

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

**Jéssica Edneuzza Bueno Lopes**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DOSEAMENTO DE  
GLICLAZIDA UTILIZANDO A TÉCNICA DE RMN<sub>q</sub>-<sup>1</sup>H.**

**Diamantina**

**2020**



**Jéssica Edneuzza Bueno Lopes**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DOSEAMENTO DE  
GLICLAZIDA UTILIZANDO A TÉCNICA DE RMNq-<sup>1</sup>H.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo de Jesus Oliveira

**Diamantina**

**2020**

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

L864d      Lopes, Jéssica Edneuzo Bueno  
Desenvolvimento e validação de método para doseamento de  
gliclazida utilizando a técnica de RMNq1H / Jéssica Edneuzo Bueno  
Lopes, 2020.  
84 p.: il.

Orientador: Eduardo de Jesus Oliveira

Dissertação (Mestrado– Programa de Pós Graduação em Ciências  
Farmacêuticas) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e  
Mucuri, Diamantina, 2020.

1. RMNQ-1H. 2. Gliclazida. 3. Controle de qualidade. 4.  
Medicamentos. 5. Teor. I. Oliveira, Eduardo de Jesus. II. Título. III.  
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

**CDD 615**

Ficha Catalográfica – Sistema de Bibliotecas/UFVJM  
Bibliotecária: Viviane Pedrosa – CRB6/2641]

**Jéssica Edneuzza Bueno Lopes**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DOSEAMENTO DE  
GLICLAZIDA UTILIZANDO A TÉCNICA DE RMNq-1H.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo de Jesus Oliveira

Data de aprovação 03/11/2020

---

Prof. Dr. Eduardo de Jesus Oliveira

UFVJM

---

Prof. Dr. Sandro Luiz Barbosa dos Santos

UFVJM

---

Prof. Dr. Kristerson Reinaldo de Luna Freire

UFPB

Diamantina

2020





**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO**  
**JEQUITINHONHA E MUCURI**

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**JÉSSICA EDNEUZA BUENO LOPES**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE**  
**MÉTODO PARA DOSEAMENTO DE**  
**GLICLAZIDA UTILIZANDO A TÉCNICA DE**  
**RMNq-1H.**

Dissertação apresentada ao MESTRADO  
EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS,  
nível de MESTRADO como parte  
dos requisitos para obtenção do  
título de MESTRA EM  
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Orientador: Prof. Dr. Eduardo de Jesus Oliveira

Data de aprovação 03/11/2020.

Prof.Dr. EDUARDO DE JESUS OLIVEIRA - UFVJM

Prof.Dr. SANDRO LUIZ BARBOSA DOS SANTOS – UFVJM

Prof.Dr. KRISTERSON REINALDO DE LUNA FREIRE - UFPB

DIAMANTINA  
2020



Documento assinado eletronicamente por **Sandro Luiz Barbosa dos Santos, Servidor**, em 03/11/2020, às 20:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#). \_\_\_\_\_



Documento assinado eletronicamente por **Kristerson Reinaldo de Luna Freire, Usuário Externo**, em 27/11/2020, às 08:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo de Jesus Oliveira, Servidor**, em 07/12/2020, às 21:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#). \_\_\_\_\_



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufvjm.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufvjm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0206936** e o código CRC **3F041574**.

*Aos meus pais,  
Bequinha e Tinha,  
que sempre priorizaram a minha educação.*



## AGRADECIMENTOS

“Porque escrever dói, arranca pedaços e deixa marcas profundas no coração. Muitas vezes o escritor desce até o inferno para que o leitor suba ao céu e leia sua dor como se fosse dor alheia. É a magia das palavras. Escrever é sangrar um pouco todo dia na presença de testemunhas que assistem a tudo, mas não podem fazer nada. E de tão trágicos, os poetas, mergulham em poças de letras, feito quem se afoga no fundo do mar. É quando o poema prende a respiração para que outras pessoas possam respirar.”

Sergio Vaz

Parei para refletir quanta coisa aconteceu em dois anos e me lembro exatamente do momento em que decidi trilhar o caminho do mundo acadêmico ao ingressar no mestrado. Hoje percebo que não é nada do que eu achava que seria. 2020, que ano louco, o mundo está completamente de cabeça pra baixo. Contudo, só tenho a agradecer por essa escolha, por ter aprendido tanto em um espaço de tempo tão curto. Às vezes tudo se resumiu em preocupação, medo e tristeza. O desespero bateu na minha porta inúmeras vezes, e as lágrimas também. Mas aprendi que somos e vivemos fragmentos de tristeza e felicidade e que o caminho é feito passo a passo, se recriando a todo o momento. Esquisito pensar que a pesquisa é lotada de erros com pitadas de acertos. Sair da zona de conforto é cansativo, mas foi isso que eu decidi fazer. E eu superei tudo, desbravei esse caminhar, mas não conseguiria chegar até aqui sozinha.

Sou grata a Deus, meu Amado Maestro, por essa grande orquestra sinfônica chamada de vida. Aos meus mentores espirituais pelo amor, dedicação e proteção. Por todas as mensagens e intuições.

Aos meus pais e minha família por essa base sólida. Por todo o incentivo apesar das dificuldades. Obrigada por acreditarem em mim. Obrigada por me proporcionarem o título de primeira mestra da família. Essa conquista é nossa.

Ao meu orientador professor Eduardo de Jesus Oliveira por ter aceitado me orientar em meio a tantas limitações. Sou grata por toda confiança, paciência e ensinamentos. Obrigada por não medir esforços para me ajudar sempre que precisei e por levar a sério meu pedido de socorro no balcão de uma drogaria.

Aos colegas do LASEB por terem me acolhido no laboratório. De forma especial, agradeço ao Kelton por toda contribuição durante o desenvolvimento do meu trabalho. Obrigada por me aturar durante meses afinco, obrigada pelos momentos de descontração. Com certeza nossa sintonia de trabalho tornou tudo mais fácil.

À Diego, meu melhor amigo, meu parceiro, meu confidente, meu amor. As palavras são superficiais quando se trata de nós, pois quando duas almas compartilham um vínculo tão forte, não há quem habite no universo que consiga descrever. Obrigada por me transformar, me encorajar e me auxiliar a dar um sentido em tudo na vida. Que seja assim pra sempre, nós dois nesse mundão! Aos amigos: Anna Tereza, obrigada pela nossa verdade, reciprocidade e conexão. Independente da distancia física, nossos corações estão sempre juntinhos. Elielton,

obrigada por se preocupar com minha felicidade como se fosse a sua e por estar sempre comigo, me ouvindo durante meus momentos de desespero. Mariana, obrigada por tanta lealdade e por esse coração tão lindo. Você é luz e inspiração. Lucas Rocha e João Paulo Falci, obrigada por estarem sempre dispostos a me ajudar chegar ao campus II. As caronas foram indispensáveis no meu processo. Obrigada também pela amizade saudável, baseada em amor, carinho e respeito. Em meio a tantas coisas boas que meu relacionamento com Diego me trouxe, está o companheirismo de vocês. Eu não tenho muitos amigos, mas agradeço profundamente a todos que participaram dos meus inúmeros momentos de felicidade durante essa caminhada. Amizade é saber interpretar olhares, entender silêncios, perdoar erros, guardar segredos, ouvir dramas e compartilhar força. E vocês são tudo isso. Não posso deixar de agradecer à Dhara. Essa que não veio até mim por acaso. Ela me escolheu pra me ajudar a cumprir minha missão espiritual e se tornou meu anjo de quatro patas. Sempre me ajudou a transformar a energia de um dia ruim, e me fez esquecer os problemas várias vezes através de suas lambidas. É o símbolo de lealdade, fidelidade e amor. Adotar um animal pode não mudar o mundo, mas com certeza mudará o mundo de quem o adotou.

À UFVJM e funcionários. É com muita gratidão que digo que participei do processo de crescimento dessa universidade e vi de perto o aumento da produção científica, mesmo com ataques veementes à imagem da universidade pública do Brasil e descontinuidade nos financiamentos para a pesquisa. Eu tenho orgulho em ser UFVJM.

Enfim, me despeço concluindo que aprendi que o meu poder está aqui comigo agora, amanhã não sei, mas confio que o necessário irá acontecer. No fim das contas, tudo isso é um piscar de olhos diante da imensidão da existência.

## RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento e a validação de um método analítico para a determinação da gliclazida, empregando a técnica de Ressonância Magnética Nuclear quantitativa de hidrogênio (RMNq-<sup>1</sup>H), uma técnica que apresenta como grandes vantagens a rapidez de análise e uso de padrões internos de fácil aquisição, baratos, e com identidade diversa à do analito de interesse. Para as análises de RMNq-<sup>1</sup>H foi utilizado um espectrômetro Bruker Fourier de 300MHz. Para validação do método, foi utilizada a substância química de referência da gliclazida. O tereftalato de dimetila (DMT) foi usado como padrão interno e o solvente escolhido foi o clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>). As amostras alopáticas analisadas consistiram de comprimidos de gliclazida 30mg de liberação prolongada obtidos no comércio local de Diamantina – MG. Foram utilizados seis lotes diferentes para preparação das amostras. Três alíquotas de cada amostra foram utilizadas para quantificação por RMNq-<sup>1</sup>H. Os sinais em  $\delta$  8,1 ppm e  $\delta$  7,9 ppm foram utilizados para quantificação do DMT e da GLZ respectivamente. Dos resultados obtidos em RMNq-<sup>1</sup>H apenas um lote apresentou resultados de acordo com as especificações de 90 – 110% do valor esperado. Três alíquotas das mesmas amostras utilizadas em RMNq-<sup>1</sup>H foram destinadas a confirmação do resultado por CLAE para validação cruzada dos dois métodos. Nenhum lote mostrou-se dentro dos limites estabelecidos. Os dados da análise estatística mostraram que não houve diferença significativa entre os resultados obtidos pelas duas técnicas a um nível de significância de 95%, porém os diferentes valores encontrados nas duas técnicas sugerem uma diferença na eficiência do processo de extração utilizado nos dois métodos, ou uma falta de uniformidade no pó dos comprimidos. Talvez esta hipótese de baixa uniformidade dos pós poderá ser confirmada com a análise de um maior número de alíquotas das amostras, o que deverá levar a uma menor dispersão entre os resultados. A metodologia de RMNq-<sup>1</sup>H desenvolvida para a determinação da gliclazida em comprimidos se mostrou sensível, seletiva, linear, com boa precisão, exatidão e robustez quando analisado os parâmetros de validação do método. Entretanto, para maior exatidão na quantificação do analito, e confirmação dos desvios de qualidade aqui relatados, um número maior de amostras deve ser analisado.

Palavras-chave: RMNq-<sup>1</sup>H; Gliclazida; Controle de Qualidade; Medicamentos; Teor.



## ABSTRACT

This technique presents advantages such as speed of analysis and use of easily found and inexpensive commercial internal standards that do not need to have the same chemical identity as the analyte of interest. For NMR analyses we used a Bruker Fourier spectrometer (300MHz). For method validation we used gliclazide pharmacopeial reference standard. Dimethyl terephthalate (DMT) was used as internal standard and the solvent was deuterated chloroform ( $\text{CDCl}_3$ ). The samples were gliclazide extended release tablets (30mg) purchased in the local commerce (Diamantina, MG). We used six different commercial batches for sample preparation. Three aliquots from each sample were used for  $^1\text{H}$ -qNMR quantification. The signals at  $\delta$  8.1 ppm and  $\delta$  7.9 ppm were used for the quantification of DMT and GLZ respectively. From the results obtained using the  $^1\text{H}$ -qNMR method, just one commercial batch had results within pharmacopeial standards (90 – 110% of labelled value). Three aliquots of the same samples analysed by  $^1\text{H}$ -qNMR were assayed by HPLC for cross validation. The results of the HPLC assay showed that none of the commercial batches were within pharmacopeial specifications. Statistical analysis showed that there was no significant difference between the results obtained by the two methods within a 95% significance level. However, the different results of individual analyses from the methods may indicate important differences in the yield of the extraction methods used for sample preparation or lack of powder homogeneity during sample preparation. This hypothesis of lack of uniformity can be ruled out by analysing a larger number of samples which will tend to give smaller standard deviations. The  $^1\text{H}$ -qNMR method that was developed was shown to be sensitive, selective, linear and rugged according to validation data. However, a larger number of samples will need to be analysed in order to confirm the quality issues pointed out in this study.

Keywords:  $^1\text{H}$ -qNMR; Gliclazide; Quality Control; Medicines; Assay.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2 - Estrutura molecular da GLZ.....	10
Figura 3 - Representação gráfica da curva analítica e da equação da reta da GLZ obtida pelo método espectrofotométrico na região UV. ....	12
Figura 4 - Representação gráfica da comparação dos métodos espectrofotométricos no UV e CLAE quanto aos valores mínimos e máximos obtidos.....	12
Figura 5 - Gráficos demonstrando os resultados obtidos da GLZ 250 uM em várias taxas de varredura por LSVs de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> /MWCNT/GCE. Os números de 1 a 8 correspondem a 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200 e 400 mVs. ....	14
Figura 6 - Esquema de um sistema de CLAE.....	18
Figura 7 - Momento magnético de um núcleo atômico.....	20
Figura 8 - Estados de spin nuclear. ....	21
Figura 9 - Modelo vetorial de Bloch. ....	22
Figura 10 - Frequência de precessão de Larmor. ....	22
Figura 11 - Gráfico do Número de publicações em que se encontra "quantitativo" e "rmn" no título obtidas por uma pesquisa no PORTAL CAPES em setembro de 2020 .....	27
Figura 12 - Fluxograma para determinação de GLZ nos métodos desenvolvidos.....	43
Figura 13 - Cromatograma inicial da amostra do pó dos comprimidos de GLZ a 100 ug/mL obtido com as condições cromatográficas descritas do método farmacopeico (2005). ....	48
Figura 14 - Cromatograma da amostra do pó de comprimido da GLZ em 100 µg/ml, eluído com fase móvel água acidificada: acetonitrila (40:60, v/v). ....	49
Figura 15 - Curvas de calibração obtidas a partir dos testes de linearidade por CLAE, utilizando uma faixa de concentração de 20 a 100 ug/mL de GLZ. A) Dia 1. B) Dia 2. C) Dia 3.....	51
Figura 16 - Sobreposição de espectros por RMN. A) Padrão interno (DMT). B) Padrão de referência (GLZ). C) Solução mista. ....	54
Figura 17 - Espectro de RMN para GLZ comprimidos.....	56
Figura 18 - Representação esquemática da sequência de pulsos de inversão recuperação. ....	57
Figura 19 - Molécula de GLZ assinalada com o H que gerou o tempo de relaxamento mais longo em RMN. ....	57
Figura 20 - Sinais analíticos usados para quantificação do DMT e da GLZ obtidos por RMNq- <sup>1</sup> H na faixa de linearidade de 0,5 a 8 mg/ml. ....	59
Figura 21 - Parâmetros e suas variações avaliadas no teste de robustez por RMNq- <sup>1</sup> H utilizando uma amostra de GLZ de 5 mg/ml.....	64
Figura 22 - Espectro de RMNq- <sup>1</sup> H adquirido para quantificação do pó dos comprimidos de GLZ de amostras comerciais, assinalando os sinais usados para quantificação. ....	66
Figura 23 - Cromatograma adquirido da análise de um lote comercial de comprimidos de GLZ a 100 ug/ml. ....	68
Figura 24 - Análise estatística da comparação entre os métodos por CLAE-DAD e RMNq- <sup>1</sup> H na quantificação das amostras comerciais de comprimidos de GLZ em seis lotes diferentes. ....	69
Figura 25 - Sinais da avermectina e do padrão interno em espectro de RMN.....	71



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Amostras selecionadas para análises dos comprimidos de GLZ. ....	31
Tabela 2 - Preparação das amostras para teste de linearidade. ....	39
Tabela 3 - Preparação de amostras para o teste de exatidão. ....	41
Tabela 4 - Parâmetros avaliados no teste de robustez. ....	42
Tabela 5 - Peso médio dos comprimidos de GLZ. ....	44
Tabela 6 - Concentração nominal de GLZ nas amostras destinadas à quantificação. ....	45
Tabela 7 - Resultados do teste de linearidade do método por CLAE, em três dias consecutivos, utilizando uma faixa de concentração de 20 a 100 ug/mL de GLZ (n=3). ....	50
Tabela 8 - Valores de exatidão e precisão para os testes realizados em três dias consecutivos (número de replicatas por dia=5), utilizando as concentrações nominais de 20, 40 e 80 ug/mL de GLZ. ....	51
Tabela 9 - Valores de deslocamento químicos (ppm) de todos os prótons da GLZ apresentados no espectro de RMNq- <sup>1</sup> H. ....	55
Tabela 10 - Teste de linearidade por RMNq- <sup>1</sup> H na faixa de concentração de 0,5 a 8 mg/ml de GLZ. ....	59
Tabela 11 - Resultados do teste de precisão por RMNq- <sup>1</sup> H utilizando uma amostra com concentração de 5 mg/ml de GLZ. ....	61
Tabela 12 - Resultados do teste de exatidão por RMNq- <sup>1</sup> H utilizando amostras de 2, 5 e 8 mg/ml de GLZ. ....	62
Tabela 13 - Teor médio de GLZ obtida pela quantificação de seis lotes comerciais por RMNq- <sup>1</sup> H. ....	65
Tabela 14 - Teor médio de GLZ em seis lotes de amostras comerciais de comprimidos quantificados por CLAE-DAD. ....	67
Tabela 15 - Teor médio de GLZ nos lotes analisados por diferentes técnicas. ....	70



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\delta$  - Deslocamento químico

2D - Duas dimensões

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AQ - Tempo de aquisição

$B_0$  - Campo magnético externo

$CDCl_3$  - Clorofórmio deuterado

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLP - Fosfato de clindamicina

Conc. - Concentração

CV - Coeficiente de Variação

D1 - Tempo de espera entre cada aquisição

D7 - Valores do delay

DAD – Detector de Arranjos de Fotodiodos

DPR - Desvio padrão relativo

DMT - Tereftalato de dimetila

FDA - *Food and Drug Administration*

FID - *Free Induction Decay*

FT - Transformada de Fourier

FTIR - Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

GCE - Eletrodo de carbono vítreo

GLZ - gliclazida

HPLC - High performance liquid chromatography

I - número quântico de spin

INCQS - Instituto nacional de controle de qualidade em saúde

IR - Infravermelho

Istd - Integral do padrão interno

Ix - Integral do analito

LC/MS - Cromatografia Líquida acoplada a Espectroscopia de Massas

LC/UV - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector UV

LSVs - Voltametrias de varredura linear

M - Magnetização

$M_0$  - Magnetização macroscópica de equilíbrio

MHz – Mega hertz

Min. - Minuto

MWCNT - nanotubos de carbono de paredes múltiplas

$M_z$  - Magnetização macroscópica

NIR - Espectrofotometria de Infravermelho próximo

NMR - Nuclear Magnetic Resonance

NS - número de aquisições

OMS - Organização Mundial da Saúde

OSCS - Sulfato de Condroitina Supersulfatado

P - Momento angular

P1 - Duração do pulso

ppm - Partes por milhão

$r^2$  - coeficiente de correlação

RDC - Resolução de Diretoria Colegiada

RF - Radiofrequência

RMN - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

RMNq – Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear Quantitativa

RMNq-<sup>1</sup>H - Ressonância Magnética Nuclear Quantitativa de Hidrogênio

S/N - sinal-ruído

SQR - Substância Química de Referência

SUR-2A - Receptores de sulfoniluréias

SUS - Sistema Único de Saúde

SW - Janela Espectral

T1 - Tempo de relaxamento

TD - Domínio de tempo

TMS - Tetrametilsilano

UFVJM - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

USP - Universidade de São Paulo

UV - Espectrofotometria no Ultravioleta

$\nu$  - Frequência

$\alpha$  - Função de onda de spin nuclear para o estado  $m_I = +1/2$  de um núcleo de spin  $1/2$

$\beta$  - Função de onda de spin nuclear para o estado  $m_I = -1/2$  de um núcleo de spin  $1/2$

$\gamma$  - Razão magnetogênica

M - Momento magnético nuclear

$\tau$  - Tempo entre pulsos de radiofrequência



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	1
2 OBJETIVOS .....	5
2.1 Objetivo Geral.....	5
2.2 Objetivos específicos.....	5
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	7
3.1 Controle de qualidade.....	7
3.2 Validação de métodos analíticos.....	9
3.3 Gliclazida.....	10
3.3.1 Métodos para quantificação da GLZ.....	11
3.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	16
3.4.1 Fundamentos .....	17
3.5 Ressonância Magnética Nuclear Quantitativa (RMNq- <sup>1</sup> H) .....	18
3.5.1 História. ....	18
3.5.2 Fundamentos da RMN.....	19
3.5.3 Fundamentos da RMNq- <sup>1</sup> H .....	25
3.5.4 Aplicações da RMNq- <sup>1</sup> H.....	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1 Amostras de GLZ.....	31
4.2 Equipamentos.....	31
4.3 Reagentes e Solventes .....	33
4.4 Padrões .....	33
4.5 Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo diodos (CLAE/DAD) ..	33
4.5.1 Desenvolvimento do método .....	33
4.5.2 Validação do método.....	34
4.6 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear quantitativa de hidrogênio (RMN-q- <sup>1</sup> H).....	36
4.6.1 Desenvolvimento do método .....	36
4.6.2 Validação do método.....	37
4.7 Quantificação .....	43

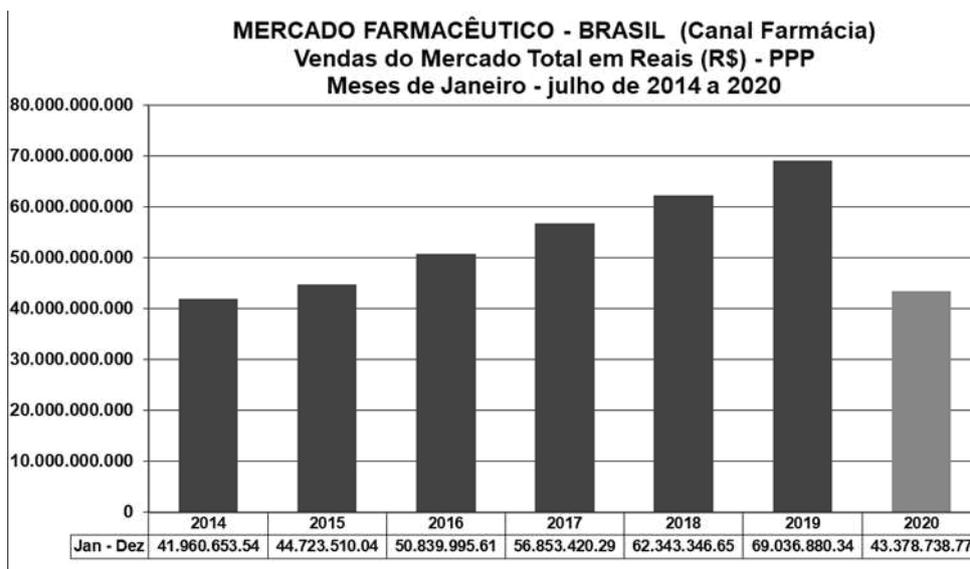
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	47
5.1 CLAE-DAD .....	47
5.1.1 Desenvolvimento do método .....	47
5.1.2 Validação do método .....	49
5.2 RMNq- <sup>1</sup> H.....	52
5.2.1 Desenvolvimento do método .....	52
5.2.2 Tempo de relaxamento .....	56
5.2.3 Validação do método por RMNq- <sup>1</sup> H.....	58
5.3 Quantificação das amostras comerciais e comparação entre a determinação de teor realizada pelo método oficial (CLAE) e o método proposto (RMNq <sup>1</sup> H) .....	64
6 CONCLUSÃO .....	75
7 PERSPECTIVAS .....	75
8 REFERÊNCIAS .....	77

## 1 INTRODUÇÃO

A indústria farmacêutica abrange além da produção de medicamentos, atividades de desenvolvimento, pesquisa, comercialização e distribuição de medicamentos. Esse setor é extremamente importante no sistema financeiro mundial e contribuiu diretamente para a consolidação do mercado globalizado. (KORNIS; BRAGA; PAULA, 2014).

