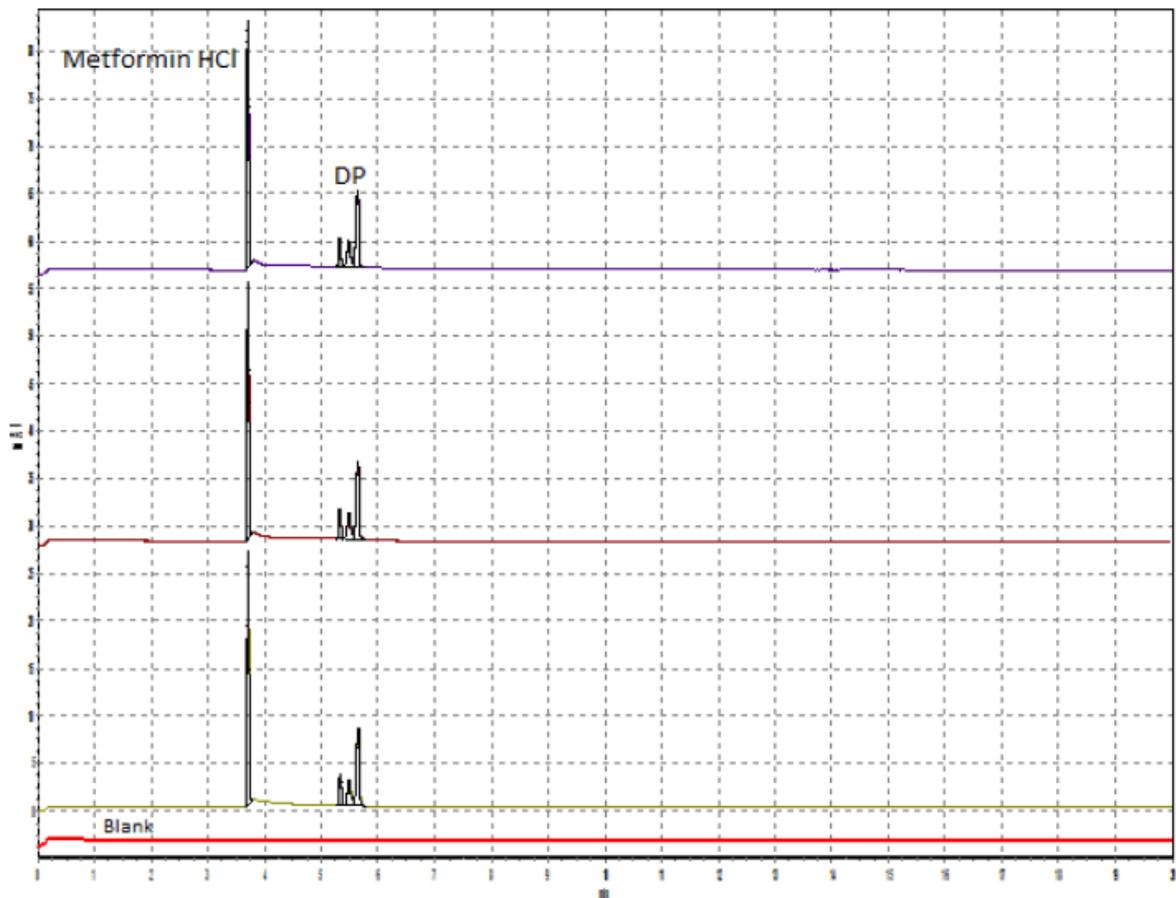


Figura 24: Eletroferograma da solução padrão de Mf ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) submetida a degradação em condição ácida. Condições: coluna capilar (60 cm x $75 \mu\text{m}$ I.D.); Eletrólito: Tetraborato de sódio 25 mm (pH 9,0), detecção UV em 220 nm, Tensão + 20kV e injeção por pressão 35 mBar / 5 segundos.