Especialmente, a indústria farmacêutica brasileira vem passando por um significativo período de crescimento e consolidação apresentando, desde 2004, um crescimento médio anual de 10% no faturamento. (FILHO; CAPANEMA, 2007). Segundo o Sindicato da Indústria de Produtos Farmacêuticos no Estado de São Paulo, o mercado farmacêutico vem crescendo exponencialmente, alcançando uma receita total de R\$ 69 bilhões em 2019, como podemos ver na Figura 1. Atualmente, o Brasil ocupa a 6ª posição no ranking global de mercados farmacêuticos, à frente de outros importantes países emergentes como o Canadá, Índia e Rússia. Projeta-se que em 2022 o Brasil alcance a 5ª posição. (SINDUSFARMA, 2018).

Figura 1 - Gráfico de vendas do mercado farmacêutico no Brasil entre 2014 e 2020.



Fonte: Sindusfarma, 2018.

Em um cenário de vários casos de falsificação de medicamentos, foi criada a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) visando proteger e promover a saúde da população brasileira. Esse órgão regulamentador exige eficácia, segurança e qualidade de todos os medicamentos registrados. (ARAÚJO *et al.*, 2010). Diante disso, as indústrias farmacêuticas tem procurado cada vez mais garantir a qualidade dos medicamentos comercializados, pois a legislação obriga a empresas instaladas no país a investirem na adaptação de suas instalações, processos e produtos. (FILHO; CAPANEMA, 2007).

Segundo Linsbinski (2008), a qualidade em medicamentos é uma obrigatoriedade, legal, ética e moral. É dever das empresas garantir a qualidade, segurança e eficácia dos medicamentos em qualquer que seja o setor, industrial ou magistral. (LINSBINSKI; DE MUSIS; MACHADO, 2008). Evidenciado isso, ter o controle de qualidade dentro de uma indústria é extremamente importante para assegurar a credibilidade de seus produtos no mercado, pois através dele temos a garantia de que as determinações impostas pelas ANVISA estão sendo cumpridas. (GALDINO; BETONI, 2014).

Ainda assim, encontramos na literatura estudos que demonstram como diversos medicamentos apresentam desvios de qualidade, oferecendo quantidade de princípio ativo abaixo do declarado na embalagem. Para sanar essa insegurança, são usados testes padronizados e normatizados que se encontram nas farmacopeias. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a farmacopeia contém normas farmacêuticas destinadas a garantir, dentro de uma determinada entidade política, a uniformidade da qualidade, da natureza, da composição e da concentração dos medicamentos aprovados por representantes. Em outras palavras, a farmacopeia é uma coleção de normas para controle de qualidade. Nas farmacopeias existem as monografias dos medicamentos que consistem em informações específicas sobre as propriedades físico-químicas, métodos de identificação, testes de impurezas, quantificações e ensaios para determinação de conteúdo. (HOLZGRABE; MALET-MARTINO, 2011).

Um dos testes mais importantes que deve ser realizado nos produtos finais é a determinação de conteúdo. Esse teste consiste na realização de análises para quantificar o teor de substância ativa em um medicamento. (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Entretanto, nem todas as monografias são atualizadas como deveriam ser e especialmente nos laboratórios brasileiros ainda falta especificações farmacopeicas para diversos fármacos.

Entre essa escassez de monografias na Farmacopeia Brasileira, ainda não se encontra inserida a monografia oficial da Gliclazida.

A gliclazida (GLZ) é uma droga da classe das sulfoniluréias, utilizada como hipoglicemiante oral e indicada no tratamento da Diabetes Mellitus Tipo II. (KUMAR, 2014). Inicialmente, o objetivo deste trabalho seria o de determinar o teor de substâncias de baixo índice terapêutico produzidas em farmácias de manipulação utilizando como técnica a Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear Quantitativa de Hidrogênio (RMNq-<sup>1</sup>H), porém verificou-se que são muito raras as farmácias magistrais que ainda produzem fórmulas com fármacos de baixo índice terapêutico, diante do risco de desvios de qualidade acarretarem sérios efeitos adversos. Diante disso, optou-se por trabalhar com a GLZ 30mg, que é uma droga de interesse nacional e seu padrão de referência estava disponível no inventário de substâncias químicas de referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). Além disso, os dados da literatura para os espectros de GLZ produzidos por ressonância magnética nuclear mostravam sinais ideais para quantificação como, por exemplo, singletos e dubletos com boa resolução.

A literatura descreve algumas técnicas analíticas que podem ser utilizadas na determinação quantitativa da GLZ, mas sua monografia oficial não está presente na Farmacopeia Brasileira, tendo-se optado neste trabalho por seguir como método de referência aquele descrito na Farmacopeia Britânica (British Pharmacopoeia, 2005). A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é a técnica oficial para a determinação de conteúdo especificada na monografia desse fármaco. Porém, esse trabalho visa destacar a Ressonância Magnética Nuclear Quantitativa (em inglês: Nuclear Magnetic Resonance; (NMRq) como técnica apropriada para a quantificação desse fármaco, já que, no que se diz respeito aos objetivos de quantificação, a RMNq compete com técnicas de separação como CLAE e eletroforese capilar. (HOLZGRABE, 2010).

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma das técnicas mais importantes de análise qualitativa, mas ainda é pouco usada para fins quantitativos. Uma única medida de RMNq-<sup>1</sup>H pode fornecer informações estruturais significativas sobre ativos e excipientes, além das informações quantitativas desses compostos, o que contribui para um controle de qualidade eficiente, simples e rápido. (SANTOS; COLNAGO, 2013). O parâmetro fundamental mais importante das medidas de RMNq-<sup>1</sup>H é a área integrada do sinal

do espectro, que é diretamente proporcional ao número de hidrogênios que absorvem energia na radiofrequência referente àquele sinal. (WAWER; DIEHL, 2017).

Apesar do custo considerável do equipamento de RMNq-<sup>1</sup>H, as vantagens do emprego desta técnica podem ser destacadas: a possibilidade de determinação de estruturas a nível molecular (análise qualitativa simultânea à quantitativa); as medidas podem ser realizadas em tempo relativamente curto (considerando-se núcleos abundantes); dispensa isolamento do analito quando o mesmo estiver presente em mistura (desde que haja a seletividade necessária); possibilidade de análise simultânea de analitos diferentes em uma mesma medida (se houver seletividade), e principalmente a possibilidade de dispensar o uso de substâncias químicas de referência para o analito de interesse, já que a quantificação pode ser realizada com quaisquer padrões internos comercialmente disponíveis com pureza adequada e que forneçam sinais que não se sobreponham ao do analito de interesse. (HOLZGRABE; DIEHL; WAWER, 2008). Entretanto, são encontrados poucos estudos quantitativos de fármacos por RMN validados na literatura e observando-se o desenvolvimento de novos métodos quantitativos, seu uso está em ascendência.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento e a validação de um método analítico para a determinação da GLZ, empregando a técnica de RMNq-<sup>1</sup>H.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Desenvolver e validar método de quantificação para GLZ utilizando RMNq-<sup>1</sup>H.
2. Comparar o desempenho do método desenvolvido com o método farmacopeico padrão.
3. Aplicar o método na determinação da uniformidade de conteúdo em formas farmacêuticas sólidas de GLZ.



### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Controle de qualidade

As indústrias farmacêuticas surgiram mundialmente, no final do século 19 e início do século 20, e desde então o setor farmacêutico tem se organizado para cumprir com regulações das atividades econômicas e sanitárias do setor. Esse segmento é responsável por realizar pesquisas, desenvolvimento, fabricação e comercialização de medicamentos. Para que o resultado dessas funções seja seguro e confiável, é necessário aplicar o controle de qualidade no processo de produção de produtos acabados e/ou matérias primas provenientes da indústria farmacêutica. (GALDINO; BETONI, 2014).

O controle de qualidade segue uma rigorosa legislação sanitária regida por órgãos regulamentadores. Sendo assim, ele assume um papel de imensa responsabilidade, pois garante a eficácia e segurança dos produtos liberados para a comercialização. Além disso, os produtos devem ser registrados pelo órgão regulador e para isso, precedem-se vários estudos sobre a físico-química e toxicologia do produto para evitar que efeitos tóxicos, como a neurotoxicidade, imunotoxicidade, a carcinogenicidade, desregulação endócrina e alterações no desenvolvimento do indivíduo, sejam expostas a população. (ANVISA, 2009).

Em âmbito nacional, o órgão regulamentador é a ANVISA que norteia todo o processo de regulamentação de medicamentos no Brasil. Um importante marco legislativo para a produção de medicamentos no país é a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) Nº 301, de 21 de agosto de 2019 que trata sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. (BRASIL, 2019). Com isso, estabeleceram-se os critérios a serem seguidos para a fabricação de medicamentos. Esses critérios visam garantir a segurança do produto e para que essa finalidade seja alcançada, a ANVISA preconiza que todos os testes estabelecidos para medicamentos sejam efetuados.

Os medicamentos em forma farmacêutica de comprimidos devem atender às exigências do teste de peso médio, teste de desintegração, teste de dissolução, uniformidade de conteúdo, teste de teor, além de especificações previstas nas monografias individuais que estão presentes nas Farmacopéias de cada país. (ANVISA, 2008).

A análise do teor do princípio ativo é uma etapa imprescindível para garantir a segurança e eficácia de produtos farmacêuticos. A grande variação no teor de fármaco dentro de um mesmo lote indica falta de conformidade quanto às Boas Práticas de Fabricação de

Medicamentos, o que pode acarretar no desenvolvimento de efeitos adversos ou até mesmo a intoxicação do paciente, em casos com teores de princípio ativo acima do valor rotulado. Em compensação, teores de princípio ativo abaixo do valor determinado podem tornar o tratamento ineficaz. (CORREIA *et al.*, 2015).

O teste para teor do princípio ativo em medicamentos está descrito na monografia de cada fármaco, assim como os limites aceitáveis. Encontra-se na literatura diversos estudos que avaliam o teor de princípio ativo de medicamentos e mostram como frequentemente encontramos lotes de medicamentos com teores de princípio ativos inaceitáveis pela legislação. Em 2008, Linsbinski constatou que os comprimidos de captopril 25mg distribuídos na rede básica do Sistema Único de Saúde (SUS) em Cuiabá, Mato Grosso, Brasil, evidenciaram teor de fármaco acima do limite permitido. (LINSBINSKI; DE MUSIS; MACHADO, 2008). Em 2012, Bianchin identificou irregularidades no aspecto visual, peso médio, friabilidade e teor de princípio ativo de comprimidos de Propranolol e Enalapril também distribuídos no SUS em uma cidade do sul do Brasil. (BIANCHIN *et al.*, 2012). Análises de 31 medicamentos à base de Docetaxel demonstraram que 21 deles continham quantidade do princípio ativo abaixo daquela aceitável (<90% da quantidade declarada) e destes, 11 apresentaram concentrações menores que 80% da quantidade rotulada, sendo que um deles apresentava concentração de Docetaxel abaixo de 40%. (BARATA-SILVA *et al.*, 2015). Em outro estudo utilizando comprimidos de Clopidogrel, foi constatado que 50% das amostras não atendiam os limites aceitáveis. (GOMEZ; ADAMS; HOOGMARTENS, 2004).

Devido a esta situação de desvios dos parâmetros de qualidade, existe uma demanda crescente por métodos de controle da qualidade, que além de serem confiáveis, sejam simples, rápidos, de baixo custo, que gerem o mínimo de resíduo químico possível, e que possam ser aplicados em uma grande quantidade de princípios ativos e excipientes, sejam em matérias primas ou produtos acabados.

Para o teste de determinação do teor, as técnicas cromatográficas são as mais utilizadas (RIBANI *et al.*, 2004), seguidas das técnicas espectroscópicas na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) quando acoplado a técnicas de separação (XU *et al.*, 2010). Essas técnicas destacam-se por serem métodos relativamente simples, rápidos e com exatidão e precisão adequadas. Entretanto, esse trabalho busca explorar a técnica de Espectroscopia de RMNq-<sup>1</sup>H como ferramenta quantitativa. Essa técnica é muito utilizada para fins qualitativos

e ultimamente vêm ganhando destaque no cenário mundial para análises quantitativas, porém ainda é pouco utilizada com essa finalidade.

Para o desenvolvimento de um novo método analítico é necessário validar o processo para que seja assegurada sua eficiência na rotina de um laboratório. Para que determinado método seja validado, suas características devem estar dentro de parâmetros estabelecidos previamente para cada propósito. (WALSH, 1999).

### **3.2 Validação de métodos analíticos**

A confiabilidade dos dados analíticos está sendo cada vez mais exigida, sendo necessário provar a qualidade das análises químicas realizadas nos produtos farmacêuticos. Quando dados analíticos não são considerados confiáveis, a probabilidade de prejuízos irrecuperáveis é alta. Para garantir informações confiáveis, um método analítico deve passar pelo processo de validação. (RIBANI *et al.*, 2004).

Quando um novo produto está sendo lançado no mercado, quando métodos já validados sofrem adaptações ou quando está sendo proposta uma nova técnica analítica para trabalho, os órgãos regulamentadores exigem a validação analítica. Para isso, vários países adotam diretrizes oficiais para padronizar esse processo. Feito isso, é possível fornecer evidências que o método é adequado para a rotina laboratorial e atende as exigências analíticas fornecendo resultados confiáveis. (ANVISA, 2008).

Os parâmetros analíticos a serem considerados para a validação dependem do ensaio a ser realizado. ARDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017, estabelece critérios para a validação de métodos analíticos e ressalta a necessidade de uma validação analítica completa quando utilizado um método não descrito em compêndio oficial reconhecido pela ANVISA. Os métodos analíticos que já estão presentes em compêndios oficiais devem apresentar apenas um estudo de validação parcial.

No anexo I da RDC 166/2017 consta os parâmetros a serem considerados em uma validação analítica. Para o ensaio de quantificação os parâmetros a serem comprovados são: exatidão, precisão, repetibilidade, seletividade, linearidade e intervalo de trabalho. Os limites de detecção e quantificação são dispensados no ensaio de teor, pois geralmente utiliza-se concentrações altas e é possível realizar uma tomada de amostra maior em comparação com outros métodos, como por exemplo, métodos bioanalíticos. (ANVISA, 2017).

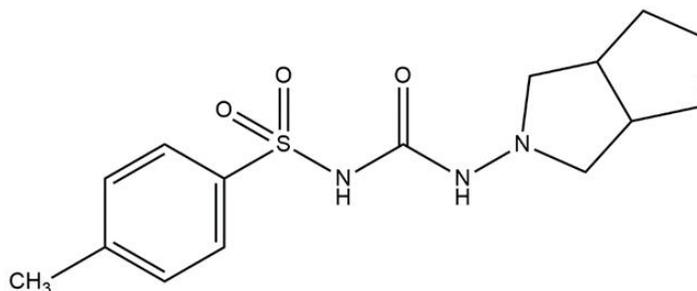
Existem na literatura, vários artigos e revisões que abordam o processo de validação de métodos analíticos. Ribani (2004) publicou uma revisão a respeito da validação de técnicas de separação, descrevendo o processo de validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Em 2002, as diretrizes para validação de métodos analíticos em um único laboratório foi publicada. Essas diretrizes fornecem recomendações mínimas sobre procedimentos que devem ser empregados para garantir a validação de um método. (THOMPSON, ELLISON, WOOD, 2002). Shabir (2003) escreveu um artigo para esclarecer os requisitos de validação que são exigidos por três órgãos diferentes nos Estados Unidos.

Para o desenvolvimento de novos métodos utilizando a técnica de RMNq-<sup>1</sup>H não é diferente. Santos e Conalço (2013) publicaram a base teórica para análises quantitativas de RMNq-<sup>1</sup>H e um exemplo de validação do método. Em 2005, verificou-se que a incerteza inerente de medição combinada na técnica de RMNq-<sup>1</sup>H para análises quantitativas é de 1,5% em um intervalo de confiança de 95%. Esse resultado foi gerado durante a elaboração de um protocolo validado para RMNq-<sup>1</sup>H, que considerou todas as questões relativas à linearidade, robustez, especificidade, seletividade e precisão, assim como influências de parâmetros específicos do instrumento e as rotinas de processamento e avaliação de dados. Esse procedimento foi realizado para garantir que amostras idênticas não sejam avaliadas de forma diferente em diferentes laboratórios. (MALZ; JANCKE, 2005).

### 3.3 Gliclazida

A Gliclazida (Figura 2), (1-(Hexahidrocyclopenta [c] pyrrol-2(1H)-yl)-3-[(4-methylphenyl) sulfonyl] urea) faz parte de uma classe de fármacos denominados sulfoniluréias de segunda geração. É um pó branco ou quase branco, praticamente insolúvel em água, livremente solúvel em diclorometano, moderadamente solúvel em acetona, levemente solúvel em álcool. (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2005).

Figura 2 - Estrutura molecular da GLZ.



Fonte: Próprio autor

Alguns de seus nomes comerciais são: Diabrezida, Diamicron, Diaprel, Diabeziol, entre outros. Existem formulações de 30 mg e 80 mg. A absorção da GLZ é rápida, mas pode ter ampla variabilidade individual, essas variações nos parâmetros de absorção da GLZ podem ser atribuídas às propriedades relacionadas à dissolução precoce no estômago, bem como às formas farmacêuticas. As concentrações plasmáticas máximas ocorrem dentro de 4-6 h a partir da administração oral. É intensamente metabolizado no fígado por hidroxilação, n-oxidação e oxidação, como outras sulfoniluréias. (CAMPBELL; LAVIELLE; NATHAN, 1991). No pâncreas, a porção sulfoniluréia da GLZ se liga com alta afinidade e seletividade aos receptores das células  $\beta$  pancreáticas, o que reflete na dose diária eficaz da GLZ, dentro da faixa de miligramas, reduzindo a incidência de episódios de hipoglicemia e ganho de peso, como ocorre com o uso de outras sulfoniluréias. Além disso, também garante a proteção cardiovascular, pois não se liga aos receptores de sulfoniluréia (SUR-2A) no coração. (PROKS *et al.*, 2002).

Já foram realizados estudos que compararam a eficácia e a segurança da GLZ em comparação com outras sulfoniluréias. (HARROWER, 1991). Em 1983, Baba *et al.* Comparou a segurança e eficácia da GLZ quando comparada a glibenclamida. Esse estudo mostrou a menor incidência de episódios de hipoglicemia (7% vs 15%) e melhora no perfil lipídico, mesmo não havendo diferenças significativas na eficácia entre os dois fármacos. Akanuma Y *et al.* (2009), através de um longo ensaio clínico, relatou que a GLZ possui propriedades que impedem a evolução da retinopatia diabética. Assim, a GLZ parece ter propriedades adicionais quando comparada a outras sulfoniluréias.

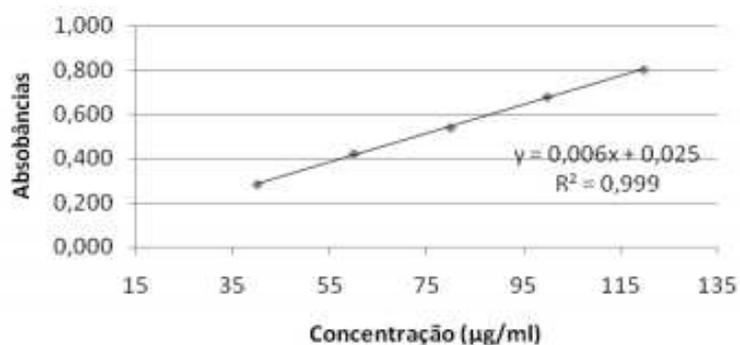
### **3.3.1 Métodos para quantificação da GLZ**

Um método oficial para determinação da GLZ está descrito na Farmacopeia Britânica. (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2005). Na Farmacopeia Brasileira não existe um método oficial para quantificação desse fármaco. Entretanto, diversos métodos foram relatados na literatura para a determinação da GLZ, pura ou em preparações farmacêuticas e fluidos biológicos. A seguir, encontramos alguns exemplos.

A Espectrofotometria no Ultravioleta (UV) foi utilizada para a determinação quantitativa da GLZ por Batistela e Laporta (2013). O trabalho teve como objetivo aperfeiçoar e validar um método rápido para quantificação. O método foi validado utilizando-se acetonitrila e água como solventes, amostras na concentração de trabalho em 80  $\mu\text{g/ml}$  e a quantificação do ativo em 244 nm. Este se mostrou específico, linear na faixa de 40 a 120

$\mu\text{g/ml}$  (Figura 3), limite de detecção de  $6,32 \mu\text{g/ml}$  e quantificação de  $18,99 \mu\text{g/ml}$ , precisão com  $\text{DPR} < 1\%$ , exatidão média de  $100,74\%$  e robustez adequada.

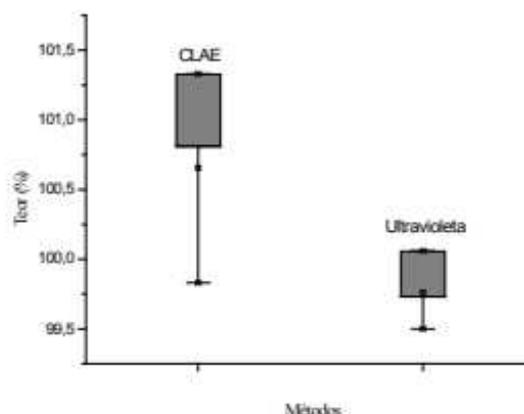
Figura 3 - Representação gráfica da curva analítica e da equação da reta da GLZ obtida pelo método espectrofotométrico na região UV.



Fonte: BATISTELA; LAPORTA, 2013.

O método validado por espectrofotometria de absorção no UV não apresentou diferença significativa quando comparado ao método oficial, por cromatografia líquida de alta eficiência, podendo ser utilizado com segurança na quantificação de comprimidos de GLZ (Figura 4).

Figura 4 - Representação gráfica da comparação dos métodos espectrofotométricos no UV e CLAE quanto aos valores mínimos e máximos obtidos.



Fonte: BATISTELA; LAPORTA, 2013.

A Espectrofotometria de Infravermelho próximo (em inglês, Near-infrared spectroscopy; NIRS) foi utilizada por YU *et al* (2014) para a quantificação de GLZ em soro

humano. O trabalho aponta como limitação da NIRS, sinais analíticos mais fracos e ruído térmico; tornando complicada a interpretação dos resultados da análise e modelagem. Por isso o foco do trabalho foi o desenvolvimento de um método para remover o ruído nos espectros de NIRS. Como resultado, o autor relata a proximidade entre o valor de referência e o valor encontrado pelo modelo de calibração. Diante disso, o trabalho forneceu uma melhoria intrínseca para a interpretação dos dados NIR (YU *et al.*, 2014).

Sunitha *et al* (2014) publicaram a proposta de um método por Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (em inglês, Fourier-transform infrared spectroscopy; FTIR), para determinação da GLZ na forma de preparações comerciais. O método envolve a medição da área da banda infravermelha correspondente ao estiramento da função amida centrado em  $3317\text{ cm}^{-1}$ . A faixa de linearidade encontrada foi de 4-24  $\mu\text{g/ml}$ . A técnica é confiável e útil para controle de qualidade para monitorar a adulteração de drogas puras. O método proposto foi validado estatisticamente e considerado útil para a determinação de rotina de GLZ em comprimidos. Os resultados resumidos em uma tabela presente no artigo mostram que a faixa de linearidade foi de 4 a 24  $\mu\text{g/mL}$ , o valor do coeficiente de correlação (r) foi de 0,9989, o desvio padrão relativo de 0,4928%, o limite de detecção e o limite de quantificação foram de 2 e 4  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

Os resultados da análise da amostra mostraram que o fármaco determinado pelo método proposto estava em boa concordância com a declaração do rótulo, comprovando a precisão do método proposto, onde a quantidade presente de ativo foi de 39,87 mg enquanto que a quantidade esperada seria de 40 mg de gliclazida.