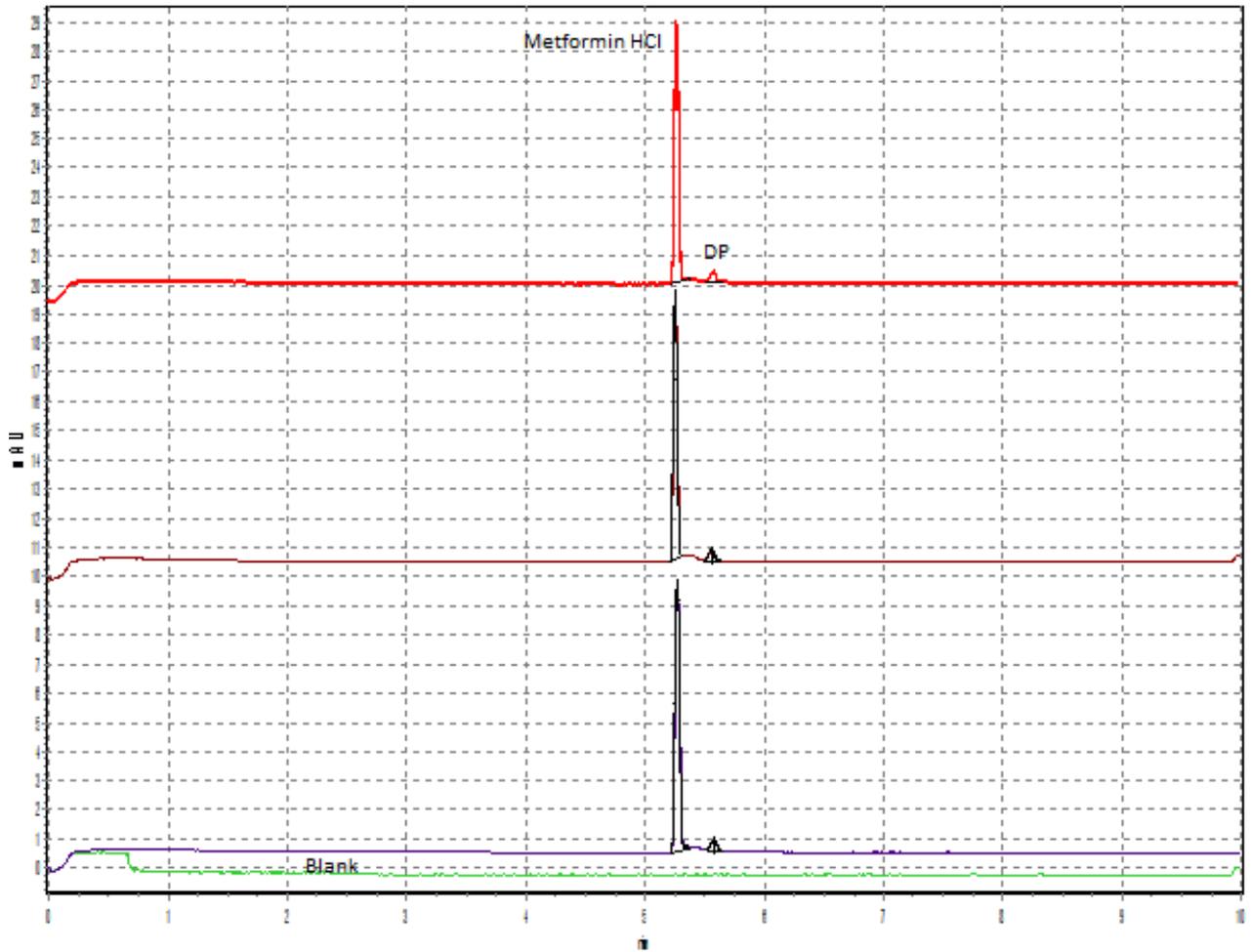


Figura 25: Eletroferograma da solução padrão de Mf ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) submetida a degradação em condição básica. Condições: coluna capilar (60 cm x $75 \mu\text{m}$ I.D.); Eletrólito: Tetraborato de sódio 25 mm (pH 9,0), detecção UV em 220 nm, Tensão + 20kV e injeção por pressão 35 mBar / 5 segundos.

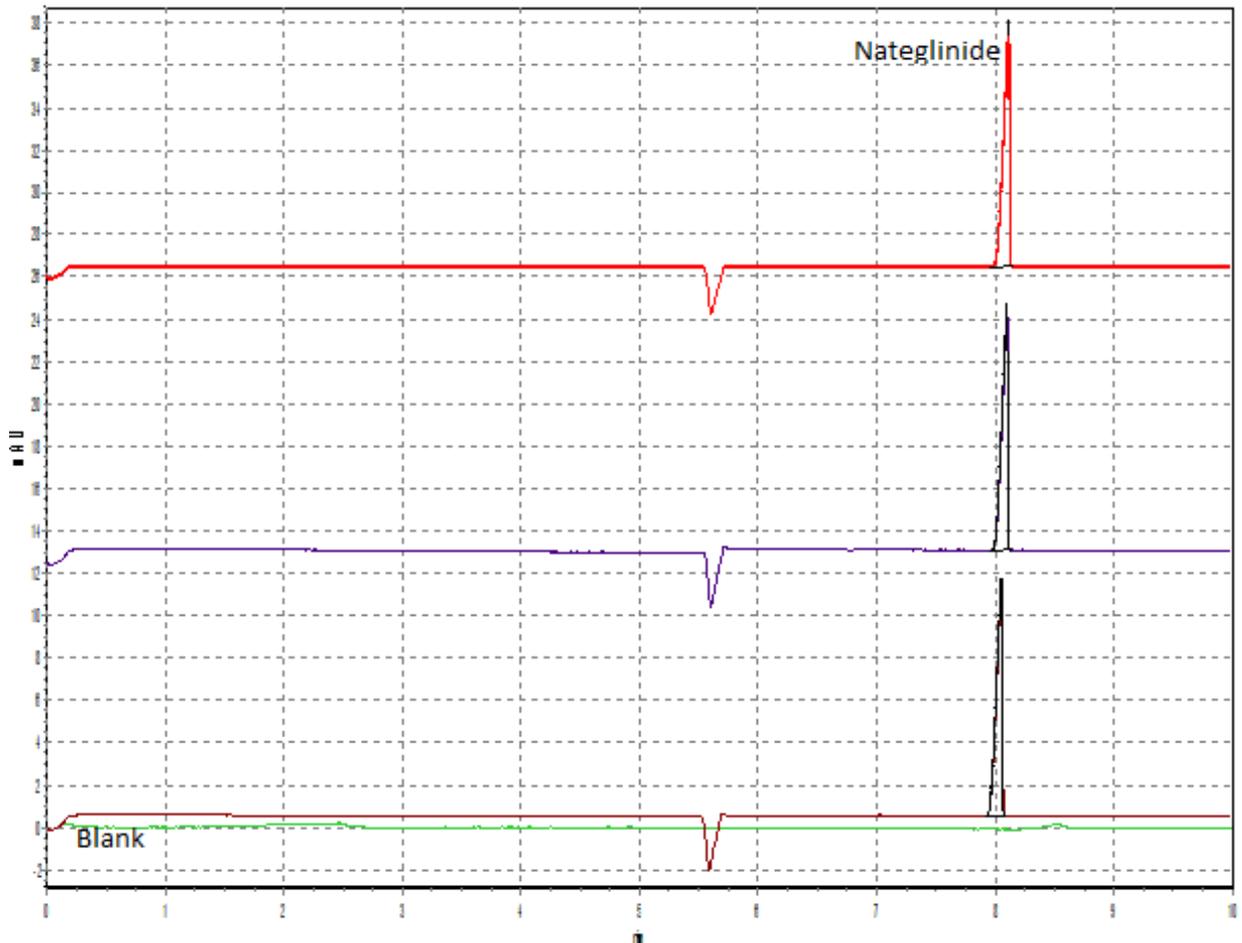


Figura 26: Eletroferograma da solução padrão de Ng ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) submetida a degradação em condição ácida. Condições: coluna capilar (60 cm x $75 \mu\text{m}$ I.D.); Eletrólito: Tetraborato de sódio 25 mm (pH 9,0), detecção UV em 220 nm, Tensão + 20kV e injeção por pressão 35 mBar / 5 segundos.

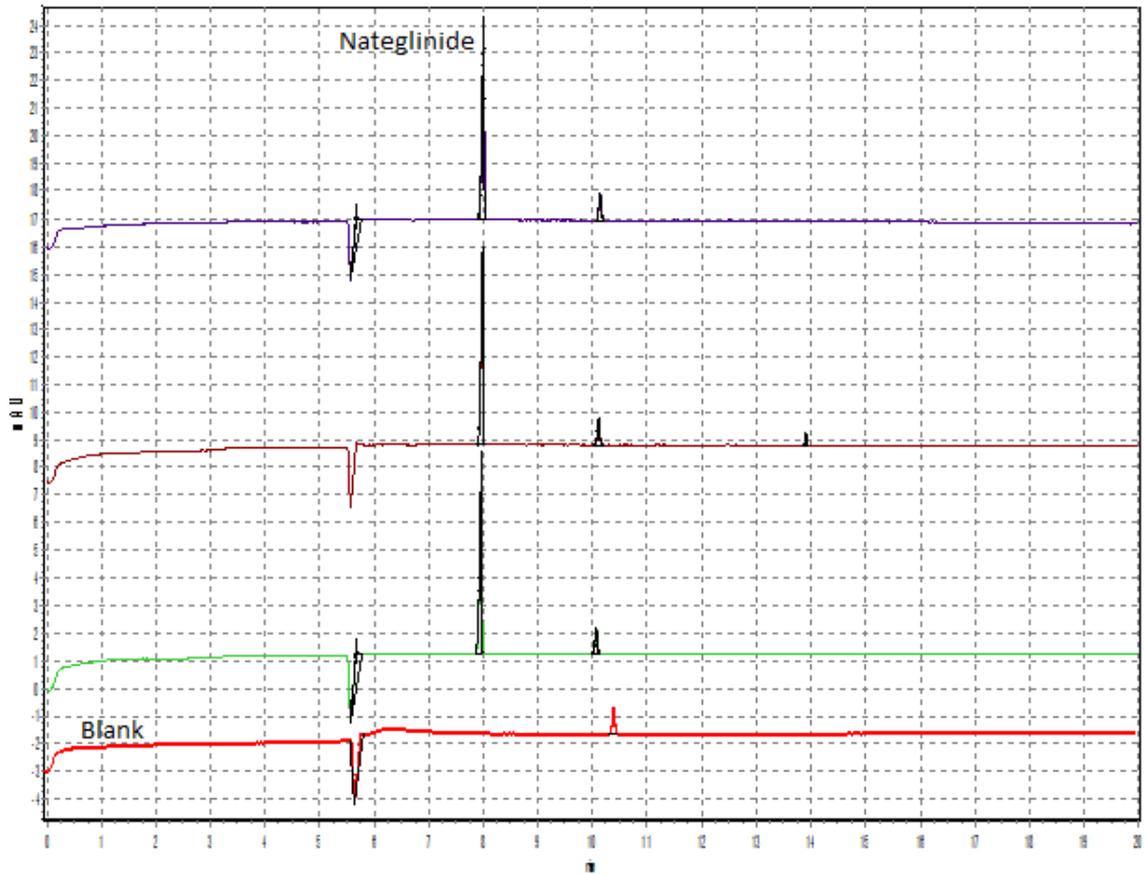


Figura 27: Eletroferograma da solução padrão de Ng ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) submetida a degradação em condição básica. Condições: coluna capilar (60 cm x $75 \mu\text{m}$ I.D.); Eletrólito: Tetraborato de sódio 25 mM (pH 9,0), detecção UV em 220 nm, Tensão + 20kV e injeção por pressão 35 mBar / 5 segundos.

5.2.1. Validação do método analítico por CE

5.2.1.1. Seletividade

A seletividade do método foi realizada através da degradação forçada das substâncias em condições descritas na literatura, como a hidrólise ácida, hidrólise básica e oxidação.

5.2.1.2. Linearidade

Foi avaliada a faixa de trabalho entre 50 e 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dos fármacos em questão. Os resultados dos estudos de linearidade de Mf está demonstrado na **Tabela 7** e de Ng está demonstrado na **Tabela 8**.

Tabela 7: concentrações das soluções de Mf e respectivas áreas para a construção da curva analítica do método por CE.

Solução	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Média das áreas (n=3)
1	50	285
2	80	491
3	90	547
4	100	609
5	110	671
6	120	729

Tabela 8: concentrações das soluções de Ng e respectivas áreas para a construção da curva analítica do método por CE.

Solução	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Média das áreas (n=3)
1	50	115
2	80	189
3	90	214
4	100	237
5	110	261

6

120

285

As curvas analíticas com os dados de Mf e Ng estão demonstrados, respectivamente, a seguir na **Figura 29 e 30** e **Tabela 9**.

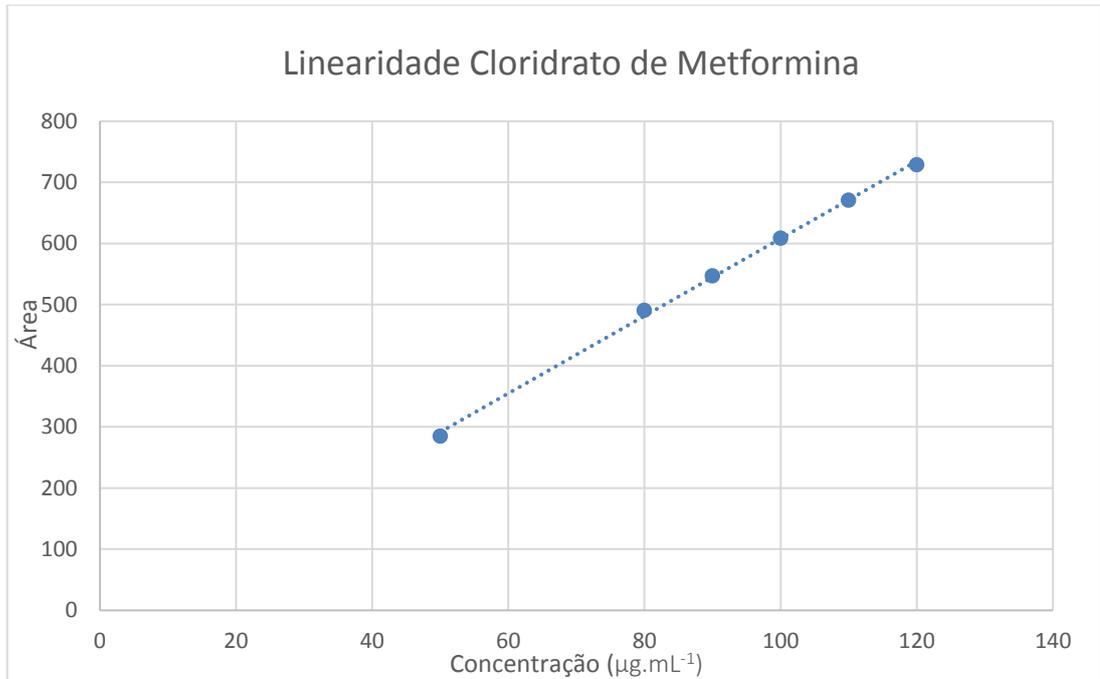


Figura 28: Curva de calibração do Mf.