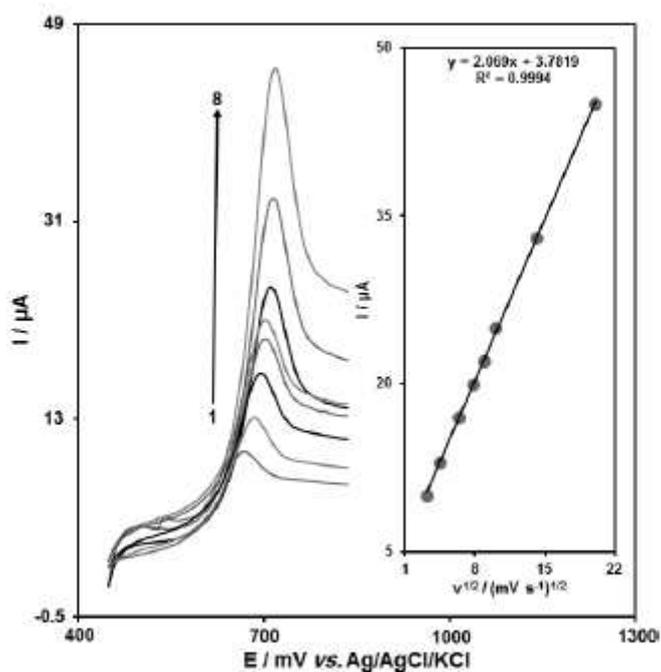
Ainda em 1981, Suzuki *et. al* desenvolveram radioimunoensaios que permitem a determinação de GLZ em soro humano. Os ensaios foram possíveis na faixa de concentração de 0,25 a 20  $\mu\text{g/ml}$  com antissoro A e de 0,1 a 10  $\mu\text{g/ml}$  com antissoro B. Esses resultados sugeriram que o metabólito hidroximetil da GLZ estava pouco presente no soro humano, e o metabólito apresentou reação cruzada com o antissoro A em 2,7%, enquanto que a reação cruzada com antissoro B foi de 90%. Essas reações cruzadas aconteceram com outros fármacos, como: Clorpropamida, tolbutamida ou Acetohexamida. (SUZUKI *et al.*, 1981).

No mesmo ano, Maeda desenvolveu um método de Cromatografia gasosa que permitiu a determinação da GLZ no plasma. As determinações foram precisas na faixa de detecção de 1 a 15  $\mu\text{g/ml}$  de GLZ no plasma, com um desvio padrão relativo de 5,2%. O

limite de detecção mínimo foi de 0,02  $\mu\text{g}$  por amostra. (MAEDA; YAMAGUCHI; HASHIMOTO, 1981).

A detecção Eletroquímica utilizando eletrodos de carbono vítreos modificados foi realizada por Ganjali em 2017. Os resultados obtidos nas condições ideais mostraram que a resposta do eletrodo à GLZ é linear em uma faixa bastante ampla de  $5,0 \times 10^{-6}$  a  $8,0 \times 10^{-4}$  M (Figura 5). (REZA GANJALI, M 2017).

Figura 5 - Gráficos demonstrando os resultados obtidos da GLZ 250  $\mu\text{M}$  em várias taxas de varredura por LSVs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2/\text{MWCNT}/\text{GCE}$ . Os números de 1 a 8 correspondem a 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200 e 400 mVs.



\*LSVs = Voltametrias de varredura linear.  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2/\text{MWCNT}/\text{GCE}$  = Eletrodo de carbono vítreo modificado usando núcleo magnético de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$  e nanotubos de carbono de paredes múltiplas.

Fonte: REZA GANJALI, M 2017.

O limite de detecção de GLZ foi de  $2,1 \times 10^{-6}$  M. Esses valores são comparáveis aos valores relatados por outros grupos de pesquisa para a determinação de GLZ por métodos diferentes. Em uma tabela de comparação da eficiência de alguns métodos usando a detecção de GLZ, o trabalho compara valores de limites de detecção e de quantificação nas técnicas de cromatografia eletrocinética micelar, cromatografia líquida, cápsula de membrana assimétrica, espectrofotometria e voltametria.

Os dados obtidos no trabalho mostram que o método baseado no uso do eletrodo desenvolvido pode ser usado com segurança para determinar o teor de GLZ em comprimidos e em amostras de urina. No estudo de recuperação para avaliar a exatidão do método observamos valores recuperados próximos aos valores esperados e um desvio padrão relativo dentro dos limites aceitáveis.

El-Enany (2003), desenvolveu métodos espectrofotométricos e espectrofluorimétricos para a determinação de GLZ em formulações farmacêuticas e fluidos biológicos. Ambos os métodos são baseados em uma reação de acoplamento entre GLZ e 4-cloro-7-nitrobenzo-2-oxa1,3-diazol em tampão borato (pH 7,8), no qual foi desenvolvido um produto de reação amarelo que pode ser medido espectrofotometricamente a 400 nm.

O gráfico de absorvância-concentração foi linear na faixa de 2–20 g/ml com limite mínimo de detecção de 0,2 g/ml, o gráfico de concentração-fluorescência também se mostrou linear ao longo da faixa de 0,2–2,5 g/ml com limite mínimo de detecção de 0,02 g/ml. Ambos os métodos foram aplicados com sucesso para a análise de comprimidos comerciais, os dados podem ser observados quando os autores comparam o desempenho dos métodos espectrofluorimétricos e espectrofotométrico na determinação de GLZ.

O método proposto foi aplicado na determinação de GLZ em sua forma comercial em comprimidos e observou-se que a recuperação de princípio ativo esteve dentro dos limites aceitáveis com boa exatidão.

Em 2014, Ezzeldin *et. al* propôs um método para determinação simultânea de Montelukaste, GLZ e Nifendipina em preparações farmacêuticas ou fluidos biológicos. O método utilizava a Cromatografia Líquida acoplada a Espectroscopia de Massas (em inglês, Liquid Chromatography–Mass Spectrometry; LC/MS). O método foi validado de acordo com as diretrizes do *Food and Drug Administration (FDA)* com boa reprodutibilidade e linearidade de 0,999 no intervalo de 10,0–5000,0 ng/ml. Os limites de quantificação para a GLZ foram de 0,04 ng/ml e de detecção 0,01 ng/ml, enquanto que a exatidão foi 106,53%. (EZZELDIN *et al.*, 2014).

Para a determinação simultânea em formulações farmacêuticas Berecka, Gumieniczek e Hopkaa desenvolveram um novo método por Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector UV (em inglês, Liquid Chromatography coupled to diode

array UV detection; LC/UV), para a determinação da GLZ e da repaglinida. Os gráficos de calibração variaram de 0,015 a 0,09 mg/ml para GLZ. Os valores de desvio padrão relativo intra e inter-dia para as soluções padrão foram 0,70 e 1,01% para GLZ. A recuperação total de GLZ foi de 99,82 +/- 0,58. Portanto, o método mostrou-se adequado para monitorar o controle de qualidade comercial comprimidos de GLZ. (BERECKA; GUMIENICZEK; HOPKAA, 2006).

Esses métodos citados, geralmente envolvem etapas trabalhosas e demoradas, transformando-os em técnicas complexas ou que necessitam de uma grande quantidade de tempo e amostra. Dentre esses métodos, podemos destacar a CLAE, como está descrito na Farmacopeia Britânica (2005) como método oficial da GLZ. Entretanto, a CLAE possui algumas limitações, incluindo preparação da amostra demorada e trabalhosa, etapas de extração, uso de grande volume de amostra ou uso de cartuchos de extração de fase sólida caros. (YU *et al.*, 2014).

### **3.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

As técnicas cromatográficas são métodos físico-químicos de separação, identificação e quantificação muito utilizadas para fins qualitativos e quantitativos devido a sua alta sensibilidade, repetibilidade, especificidade e boa desempenho de análise. (SARKAR; KHANDAVILLI; PANCHAGNULA, 2006). Elas são utilizadas em diversas áreas, como exemplo, na Indústria de Alimentos (PRADO; GODOY, 2007), Petroquímica (GIERTYAS, 2016), Análise Forense (DE OLIVEIRA *et al.*, 2009), Química Orgânica de produtos naturais (TONIN, 2006), bioquímica (SUGAWARA *et al.*, 2008), Farmacologia (COSTA; PEREIRA NETTO, 2012), Análises clínicas (MENEZES *et al.*, 2012) e com destaque na Indústria Farmacêutica. (SILVA, 2016).

A CLAE pode ser baseada em diversos mecanismos de retenção, de acordo com a interação entre os componentes da amostra e as duas fases presentes no sistema denominadas fase móvel e fase estacionária. Esses mecanismos podem ser divididos em adsorção, partição, troca iônica, filtração em gel, afinidade e pareamento iônico, e o mecanismo predominante vai depender da fase estacionária utilizada. A separação dos componentes da amostra depende das diferenças de afinidade que terão em relação às duas fases. (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1997).

### 3.4.1 Fundamentos

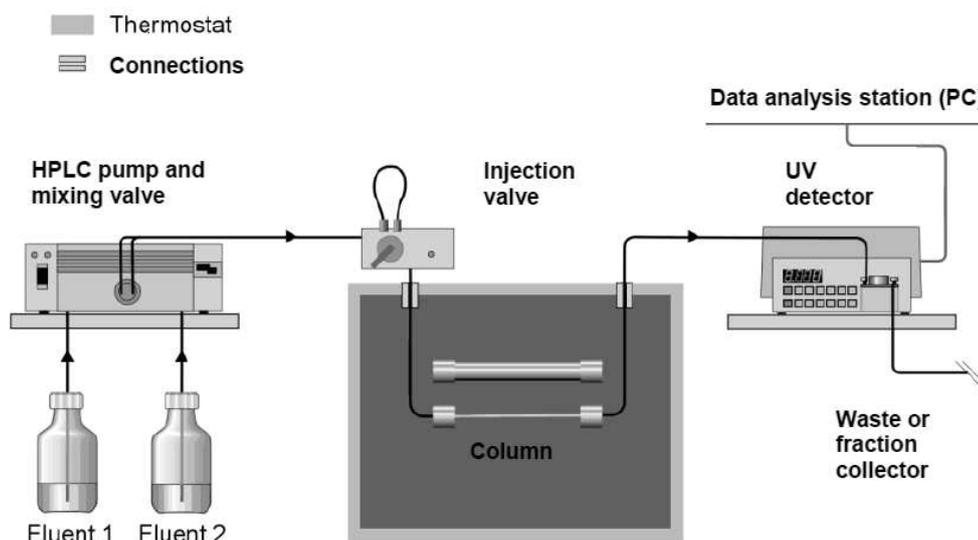
Na CLAE, os componentes a serem separados são distribuídos em duas fases imiscíveis, uma estacionária contida em uma coluna e outra líquida composta por solventes que se move em uma direção específica. Essa técnica utiliza normalmente como fase estacionária, colunas metálicas empacotadas com partículas de sílica e submetidas a pressões elevadas para impulsionar a fase móvel líquida, o que é alcançado com o auxílio de uma bomba de alta pressão. (BLUM, 2014).

Sistemas que contem fases estacionárias polares e fase móvel apolar são chamados de cromatografia em fase normal. Na cromatografia com fase reversa acontece o oposto. Uma cadeia carbônica que está quimicamente ligada á sílica da coluna da fase estacionária, faz com que a coluna tenha uma afinidade com compostos apolares, e consequentemente a fase móvel passa a ser polar. A natureza da substância a ser separada, a composição e o fluxo da fase móvel e a área superficial da fase estacionária, são alguns fatores que influenciam no tempo de separação cromatográfica. (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1997).

Para a CLAE, a amostra deve ser preparada com o intuito de extrair, concentrar e limpar a mesma, evitando que possa haver dano ou contaminação ao sistema (NETO; PINTO, 2014). Essa amostra interage de formas diferentes com a fase estacionaria do sistema, dependendo de sua natureza química. Dessa forma, o tempo que cada substância fica retida na coluna, pode ser usado como um identificador para as substâncias presentes na mistura a ser analisada. (BLUM, 2014).

Como podemos ver na figura 6, a CLAE utiliza um equipamento que contem os reservatórios da fase móvel, uma bomba que tem a função de forçar a entrada da fase móvel no sistema cromatográfico e variar a composição da fase móvel ou para misturar de forma isocrática (com composição constante) a fase móvel, um injetor que introduz a amostra no sistema, a coluna cromatográfica, um detector e softwares para controlar o sistema e registrar os dados. Após a amostra ser preparada, ela é injetada no sistema manualmente ou por meio de um amostrador automático previamente programado para injetar volumes específicos de amostra. A afinidade da substância pelas fases do sistema irá definir seu tempo de retenção na coluna cromatográfica.

Figura 6 - Esquema de um sistema de CLAE.



Fonte: Dctech, 2017.

Os detectores devem ser sensíveis, rápidos, seletivos, estáveis e com alta reprodutibilidade, sendo os mais usados para a CLAE: os detectores de UV com comprimento de onda variável, os detectores de UV com arranjos de fotodiodos (DAD), os de fluorescência e fluorescência de varredura, espectrômetros de massas, detectores por índice de refração e detecção eletroquímica. Com a variedade de detectores para a técnica de CLAE conseguimos analisar uma variedade de analitos, desde íons a macromoléculas. (NETO; PINTO, 2014).

### 3.5 Ressonância Magnética Nuclear Quantitativa (RMNq-<sup>1</sup>H)

A Ressonância Magnética Nuclear Quantitativa de hidrogênio (RMNq-<sup>1</sup>H) é uma técnica poderosa e promissora para determinar a concentração de uma amostra. Além disso, oferece uma vasta quantidade de informações estruturais. Assim como outras técnicas, ela está baseada na espectrometria de absorção (SILVERSTEIN, 2005), porém oferece uma visão única do analito, pois seu mecanismo é completamente diferente de outras técnicas analíticas. (PAULI; JAKI; LANKIN, 2005).

#### 3.5.1 História

Os primeiros estudos com a Ressonância Magnética Nuclear (em inglês NMR, Nuclear Magnetic Resonance) foram iniciados em 1939. Começaram a partir da descrição dos experimentos que mediam com alta precisão os momentos magnéticos de um próton e, além disso, também foram apresentados resultados da rotação de uma molécula diante de um

campo magnético externo. A partir daí, mostrou-se possível à aplicação de procedimentos espectroscópicos utilizando ondas de rádio. (KELLOGG *et al.*, 1939).

Até então, ressonância magnética era usada para a determinação de momentos magnéticos nucleares por feixes. Em 1946, Alvarez e Bloch observaram a indução nuclear enquanto buscavam a comparação entre momentos magnéticos e concluíram que esse método poderia resolver vários problemas existentes no método de feixe nuclear, como a exata comparação dos momentos magnéticos nucleares e a dificuldade na determinação da razão giromagnética. Dessa forma, concluíram que a indução eletromagnética poderia ser desenvolvida como um método simples e prático para medir campos magnéticos com alta precisão. (BLOCH F., 1946).

Richard R. Ernst, ganhou o Prêmio Nobel em Química em 1991, por suas contribuições ao desenvolvimento da metodologia de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de alta resolução, graças ao seu método altamente sensível e de alta resolução nas décadas de 1960 e 1970. Em 1962, Ernst finalizou sua tese de doutorado e começou trabalhar na empresa Varian, juntamente com vários cientistas famosos, entre eles, Weston Anderson, que em 1964 propôs um experimento de excitação de pulsos que levou ao RMN com transformada de Fourier (FT), como conhecemos hoje. Em 1969, pela primeira vez, foi demonstrado um espectrômetro comercial de RMN com FT. Já em 1974, Thomas Baumann (primeiro aluno de pós-graduação de Ernst), desenvolveu experimentos com a espectroscopia em duas dimensões (2D) e a partir daí a espectroscopia multidimensional se desenvolveu rapidamente. (“THE NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY, 1991”).

A RMNq- $^1\text{H}$  é quase tão antiga como a própria RMN. O primeiro experimento quantitativo descrito na literatura aconteceu em 1963, por Jungnickel, Forbes e Hollis. Até hoje a literatura de livros didáticos não enfatiza o uso quantitativo dessa técnica e não motiva educadores e pesquisadores a utilizá-la como uma ferramenta quantitativa, porém podemos observar a sua importância nesse campo quando observamos a quantidade de publicações que fornecem evidências quanto a essa ferramenta analítica. (PAULI; JAKI; LANKIN, 2005).

### **3.5.2 Fundamentos da RMN**

Basicamente, a técnica de espectroscopia por RMN se baseia no fato de que os núcleos dos átomos possuem uma rotação intrínseca chamada número quântico de spin (I). Estes números quânticos possuem valores iguais ou maiores que zero e sempre múltiplos de

1/2. A grande maioria dos compostos químicos possui pelo menos um núcleo que possui spin nuclear com valor maior que zero como, por exemplo, o hidrogênio, que é um agente ativo de RMN de alta abundância. Um agente ativo de RMN possui I maior que zero e consegue formar um momento angular (P) ou movimento angular.

Na Figura 7, podemos observar que o movimento giratório dos prótons dá origem a um momento angular (P) e o movimento da carga gera um momento magnético nuclear ( $\mu$ ) com magnitude e direção. Podemos evidenciar essa afirmação na equação 1, podendo então concluir que o momento angular do átomo dá origem a um momento magnético nuclear,  $\mu$ .

$$\mu = \gamma \times P \quad (1)$$

Onde,  $\gamma$  é a razão magnetogênica ou razão giromagnética. Com a formação do momento magnético nuclear, podemos comparar um átomo a um pequeno ímã. Essas propriedades são fundamentais para o fenômeno de RMN. (CLARIDGE, 2016).

Figura 7 - Momento magnético de um núcleo atômico.



Fonte: CLARIDGE, 2016.

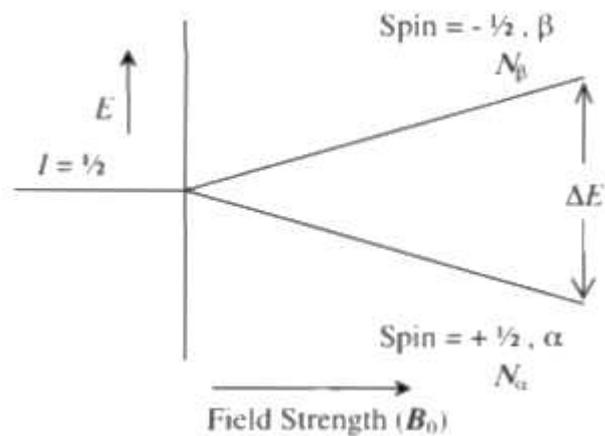
Quando um campo magnético externo ( $B_0$ ) é uniformemente aplicado sob a amostra, os momentos magnéticos nucleares se alinham em algumas orientações possíveis em relação a esse campo que está sendo aplicado e cada orientação corresponde a um nível característico de energia potencial do núcleo. A quantidade de orientações pode ser suposta pela equação 2.

$$2I+1 \quad (2)$$

O núcleo de um próton é livre pra assumir qualquer orientação possível na ausência de um campo magnético externo e os spins são ditos estarem degenerados. Na

presença do campo magnético externo, um próton com número de spin  $1/2$ , está condicionado a duas orientações possíveis, que pode ser de baixa energia (paralela ao campo aplicado, alfa), ou de alta energia (antiparalela ao campo aplicado, beta,) com um leve excesso de prótons no estado de baixa energia de acordo com a distribuição de Boltzmann, como está demonstrado na figura 8. (SILVERSTEIN, 2005).

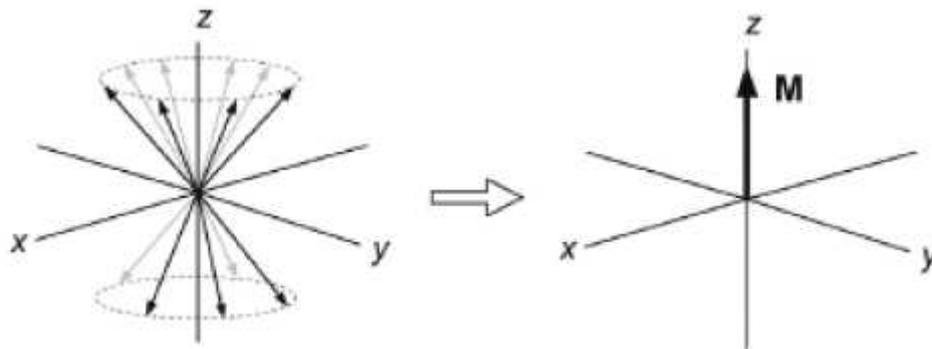
Figura 8 - Estados de spin nuclear.



Fonte: SILVERSTEIN, 2005.

Onde  $N_\alpha$  e  $N_\beta$ , representam o número de núcleos em cada orientação. A diferença entre os níveis de energia de spin são muito pequenas e apenas um pequeno excesso de spins será excitável (este excesso corresponde à diferença entre o número de núcleos que habitam o estado de menor energia e o número de núcleos que habitam o estado de maior energia). É por isso que a técnica de RMN é tão insensível em relação a outras técnicas como infravermelho (IR) e UV. Esse pequeno excesso populacional dá origem a um vetor resultante de magnetização ( $M$ ) ao longo do eixo z, como podemos observar na figura 9. Essa imagem simplificada é referida como modelo vetorial de Bloch ou como modelo do vetor de RMN.

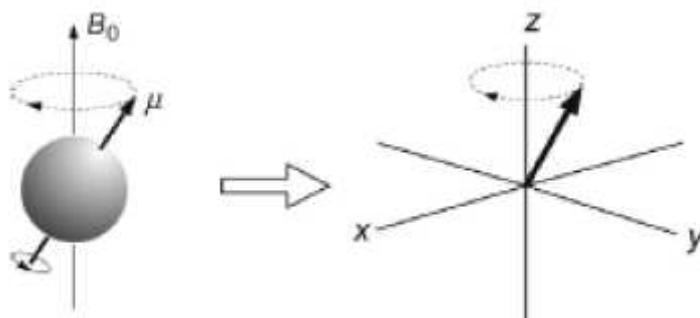
Figura 9 - Modelo vetorial de Bloch.



Fonte: CLARIDGE, 2016.

O campo magnético estático aplicado atua no momento magnético do núcleo como se estivesse aplicando um torque, o que faz com que o próton trace um caminho circular ao campo aplicado fazendo com que ele gire em torno de seu próprio eixo, como é mostrado na figura 10. É comum definir a direção do campo magnético estático ao longo do eixo z. Essa movimentação é chamada de precessão e a frequência de precessão é chamada de frequência de precessão de Larmor.

Figura 10 - Frequência de precessão de Larmor.



Fonte: CLARIDGE, 2016.

A frequência de precessão de Lamor pode ser calculada pela equação 3.

$$\omega = -\gamma B_0 \text{ rads}^{-1} \quad (3)$$

Há possibilidade de induzir uma transição entre esses dois estados de energia, aplicando-se uma frequência ( $\nu$ ) correspondente a precessão de Lamor dos prótons. A variação de energia dada para ocorrer essa transição pode ser obtida através da equação 4.

$$\Delta E = (h\gamma/2\pi) B_0 \quad (4)$$

Onde,  $h$  corresponde a constante de Planck,  $\gamma$  a razão giromagnética e  $B_0$  o campo aplicado. Os espectrômetros de RMN empregam campos magnéticos com alta intensidade que correspondem a essas frequências ressonantes enquadradas na região de radiofrequência do espectro eletromagnético. (CLARIDGE, 2016).

A absorção de energia no campo de radiofrequência faz com que o núcleo de um próton vire de uma orientação para outra. E como já foi citada anteriormente, a irradiação de uma frequência apropriada pode levar a transições entre esses vários níveis de energia, desde que obedeça a condição de haver apenas transições entre níveis de energia adjacentes. Isto é, essa regra de seleção exige que haja apenas uma frequência específica para as transições em determinado  $B_0$ , já que os níveis são igualmente espaçados. Em resumo, núcleos atômicos de elementos com  $I$  maior que zero, quando colocados em um campo magnético externo, podem absorver energia da radiação de radiofrequência. (JACKMAN; STERNHELL, 1969).

Quando se irradia a amostra com um pulso de radiofrequência definido e com amplitude conhecida por um período de tempo determinado, a radiofrequência impõe uma mudança no vetor de magnetização em uma direção perpendicular ao campo magnético, que faz com que a magnetização ao longo do eixo  $z$ , gire em torno do plano  $x - y$  (figura 6). Entretanto, a magnetização no plano  $x - y$  significa uma perturbação no equilíbrio do spin e, naturalmente, qualquer sistema químico que é perturbado se reajustará para restabelecer essa condição de equilíbrio novamente e, assim, cessado o pulso de radiofrequência o vetor transversal de magnetização desaparecerá gradualmente do eixo  $x - y$  e simultaneamente

começará a reaparecer ao longo do eixo z. Esse retorno ao equilíbrio é conhecido como relaxamento e faz com que o sinal de RMN decaia com tempo, produzindo o decaimento de indução livre (FID, do inglês Free Induction Decay). (BECKER, E. D., 2000).

O relaxamento influencia tanto na resolução, como na sensibilidade do experimento. Isso acontece porque a recuperação da magnetização ao longo do eixo z (relaxamento longitudinal) corresponde ao restabelecimento das populações de equilíbrio e, portanto, esse processo corresponde a uma perda de energia dos spins. A energia perdida pelos spins é transferida para o ambiente em forma de calor e coletado por um receptor e analisado. A teoria de RMN de Bloch sugere que a recuperação da magnetização segue um comportamento exponencial descrito pela equação 5.

$$\frac{dM_z}{dt} = \frac{M_0 - M_z}{T_1} \quad (5)$$

onde  $M_0$  é magnetização em equilíbrio térmico e  $T_1$  é a constante de tempo de relaxamento. Quando ainda não há magnetização, a magnetização longitudinal no momento  $t$  será conforme a equação 6.

$$M_z = M_0 (1 - e^{-t/T_1}) \quad (6)$$

Para o completo relaxamento após um pulso de 90 graus é necessário aguardar um período de pelo menos cinco vezes o valor de  $T_1$ , pois é o momento em que a magnetização se recuperou em 99,33%, para moléculas orgânicas de tamanho médio, podendo esse tempo durar alguns minutos.

Em uma molécula, prótons em ambientes químicos diferentes precessam com uma frequência ligeiramente diferente e irão entrar em ressonância quando expostos ao pulso de radiofrequência em frequências também diferentes em algumas partes por milhão uns dos outros. Esta diferença na frequência de ressonância, expressa em partes por milhão dá origem à escala de deslocamento químico, que é utilizada para identificar o tipo de próton que gerou

o sinal, fornecendo assim informação estrutural importante para a elucidação da estrutura de moléculas orgânicas.

Quando a magnetização decai após a excitação é produzido um sinal chamado FID, ele será coletado durante um tempo após o pulso, e então passará por uma equação matemática chamada de transformada de Fourier (FT), para então ser gerado um espectro. Esse processo é necessário, pois em moléculas complexas, existem várias frequências que geram um sinal complexo resultado da interferência construtiva e destrutiva das frequências originais constituintes, então todas essas informações de sinais dependentes do tempo, passam pela FT para extrair as frequências dos dados obtidos. Em resumo, a Transformada de Fourier é uma operação matemática que converte as informações do FID (domínio do tempo) em dados de frequências (domínio da frequência). (CLARIDGE, 2016).

### 3.5.3 Fundamentos da RMNq-<sup>1</sup>H

A RMNq-<sup>1</sup>H não só identifica moléculas, como permite quantificar as espécies analisadas, uma vez que a intensidade do sinal gerado no espectro é diretamente proporcional ao número de núcleos que geraram aquele sinal. A relação entre essas grandezas pode ser dada pela equação 7 (HOLZGRABE *et al.*, 2005). Em espectroscopia de RMNq-<sup>1</sup>H, cada átomo de H leva a pelo menos um sinal. A maioria das moléculas de interesse analítico contém mais do que um átomo H, por isso, geralmente os espectros são mais complexos do que cromatogramas.

$$I = cs \times N \quad (7)$$

Onde, *cs* também pode ser chamada de constante do espectrômetro, pois ela é resultante de parâmetros entre o espectrômetro e a amostra. Para a determinação quantitativa, a relação das razões de área relativa  $I_x / I_y$  é a mais fácil forma de obter resultados quantitativos, como mostra a equação 8.

$$\frac{I_x}{I_y} = \frac{N_x}{N_y} \quad (8)$$

Onde  $N_x$ , representa o número relativo de spins ou prótons que geram o sinal.

O processo de integração dos sinais é crucial para uma quantificação exata, sendo assim os sinais a serem integrados devem estar bem separados, o nível de ruído deve estar baixo, deve-se obter uma boa linha de base e um bom shimming, além de uma janela espectral que seja uniformemente excitada pelo pulso de radiofrequência (RF). Com todos esses parâmetros ajustados, a validação do método pode ser realizada.

Como comentado anteriormente, a diferença populacional de spins entre os dois estados de energia é baixa, por isso a RMNq-<sup>1</sup>H tem como limitação a baixa sensibilidade. Essa limitação está sendo contornada por equipamentos com campos magnéticos mais altos e softwares modernos. Além disso, o número de scans pode melhorar a relação S/N e a qualidade do espectro pode ser melhorada com um bom shimming. (HOLZGRABE *et al.*, 2005).

Em relação a métodos cromatográficos e outros métodos, a RMNq-<sup>1</sup>H oferece a vantagem de estar sempre pronta para análises, eliminando o tempo gasto com preparação do equipamento e da amostra, bastando dissolvê-la em cerca de 0,7 ml de solvente deuterado adequado. Outra vantagem relacionada é o baixo volume de solvente utilizado. Todavia, a vantagem principal se deve ao fato de que a RMNq-<sup>1</sup>H é considerada um método primário, pois a quantificação de substâncias pode ser realizada diretamente, sem o uso de um padrão de referência com identidade igual a da amostra quantificada. (B. KING, 2000). O sinal de RMN é extremamente linear por ser proporcional a quantidade de átomos que gerou aquele sinal, isso torna dispensável uma curva de calibração antes das análises. Os sinais no espectro são medidas das concentrações molares das substâncias, independente da estrutura molecular, diferente de outras técnicas, como na detecção por UV. (HOLZGRABE; DIEHL; WAWER, 1998).

#### **3.5.4 Aplicações da RMNq-<sup>1</sup>H**

A Farmacopeia Europeia já utiliza a técnica de RMN para identificar drogas e reagentes substituindo métodos como espectroscopia de infravermelho. (HOLZGRABE; DIEHL; WAWER, 1998). A partir disso, percebemos que a RMN vem sendo muito utilizada oficialmente para fins qualitativos, como por exemplo, na identificação da heparina. A produção de heparina não fracionada contaminada com sulfato de condroitina supersulfatado (OSCS) levou à morte de mais de 100 pacientes e fez a Universidade de São Paulo (USP) revisar seus protocolos limitando a quantidade de OSCS, assim como dos solventes residuais

etanol e metanol. Entretanto, nenhum teste cromatográfico é capaz de identificar todas as impurezas em uma única análise, o que pode ser realizado por RMN. (BEYER *et al.*, 2008).

A RMN tem se apresentado como uma valiosa e versátil ferramenta quantitativa e está sendo desenvolvida e aplicada com êxito em diversas áreas. O número de artigos cujo título inclui as palavras 'quantitativo' e 'NMR' vêm aumentando de modo contínuo como podemos ver na figura 11.

Figura 11 - Gráfico do Número de publicações em que se encontra "quantitativo" e "rmn" no título obtidas por uma pesquisa no PORTAL CAPES em setembro de 2020



Fonte: Próprio autor.

Na indústria farmacêutica, ela vem fornecendo contribuições significativas e valiosas para análises *in vitro* de misturas complexas como drogas, biofluidos, amostras de tecido e também em investigações, clínicas *in vivo*. Hou *et. Al* (2014) mostrou que não houve diferenças significativas entre o resultado do ensaio obtido por HPLC e RMNq-<sup>1</sup>H para a determinação da avermectina. O método de RMNq-<sup>1</sup>H atuou como uma escolha mais rápida e fácil para a determinação de ativos em formulações de drogas. Como conclusão, o trabalho define o método como uma excelente escolha para controle de qualidade de rotina e análise de estabilidade de avermectina na forma de comprimido e no ambiente. (HOU *et al.*, 2014).

Goger *et. Al* (1999) também discutiu sobre a rapidez e precisão da RMNq-<sup>1</sup>H para a determinação da azatioprina. A espectroscopia de RMN se mostrou mais rápida e fácil de

executar além de mais específica, porque não há probabilidades de interferências como em procedimentos de UV e CLAE. Liang et. Al (2014) concluiu que os resultados obtidos no trabalho para determinação da clindamicina, eram indistinguíveis dos resultados obtidos por CLAE. Nesse trabalho, também foi ressaltado as vantagens exclusivas como não ser um método destrutivo, não ser necessário isolamento prévio de analito necessário e nenhum requisito para padrões de referência idênticos ao analito.

Em 2019, Qin estabeleceu um método de RMNq-<sup>1</sup>H para determinação do topiramato em seu estudo. Como conclusão, destacou-se a viabilidade, alta exatidão e precisão, análise qualitativa e quantitativa simultâneas, bem como a determinação do conteúdo sem a própria substância de referência. (QIN; WANG; LU, 2019). Da mesma forma, no estudo do piracetam concluiu-se que a RMNq-<sup>1</sup>H pode ser usada para controle de qualidade de rotina e análise de estabilidade. (EL-ADL; EL-SADEK; HASAN, 2017). Além desses estudos em fármacos, a RMNq-<sup>1</sup>H se mostra promissora para controle de qualidade de vacinas. (LEAL, 2013).

Existem vários exemplos na literatura de elucidação e quantificação de impurezas em amostras farmacêuticas. A RMNq-<sup>1</sup>H é considerada uma técnica perfeita para quantificação de impurezas. (HOLZGRABE; MALET-MARTINO, 2011). Enquanto que na agricultura, a RMNq-<sup>1</sup>H se mostrou bastante promissora, inclusive para a quantificação de ácidos graxos em óleos, pois ela dispensa reações de transesterificações que são indispensáveis quando se utiliza métodos cromatográficos. Além disso, se mostrou uma excelente técnica para detectar adulterações em produtos agrícolas. (SANTOS, 2014).

A RMNq-<sup>1</sup>H se mostrou sensível para determinação de cocaína em amostras apreendidas de crack, podendo ser utilizada pela perícia forense para determinar o teor de drogas. Nesse caso, a RMNq-<sup>1</sup>H se mostrou especialmente vantajosa por não ser necessário usar um padrão de referência para realizar medidas quantitativas (COSTA, 2012), (ALMEIDA *et al.*, 2018), (BENEDITO, 2018), (SERRANO, 2019). Essa técnica também vem sendo usada em análises metabômicas, para caracterizar os metabólomas de muitas amostras biológicas diferentes, essa área é chamada metabômica quantitativa. Wishart (2008) publicou uma revisão sobre o uso da RMNq-<sup>1</sup>H na análise do metabolismo cerebral e da medula espinhal, na esquizofrenia, esclerose múltipla, diabetes, obesidade, doença cardiovascular, distúrbios metabólicos, artrite e rejeição de órgãos, propondo que a identificação de metabólitos *in vivo* por RMNq-<sup>1</sup>H seja aceita pela comunidade científica.

Os produtos naturais se destacam no ramo farmacêutico devido a sua importância para o surgimento de novos medicamentos. Para isso, geralmente é necessário separar essa porção ativa de uma matriz complexa de substâncias químicas, o que resulta em um desafio para a quantificação de produtos naturais. Mais uma vez o RMNq-<sup>1</sup>H fornece enormes vantagens, pois a técnica permite acesso simultâneo tanto à informação qualitativa (estrutura química) quanto à quantitativa. (PAULI; JAKI; LANKIN, 2005). Staneva (2011) publicou pela primeira vez o uso da RMNq-<sup>1</sup>H para estimativa quantitativa de lactonas sesquiterpênicas no extrato de *A. montana*. E mostra que nenhum dos métodos usados até o momento forneceu resultados com mais precisão da quantidade de lactonas totais. Em 2004, foi desenvolvido um método de RMNq-<sup>1</sup>H para análise quantitativa de canabinóides. Este método mostrou ser indispensável um padrão de referência e permitiu a quantificação rápida e simples de canabinóides com um tempo de análise final de apenas 5 min, sem a necessidade de uma etapa de pré purificação necessária em métodos cromatográficos. (HAZEKAMP; CHOI; VERPOORTE, 2004).

Na indústria de alimentos, como por exemplo, na quantificação de adoçantes, a RMNq-<sup>1</sup>H se mostrou rápida, com fácil preparação de amostras e baixa geração de resíduos de solvente. (PANIAGUA-VEGA *et al.*, 2019). Siciliano *et al.* (2013) analisou a composição da cadeia de ácidos dos extratos lipídicos obtidos a partir de dois salames típicos da Calábria e concluiu que cadeias de ácidos graxos podem ser facilmente quantificadas por RMNq-<sup>1</sup>H. Diante disso, as técnicas de RMNq-<sup>1</sup>H são úteis aos métodos de análise das frações lipídicas de produtos cárneos. Destaca-se como vantagem o curto tempo necessário para preparação de amostras e o registro de espectros permitindo a análise de um maior número de matrizes por dia. Para o estudo de contaminações ambientais, a RMNq-<sup>1</sup>H já se mostrou eficiente para a quantificação de vários poluentes orgânicos presentes no esgoto, uma vez que ela é uma valiosa ferramenta para o estudo de componentes químicos presentes na água. (FILHO, 2014).

Como podemos observar na literatura, no que diz respeito à quantificação, RMNq-<sup>1</sup>H compete com técnicas de separação como CLAE e eletroforese capilar, entre outras.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Amostras de GLZ

As amostras utilizadas no presente trabalho consistiram de comprimidos de GLZ 30mg de liberação prolongada obtidos no comércio local de Diamantina – MG, durante o ano de 2020.

Foram escolhidos seis lotes diferentes de GLZ 30mg de liberação prolongada com laboratórios determinados aleatoriamente de acordo com a disponibilidade do comércio local, conforme disposto na tabela 1.

Tabela 1 - Amostras selecionadas para análises dos comprimidos de GLZ.

Laboratório	Lote
Pharlab	3012426
Pharlab	3012513
Ranbaxy	AB43641
EMS	L1M9594
EMS	L1P3154
EMS	L1M8155

### 4.2 Equipamentos

Para as análises de RMNq-<sup>1</sup>H foi utilizado um espectrômetro Bruker Fourier 300 HD (7,1 T), operando a 300,18 MHz equipado com sonda de identificação de 5 mm e com bobina de gradiente em z (55G/cm), em uma temperatura de 25°C. O software usado para processamento dos dados foi o TOPSPIN versão 3.2. Os parâmetros de análise foram:

- Frequência: 300,18 MHz;
- Janela espectral: 10.1664 Hz;
- Tempo de Aquisição: 2.6843 s;
- Tempo de Relaxamento: 14 s;
- Pulso: 30°;
- Número de transientes (scans): 64.

Para as análises em CLAE, foi utilizado um cromatógrafo líquido Shimadzu contendo bombas Shimadzu LC-6AD, com unidade de degaseificação Shimadzu DGU-20A5r, os módulos controlados por um controlador Shimadzu CBM-20, equipado com um amostrador automático Shimadzu SIL-10AF e um forno de coluna Shimadzu CTO-20A. A separação foi feita usando uma coluna C18 com 250 mm de comprimento e 4.6 mm de diâmetro interno, e com fase estacionária de sílica gel de fase reversa octadecilsilano (C18), com partículas de 5 µm de diâmetro. Para detecção foi usado um detector espectrofotométrico de arranjo de fotodiodos Shimadzu SPD-M20A ajustado a 233 nm. Para processamento dos dados foi utilizado o software LabSolutions 2.0. A fase móvel consistia de 60% de acetonitrila e 40% de água Milli-Q contendo 0,1% de ácido trifluoracético, em um fluxo de 0.9 mL/min.

Foi utilizado um purificador de água milliQ Elga-Purelab Classic Di-MK2 (Nova Analítica Imp. Exp. Ltda) para preparação da água para as análises, um sistema de filtração a vácuo juntamente com uma bomba de vácuo Primatec, para remover possíveis impurezas e o ar dissolvido nos solventes utilizados na fase móvel para CLAE.

Para a pesagem das amostras foi utilizada uma balança analítica Shimadzu ATX224, um agitador automático Vortex Mixer S0200 (Labnet International, Inc.) para garantir uma extração eficiente de GLZ e uma centrífuga Low speed SL 16 RAV (Spinlab) para acelerar o processo de sedimentação das amostras.

### **4.3 Reagentes e Solventes**

Foram utilizados, acetonitrila para HPLC (J.T Baker, Avantor), ácido trifluoracético (99%, Sigma Aldrich), água Milli-Q produzida no Laboratório de Eletroquímica e Química Ambiental da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) e clorofórmio deuterado (99,8% D com 0.5% de TMS, Sigma Aldrich, CDCl<sub>3</sub>).

### **4.4 Padrões**

Como padrão de referencia primário foi utilizado a substância química de referência (SQR) gliclazida 99,8% (GLZ) e adquirida no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, INCQS/FIOCRUZ (lote 1057).

A amostra da solução de referência da GLZ foi feita pesando-se exatamente cerca de 10 mg da SQR e diluindo-se em 10 ml de clorofórmio deuterado.

O tereftalato de dimetila (DMT 99.0%) foi adquirido da Sigma Aldrich Brasil Ltda. (lote BCBX9603), para ser usado como padrão interno.

A amostra do padrão interno foi feita pesando-se exatamente cerca de 3,7 mg de DMT e diluindo em 1 ml de CDCl<sub>3</sub>.

### **4.5 Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo diodos (CLAE/DAD)**

#### ***4.5.1 Desenvolvimento do método***

Na fase de desenvolvimento do método por CLAE/DAD foram observados os seguintes parâmetros de desempenho: a seletividade do método para a separação do pico da GLZ em relação aos interferentes e tempo de retenção de acordo com a concentração de acetonitrila.

A seletividade foi investigada em amostras preparadas com comprimidos de GLZ da seguinte forma:

- a) Determinou-se o peso médio de 20 comprimidos de GLZ;
- b) Trituraram-se os comprimidos para obtenção de um pó fino e homogêneo;
- c) Pesou-se exatamente cerca de 20,0 mg do pó dos comprimidos de GLZ;
- d) Diluiu-se o pó em 20 ml de acetonitrila;
- e) Agitou-se por aproximadamente 1 hora;
- f) Filtrou-se a solução com um papel de filtro;
- g) Transferiu-se 1 ml para um balão volumétrico de 10 ml;
- h) Adicionou-se acetonitrila qsp 10 ml;
- i) Obteve-se a solução na concentração de 100 µg/ml;
- j) Posicionou-se o vial no amostrador automático e injetou-se 20 µL para testes experimentais prévios.

#### **4.5.2 Validação do método**

A validação do método foi realizada de acordo com a RDC n° 166/2017 da ANVISA (BRASIL, 2017).

Os parâmetros avaliados por CLAE foram: linearidade, precisão e exatidão. A validação utilizou o padrão de referência primário de GLZ e para a preparação da solução estoque utilizou-se as seguintes etapas, em três dias alternados para realização dos ensaios.

- a) Pesou-se exatamente cerca de 10 mg do padrão de referência;
- b) Transferiu-se para balão volumétrico de 10 ml;
- c) Dissolveu-se em solução de acetonitrila no balão volumétrico e completou-se o volume para 10 ml. Essa solução estoque foi guardada em refrigerador até o momento do ensaio.

##### **4.5.2.1 Linearidade**

Com a solução estoque previamente preparada a 1mg/ml, foi analisada a linearidade do método em três dias consecutivos. Para isso, utilizaram-se seis concentrações distintas do padrão de referência de GLZ, cuja medida foi realizada em triplicata. As amostras para a curva de calibração foram completadas utilizando água: acetonitrila (60:40, v/v). Utilizando-se uma micropipeta foram realizadas diluições para obter as concentrações na faixa de 20 a 100µg/ml, com os seguintes volumes:

- 1.176  $\mu\text{L}$  de água: acetonitrila (60:40, v/v) e 24  $\mu\text{L}$  da solução mãe, obtendo-se concentração nominal de 20  $\mu\text{g/ml}$ ;
- 1.164  $\mu\text{L}$  de água: acetonitrila (60:40, v/v) e 36  $\mu\text{L}$  da solução mãe, obtendo-se concentração nominal de 30  $\mu\text{g/ml}$ ;
- 1.152  $\mu\text{L}$  de água: acetonitrila (60:40, v/v) e 48  $\mu\text{L}$  da solução mãe, obtendo-se concentração nominal de 40  $\mu\text{g/ml}$ ;
- 1.128  $\mu\text{L}$  de água: acetonitrila (60:40, v/v) e 72  $\mu\text{L}$  da solução mãe, obtendo-se concentração nominal de 60  $\mu\text{g/ml}$ ;
- 1.104  $\mu\text{L}$  de água: acetonitrila (60:40, v/v) e 96  $\mu\text{L}$  da solução mãe, obtendo-se concentração nominal de 80  $\mu\text{g/ml}$ ;
- 1.080  $\mu\text{L}$  de água: acetonitrila (60:40, v/v) e 120  $\mu\text{L}$  da solução mãe, obtendo-se concentração nominal de 100  $\mu\text{g/ml}$ .

A linearidade foi avaliada pela análise de uma curva de calibração, onde se observa o valor de critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação ( $r^2$ ), que deve ser maior ou igual a 0,999 (BRASIL, 2017).

#### 4.5.2.2 Exatidão

A exatidão do método foi determinada em três dias consecutivos a partir da quintuplicata de três concentrações distintas. As concentrações escolhidas foram baixa (20  $\mu\text{g/ml}$ ), média (40  $\mu\text{g/ml}$ ) e alta (80  $\mu\text{g/ml}$ ). A concordância entre o valor nominal e o valor teórico das amostras de GLZ foi comparada para avaliar a exatidão do método. As concentrações nominais foram calculadas por meio da equação obtida na curva de calibração dos ensaios de linearidade.

#### 4.5.2.3 Precisão

A precisão foi analisada a partir da repetibilidade, onde as amostras foram avaliadas sob as mesmas condições de preparo, analista, operação e instrumentação em uma única corrida analítica. Para tais ensaios foram utilizadas as mesmas amostras do ensaio de exatidão, 20, 40 e 80  $\mu\text{g/ml}$ . A precisão foi expressa por meio do desvio padrão relativo.

## 4.6 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear quantitativa de hidrogênio (RMN- $q$ - $^1\text{H}$ )

### 4.6.1 Desenvolvimento do método

Em testes prévios, foram analisadas as amostras dos padrões de GLZ e de DMT separadamente para observar a relação sinal/ruído dos sinais e em seguida uma amostra contendo os dois padrões para observar se os sinais não se sobrepunham no espectro de RMN.

Os espectros foram obtidos em um espectrômetro Bruker 300 MHz para o hidrogênio. O software utilizado na obtenção e processamento dos dados foi o Topspin versão 3.2.

Com a visibilidade dos sinais, foi possível determinar o tempo de relaxamento ideal para a aquisição completa dos dados. Utilizando a amostra contendo os padrões da GLZ (10 mg) e do DMT (3,7 mg) para 1 ml de clorofórmio deuterado, foram retirados 650  $\mu\text{l}$  e transferido para o tubo de RMN, utilizando uma micropipeta automática. O volume resultante do tubo foi conferido e o tubo foi vedado com parafilm e devidamente identificado. Em seguida foi realizado o experimento de inversão/recuperação para a determinação do tempo em que a magnetização longitudinal fosse recuperada.

No experimento de inversão/recuperação foi analisado o tempo de recuperação da magnetização longitudinal, para isso, foram aplicados pulsos de  $180^\circ$  e na sequencia novos pulsos de  $90^\circ$ , variando D7 em 11 valores: 0; 0.3; 0.6; 0.9; 1.2; 1.5; 1.8; 2.1; 2.4; 2.7; 3.0. Depois de obtidos os espectros, a intensidade do sinal foi observada e os sinais foram integrados.

Para encontrar uma equação que nos fornecesse uma fórmula matemática para a comparação dos dados obtidos através das integrais, foi utilizada a equação 9:

$$M_z = M_0 \left( 1 - e^{-\left(\frac{\tau}{T_1}\right)} \right) \quad (9)$$

Onde,  $M_z$  e  $M_0$  representam a magnetização ao longo do eixo z após o tempo de espera e o equilíbrio térmico, respectivamente. O tempo de relaxamento é indicado na equação como  $T_1$  e o  $\tau$  é o tempo entre pulsos de radiofrequência.

Através dessa equação foi concluída a equação 10:

$$a = \frac{1}{T1} \quad (10)$$

Onde;  $\alpha$  é o coeficiente angular da equação linear referente às integrais obtidas nos espectros dos experimentos de inversão/recuperação para cada pico encontrado separadamente. No total foram analisadas 11 regiões em cada um dos 11 experimentos com variação nos valores de D7. Dessa forma o valor de T1 é multiplicado por 5, o que garante o relaxamento completo dos prótons presentes na amostra.