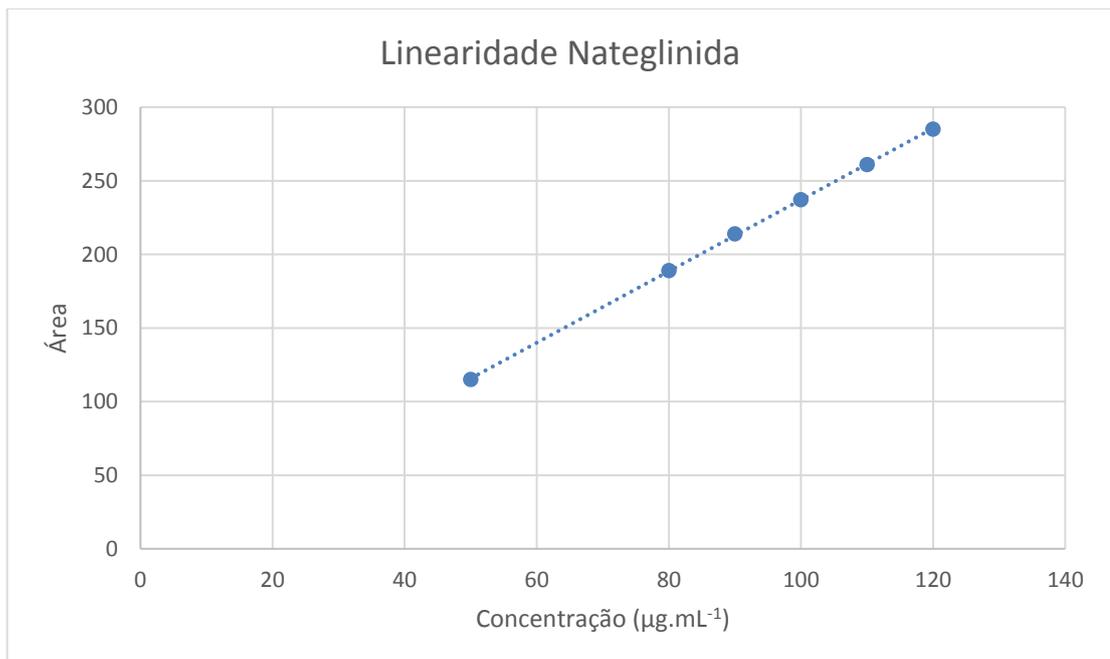


Figura 29: Curva de calibração da Ng.

Tabela 9: resultados da curva analítica obtidos para a análise de Mf e Ng.

Parâmetros da curva analítica	Cloridrato de Metformina	Nateglinida
Coeficiente de correlação (r)	0,9986	0,9999
Equação da reta ($y = ax + b$)	$y = 6.3297x - 24.892$	$y = 2.4265x - 5.5946$
Desvio Padrão Relativo (DPR %)	0,27	0,27
Faixa de concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	50 a 120	50 a 120

Os coeficientes de correlação foram maiores a 0,990 demonstrando haver uma correlação entre concentração e área dos fármacos de interesse. A linearidade realizada para este método cumpriu com os requisitos requeridos pelos compêndios oficiais para ambas as substâncias.

5.2.1.3. Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção e o limite de quantificação de Mf e Ng estão representados na **Tabela 10**.

Tabela 10: resultados do limite de detecção e limite de quantificação de Mf e Ng.

	Metformin	Nateglinide
LOD ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0.010	0.026
LOQ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0.033	0.086

5.2.1.4. Precisão repetibilidade e intermediária

Na **Tabela 11** representa os resultados obtidos da repetibilidade e precisão intermediária do método analítico por CE. Observa-se que nos resultados obtidos, calculou-se o %DPR das substâncias em questão e o resultado foi menor que 5%,

portanto a precisão das amostras injetadas foi considerada satisfatória conforme critérios de aceitação.

Tabela 11: Resultados obtidos nas determinações da repetibilidade e precisão intermediária do método por CE de Mf e Ng.

	Cloridrato de Metformina	Nateglinida
Repetibilidade (%DPR)	0.009	0.011
Precisão intermediária (%DPR)	0.009	0.017

5.2.1.5. Exatidão

A exatidão foi realizada com o preparo de amostras com uma concentração baixa, média e alta (80%, 100% e 120%) em triplicata, onde foram determinadas no equipamento de CE e dentro da faixa linear do método, traduzindo o grau de concordância entre os resultados na **Tabela 12**.

Tabela 12: Valores de recuperação nas três concentrações avaliadas de Mf e Ng.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)	
	Cloridrato de Metformina	Nateglinida
80	100.5	99.8
100	101.2	99.5
120	100.9	100.3

5.2.1.6. Robustez

O parâmetro de robustez foi avaliado no desenvolvimento do método, onde foram modificados deliberadamente alguns parâmetros eletroforéticos e não foram observadas diferenças significativas nas respostas analíticas de Mf e Ng.

Tabela 13: Resultados obtidos na robustez

Metformina					
Condições	Nível	TR (min)	DPR (%)	FR	Recuperação FR (%)
CMN	NA	3.7	0.1	1.0033	NA
Concentração do eletrólito					
23 mM	-2	3.7	0.1	1.0020	100
27 mM	+2	3.7	0.1	1.0036	100
Voltagem					
18 V	-2	3.8	0.1	1.0016	100
22 V	+2	3.4	0.1	0.9996	100
Nateglinida					
CMN	NA	7.6	0.1	0.9974	NA
Concentração do eletrólito					
23 mM	-2	7.6	0.1	1.0018	100
27 mM	+2	7.7	0.1	1.0021	100
Voltagem					
18 V	-2	7.6	0.3	1.0019	100
22 V	+2	7.3	0.2	0.9991	100

CMN: Condições do Método Normal; TR: Tempo de Retenção; DPR: Desvio Padrão Relativo; FR: Fator Robustez.