A aquisição dos espectros de RMNq-  $^1\text{H}$  foi feita com uma sequencia de pulsos zg30, que constituiu um atraso de relaxamento (delay – D1) de 14s, pulso de 30° (pulse angle), tempo de aquisição de 2,68s (acquisition time – aq). O shimming foi feito manualmente buscando definição e resolução do sinal do solvente clorofórmio deuterado com 0,5% de TMS em 0 PPM.

Os espectros foram adquiridos 64 vezes (ns), com uma janela espectral de 10 ppm (spectral width – sw) para 300 Mhz. As aquisições ocorreram em uma temperatura ambiente de 25°C.

O processamento da FID foi feito com software Topspin 3.2 pela aplicação do zero filling (16k) e foi feito o ajuste manual de fase e da linha de base. Os deslocamentos químicos foram referenciados com o TMS em 0 ppm. A integração foi feita manualmente nos sinais de 8.10 ppm do DMT e 7.94 ppm da GLZ.

#### **4.6.2 Validação do método**

##### **4.6.2.1 Seletividade**

Neste trabalho, a seletividade/especificidade do método de análise por RMNq- $^1\text{H}$  H foi avaliada utilizando a seguinte estratégia:

A1- Foi preparada uma amostra de solução padrão de referência de GLZ na concentração de 10 mg/ml. Pesou-se exatamente cerca de 10 mg de GLZ padrão e transferiu-se para um tubo tipo Eppendorf®. Posteriormente, foi diluído com 1 ml de clorofórmio deuterado até completa solubilização. Foi retirada uma alíquota de 650 µl dessa solução com auxílio de uma micropipeta automática e transferido para um tubo de RMN. Esse tubo foi devidamente identificado e vedado com parafilm para análise no espectrômetro.

A2- Utilizando uma amostra de padrão interno de DMT, foi realizada a segunda análise. A amostra foi preparada na concentração de 3,7 mg/ml de DMT. Primeiramente, pesou-se exatamente cerca de 3,7 mg de DMT e transferiu-se para um tubo tipo Eppendorf®. Posteriormente, foi diluído com 1 ml de clorofórmio deuterado e transferido 650 µl da solução para o tubo de RMN, que foi devidamente identificado e vedado com parafilm para realização da análise no espectrômetro.

A3- A terceira amostra continha o padrão de referencia da GLZ e o padrão interno DTM para avaliar se não ocorria a sobreposição dos picos no espectro. Pesou-se exatamente cerca de 10 mg de GLZ e 3,7 mg de DMT e transferiu-se para um Etubo tipo Eppendorf®, em seguida diluiu-se com 1 ml de clorofórmio deuterado e transferiu-se 650 µl para um tubo de RMN para prosseguir com a análise no espectrômetro.

A4- A amostra 4 foi composta por uma solução contendo pó dos comprimidos de GLZ triturados e o padrão interno DMT diluídos em clorofórmio deuterado. Em testes preliminares, a concentração de 6,5 mg/ml de GLZ nos forneceu uma boa relação sinal/ruído e não causava inhomogeneidade no campo magnético. Para alcançar essa concentração, foram pesados 34,8 mg do pó do medicamento triturado e 3,7 mg de DMT e diluído em 1 ml de clorofórmio deuterado em tubo tipo Eppendorf®. Em seguida utilizou-se um agitador automático durante 30 minutos, para garantir completa solubilização. Feito isto, o tubo tipo Eppendorf® foi levado a uma centrifuga durante 5 minutos para que fossem separados os excipientes do principio ativo solubilizado. Foi coletado o sobrenadante da fase límpida com auxílio de uma micropipeta automática e levado ao tubo de RMN para análise em espectrômetro, após identificação e vedação do mesmo.

#### 4.6.2.2 Linearidade

A linearidade do método desenvolvido foi avaliada por meio da análise de seis concentrações do padrão de referência de GLZ cobrindo uma faixa de concentração entre 0,5

a 8 mg/ml. O ensaio foi realizado de acordo com as condições experimentais previamente estabelecidas. A linearidade foi avaliada pelo valor de critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação ( $r^2$ ), que deve ser maior ou igual a 0,999, segundo o Guia para tratamento estatístico da validação analítica (BRASIL, 2017).

O preparo de soluções foi feito a partir de uma mesma solução estoque, sendo esta preparada a partir da pesagem de 20 mg da SQR, que foi diluída em 2 ml de clorofórmio deuterado, preparando assim, uma solução mãe na concentração de 1 mg/ml. O DMT foi pesado separadamente 06 vezes e transferido para 06 tubos tipo Eppendorf®s diferentes, para manter a mesma concentração de padrão interno em todas as amostras.

A partir da solução mãe de 1 mg/ml, foram feitas diluições retirando alíquotas da solução mãe e transferindo para o tubo tipo Eppendorf® contendo o padrão interno, que originaram as seguintes concentrações: 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 mg/ml, estas foram preparadas segundo a tabela 2.

Tabela 2 - Preparação das amostras para teste de linearidade.

Vol. da solução estoque de gliclazida ( $\mu\text{L}$ )	Vol. de $\text{CDCl}_3$ ( $\mu\text{L}$ )	Concentração final (mg/ml)
30	570	0.5
60	540	1
120	480	2
240	360	4
360	240	6
480	120	8

Cada diluição foi realizada no momento da análise para evitar evaporação do clorofórmio deuterado. Assim após cada diluição, o conteúdo do tubo tipo Eppendorf® foi transferido para o tubo de RMN e em seguida a análise foi realizada com os parâmetros pré-estabelecidos.

#### 4.6.2.3 Precisão

Para avaliação da precisão foi preparado uma solução com concentração da SQR na concentração de 5mg/ml. Pesou-se 2,75 g de SQR de GLZ e 3,7 g de padrão interno e transferidos para um tubo tipo Eppendorf®. Em seguida foi diluído com 550 µl de clorofórmio deuterado. Com ajuda de uma micropipeta automática, o conteúdo do tubo tipo Eppendorf® foi transferido para o tubo de RMN, que foi devidamente identificado e vedado para análise no espectrômetro.

Foram realizadas 6 análises da mesma amostra para verificar a precisão do método.

#### 4.6.2.4 Exatidão

Para o teste de exatidão foram preparadas cinco amostras de cada concentração. Foram utilizadas concentrações baixas, médias e altas (baixa: 2 mg/ml, média: 5 mg/ml, alta: 8 mg/ml). Para a preparação das amostras foi usada a seguinte estratégia:

- a) Preparou-se uma solução mãe do padrão de referência de GLZ de 10 mg/ml.
- b) Pesou-se 45 mg do padrão de referencia primário.
- c) Diluiu-se em um balão volumétrico contendo 4,5 ml de  $CDCl_3$ .
- d) Preparou-se uma solução mãe do padrão interno (DMT) de 17 mg/ml.
- e) Pesou-se 3,4 mg do padrão interno.
- f) Diluiu-se em um balão volumétrico contendo 2 ml de  $CDCl_3$ .
- g) Prepararam-se cinco amostras na concentração de 2 mg/ml utilizando a técnica de diluição das soluções mães de GLZ e DMT e completando o volume de 500 µL com o solvente  $CDCl_3$  puro.
- h) Prepararam-se cinco amostras na concentração de 5 mg/ml utilizando a técnica de diluição das soluções mães de GLZ e DMT e completando o volume de 500 µL com o solvente  $CDCl_3$  puro.
- i) Prepararam-se cinco amostras na concentração de 8 mg/ml utilizando a técnica de diluição das soluções mães e completando o volume de 500 µL com o solvente  $CDCl_3$  puro, como está descrito na tabela 3.

Tabela 3 - Preparação de amostras para o teste de exatidão.

Solução estoque de GLZ	Solução estoque de DMT	Diluições (µl)	Conc. Final (mg/ml)
10 mg/ml	17,1 mg/ml	100+100+300	2
		100+100+300	2
		100+100+300	2
		100+100+300	2
		100+100+300	2
		250+100+150	5
10 mg/ml	17,1 mg/ml	250+100+150	5
		250+100+150	5
		250+100+150	5
		250+100+150	5
		250+100+150	5
		400+100	8
10 mg/ml	17,1 mg/ml	400+100	8
		400+100	8
		400+100	8
		400+100	8
		400+100	8
		400+100	8

Após a preparação das amostras, foi realizada uma análise para cada amostra no espectrômetro com os parâmetros previamente estabelecidos.

Para o cálculo da concentração real de GLZ na amostra, utilizou-se a equação 11:

$$Cx = \frac{Ix}{Istd} \times \frac{Nstd}{Nx} \times mstd \quad (11)$$

#### 4.6.2.5 Robustez

Para avaliação da robustez dos métodos, os parâmetros importantes para aquisição dos dados foram variados passo a passo em uma ampla faixa de intervalo a partir do padrão de referência primário. A tabela 4 resume todos os parâmetros examinados e suas variações.

Tabela 4 - Parâmetros avaliados no teste de robustez.

Parâmetro	Sigla	Variação
Número de scans	NS	8, 16, 32, 64, 128, 256, 512
Atraso de relaxamento	D1 (s)	6, 10, 14, 18, 22, 26
Domínio de tempo	TD (k)	8, 10, 14, 16, 18, 20, 22
Janela espectral	SWH (ppm)	10, 20
Duração do pulso	P1 ( $\mu$ s)	11, 12, 13

#### 4.7 Quantificação

As 36 amostras do pó do comprimido foram preparadas para determinar o teor de GLZ pelos métodos de CLAE-DAD e RMNq-<sup>1</sup>H, como está descrito na Figura 12 a seguir.

Figura 12 - Fluxograma para determinação de GLZ nos métodos desenvolvidos.



Fonte: Próprio autor.

Foram preparadas seis amostras de cada um dos seis lotes disponíveis para determinar o teor de GLZ no pó dos comprimidos, sendo que três amostras de cada lote foram destinadas a determinação pelo método desenvolvido de RMNq-<sup>1</sup>H, e as outras três amostras de cada lote foram destinadas a determinação pelo método farmacopeico oficial, CLAE.

- a) Determinou-se o peso médio de 20 comprimidos de cada lote (Tabela 5)
- b) Triturou-se os 20 comprimidos de cada lote com ajuda de um grau e pistilo até obter um pó fino;
- c) Homogeneizou-se o pó triturado;
- d) Pesaram-se seis amostras de cada lote para obter concentrações específicas (Tabela 6);
- e) Diluíram-se as três amostras de cada um dos seis lotes que iriam para a determinação em CLAE-DAD em 50 ml acetonitrila em balão volumétrico;

- f) Agitou-se por cerca de 1 hora;
- g) Filtrou-se com papel filtro e funil;
- h) Pipetou-se 2 mL do filtrado e diluiu-se em 50 ml de uma solução água: acetonitrila (60:40, v/v).
- i) Transferiu-se 1,5 ml da solução final para três vials diferentes de CLAE;
- j) As outras três amostras de cada lote que iriam para a determinação por RMNq-<sup>1</sup>H foram dissolvidas em 1 ml de clorofórmio deuterado;
- k) Agitou-se por cerca de 1 hora;
- l) Centrifugou-se;
- m) Retirou 600 µL do sobrenadante e transferiu-se para um tubo tipo Eppendorf® contendo 3,4 mg/ml de DMT;
- n) Após diluição com DMT, transferiu-se 550 µL para um tubo de RMN;
- o) Dessa forma foram analisadas 36 amostras finais, sendo três amostras de cada um dos seis lotes de comprimidos de GLZ destinadas à análise por CLAE-DAD e três amostras de cada um dos seis lotes destinadas a análise em RMNq-<sup>1</sup>H.

Tabela 5 - Peso médio dos comprimidos de GLZ.

Lote	Nº do Lote	Peso médio (g)
A	3012513	0,1449
B	L1M8155	0,1464
C	L1M9594	0,1451
D	3012426	0,1465
E	AB43641	0,1450
F	L1P3154	0,1458

Tabela 6 - Concentração nominal de GLZ nas amostras destinadas à quantificação.

Lote	Amostra	Concentração nominal das amostras para HPLC ( $\mu\text{g/ml}$ )	Concentração nominal das amostras para RMNq- $^1\text{H}$ (mg/ml)
A	1	33,13	3,98
	2	33,13	3,98
	3	30,21	3,98
B	1	32,80	4,00
	2	32,81	4,00
	3	32,86	4,00
C	1	33,16	4,03
	2	33,25	4,03
	3	33,25	4,03
D	1	32,98	4,00
	2	32,85	4,00
	3	32,93	4,00
E	1	33,19	4,01
	2	33,15	4,01
	3	33,27	4,01
F	1	33,15	4,03
	2	33,12	4,03
	3	33,10	4,03

A quantificação experimental de GLZ foi obtida pela área sob o pico cromatográfico em 7,3 minutos e aplicado a equação da reta obtida na curva de calibração com o padrão de referencia primário.

Para o cálculo da quantificação experimental de GLZ em RMNq-<sup>1</sup>H H utilizou-se a relação entre as áreas sob dos picos da GLZ em 7,9 ppm e do DMT em 8,1 ppm. Depois de obtida essa relação, a fórmula utilizada para a quantificação está descrita na equação 12.

$$Px = \frac{Ix}{Istd} \times \frac{Nstd}{Nx} \times \frac{Mx}{Mstd} \times \frac{mstd}{mx} \times Pstd \quad (12)$$

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

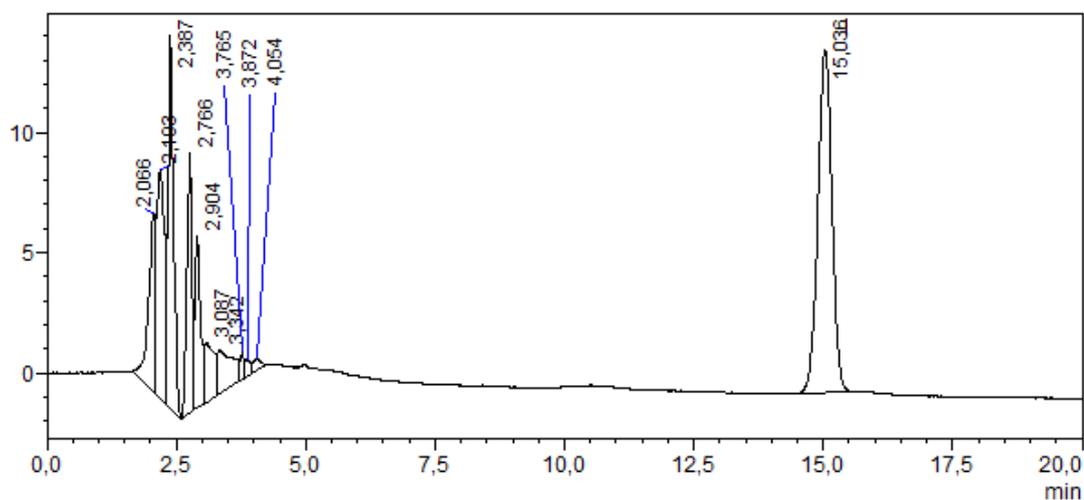
### 5.1 CLAE-DAD

#### 5.1.1 *Desenvolvimento do método*

Como não há metodologia analítica para a GLZ descrita na Farmacopeia Brasileira, optamos por adotar como metodologia aquela descrita na Farmacopeia Britânica (2005). O método para análise de teor descrito na monografia da Farmacopeia Britânica para o FÁRMACO GLZ utiliza nas especificações cromatográficas uma coluna de aço inoxidável de 0,25 m de comprimento e 4 mm de diâmetro, empacotada com sílica gel octilsilil (5 µm). Na fase móvel utiliza-se um fluxo de 0,9 ml/min de uma mistura de 0,1% de trietilamina, 0,1% de ácido trifluoroacético, 45% de acetonitrila e 55% de água. Para detecção utiliza-se um detector de ultravioleta ajustado para 235 nm. Consideramos essa metodologia como ponto de partida para o desenvolvimento do método de quantificação das amostras de GLZ por CLAE-DAD neste estudo.

No desenvolvimento de um método cromatográfico deve-se buscar a obtenção de uma resolução satisfatória, uma boa seletividade e um tempo de análise razoável (PASCHOAL *et al.*, 2008). Para os comprimidos de GLZ, tomou-se como base a metodologia descrita por Al-Omary (2017) estabelece que para o processo de extração da GLZ do pó dos comprimidos do medicamento, deve-se agitar 0,8 g de GLZ por 1 hora em um balão volumétrico com 200 mL de acetonitrila. Após extração, deve-se filtrar e diluir 10 mL do filtrado para 200 mL com uma mistura de 2 volumes de acetonitrila e 3 volumes de água. Utilizando as especificações do método farmacopeico para GLZ e a metodologia descrita por Al-Omary (2017), inicialmente, analisou-se uma solução de pó dos comprimidos de GLZ a 100 µg/ml a fim de investigar a influência da composição da fase móvel no tempo de retenção do analito. Após a primeira corrida cromatográfica obtivemos o cromatograma que consta na Figura 13.

Figura 13 - Cromatograma inicial da amostra do pó dos comprimidos de GLZ a 100 ug/mL obtido com as condições cromatográficas descritas do método farmacopeico (2005).

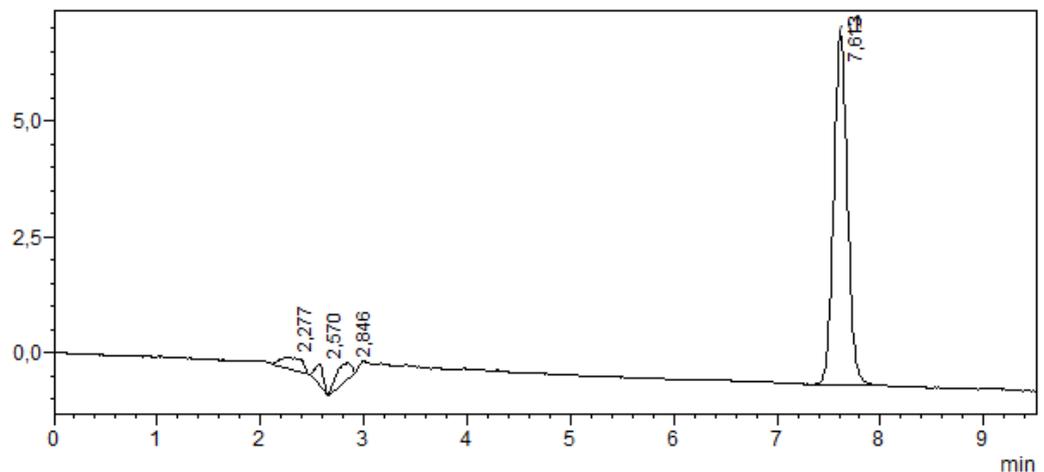


O tempo de retenção representa o tempo em que o analito fica retido na fase estacionária (PASCHOAL *et al.*, 2008) em relação a um analito não retido. Ao observamos o cromatograma da Figura 1, constatou-se que o tempo de retenção da GLZ foi de 15 minutos, um tempo relativamente alto que poderia ser devido à baixa proporção de acetonitrila na fase móvel. Dessa forma optou-se por algumas adaptações no método a fim de diminuir o tempo de retenção da GLZ e diminuir o consumo de fase móvel.

A fase móvel avaliada foi: 40% de acetonitrila para o solvente B e 60% de água acidificada com 0,1% de ácido trifluoracético para o solvente A. Através dessa análise, pode-se verificar que o método identificou o analito de interesse, mesmo com outros componentes presentes na amostra, como os vários excipientes do comprimido, mostrando uma boa seletividade. Observou-se que os solventes escolhidos proporcionavam um pico com boa resolução.

Com a fase orgânica estabelecida, avaliou-se a composição da fase móvel no tempo de retenção. O melhor tempo de retenção da GLZ foi obtido utilizando uma eluição isocrática consistindo em: 60% de fase B e 40% de fase A. Esse aumento de 20% da fase B garantiu que a fase móvel torna-se menos polar, aumentando a força eluotrópica e fez com que o tempo de retenção da GLZ diminuísse de 15 minutos para 7,5 minutos, com tempo de corrida de 9,5 minutos. O perfil cromatográfico obtido após a otimização dessas condições pode ser observado na figura 14.

Figura 14 - Cromatograma da amostra do pó de comprimido da GLZ em 100 µg/ml, eluído com fase móvel água acidificada: acetonitrila (40:60, v/v).



Ao se analisar a faixa de comprimento de onda de 180 a 320 nm, observou-se o pico cromatográfico da GLZ com absorção máxima de comprimento de onda em torno de 235 nm.

Para prosseguir com a validação parcial do método, optou-se por reduzir o volume de solvente utilizado na preparação de amostras indicado pelo trabalho realizado por Al-Omary (2017).

### 5.1.2 Validação do método

Segundo a RDC n° 166/2017, um método já validado deve passar por uma validação parcial quando ocorrer à adaptação do método a diferentes laboratórios. Como está descrito na Farmacopeia Britânica (2005), o método oficial para a quantificação da GLZ é a CLAE. A partir desse método validado, este estudo fez algumas modificações no sentido de ajustar volume de amostra, de reagentes e tempo de retenção. Diante desta adaptação, se avaliou os parâmetros de precisão, exatidão e seletividade para a validação do método utilizando CLAE.

#### 5.1.2.1 Linearidade

A linearidade do método foi analisada em três dias consecutivos. Foram preparadas seis amostras com concentrações de 20 a 100 µg/ml, sendo cada amostra injetada em triplicata. Os resultados das injeções podem ser avaliados na tabela 7.

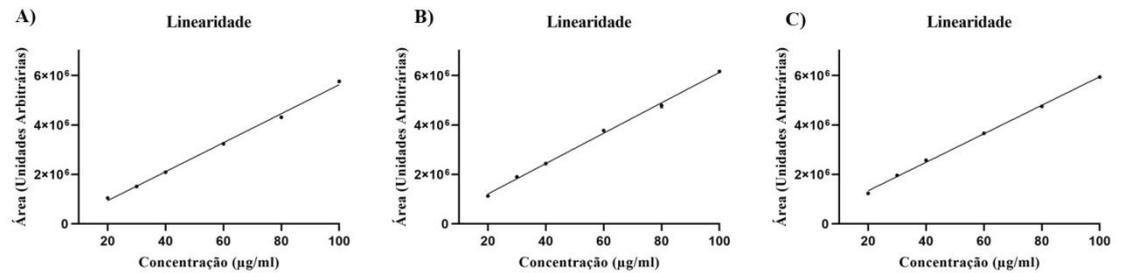
Tabela 7 - Resultados do teste de linearidade do método por CLAE, em três dias consecutivos, utilizando uma faixa de concentração de 20 a 100 µg/mL de GLZ (n=3).

<b>Dia</b>	<b>Concentração (µg/ml)</b>	<b>Área integrada (média)</b>	<b>Equação</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
DIA 1	20	1023434	$y = 58645x - 239520$	0.999
	30	1503132		
	40	2083484		
	60	3234877		
	80	4307174		
	100	5763547		
DIA 2	20	1123730	$y = 61487x - 25112$	0.999
	30	1896259		
	40	2429434		
	60	3766156		
	80	4759633		
	100	6164925		
DIA 3	20	1229565	$y = 57691x + 17907$	0.999
	30	1949278		
	40	2573404		
	60	3664480		
	80	4761727		
	100	5934128		

Os resultados obtidos através da regressão linear permitem concluir que o método é linear dentro do intervalo de concentrações estudadas cumprindo os critérios de aceitação estabelecidos de coeficiente de correlação ( $r^2$ ) maior ou igual que 0.999.

Na figura 15 estão apresentadas as três curvas de calibração obtidas para o teste de linearidade dos dias 1 (Figura 15 A), 2 (Figura 15 B) e 3 (Figura 15 C).

Figura 15 - Curvas de calibração obtidas a partir dos testes de linearidade por CLAE, utilizando uma faixa de concentração de 20 a 100 µg/mL de GLZ. A) Dia 1. B) Dia 2. C) Dia 3.



### 5.1.2.2 Exatidão

O método utilizado para o estudo da exatidão foi realizado preparando-se amostras com concentrações nominais conhecidas através do uso da SQR da GLZ. O teste foi realizado em três dias consecutivos a partir da quintuplicata de três níveis de concentrações distintas (20, 40 e 80 µg/ml). O valor experimental da concentração obtido nas amostras de GLZ foi calculado utilizando a equação da reta da curva de calibração plotada nos dias dos ensaios de exatidão. A concordância entre o valor nominal e o valor experimental das amostras de GLZ foi comparada para avaliar a exatidão do método. A porcentagem de ativo deveria se enquadrar entre 95 – 105% do valor nominal. Na tabela 8 estão apresentados os resultados obtidos para o teste de exatidão realizado por CLAE.

Tabela 8 - Valores de exatidão e precisão para os testes realizados em três dias consecutivos (número de replicatas por dia=5), utilizando as concentrações nominais de 20, 40 e 80 µg/mL de GLZ.

<b>Dia</b>	<b>Concentração estimada (µg/ml)</b>	<b>Área integrada (média)</b>	<b>Concentração encontrada (µg/ml)</b>	<b>Exatidão (%)</b>	<b>CV (%)</b>
DIA 1	20	1349154	19.95	100	3.47
	40	2591247	40.83	102	2.99
	80	5002948	81.36	102	3.18
DIA 2	20	1373577	20.36	102	3.28
	40	2632629	41.52	104	1.62
	80	5096999	82.94	104	1.91
DIA 3	20	1328821	19.61	98	3.93
	40	2631221	41.50	104	2.95
	80	5066647	82.43	103	2.01

Os resultados apresentados na Tabela 2 mostram que no dia 1 a exatidão do método para determinação de GLZ variou de 100 a 102%, no dia 2 essa variação foi de 102 a 104% e no dia 3 foi de 98 a 103%. Esses valores estão dentro dos critérios de aceitação para a o teste de exatidão.

### 5.1.2.3 Precisão

Para o ensaio de precisão foram utilizadas as mesmas amostras e concentrações do ensaio de exatidão, 20, 40 e 80  $\mu\text{g/ml}$ . A partir das análises da quintuplicata de cada nível de concentração, a precisão foi expressa por meio do desvio padrão relativo (DPR) entre essas análises. Como podemos observar na tabela 2, o DPR mostrou-se inferior a 5,0% em todas as concentrações e em todos os dias de ensaio realizado. Pode-se verificar que os resultados obtidos cumprem os critérios de aceitação estabelecidos pela RDC 166 de 2017 (ANVISA).

## 5.2 RMNq-<sup>1</sup>H

### 5.2.1 Desenvolvimento do método

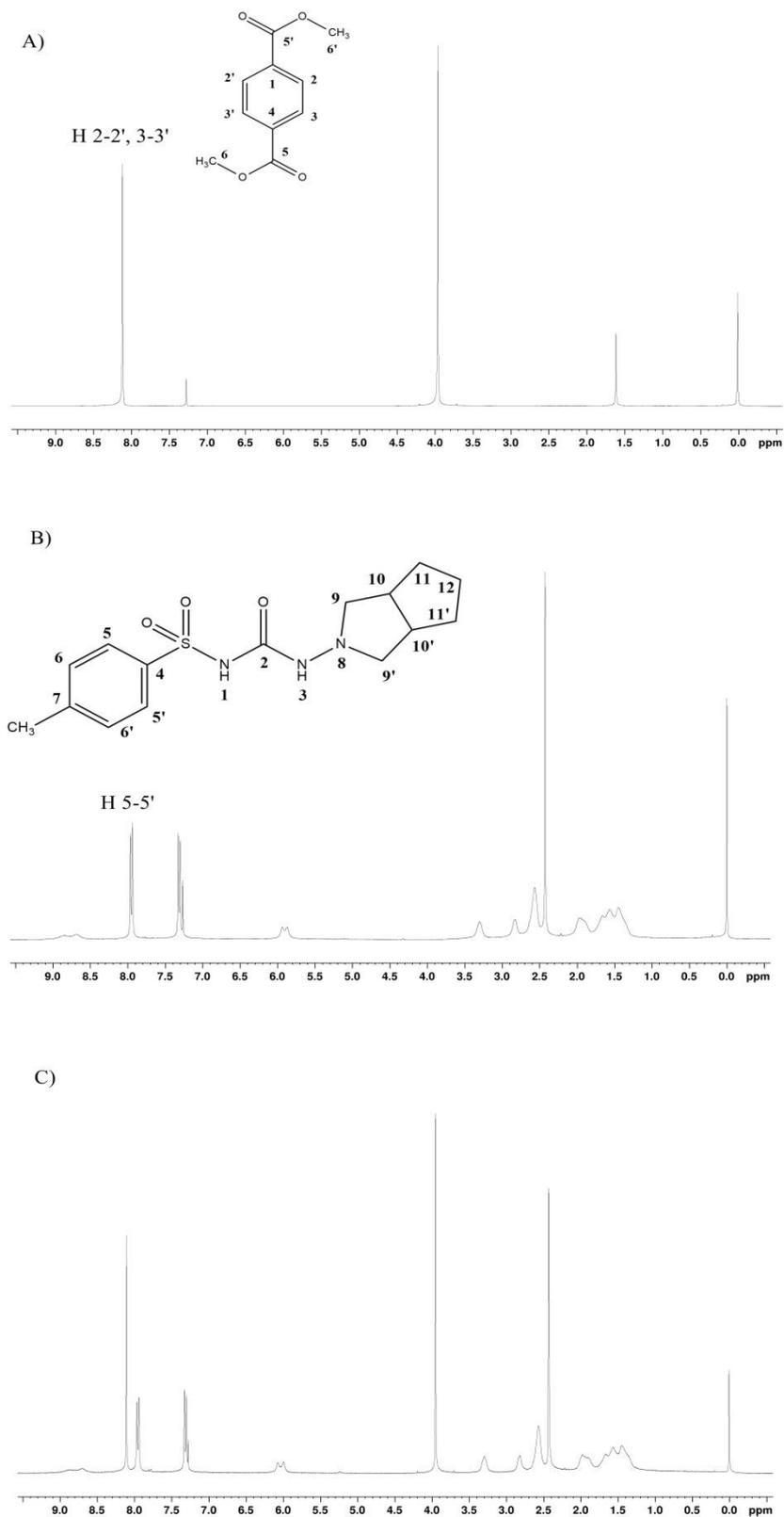
Preliminarmente, a amostra de GLZ passou pelo ensaio de solubilidade em  $\text{CDCl}_3$ . Este solvente foi escolhido como solvente para os experimentos de RMNq<sup>1</sup>-H, pois é um solvente deuterado barato, tem uma boa capacidade de solubilização da GLZ, e quase todos os dados de RMN para a GLZ disponíveis na literatura foram obtidos em  $\text{CDCl}_3$ . Em seguida, testou-se a solubilidade do padrão interno, DMT, em  $\text{CDCl}_3$ . O DMT mostrou boa solubilidade no solvente escolhido. Uma solução de 10 mg/mL de DMT foi transferida para um tubo de RMN para observar se os seus sinais não iriam se sobrepor aos sinais da GLZ nos espectros de RMN. O espectro mostrou que essa concentração resultaria um pico muito intenso na região de  $\delta$  8,1 ppm referente aos hidrogênios aromáticos. Diante disso reduzimos a concentração para 3,4 mg/mL de DMT, reduzindo o pico em até 3 vezes. Podemos observar o espectro obtido para o DMT na Figura 16 A.

Em seguida, uma amostra de GLZ na concentração de 10 mg/ml diluída em  $\text{CDCl}_3$  foi transferida para um tubo de RMN sem adição do padrão interno para observação do perfil do espectro. O espectro de GLZ obtido estava de acordo com os dados descritos na literatura em relação ao número de sinais, valores de deslocamento químico e multiplicidade

de sinais, mesmo com sinais largos e que não estão bem definidos devido ao uso de um espectrômetro de campo magnético inferior ao utilizado no trabalho usado como comparação (AL-OMARY, 2017). O espectro obtido através da análise de uma amostra em 10 mg/ml está apresentado na Figura 16 B.

Na Figura 16 C conseguimos analisar o espectro de RMNq-<sup>1</sup>H obtido através de uma mistura dos dois padrões em CDCl<sub>3</sub>. Através desse espectro podemos escolher os sinais para quantificação. O singlete em  $\delta$  8,1 ppm pertencente ao sistema aromático dissubstituído do DMT foi escolhido para determinação quantitativa do padrão interno. O singlete originado de prótons metílicos da GLZ em  $\delta$  2,4 ppm seria o sinal preferencial para quantificação da GLZ, entretanto a sobreposição de alguns sinais nessa região do espectro obtido em baixo campo (300 MHz) inviabilizou o uso deste sinal, pois esta sobreposição poderia causar erro na integração da área. Contudo, o uso de dubleto para quantificação também é muito usado na literatura (Hou *et al.*, 2014) (Liang *et al.*, 2014), dessa forma o sinal em  $\delta$  7,9 ppm (2H, H 5-5') pertencente ao sistema aromático da GLZ não se sobrepõe a nenhum outro sinal e pode ser utilizado para uma quantificação mais precisa pois possui uma boa relação sinal-ruído (S/N). Sendo assim, ele foi selecionado como o sinal analítico para fins quantitativos.

Figura 16 - Sobreposição de espectros por RMN. A) Padrão interno (DMT). B) Padrão de referência (GLZ). C) Solução mista.



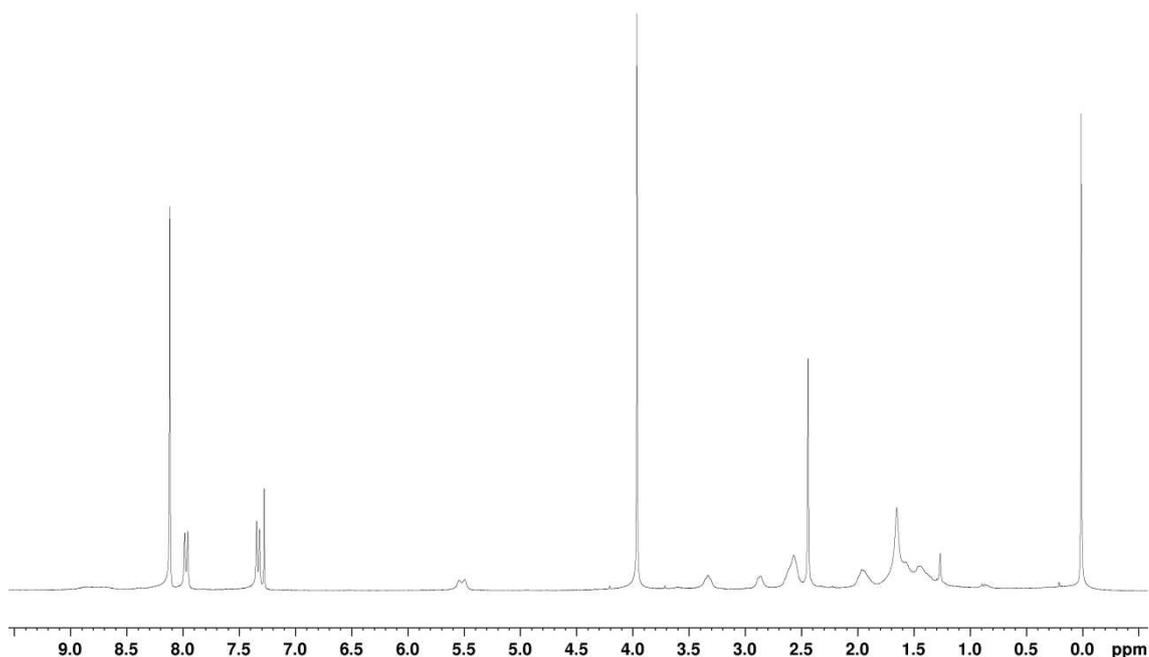
Na tabela 9 podemos observar os valores dos deslocamentos químicos, em ppm, para todos os prótons da GLZ apresentados nos sinais dos espectros anteriores.

Tabela 9 - Valores de deslocamento químicos (ppm) de todos os prótons da GLZ apresentados no espectro de RMNq-<sup>1</sup>H.

Próton	Deslocamento químico (ppm)
N1-H	5.91 d
N3-H	8.75 m
H5	7.95 d
H6	7.31 d
C-Me	2.42 s
H9eq	3.30 s
H9ax	2.83 m
H10	2.57 s
H11ax	1.44 m
H11eq	1.94 m
H12ax	1.66 m
H12eq	1.56 m

Com esse perfil de padrões bem definidos, preparou-se uma solução do pó dos comprimidos de GLZ a 10 mg/mL em CDCl<sub>3</sub> e observou-se o perfil do espectro. A figura 17 exhibe o espectro para o pó dos comprimidos de GLZ, na qual demonstra claramente que os picos selecionados para quantificação não se sobrepõem entre os constituintes de interesse e nem com sinais oriundos de potenciais interferentes presentes nos comprimidos, como algum excipiente que pudesse gerar sinais no espectro de RMN.

Figura 17 - Espectro de RMN para GLZ comprimidos.



O shimming realizado de forma manual acarretou um maior gasto de tempo, entretanto a utilização do solvente  $\text{CDCl}_3$  com TMS proporcionou facilidade na obtenção de homogeneidade nas amostras, conseqüentemente facilitando esse procedimento manual.

### 5.2.2 *Tempo de relaxamento*

Segundo Malz e Jancke (2005), o processo de relaxamento consiste no processo de retorno dos núcleos excitados para o estado fundamental. Esse processo segue a lei de variação exponencial representada na equação 13.

$$M_z = M_0 \left( 1 - e^{-\left(\frac{t}{T_1}\right)} \right) \quad (13)$$

O tempo necessário para o processo de relaxamento atingir o equilíbrio termodinâmico é chamado de tempo de relaxamento ( $T_1$ ). As variáveis utilizadas na equação 9 para o cálculo do relaxamento foram obtidas através do experimento de sequência de pulsos de inversão recuperação (Figura 18). Um valor de  $T_1$  adequado deve garantir que todos os átomos excitados retornem ao seu estado fundamental antes que possam ser excitados novamente por nova sequência de pulsos, garantindo assim a coleta completa do sinal, o que pode melhorar a sensibilidade do método.



### 5.2.3 Validação do método por RMNq-<sup>1</sup>H

O método de RMNq-<sup>1</sup>H foi validado para a determinação da GLZ usando DMT como padrão interno e a SQR da GLZ no preparo das amostras, segundo as recomendações da RDC n° 166/2017 da ANVISA (BRASIL, 2017), e de acordo com metodologia descrita em Al-Omary (2017).

#### 5.2.3.1. Seletividade

A seletividade define a capacidade do método em detectar o analito de interesse em meio a outros componentes da matriz, interferentes, produtos de degradação, impurezas. Os espectros do padrão interno, do padrão de referencia, da mistura dos dois e dos comprimidos de GLZ na presença do padrão interno são mostrados nas figuras 4 e 5, que demonstram que não houve nenhum interferente nos sinais escolhidos para quantificação.

#### 5.2.3.2. Linearidade

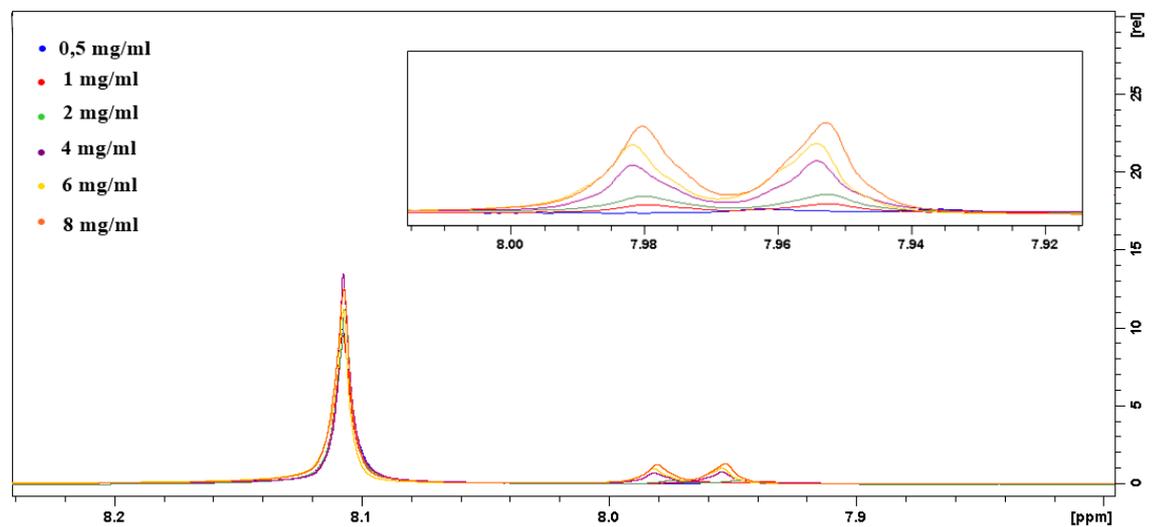
As curvas de calibração mostraram linearidade na faixa de concentração de 0,5 a 8 mg/ml para GLZ. O método não é sensível como outros métodos de quantificação, como a cromatografia líquida com detecção por ultravioleta ou como cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas, já que a espectroscopia de RMN é inerentemente pouco sensível e especialmente pelos espectros terem sido obtidos em espectrômetro de campo relativamente baixo (300 MHz). Porém, para o ensaio de teor o limite de detecção não é um parâmetro importante de ser determinado segundo a RDC n° 166/2017 da ANVISA (BRASIL, 2017).

O coeficiente de correlação obtido a partir da regressão linear curvas foi de 0,9999 quando dois prótons do sistema aromático em  $\delta$  7,9 ppm foram usados como sinais analíticos, conforme mostrado na Tabela 10. Os sinais analíticos do DMT referentes aos quatro prótons do sistema aromático e da GLZ referentes aos dois prótons do sistema aromático, aumentaram de acordo com o aumento da concentração. Essa relação pode ser observada na Figura 20. Os resultados indicaram que o método selecionado apresentou excelente linearidade nessas faixas de concentração.

Tabela 10 - Teste de linearidade por RMNq-<sup>1</sup>H na faixa de concentração de 0,5 a 8 mg/ml de GLZ.

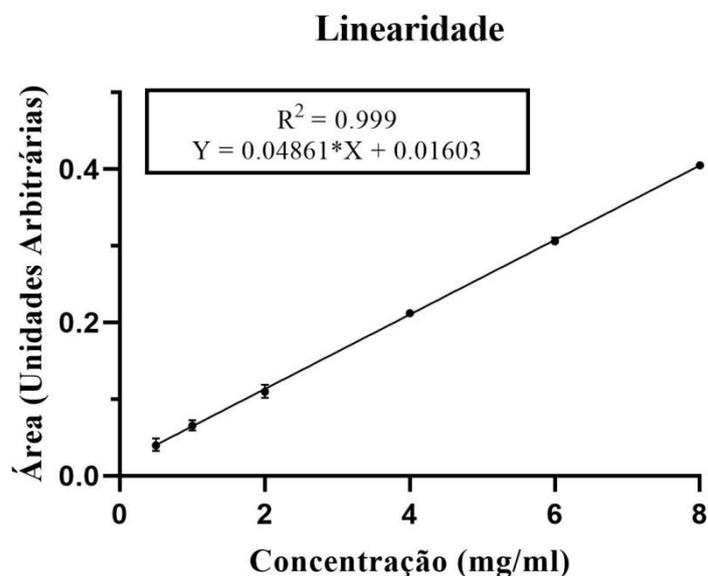
N°	Concentração de GLZ (mg/ml)	I x	I std	Ix/Istd
1	0,5	4326949038	1.08355E+11	0.039943
2	1.0	6202616482	94385045466	0.065716
3	2.0	11196205782	91995572602	0.111713
4	4.0	16976768590	77082466026	0.212247
5	6.0	22646909244	77973293204	0.306473
6	8.0	26494590285	66703163323	0.405218

Equação linear  $Y = 0.04861X + 0.01603$   
 $R^2 = 0,999$

Figura 20 - Sinais analíticos usados para quantificação do DMT e da GLZ obtidos por RMNq-<sup>1</sup>H na faixa de linearidade de 0,5 a 8 mg/ml.

A relação entre a concentração na solução de pó dos comprimidos analisados e as integrais obtidas nos espectros está representado no Gráfico 1.

Gráfico 1 - Curva de calibração obtida para comprovar a linearidade da técnica de RMNq-<sup>1</sup>H para a quantificação da GLZ.



Yang *et al.* (2015), relatou uma faixa de linearidade para o fármaco Tadalafil (p/p) de 0,47 a 3,88 por mg de 2,4-DNT, mostrando que para a GLZ obteve-se uma faixa mais ampla de linearidade. Hou *et al.* 2014, usaram uma faixa de concentração de 5.08 a 13.58 mg/mL para comprovar a linearidade do método de RMNq<sup>1</sup>-H para o fármaco avermectina, o que nos permite observar que a faixa usada neste presente trabalho abrange concentrações ainda menores. Quin *et al.* 2019, mostrou uma relação linear entre a concentração do fármaco topiramato e a área da integral dos sinais na faixa de 0 a 1 mg/ml. Neste estudo citado, observamos uma faixa linear que abrange concentrações baixas, entretanto o equipamento utilizado foi um espectrômetro de 400 MHz, o que garante uma melhor sensibilidade do método, devido ao campo magnético mais forte (MALZ; JANCKE, 2005). Isso reflete a capacidade do método de RMNq<sup>1</sup>-H de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito.

#### 5.2.3.3. Precisão

O teste de precisão foi realizado por análise de replicatas de amostras analisadas no mesmo dia e expresso pelo DPR para demonstrar a dispersão dos resultados. A repetibilidade foi testada nas mesmas condições de operação do equipamento, mesmo analista, mesmos reagentes, dia e mesmas condições ambientais, em pequeno espaço de tempo. Foi usado uma única solução teste com concentração de 5 mg/ml que foi determinada

seis vezes. O DPR para a repetibilidade intradia foi menor que 1%, o que mostrou que o método tem alta precisão e garante a viabilidade do método (Tabela 11).

Tabela 11 - Resultados do teste de precisão por RMNq-<sup>1</sup>H utilizando uma amostra com concentração de 5 mg/ml de GLZ.

N°	Ix	Istd	Ix/Istd
1	19560115152	79904157452	0.244794711
2	20170210496	79546357048	0.253565484
3	19374478320	80237567228	0.24146393
4	20370485756	79454422176	0.256379509
5	21551122664	89693237864	0.240275891
6	19142025756	80416516876	0.238035997
DPR = 0,75%			

#### 5.2.3.4. Exatidão

A exatidão de um método expressa a concordância entre o valor real do analito na amostra e o estimado pelo processo analítico. O método utilizado para o estudo da exatidão foi realizado com o uso da SQR da GLZ. O teste foi realizado através de 15 amostras de composição conhecida. As amostras foram preparadas em quintuplicata em três níveis de concentração: baixas, médias e altas. As cinco amostras de baixa concentração foram preparadas a 2 mg/ml. As cinco amostras de média concentração foram preparadas a 5 mg/ml. E por fim, as cinco últimas amostras de alta concentração foram preparadas a 8 mg/ml.

As 15 amostras foram analisadas e o sinal em  $\delta$  7,9 ppm (2H, H 5-5') referente à GLZ e em  $\delta$  8,1 ppm referente ao DMT, foram usados para quantificação das substâncias. Na tabela 12 podemos observar os resultados do teste de exatidão.

Tabela 12 - Resultados do teste de exatidão por RMNq-<sup>1</sup>H utilizando amostras de 2, 5 e 8 mg/ml de GLZ.