5.3. Método analítico por HPLC (HILIC)

No desenvolvimento analítico do método por HPLC, foi explorado a técnica através da fase estacionária HILIC, pois conforme características físico-químicas, a Mf é um fármaco que não tem retenção significativa em RP-HPLC, pois é muito polar.

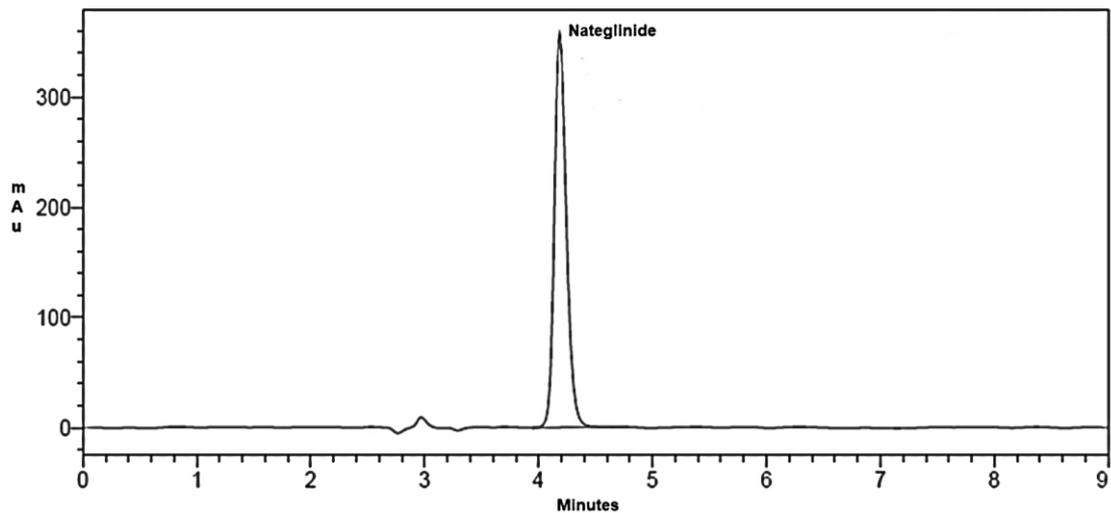


Figura 30: Cromatograma da solução padrão de nateglinida ($20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Condições cromatográficas: coluna Poroshell 120 HILIC (100 mm x 2,1 mm) $2,7 \mu\text{m}$; fase móvel: Acetonitrila e Tampão formiato de amônia (95:5); eluição isocrática, detecção UV em 220 nm, vazão em $0,8 \text{ mL min}^{-1}$.

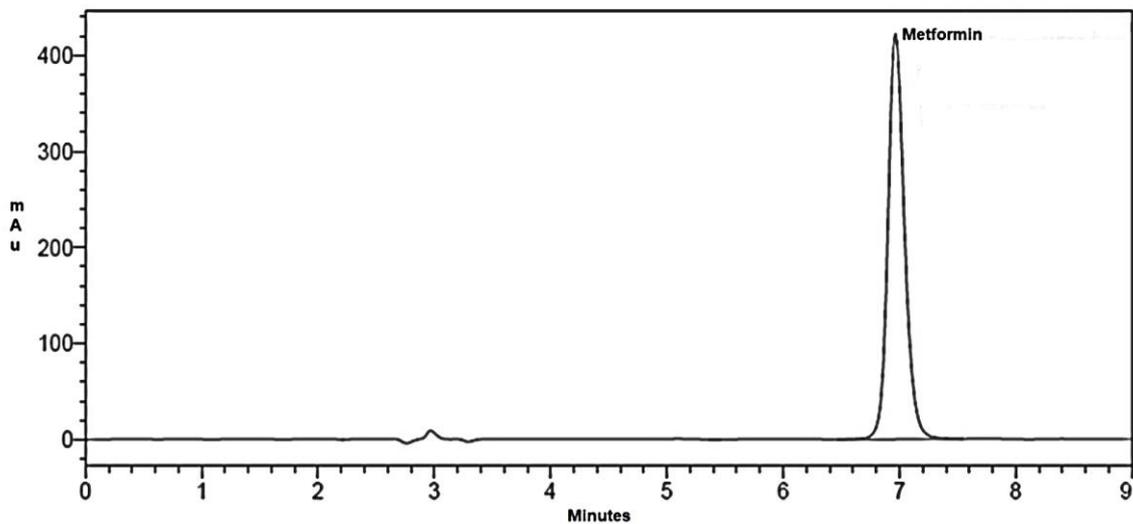


Figura 31: Cromatograma da solução padrão de metformina ($20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Condições cromatográficas: coluna Poroshell 120 HILIC (100 mm x 2,1 mm) $2,7 \mu\text{m}$; fase móvel: Acetonitrila e Tampão formiato de amônia (95:5); eluição isocrática, detecção UV em 220 nm, vazão em $0,8 \text{ mL min}^{-1}$.

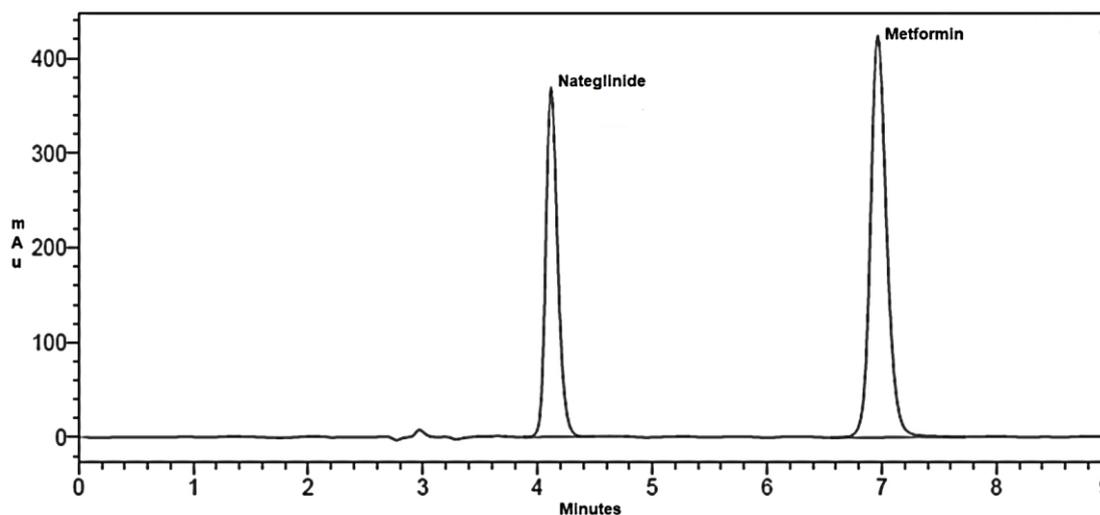


Figura 32: Cromatograma da solução padrão de nateglinida e metformina ($20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ cada). Condições cromatográficas: coluna Poroshell 120 HILIC (100 mm x 2,1 mm) $2,7 \mu\text{m}$; fase móvel: Acetonitrila e Tampão formiato de amônia (95:5); eluição isocrática, detecção UV em 220 nm, vazão em $0,8 \text{ mL min}^{-1}$.