N°	Concentração (mg/ml)	Ix	Istd	Ix/Istd	Concentração real (mg/ml)	Valor médio (%)
1	2	3251374786	1.84E+10	0.176908	2.42	
2	2	7843485140	5.07E+10	0.154811	2.12	
3	2	1000906131	7.00E+09	0.142925	1.96	102.31
4	2	5630379200	4.53E+10	0.124269	1.70	
5	2	8211743160	5.51E+10	0.148969	2.04	
6	5	2.095E+10	5.47E+10	0.3832366	5.24	
7	5	2.042E+10	5.08E+10	0.4017459	5.50	
8	5	4.324E+09	1.17E+10	0.3711543	5.08	103.18
9	5	1.968E+10	5.47E+10	0.3600274	4.93	
10	5	2.097E+10	5.67E+10	0.3696091	5.06	
11	8	2.98E+10	4.58E+10	0.649890	8.60	
12	8	2.91E+10	4.77E+10	0.610786	8.09	
13	8	3.00E+10	4.62E+10	0.648376	8.58	104.36%
14	8	3.01E+10	4.65E+10	0.647482	8.57	
15	8	2.82E+10	4.73E+10	0.596411	7.90	

A média das cinco amostras de 2 mg/ml foi 102,31% em relação ao valor estimado. Enquanto que a média das cinco amostras de 5 mg/ml foi de 103,18% do valor esperado. E para a última concentração de 8 mg/ml, a média entre as cinco amostras foi de 104,36%. Esses resultados mostram que as médias dos três níveis de concentrações ficaram entre 95 – 105%, o que indica resultados aceitáveis para o teste de exatidão.

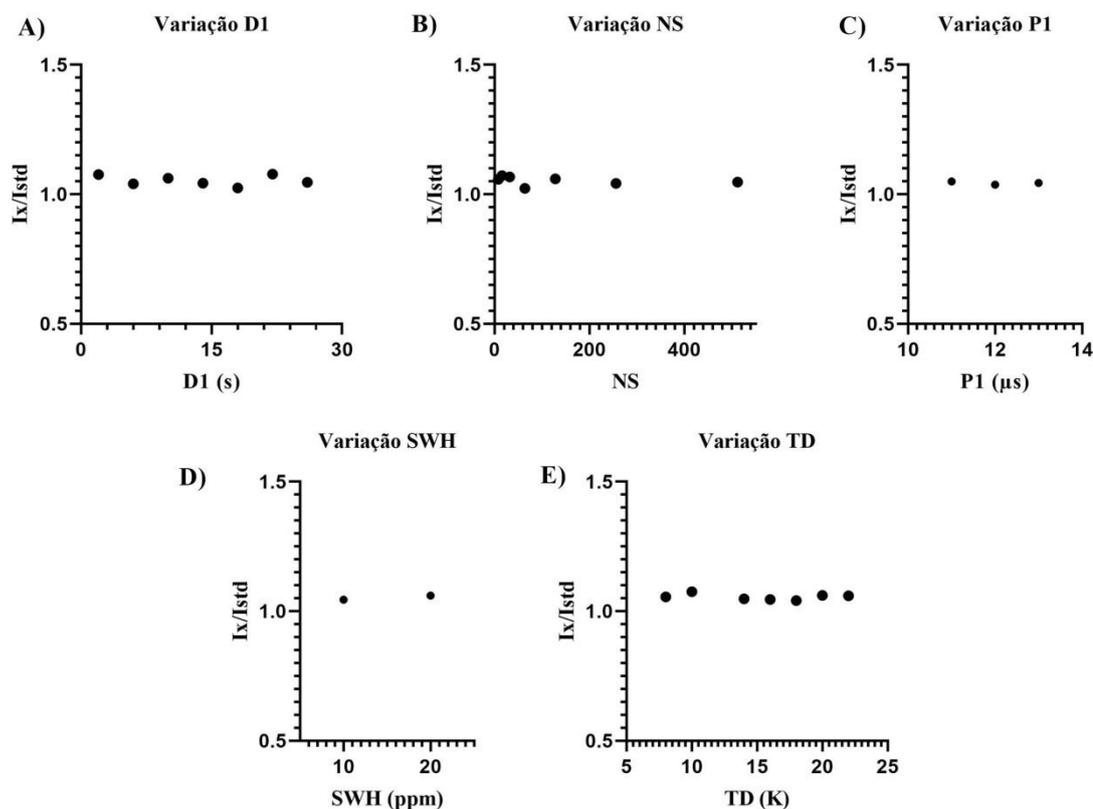
A maioria dos trabalhos encontrados na literatura utiliza o método de ensaios de recuperação na matriz para determinar a exatidão. Geralmente isso ocorre porque a SQR tem alto custo e também tem abrangência limitada de matrizes e analitos. Entretanto a utilização do método baseado no uso da SQR é preferida, pois está diretamente relacionada com padrões internacionais de pureza conhecida.

#### 5.2.3.5. Robustez

A robustez do método é a capacidade de permanecer inalterado sob pequenas variações nos parâmetros do método e fornece uma indicação de sua adequação durante a rotina laboratorial. A avaliação da robustez foi baseada na análise da diferença entre as integrais dos sinais escolhidos para quantificação, que foi obtida pela variação de cinco parâmetros de forma independente: o número de scans (NS), o atraso de relaxamento (D1), a duração do pulso (P1), o tamanho da janela espectral (SWH) e número de pontos para amostragem do FID (TD).

Todos os parâmetros avaliados mostram-se dentro do intervalo de 95 – 105% do valor definido como padrão, como foi representado na Figura 21. Sendo assim, o método mostrou-se bastante robusto em termos dos parâmetros acima mencionados.

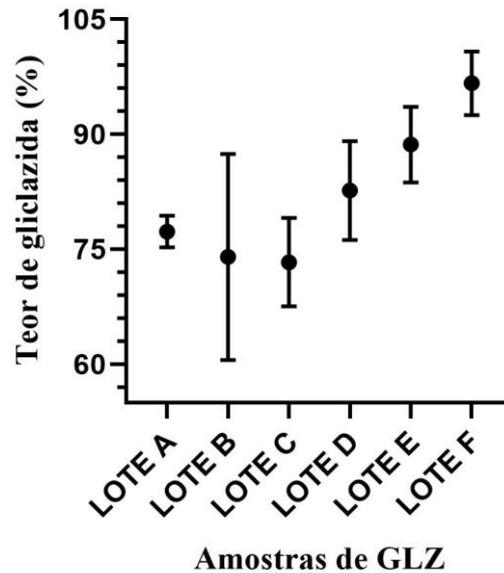
Figura 21 - Parâmetros e suas variações avaliadas no teste de robustez por RMNq<sup>1</sup>H utilizando uma amostra de GLZ de 5 mg/ml.



Onde, D1= atraso de relaxamento. NS = número de scans. P1 = Duração do pulso. SWH = janela espectral. TD = pontos para amostragem do FID.

### 5.3 Quantificação das amostras comerciais e comparação entre a determinação de teor realizada pelo método oficial (CLAE) e o método proposto (RMNq<sup>1</sup>H)

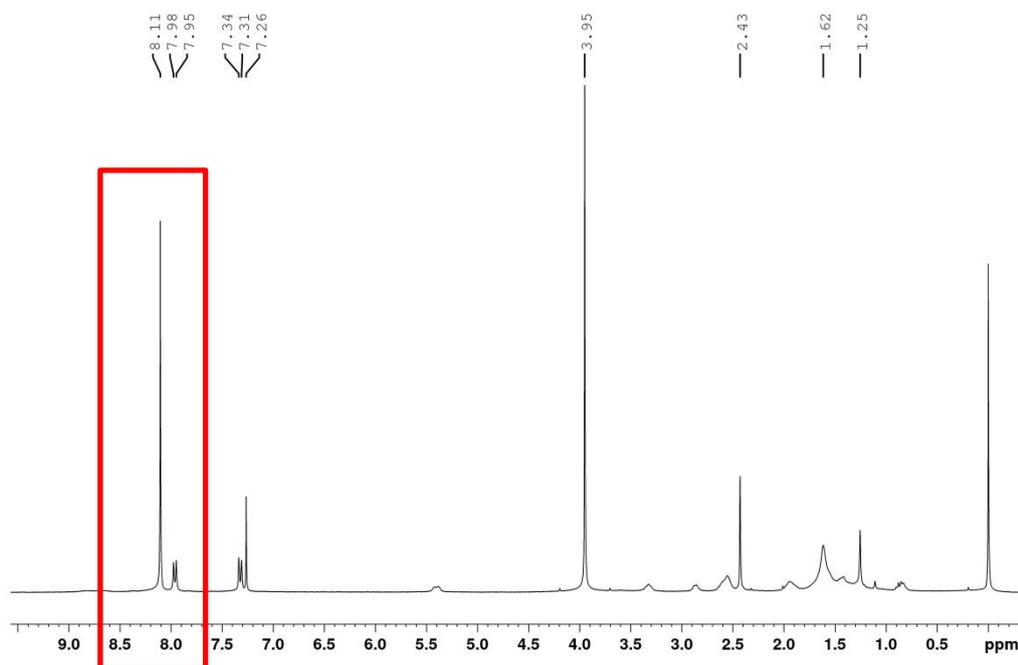
As primeiras 18 amostras de pó de comprimido da GLZ foram quantificadas inicialmente pelo método desenvolvido e validado de RMNq<sup>1</sup>H. O teor médio de GLZ em cada lote quantificado por RMNq<sup>1</sup>H está plotado no gráfico 2 e discriminado na tabela 13.

Gráfico 2 - Teor médio de GLZ em seis lotes comerciais quantificados por RMNq-<sup>1</sup>H.Tabela 13 - Teor médio de GLZ obtida pela quantificação de seis lotes comerciais por RMNq-<sup>1</sup>H.

Lote	Concentração nominal teórica de gliclazida (mg/ml)	Concentração experimental média (mg/ml)	Teor médio de GLZ (%)
A	3,98	3,06	77
B	4,00	2,92	73
C	4,03	2,94	73
D	4,00	3,32	83
E	4,01	3,57	89
F	4,03	3,87	96

Os resultados foram obtidos calculando a média da triplicata das integrais das amostras de cada um dos lotes e confrontando os dados com a concentração de GLZ estimada considerando-se 100% de pureza. Na Figura 22 podemos observar um exemplo da aquisição de um dos espectros de RMNq-<sup>1</sup>H para o comprimido de GLZ (sinal em 7,9 ppm), adicionado o DMT como padrão interno (sinal em 8,1 ppm) demarcando os sinais que foram usados para integração e conseqüentemente quantificação.

Figura 22 - Espectro de RMNq-  $^1\text{H}$  adquirido para quantificação do pó dos comprimidos de GLZ de amostras comerciais, assinalando os sinais usados para quantificação.



Dos resultados obtidos três dos seis lotes de GLZ apresentaram resultados abaixo de 80% do valor esperado e 2 dos 6 lotes apresentaram resultados entre 80 e 90% do valor esperado. Apenas 1 lote apresentou resultados de acordo com as especificações de 90 – 110% do valor esperado. O teor de GLZ nos lotes analisados apresentou resultados abaixo do esperado, considerando a dosagem nominal teórica dos comprimidos, com exceção do LOTE F.

Para confirmação dos resultados, as amostras foram submetidas ao método farmacopeico oficial utilizado na Farmacopeia Britânica (2005). Alíquotas das mesmas amostras submetidas à análise por RMN foram quantificadas por CLAE. O teor médio de GLZ em cada lote quantificado por CLAE está plotado no gráfico 3 e discriminado na tabela 14.

Gráfico 3 - Teor médio de GLZ em seis lotes de amostras comerciais do comprimido quantificado por CLAE-DAD.

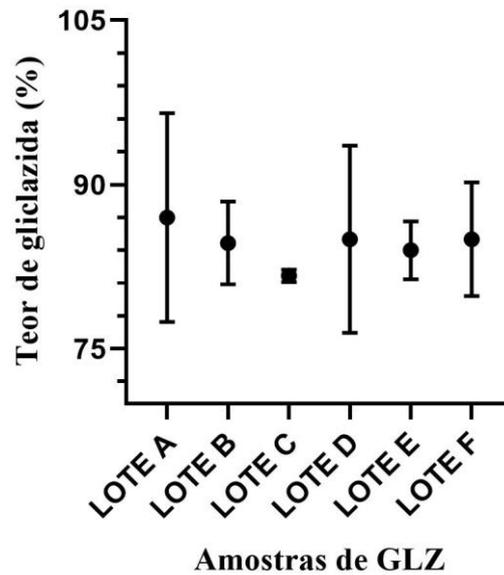


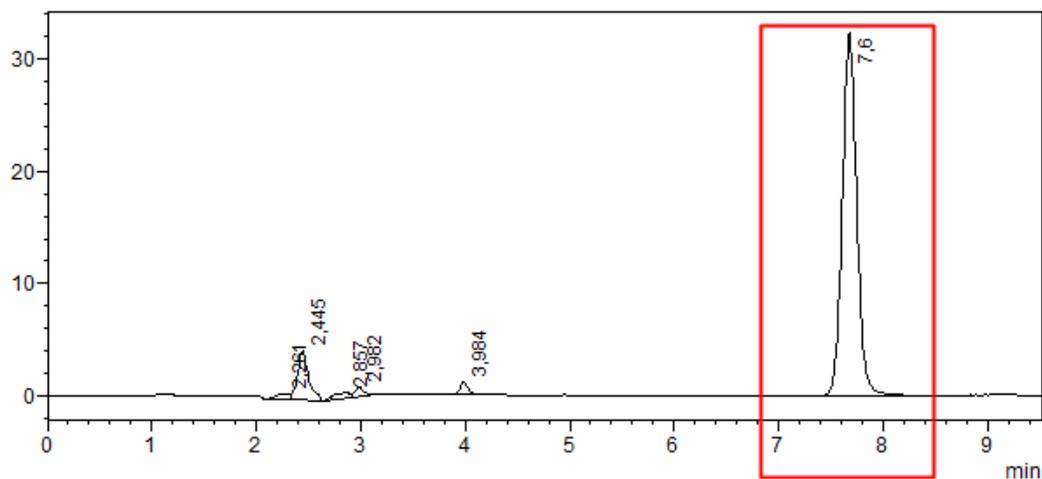
Tabela 14 - Teor médio de GLZ em seis lotes de amostras comerciais de comprimidos quantificados por CLAE-DAD.

Lote	Concentração nominal teórica de gliclazida ( $\mu\text{g/ml}$ )	Concentração experimental média ( $\mu\text{g/ml}$ )	Teor médio de GLZ (%)
A	32.16	27.98	87
B	32.82	27.74	85
C	33.22	27.11	82
D	32.92	27.91	85
E	33.20	28.00	84
F	33.12	28.28	85

Os resultados foram obtidos calculando a média da triplicata das integrais das amostras de cada um dos lotes e calculando a concentração através da curva de calibração realizada no dia, em seguida confrontaram-se os dados com a concentração de GLZ estimada considerando-se 100% de pureza.

Na Figura 23 podemos observar um exemplo de um dos cromatogramas adquiridos da análise do pó dos comprimidos de GLZ, demarcando os sinais que foram usados para integração e consequentemente quantificação.

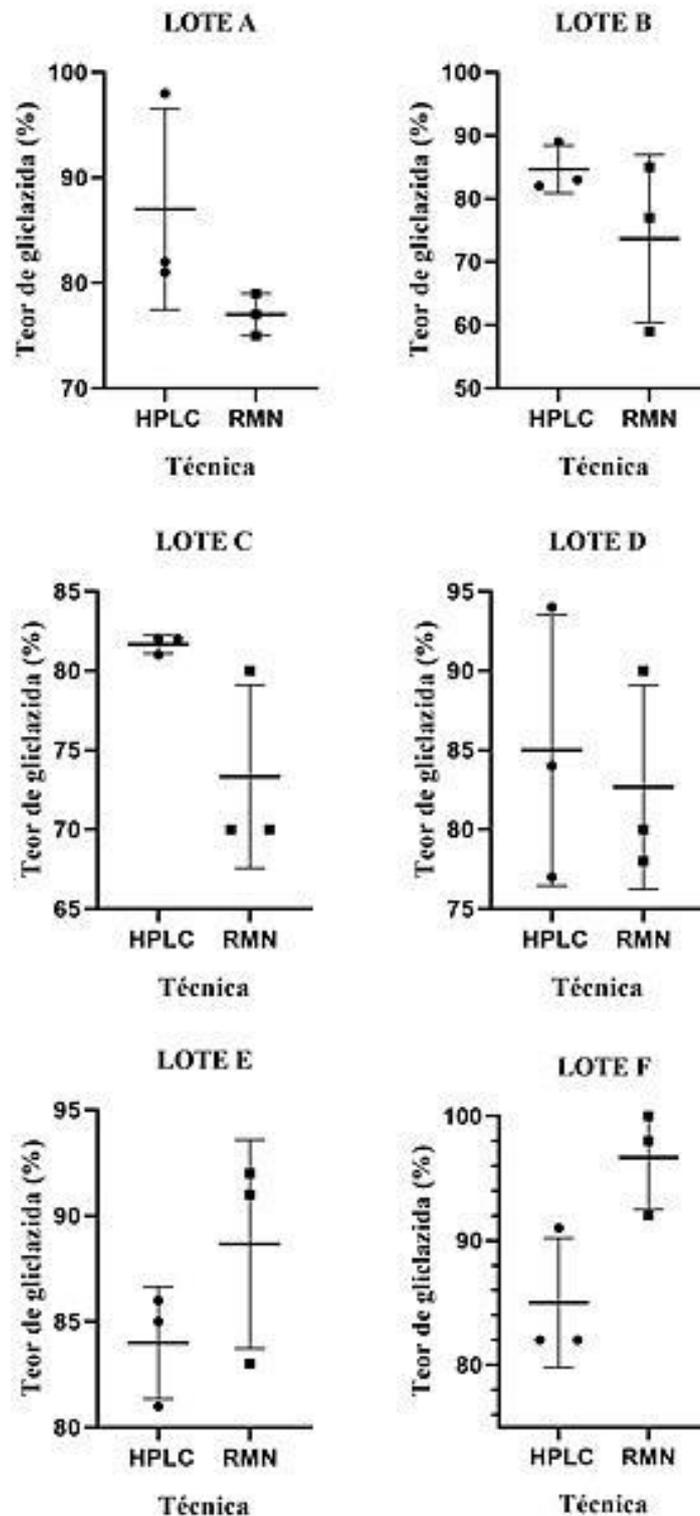
Figura 23 - Cromatograma adquirido da análise de um lote comercial de comprimidos de GLZ a 100 ug/ml.



Todos os resultados obtidos apresentaram resultados entre 80% e 90% do valor esperado. O método oficial também mostrou resultados abaixo do esperado, sem exceções. Nenhum lote mostrou-se dentro dos limites estabelecidos de 90 a 110%.

Na Figura 24 podemos observar a análise estatística desse resultado comparativo entre os dois métodos.

Figura 24 - Análise estatística da comparação entre os métodos por CLAE-DAD e RMNq-<sup>1</sup>H na quantificação das amostras comerciais de comprimidos de GLZ em seis lotes diferentes.



Os dados da análise estatística mostraram que não houve diferença significativa entre os resultados obtidos pelas duas técnicas para um intervalo de confiança de 95%. Na tabela 15 conseguimos observar o teor médio apresentado pelos dois métodos estudados.

Tabela 15 - Teor médio de GLZ nos lotes analisados por diferentes técnicas.

Método	Lote	Teor (%)	Média
CLAE	A	87	85%
	B	85	
	C	82	
	D	85	
	E	84	
	F	85	
RMNq- <sup>1</sup> H	A	77	81%
	B	73	
	C	73	
	D	83	
	E	89	
	F	96	

Rao (2011) determinou a GLZ na presença de cloridrato de metformina em comprimidos por CLAE e concluiu que a quantidade de cada droga nas amostras de comprimido atendeu aos requisitos (90 -110%). (RAO, 2011). Berecka, Gumieniczek e Hopkaa, (2006) quantificaram a GLZ juntamente com a repaglinida e obtiveram uma recuperação de GLZ em fórmulas comerciais de 100.40 +/- 0.35. (BERECKA; GUMIENICZEK; HOPKAA, 2006).

Liang *et al*, (2014), apresentou a quantificação de fosfato de clindamicina (CLP) em uma formulação de comprimido convencional, realizada usando hidrogenoftalato de potássio como o padrão interno e óxido de deutério como o solvente. Quando os resultados obtidos foram confirmados por comparação com os resultados obtidos por CLAE, o conteúdo de CLP em sua formulação de comprimido foi calculado em 46,3% por CLAE e 45,0% por RMNq-<sup>1</sup>H, indicando claramente a abordagem por RMNq-<sup>1</sup>H era igual, senão mais precisa.

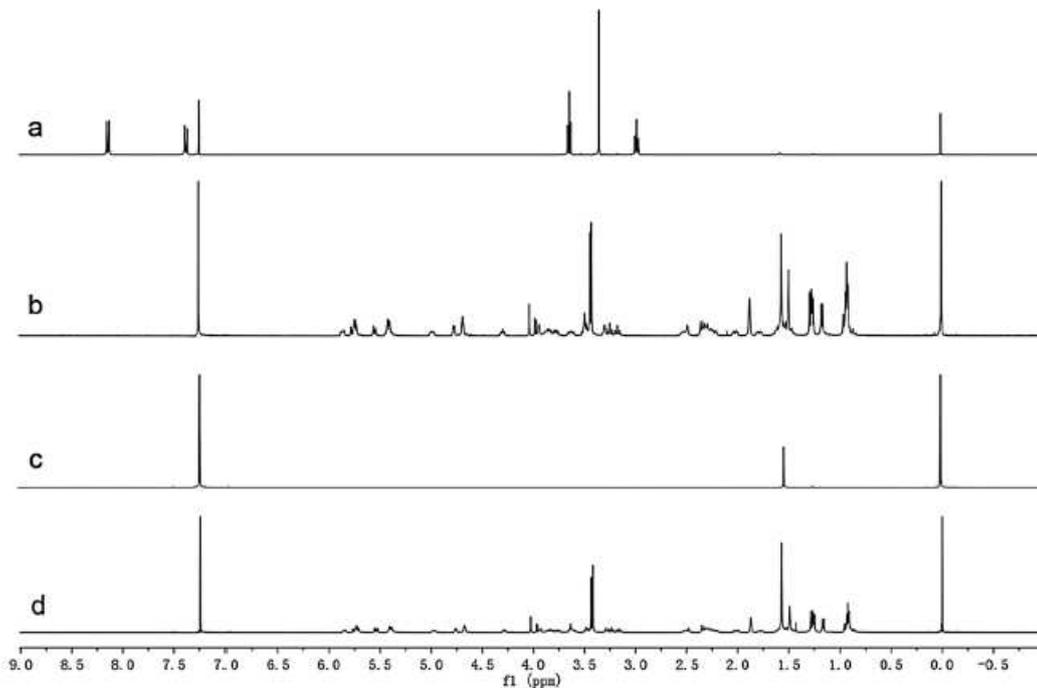
Goger *et al*. (1999), quantificou a azatioprina em comprimidos por RMNq-<sup>1</sup>H, e concluiu que o espectro de RMNq-<sup>1</sup>H fornece informações sobre a quantidade de uma impureza em uma amostra de modo que o isolamento da mesma não é necessário. Em CLAE,

essa etapa faz parte de um procedimento demorado, que não é necessário por RMNq-<sup>1</sup>H. Portanto, este método seria superior ao método por CLAE no que diz respeito a seletividade, rapidez e simplicidade. (GÖĞER et al., 1999).

Qin *et al.* (2019), usou a RMNq-<sup>1</sup>H para determinar o topiramato em uma formulação de comprimidos, usando DMSO-d<sub>6</sub> como o solvente. Os resultados obtidos usando CLAE foram uma média de 99,85% de teor de topiramato nos comprimidos, enquanto que os resultados obtidos usando RMNq-<sup>1</sup>H foram de 99,84% de teor de topiramato nos comprimidos. Ou seja, ao comparar CLAE e RMNq-<sup>1</sup>H utilizando a mesma amostra, a consistência dos resultados mostrou viabilidade do método de RMNq-<sup>1</sup>H.

Hou *et al.* (2014), aplicou a RMNq-<sup>1</sup>H na determinação da avermectina B1a. O estudo constatou que não houve diferenças significativas entre o resultado do ensaio obtido por CLAE e RMNq-<sup>1</sup>H, que também forneceu evidências para RMNq-<sup>1</sup>H atuar como uma escolha mais rápida e fácil para a determinação de ativos em formulações de drogas. Os sinais escolhidos a 5,56 e 8,14 ppm para avermectina e para o padrão interno respectivamente, mostram uma boa seletividade do método proposto e podem ser observados na figura 25.

Figura 25 - Sinais da avermectina e do padrão interno em espectro de RMN.