5.3.1. Validação do método analítico por CE

5.3.1.1. Seletividade

A seletividade do método foi realizada através da degradação forçada das substâncias em condições descritas na literatura, como a hidrólise ácida, hidrólise básica e oxidação.

5.3.1.2. Linearidade

Foi avaliada a faixa de trabalho entre 16 e $24 \mu\text{g.mL}^{-1}$ dos fármacos em questão. Os resultados dos estudos de linearidade de Mf está demonstrado na **Tabela 14** e de Ng está demonstrado na **Tabela 15**.

Tabela 14: concentrações das soluções de Mf e respectivas áreas para a construção da curva analítica do método por HPLC HILIC.

Solução	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Média das áreas
1	80	538295
2	90	543612
3	100	549119
4	110	554580
5	120	560108

Tabela 15: concentrações das soluções de Ng e respectivas áreas para a construção da curva de calibração do método por HPLC HILIC.

Solução	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Média das áreas
1	80	279298
2	90	282184
3	100	285548
4	110	287499
5	120	291210

As curvas analíticas com os dados de Mf e Ng estão demonstrados, respectivamente, a seguir na **Figura 34 e 35** e **Tabela 16**.

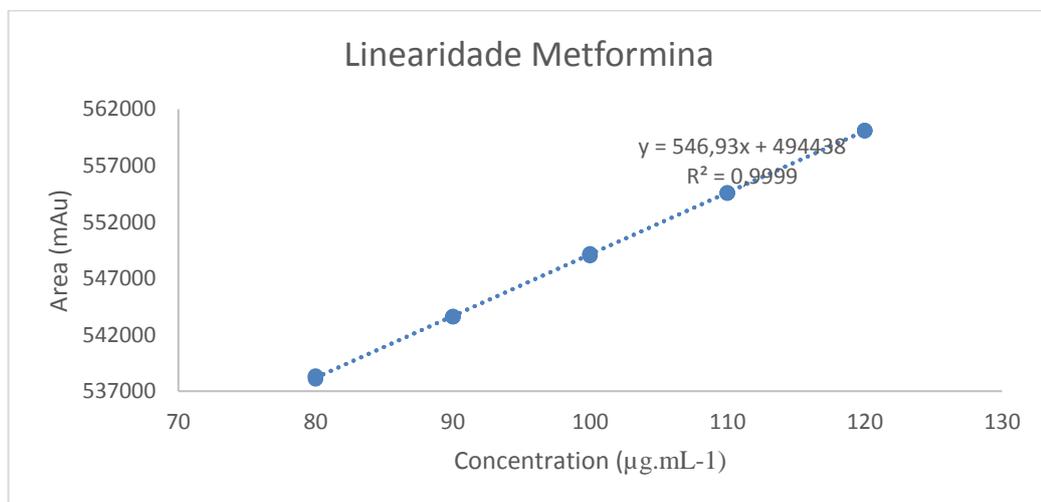


Figura 33: Curva analítica da Mf.

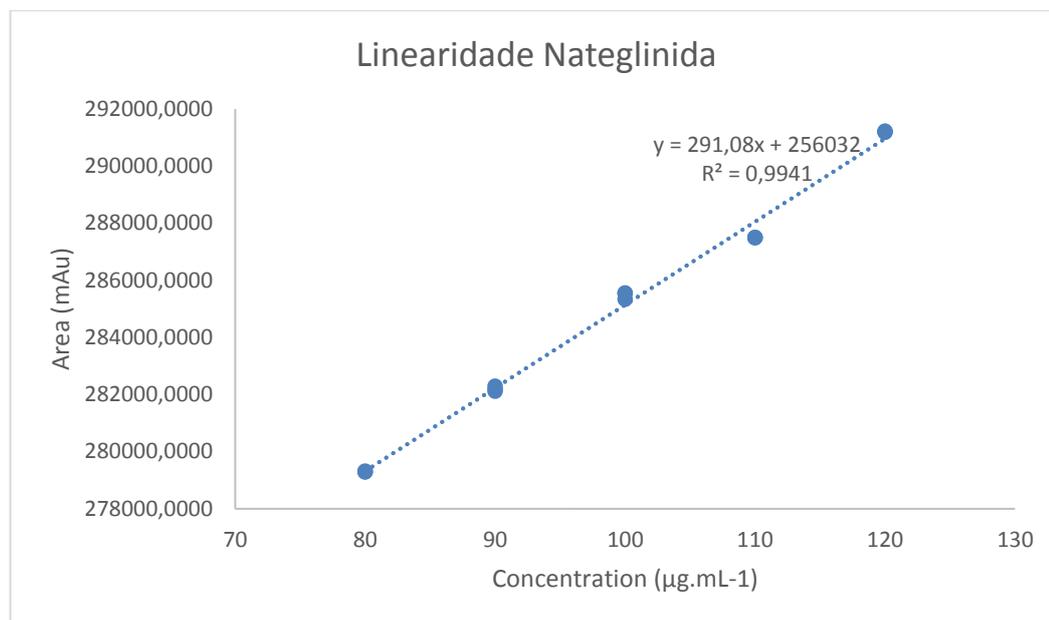


Figura 34: Curva analítica da Ng.

Tabela 16: resultados da curva analítica obtidos para a análise de Mf e Ng.

Parâmetros da curva analítica	Cloridrato de Metformina	Nateglinida
Coefficiente de correlação (r)	0,9999	0,9941
Equação da reta ($y = ax + b$)	$y = 546,93x + 494438$	$y = 291,08x + 256032$
Desvio Padrão Relativo (DPR %)	0,35	0,41
Faixa de concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	80 a 120	80 a 120

Os coeficientes de correlação foram maiores a 0,990 demonstrando haver uma correlação entre concentração e área dos fármacos de interesse. A linearidade realizada para este método cumpriu com os requisitos requeridos pelos compêndios oficiais para ambas as substâncias.

5.3.1.3. Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção e o limite de quantificação de Mf e Ng estão representados na **Tabela 17**.

Tabela 17: resultados do limite de detecção e limite de quantificação de Mf e Ng.

	Metformin	Nateglinide
LOD ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0.010	0.026
LOQ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0.033	0.086

5.3.1.4. Precisão repetibilidade e intermediária

Na **Tabela 18** representa os resultados obtidos da repetibilidade e precisão intermediária do método analítico por HPLC HILIC. Observa-se que nos resultados obtidos, calculou-se o %DPR das substâncias em questão e o resultado foi menor que 5%, portanto a precisão das amostras injetadas foi considerada satisfatória conforme critérios de aceitação.

Tabela 18: Resultados obtidos nas determinações da repetibilidade e precisão intermediária do método por HPLC HILIC de Mf e Ng.

	Cloridrato de Metformina	Nateglinida
Repetibilidade (%DPR)	0,032	0,038
Precisão intermediária (%DPR)	0,023	0,021

5.3.1.5. Exatidão

A exatidão foi realizada com o preparo de amostras com uma concentração baixa, média e alta (80%, 100% e 120%) em triplicata, onde foram determinadas no equipamento de HPLC e dentro da faixa linear do método, traduzindo o grau de concordância entre os resultados na **Tabela 19**.

Tabela 19: Valores de recuperação nas três concentrações avaliadas de Mf e Ng.

Concentração (µg/mL)	Recuperação (%)	
	Cloridrato de Metformina	Nateglinida
80	100,3	99,0
100	100,1	100,0
120	100,4	99,8

5.3.1.6. Robustez

O parâmetro de robustez foi avaliado no desenvolvimento do método, onde foram modificados deliberadamente alguns parâmetros cromatográficos e não foram observadas diferenças significativas nas respostas analíticas de Mf e Ng.

5.4. Comparação entre as técnicas analíticas CE e HPLC

Tabela 20: Comparação de resultados entre as técnicas de MELC e CE para determinação quantitativa da metformina associada a nateglinida.

Parâmetros	Metformina		Nateglinida	
	MELC	CE	MELC	CE
Média (%) n=6	99,4	99,8	99,9	99,4
DPR (%)	0,54	0,87	0,83	0,43
Teste F	0,33		0,18	
Teste t	0,35		0,24	

Tabela 21: Comparação de resultados entre as técnicas de HPLC HILIC e CE para determinação quantitativa da metformina associada a nateglinida.

Parâmetros	Metformina		Nateglinida	
	HPLC HILIC	CE	HPLC HILIC	CE
Média (%) n=6	99,6	99,8	100,6	99,4
DPR (%)	0,64	0,87	0,62	0,43
Teste F	0,53		0,45	
Teste t	0,64		0,00	

Pela comparação estatística utilizando os testes F (Fischer – Snedecor) ($F_{\text{encontrado}} < F_{\text{crítico}}$) e t Student's ($t_{\text{encontrado}} < t_{\text{crítico}}$) demonstrou que não há diferenças significativas entre os métodos proposto nas técnicas de MELC, CE e HILIC.

6. **CONCLUSÃO**

Analisando todos os dados apresentados neste projeto, como os cromatogramas, eletroferogramas e todas as condições cromatográficas testadas para desenvolver os métodos de HPLC baseado em microemulsão, CE e HPLC HILIC conclui-se que esses métodos estão aptos a ser utilizados para detecção e quantificação de Nateglinida e Cloridrato de Metformina em IFA, não causando nenhuma interferência no resultado dos analitos de interesse.

O método desenvolvido CZE foi capaz de detectar os produtos de degradação da nateglinida e da metformina nas condições ácidas e básicas, sendo que os analitos foram degradados nas condições ácida, básica e hidrólise exigidas pela agência reguladora para validação de métodos analíticos (RDC 166/17).

Observando os resultados estatísticos do desenvolvimento e validação do método por MELC, CE e HPLC HILIC pode-se concluir que os métodos são seletivos, lineares, precisos, exatos e robustos, Mf e Ng foram separados em menos de 10 minutos.

Portanto, os métodos propostos podem ser utilizados como referência no desenvolvimento e validação através das técnicas propostas neste projeto dentro das indústrias farmacêuticas para determinação simultânea de Mf e Ng.

7. REFERÊNCIAS

ABTEMARIAM, SOLOMON. Type-2 diabetes: **Definition, diagnosis and significance**. In: MEDICINAL Foods as Potential Therapies for Type-2 Diabetes and Associated Diseases: The Chemical and Pharmacological Basis of their Action. 1. ed. London, UK: Academic Press, 2019. v. 1, cap. 1, p. 3-10. ISBN 978-0-08-102922-0. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102922-0.00001-8>. Acesso em: 12 abr. 2021.

AUBRY, A.F.; TATTERSALL, P.; RUAN, J. **Development of Stability Indicating methods**, Kim HuynhBa (Ed.) Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development: Regulations, Methodologies, and Best Practices, Springer. NY, 2008, 139151.

BRANCHTEIN, L.; MATOS, M. C. G. **Em Farmacologia Clínica: Fundamentos da Terapêutica Reacional**; Fuchs, F. D.; Wannmacher, L.; Ferreira, M. B., eds.; 3a ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2004, cap. 63

BRASIL. Resolução n. 166, de 24 de julho de 2017. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Diário Oficial da União, Brasília, n.141, 25 jul.2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Caderno de atenção básica: Diabetes mellitus**. 16ª edição, Brasília, 2006.

BRITISH PHARMACOPEIA. **Appendix II A. Infrared Spectrophotometry**. Disponível em:

<http://www.pharmacopoeia.co.uk/bp2012/ixbin/bp.cgi?a=display&r=jxjiju09keZ&n=8&i d=1013&tab=search&all=yes>. Acesso em: 25 maio 2018.