A linearidade foi avaliada em uma faixa de 5,08 a 13,58 mg/mL que produziu um coeficiente de correlação de 0,9999. A exatidão do método foi estimada pela recuperação

média e o desvio padrão relativo. A recuperação média foi de 98,86%, e DPR foi de 0,34%. Os resultados obtidos foram comparados com os resultados obtidos na técnica de CLAE. O ensaio do comprimido de avermectina foi preparado para obter 3,71%. Foi atestado que não houve diferenças significativas entre o resultado do ensaio obtido pelo método de CLAE e método de RMN, sendo que o ensaio descrito pelo fabricante foi 3,78%. Como conclusão observa-se que o método oferece uma excelente escolha para controle de qualidade de rotina e análise de estabilidade de avermectina na forma de comprimido e no ambiente. Além disso, o método também oferece possibilidades para a determinação quantitativa de medicamentos com baixo teor.

Yang *et al.* (2015), propôs o método de RMNq-<sup>1</sup>H para determinar tadalafil em medicamentos a granel e seus comprimidos. Os espectros foram obtidos em dimetilsulfóxido-d<sub>6</sub> usando 2,4-dinitrotolueno como o padrão interno. As curvas de calibração mostraram linearidade na faixa de 0,47 a 3,88 mg e o coeficiente de correlação obtido foi de 0,9999 quando utilizou-se três prótons aromáticos como sinais analíticos. Os sinais em  $\delta$  8,72, 8,45, 7,82 (de dimetilsulfóxido-d<sub>6</sub>) e 5,91 ppm (de tadalafil) foram usados para a quantificação. O padrão de Tadalafil foi adicionado aos comprimidos para investigar a recuperação de tadalafil de comprimidos. As recuperações médias de tadalafil foram 100,12%, 100,71%, e 99,06%, com valores de % RSD 1,81%, 1,78% e 1,40% para três sinais, respectivamente. Dessa forma mostrou-se que o Tadalafil foi recuperado quantitativamente. Os resultados foram consistentes com os obtidos por análise em CLAE, indicando que o RMNq-<sup>1</sup>H é um método útil e prático para a determinação de tadalafil em medicamentos a granel e seus comprimidos.

El-Adl *et al.* (2017), concluiu em seu trabalho que o método de RMNq-<sup>1</sup>H oferece uma excelente escolha sobre os métodos descritos anteriormente para o controle de qualidade do medicamento piracetam. Para piracetam, o singlete estava a 3,94 ppm, originado de dois prótons do grupo CH<sub>2</sub>. Os medicamentos contendo o princípio ativo foram analisados pelo método proposto e os resultados do ensaio obtidos por RMNq-<sup>1</sup>H foram confirmados por comparação com método de CLAE. O método proposto por RMNq-<sup>1</sup>H forneceu uma média de 99.74±0.78 de teor dos comprimidos, enquanto que o método de referencia por CLAE mostrou uma média de 100.16±1.07, indicando que não há diferença significativa entre os resultados obtidos por RMNq-<sup>1</sup>H e CLAE. (EL-ADL; EL-SADEK; HASAN, 2017).

Segundo a farmacopeia britânica, a GLZ é praticamente insolúvel em água, ligeiramente solúvel em álcool, moderadamente solúvel em acetona e livremente solúvel em

diclorometano. O processo de extração da GLZ foi realizado com acetonitrila para o método em CLAE-DAD e com clorofórmio deuterado para o método em RMNq<sup>1</sup>- H. Essa diferença de solventes para o processo de extração pode ter levado a diferenças entre os resultados obtidos pelas duas técnicas. A acetonitrila trata-se de um solvente polar com polaridade próxima ao metanol (CH<sub>3</sub>OH), já o clorofórmio é um solvente significativamente mais apolar, próximo ao diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

Além da diferença na solubilidade do solvente utilizado, o processo utilizado para extração pode demonstrar algumas diferenças nos resultados obtidos pelas duas técnicas, como por exemplo, o uso da centrifugação no processo realizado para a determinação das amostras por RMNq<sup>1</sup>H. A centrifugação foi relativamente longa, o que pode também ter acarretado a evaporação do solvente utilizado, já que ele tem uma volatilidade muito alta.

Observando os resultados da tabela 15, podemos verificar diferenças entre os resultados individuais de teor de GLZ dos lotes conforme determinados por CLAE e RMNq-<sup>1</sup>H. Isto pode refletir diferenças na eficiência do processo de extração conforme já mencionado, ou uma falta de uniformidade no pó dos comprimidos, mesmo utilizando uma técnica de mistura para melhorar os resultados. Analisando a Figura 31 podemos notar que em cada lote existem dois pontos referentes ao teor que estão com valores próximos entre si nas diferentes técnicas. O que nos permite concluir que talvez a inhomogeneidade do pó dos comprimidos tenham levado a resultados diferentes entre as duas técnicas.

Talvez esta hipótese de baixa uniformidade dos pós poderá ser confirmada com a análise de um maior número de alíquotas das amostras, o que deverá levar a uma maior dispersão entre os resultados.



## 6 CONCLUSÃO

A metodologia de RMNq<sup>1</sup>-H desenvolvida para a determinação da GLZ em comprimidos se mostrou sensível, seletiva, linear, com boa precisão, exatidão e robustez quando analisado os parâmetros de validação do método. Entretanto, para maior exatidão na quantificação do analito, um número maior de amostras deve ser analisado para melhores resultados.

Não houve diferença significativa entre os resultados obtidos pelas duas técnicas para um intervalo de confiança de 95%. Entretanto, o teor médio das amostras de GLZ pelo método de RMNq<sup>1</sup>-H foi de 81%, com amostras variando de 73 a 96%. Os resultados do método por CLAE foram superiores, onde o teor médio das amostras foi de 85%, variando de 82 a 87% de GLZ.

Os resultados das duas metodologias permitiram avaliar que não há uniformidade no conteúdo dos pós dos comprimidos de GLZ, mesmo utilizando técnicas de mistura para melhoria dos resultados.

## 7 PERSPECTIVAS

Análise de uma quantidade maior de amostras de pó do comprimido de GLZ para se observar possível redução no desvio padrão dos resultados obtidos.

Análise de maior número de lotes para verificar se o baixo teor encontrado neste trabalho é um desvio de qualidade localizado ou generalizado.

Além disso, a utilização de uma balança analítica contendo seis casas decimais após a vírgula para aumentar a confiabilidade dos resultados.



## 8 REFERÊNCIAS

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada- RDC nº 166, de 25 de Julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Disponível em: <[www.anvisa.gov.br/legis](http://www.anvisa.gov.br/legis)> Acessado em: 11 set. 2020.

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada- RDC nº 301, de 21 de Agosto de 2019. Dispõe sobre as Diretrizes Gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Disponível em: <[www.anvisa.gov.br/legis](http://www.anvisa.gov.br/legis)> Acessado em: 11 set. 2020.

AKANUMA, Y. et al. Long-term comparison of oral hypoglycemic agents in diabetic retinopathy Gliclazide vs. other sulfonylureas. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 5, n. 2, p. 81–90, jul. 1988.

ALMEIDA, N. S. et al. A Validated NMR Approach for MDMA Quantification in Ecstasy Tablets. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 9, p. 1944–1950, set. 2018.

AL-OMARY, F. A. M. Gliclazide. In: **Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology**. [s.l.] Elsevier, 2017. v. 42p. 125–192.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública nº 50, de 4 de setembro de 2008.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública nº 88, de 27 de novembro de 2009.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacopeia Brasileira, volume 1. 5ª Ed. Brasília, 2010.

ARAÚJO, L. U. et al. Medicamentos genéricos no Brasil: panorama histórico e legislação. **Revista Pan-americana de Salud Pública**, v. 28, n. 6, p. 480–492, dez. 2010.

BABA, S. et al. Comparison of gliclazide and glibenclamide treatment in non-insulin-dependent diabetes. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 141 Supl., p. 693–706, dez. 1983.

GÖĞER, N. G. et al. Quantitative determination of azathioprine in tablets by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 21, n. 3, p. 685–689, nov. 1999.

RAO, U. Determination of gliclazide in a tablet dosage form in the presence of metformin hydrochloride by ion pair reversed phase liquid chromatographic technique. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n. 11, p. 1331–1337, 22 set. 2011.

BARATA-SILVA, C. et al. Desafios ao controle da qualidade de medicamentos no Brasil. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 25, n. 3, p. 362–370, 28 set. 2017.

BATISTELA, C. G.; LAPORTA, L. V. determinação quantitativa de gliclazida em comprimidos por espectrofotometria no ultravioleta. **Disciplinarum Scientia. Série: Ciências da Saúde**, Santa Maria, v. 14, n. 1, p. 13, 25 jul. 2012.

BECKER, E. D. High Resolution NMR : Theory and Chemical Applications. 3<sup>a</sup> ed. **National Institutes of Health**. Bethesda, Maryland, p. 441. 2000.

BENEDITO, L. E. C. Caracterização de amostras de cocaína por ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup>H. 27 ago. 2018. p. 84 Tese (Doutorado em Química). Universidade de Brasília. Brasília. 2018.

BERECKA, A.; GUMIENICZEK, A.; HOPKAA, H. Development and Validation of a New High-Performance Liquid Chromatography Method for the Determination of Gliclazide and Repaglinide in Pharmaceutical Formulations. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v. 89, n. 2, p. 319–325, 1 mar. 2006.

BEYER, T. et al. Quality assessment of unfractionated heparin using <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, n. 1, p. 13–19, set. 2008.

BEYER, T.; SCHOLLMAYER, C.; HOLZGRABE, U. The role of solvents in the signal separation for quantitative <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, n. 1, p. 51–58, 1 maio 2010.

BIANCHIN, M. D. et al. Evaluation of the quality of propranolol and enalapril tablets supplied in the public health system in a southern Brazilian city. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 17, n. 2, p. 491–498, fev. 2012.

BLOCH, F. . Nuclear Induction. **Physical Review**. Stanford University, California, vol. 70, n. 7-8, Jul. 1946.

BLUM, F. High performance liquid chromatography. **British Journal of Hospital Medicine**, v. 75, n. Sup2, p. C18–C21, fev. 2014.

BRITO, N. M. et al. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS: ESTRATÉGIA E DISCUSSÃO. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, 31 dez. 2003.

CAMPBELL, D. B.; LAVIELLE, R.; NATHAN, C. The mode of action and clinical pharmacology of gliclazide: a review. **Diabetes Research and Clinical Practice**, Gliclazide Therapy of NIDDM in the 90s. v. 14, p. S21–S36, 1 jan. 1991.

CAPANEMA, L. X. DE L. Indústria farmacêutica brasileira: reflexões sobre sua estrutura e o potencial de investimentos. 2007.

CLARIDGE, T. D. W. Chapter 2 - Introducing High-Resolution NMR. In: CLARIDGE, T. D. W. (Ed.). . **High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry (Third Edition)**. Boston: Elsevier, p. 11–59. 2016.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de cromatografia. 2006.

COMMISSION, B. P. **British pharmacopoeia 2005**. Edição: 2005th. ed. Place of publication not identified: Stationery Office, 2005.

CORREIA, L. F. et al. Avaliação da equivalência farmacêutica de comprimidos de hidroclorotiazida disponíveis no mercado do Rio de Janeiro. **Rev. Bras. Farm.** 96 (2): 1266 – 1284, 2015.

COSTA, F. M. DA; PEREIRA NETTO, A. D. Desenvolvimento e aplicação de métodos para a determinação de ivermectina em medicamentos de uso veterinário. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 616–622, 2012.

COSTA, R. A. R. Determinação do grau de purezas de amostras de crack apreendidas no estado da Paraíba por RMNq-1H-H e CLAE-DAD. Universidade federal da paraíba. 10 de fev. 2012. Dissertação (Programa de pós-graduação em produtos naturais e sintéticos bioativos). p. 120, 2012.

DCTECH - Problemas na bomba, no injetor ou no detector HPLC: como identifica-los e resolvê-los -. DCtech, 12 jun. 2017. Disponível em: <<https://www.dctech.com.br/problemas-na-bomba-no-injetor-ou-no-detector-hplc-como-identifica-los-e-resolve-los/>>. Acesso em: 16 maio. 2020

DE OLIVEIRA, M. F. et al. Análise do teor de cocaína em amostras apreendidas pela polícia utilizando-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV-Vis. **Eclética Química**. São Paulo, vol. 4, n. 3, p. 7. 2009.

DIÁRIO DA MANHÃ. Médicos falam de seus problemas com remédios genéricos, similares, ou seja, sem controle adequado no Brasil [Internet]. 2015. Seção Opinião Pública [citado em 7 out 2016]. Disponível em: <http://www.dm.com.br/opiniao/2015/04/medicos-falam-de-seus-problemas-com-remediosgenericos-similares-ou-seja-sem-controle-adequado-no-brasil.html>

EL-ADL, S. M.; EL-SADEK, M. E.; HASAN, M. H. Determination and Validation of Piracetam in Pharmaceuticals Using Quantitative Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. **Analytical Chemistry Letters**, v. 7, n. 2, p. 271–279, 4 mar. 2017.

EL-ENANY, N. Spectrofluorimetric and Spectrophotometric Determination of Gliclazide in Pharmaceuticals by Derivatization with 4-Chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v. 86, n. 2, p. 209–214, 1 mar. 2003.

EZZELDIN, E. et al. Development and validation of LC/MS/MS method for the simultaneous determination of montelukast, gliclazide, and nifedipine and its application to a pharmacokinetic study. **Chemistry Central Journal**, v. 8, n. 1, p. 17, dez. 2014.

FILHO, E. G. A. Análises de compostos orgânicos não específicos no esgoto sanitário doméstico através das técnicas de RMNq-1H e HPLC-(UV/MS)-SPE-ASS-NMR. 10 de out. de 2014. p. 150. Tese (Doutorado em Química Orgânica). Universidade Federal de São Carlos. São Paulo. 2014.

GALDINO, T.; BETONI, S. A importância do controle de qualidade na indústria farmacêutica. **Revista uningá review**. Maringá-PR. v. 20, n.2, pp.97-103, Out - Dez 2014.

GIERTYAS, C. J. Desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos para a determinação dos produtos de oxidação do glicerol. **Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia**. Programa de pós-graduação em Química e Biotecnologia. Maceió. 23 fev. 2016.

GÖĞER, N. G. et al. Quantitative determination of azathioprine in tablets by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 21, n. 3, p. 685–689, nov. 1999.

GOMEZ, Y.; ADAMS, E.; HOOGMARTENS, J. Analysis of purity in 19 drug product tablets containing clopidogrel: 18 copies versus the original brand. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 34, n. 2, p. 341–348, 4 fev. 2004.

HARROWER, A. D. B. Efficacy of gliclazide in comparison with other sulphonylureas in the treatment of NIDDM. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 14, p. S65–S67, jan. 1991.

HAZEKAMP, A.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. Quantitative Analysis of Cannabinoids from Cannabis sativa Using <sup>1</sup>H-NMR. **CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN**, v. 52, n. 6, p. 718–721, 2004.

HOLZGRABE, U. et al. Quantitative NMR spectroscopy—Applications in drug analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, n. 5, p. 806–812, ago. 2005.

HOLZGRABE, U.; DIEHL, B. W. K.; WAWER, I. NMR spectroscopy in pharmacy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 17, n. 4, p. 557–616, 1 ago. 1998.

HOLZGRABE, U.; MALET-MARTINO, M. Analytical challenges in drug counterfeiting and falsification—The NMR approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, n. 4, p. 679–687, jun. 2011.

HOU, Z. et al. Quantitative determination and validation of avermectin B<sub>1a</sub> in commercial products using quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy: An effective method utilized on AVERMECTIN B<sub>1a</sub> assessment. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 52, n. 9, p. 480–485, set. 2014.

JACKMAN, L. M.; STERNHELL, S. Application of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Organic Chemistry: International Series in Organic Chemistry. **Elsevier**, 1969.

KELLOGG, J. M. B. et al. The Magnetic Moments of the Proton and the Deuteron. The Radiofrequency Spectrum of H<sub>2</sub> in Various Magnetic Fields. **Physical Review**, v. 56, n. 8, p. 728–743, 15 out. 1939.

KING, B. The practical realization of the traceability of chemical measurements standards. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 5, n. 10, p. 429–436, 1 nov. 2000.

KORNIS, G. E. M.; BRAGA, M. H.; PAULA, P. A. B. DE. Transformações recentes da indústria farmacêutica: um exame da experiência mundial e brasileira no século XXI. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 24, n. 3, p. 885–908, set. 2014.

Kumar, Vipin. Analytical methods for the determination of gliclazide in pharmaceutical formulations and biological fluids. **World Journal of Pharmaceutical Research**. v. 3, n. 9, p. 979-997, 2014.

LEAL, A. P. F. Aplicação do método de ressonância magnética nuclear para identificação e quantificação de polissacarídeos meningocócicos sorogrupos c e w135. 31 de mai. 2013. p. 144. Dissertação (Mestrado profissional em Tecnologia de Imunobiológicos). Instituto de tecnologia em imunobiológicos Bio-Manguinhos. Rio de Janeiro. 2013.

LIANG, X. et al. The application of quantitative NMR for the facile, rapid and reliable determination of clindamycin phosphate in a conventional tablet formulation: Quantitative NMR for the determination of clindamycin phosphate. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 52, n. 4, p. 178–182, abr. 2014.

LINSBINSKI, L. M.; DE MUSIS, C. R.; MACHADO, S. R. P. Pharmaceutical equivalence evaluation in captopril tablets. p. 6, 2008.

MAEDA, T.; YAMAGUCHI, T.; HASHIMOTO, M. Gas chromatographic determination of the hypoglycaemic agent gliclazide in plasma. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 223, n. 2, p. 357–363, 8 maio 1981.

MALZ, F.; JANCKE, H. Validation of quantitative NMR. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, n. 5, p. 813–823, ago. 2005.

MENEZES, M. DAS G. S. et al. Determinação de HbA1c por CLAE: interferência de variantes de hemoglobinas S e C e alta concentração de HbF. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 5, p. 337–344, out. 2012.

NETO, S.; PINTO, J. L. Uma metodologia analítica rápida para quantificação simultânea de estrógenos em águas usando HPLC-DAD e calibração de segunda ordem. **Universidade Federal da Paraíba**. Departamento de Química. João Pessoa-PB. 2014.

PAN, D. et al. Low level drug product API form analysis – Avalide tablet NIR quantitative method development and robustness challenges. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 89, p. 268–275, fev. 2014.

PANIAGUA-VEGA, D. et al. A validated NMR method for the quantitative determination of rebaudioside A in commercial sweeteners. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 79, p. 134–142, 1 jun. 2019.

PASCHOAL, J. A. R. et al. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1190–1198, 2008.

PAULI, G. F. et al. Quantitative <sup>1</sup>H NMR. Development and Potential of an Analytical Method: An Update. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 4, p. 834–851, 27 abr. 2012.

PAULI, G. F.; JAKI, B. U.; LANKIN, D. C. Quantitative <sup>1</sup>H NMR: Development and Potential of a Method for Natural Products Analysis. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 1, p. 133–149, 1 jan. 2005.

PRADO, M. A.; GODOY, H. T. Teores de corantes artificiais em alimentos determinados por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 268–273, abr. 2007.

PROKS, P. et al. Sulfonylurea Stimulation of Insulin Secretion. **Diabetes**, v. 51, n. Supplement 3, p. S368–S376, 1 dez. 2002.

QIN, L.; WANG, X.; LU, D. Quantitative determination and validation of topiramate and its tablet formulation by <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. **Analytical Methods**, v. 11, n. 5, p. 661–668, 2019.

REZA GANJALI, M. Electrochemical Determination of Gliclazide on Magnetic Core- Shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> Functionalized Multiwall Carbon Nanotubes Modified Glassy Carbon Electrode. **International Journal of Electrochemical Science**, p. 8868–8877, out. 2017.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, out. 2004.

SANTOS, M. DA S. **Desenvolvimento de métodos de RMN para controle de qualidade de produtos farmacêuticos e agrícolas**. Doutorado em Química Analítica e Inorgânica—São Carlos: Universidade de São Paulo, p. 156, 14 fev. 2014.

SANTOS, M. DA S.; COLNAGO, L. A. Validação de método quantitativo por RMN de <sup>1</sup>H para análises de formulações farmacêuticas. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 324–330, 2013.

SARKAR, M.; KHANDAVILLI, S.; PANCHAGNULA, R. Development and validation of RP-HPLC and ultraviolet spectrophotometric methods of analysis for the quantitative estimation of antiretroviral drugs in pharmaceutical dosage forms. **Journal of Chromatography B**, v. 830, n. 2, p. 349–354, jan. 2006.

SERRANO, J. N. P. Caracterização e quantificação de novas substâncias psicoativas por ressonância magnética nuclear. 20 fev. 2019. Dissertação (Programa de pós-graduação em Química). Universidade de Brasília. Brasília. 2019.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **J. Chromatogr. A**, 987. p. 57-66, 2003.

SICILIANO, C. et al. Quantitative determination of fatty acid chain composition in pork meat products by high resolution <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 136, n. 2, p. 546–554, 15 jan. 2013.

SILVA, A. F. A. Validação de métodos analíticos para controle de qualidade de um medicamento, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Set 2016. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química e Bioquímica). Universidade Nova de Lisboa, p. 90, 2016.

SILVA, A. L. M. DA et al. Desenvolvimento de método analítico por CLAE em comprimidos de Benznidazol para a Doença de Chagas. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1163–

1166, out. 2007.

SILVERSTEIN, R. M. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. Edição: 8 ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2005.

SINDUSFARMA. Sindicato da Indústria de Produtos Farmacêuticos no Estado de São Paulo. Indicadores econômicos Sindusfarma, 2014.  
[http://sindusfarma.org.br/cadastro/index.php/site/ap\\_indicadores](http://sindusfarma.org.br/cadastro/index.php/site/ap_indicadores), acessado em 06/Jan/2020.

STANEVA, J. et al. Quantitative analysis of sesquiterpene lactones in extract of *Arnica montana* L. by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, n. 1, p. 94–99, 5 jan. 2011.

SUGAWARA, E. K. et al. Emprego da cromatografia líquida de alta eficiência na determinação de cortisol sérico em substituição à técnica de radioimunoensaio. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 44, n. 5, p. 337–342, out. 2008.

SUNITHA, P. G. et al. FTIR SPECTROSCOPIC METHOD FOR QUANTITATIVE ANALYSIS OF GLICLAZIDE IN TABLETS. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 4, n. 3, p. 145–146, 15 maio 2014.

SUZUKI, H. et al. Determination of a New Hypoglycemic Drug, Gliclazide, in Human Serum by Radioimmunoassay. **Journal of Pharmacobio-Dynamics**, v. 4, n. 3, p. 217–225, 1981.

The Nobel Prize in Chemistry 1991. Disponível em:  
<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1991/ernst/lecture>. Acesso em 18 abr. 2020.

THOMPSON, M. STEPHEN L. R. E., WOOD R., Harmonized guidelines for singlelaboratory validation of methods of analysis. **Pure Appl. Chem.**, Vol. 74, No. 5, pp. 835–855, 2002.

TONIN, F. G. Análise de flavanóides por cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar - otimização de separação e aplicações tecnológicas. 09 de Jun. 2006, p. 214. Tese (Doutorado no Instituto de Química). Universidade de São Paulo. São Paulo. 2006.

UMAPATHI, P.; AYYAPPAN, J.; QUINE, S. Quantitative Determination of Metformin Hydrochloride in Tablet Formulation Containing Croscarmellose Sodium as Disintegrant by HPLC and UV Spectrophotometry. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 11, n. 1, p. 107–116, 12 mar. 2012.

WALSH, M. C. Moving from official to traceable methods. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, p. 616-623, 1999.

WAWER, I.; DIEHL, B. **NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis**. [s.l.] Elsevier, 2017.

WISHART, D. S. Quantitative metabolomics using NMR. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, Metabolomics. v. 27, n. 3, p. 228–237, 1 mar. 2008.

XU, H. et al. Determination of Rutin with UV-Vis Spectrophotometric and Laser-

Induced Fluorimetric Detections Using a Non-Scanning Spectrometer. **Analytical Letters**, v. 43, n. 6, p. 893–904, abr. 2010.

YU, L. et al. Quantitative Determination of Gliclazide in Plasma by Near-Infrared Spectroscopy Compared with Tailoring Noise Frequency Spectrum. Drug formulations and clinical methods. *Journal of AOAC International*, p. 6, 2014.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, out. 2004.