CASARIN, FABIANA; MENDES, CAROLINE ELIZA; LOPES, TONI JEFFERSON; DE MOURA, NEUSA FERNANDES. Planejamento experimental do processo de secagem

da amora-preta (*Rubus* sp.) para a produção de farinha enriquecida com compostos bioativos. **Brazilian Journal of Food Technology**, [s. l.], v. 19, 2016.

CHENG, C. L.; CHOU, C. H. J. **Chromatogr. B** 762, 2001. p. 51–58.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 6. Ed. Campinas: UNICAMP, 1995. 279p.

FERREIRA, V. A.; CAMPOS, S. M. B. **Avanços farmacológicos no tratamento do diabetes tipo 2**. Disponível em: http://www.mastereditora.com.br/periodico/20141101_221529.pdf. Acesso em: 05 abril 2018.

GIKA, HELEN G.; THEODORIDIS, GEORGIOS A.; PLUMB, ROBERT S. Current practice of liquid chromatography-mass spectrometry in metabolomics and metabonomics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 87, p. 12-25, 2014.

GODONE, R. L.N.; LEITÃO, G. M.; ARAÚJO, N. B.; CASTELLETTI, C. H.M.; LIMA-FILHO, J. L.; MARTINS, D. B.G. **Clinical and molecular aspects of breast cancer: Targets and therapies**. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 106, p. 14-34, 2018.

GOODMAN & GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12 Ed. Editora McGrawHill, 2012.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental**. 6. Ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. 836p.

HU, S.; WANG, B. E.; DUNNING, J. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. Vol. 291, 1998. p. 1372.

ICH. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for human use: **Guideline on Validation of Analytical Procedures Q2 (R1)**, Text and methodology. 2005.

JAVIDFAR, SHAHRZAD; PILEHVAR-SOLTANAHMADI, YOUNES; FARAJZADEH, RAANA; LOTFI-ATTARI, JAVID; SHAFIEI-IRANNEJAD, VAHID; HASHEMI, MEHRDAD; ZARGHAMI, NOSRATOLLAH. **The inhibitory effects of nano-encapsulated metformin on growth and hTERT expression in breast cancer cells.** Journal of Drug Delivery Science and Technology, [s. l.], v. 43, p. 19-26, 2018.

KIM, Y.; BABU, A. R. **Clinical potential of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors in the management of type 2 diabetes.** Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy. 2012. p. 313–327.

LATROUS EL ATRACHE, LATIFA; BEN SGHAIER, RAFIKA; BEJAOUI KEFI, BOCHRA; HALDYS, VIOLETTE; DACHRAOUI, MOHAMED; TORTAJADA, JEANINE. **Factorial design optimization of experimental variables in preconcentration of carbamates pesticides in water samples using solid phase extraction and liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry determination.** Talanta, [s. l.], v. 117, p. 392-398, 2013.

LAVRA, Z M M; SONEGO, F; DA SILVA, R M F. **Development and validation of an analytical method for Nystatin vaginal cream by high performance liquid chromatography.** Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, [s. l.], v. 44, ed. 4, p. 637-643, 2008.

MIRANDA, C.E.S.; CARRILHO, E.; GERVASIO, A.P.; GINÉ, M.F. **Sistemas Interfaceados de análise por injeção em fluxo e eletroforese capilar (FIA-CE): desafios, aplicações e perspectivas.** Química Nova, São Paulo, vol. 25, nº3. 2002.

NICOLÓSI, M. **Validação de métodos analíticos.** Controle de Contaminação. 2003. p. 12-21.

PINTO, T. J. A.; FERRARINI, M.; GATTI, R. M. **Proposta de roteiro prático para a validação de métodos analíticos.** Farmácia & Química. 2003. p. 26-36.

POWERS, A. C.; DÀLESSIO, D. **Pâncreas endócrino e farmacologia do diabetes mellitus e da glicemia.** In: Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 12^a ed. Porto Alegre: AMGH, 2012.

PRADO, M. S.A. **Determinação de fármacos em formulações farmacêuticas empregando a eletroforese capilar como alternativa à cromatografia líquida de alta eficiência.** São Paulo, 2002. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

PROKHOROVA, A. F.; SHAPOVALOVA, E. N.; SHPIGUN, O. A. **Chiral analysis of pharmaceuticals by capillary electrophoresis using antibiotics as chiral selectors.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2010. p. 1170-1179.

SALAS, MARIBEL; WARD, ALEXANDRA; CARO, JAIME. **Health and economic effects of adding nateglinide to metformin to achieve dual control of glycosylated hemoglobin and postprandial glucose levels in a model of type 2 diabetes mellitus.** Clinical Therapeutics, [s. l.], v. 24, p. 1690-1705, 2002.

SÀIZ, JORGE; KOENKA, ISRAEL JOEL; MAI, THANH DUC; HAUSER, PETER C.; GARCÍA-RUIZ, CARMEN. **Simultaneous separation of cations and anions in capillary electrophoresis.** TrAC - Trends in Analytical Chemistry, [s. l.], v. 62, p. 162-172, 2014.

SANKALIA, J. M., SANKALIA, M. G., SUTARIYA, V. B., MASHRU, R. C. **Nateglinide quantification in rabbit plasma by HPLC: Optimazationm and application to pharmacokinetic study.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.44, p.193-204, 2007.

SANTOS, M.R.; TAVARES, M.F.M.; RUBIM, J.C. **Implementação de um sistema de eletroforese capilar com detecção de fluorescência induzida por laser.** Química Nova, São Paulo, vol. 23 nº5. 2000.

SHAODONG, JIA; LEE, WON JUN; EE, JI WON; PARK, JEONG HILL; KWON, SUNG WON; LEE, JEONGMI. **Comparison of ultraviolet detection, evaporative light scattering detection and charged aerosol detection methods for liquid-chromatographic determination of anti-diabetic drugs.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, [s. l.], v. 51, ed. 4, p. 973-978, 2010.

SMELA, M. J. **Regulatory considerations for stability indicating analytical methods in drug substance and drug product testing.** Disponível em: www.americanpharmaceuticalreview.com. Acesso em: 31 maio 2018.

SPUDEIT, DANIEL ALFONSO; DOLZAN, MARESSA DANIELLI; MICKE, GUSTAVO AMADEU. **Eletroforese Capilar: uma breve introdução.** Scientia Chromatographica, [s. l.], v. 4, ed. 4, p. 287-297, 2012.