

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Farmácia Industrial
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**SIBUTRAMINA: VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA E
AVALIAÇÃO BIOFARMACOTÉCNICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Isabel Cristina Fração Diefenbach

Santa Maria, RS, Brasil

2007

SIBUTRAMINA:VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA E AVALIAÇÃO BIOFARMACOTÉCNICA

por

Isabel Cristina Fração Diefenbach

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM/RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

Orientador: Prof. Dr. Celso Figueiredo Bittencourt

Santa Maria, RS, Brasil

2007

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

A COMISSÃO EXAMINADORA, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

SIBUTRAMINA: VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA E AVALIAÇÃO
BIOFARMACOTÉCNICA

elaborada por

Isabel Cristina Fração Diefenbach

como requisito parcial para obtenção do grau de

Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Celso Figueiredo Bittencourt
(Presidente/Orientador)

Prof. Dr. Leandro Machado Rocha (UFF/Niterói)

Prof^a. Dr^a. Margareth Linde Athayde (UFSM/Santa Maria)

Santa Maria, 17 de agosto de 2007.

DEDICO ESTE TRABALHO

À minha família, pelo apoio em todos os momentos da minha vida;
ao meu marido Luiz Carlos, pela demonstração de otimismo, pelo amor e paciência;
à minha filha Lara, pelo prazer de ser mãe;
e em especial ao meu irmão William, pelo amor e dedicação dispensados a mim enquanto viveu.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Celso F. Bittencourt, pela amizade, orientação, pelo aprendizado e incentivo durante a realização deste trabalho e pelo exemplo profissional;

À querida amiga professora Dr^a Simone Gonçalves Cardoso, pela demonstração constante de carinho, amizade, pelo incentivo e exemplo profissional;

Aos professores do Programa de Pós-graduação, pelos conhecimentos adquiridos;

À sempre e querida amiga Lisiane Bajerski, pela amizade, dedicação e companherismo;

Aos amigos Marcos, Ana, Milene e Luciane pela convivência amigável, troca de idéias, ajuda constante e pelo auxílio, demonstrados durante todas as etapas deste trabalho;

À professora Dr^a Margareth Athayde, pela atenção a mim dispensada durante a Docência orientada;

Ao professor Dr. Oscar Endrigo Dorneles Rodrigues, pela orientação e auxílio na espectrometria no infravermelho;

Ao Juliano Barin pelo auxílio na análise dos espectros RMN ¹H e RMN ¹³C;

Ao professor Dr. Érico Marlon Flores, pela amizade e contribuições durante a elaboração deste trabalho;

À Comissão Permanente de Revisão da Farmacopéia Brasileira da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA -, pelo apoio recebido;

À Dr^a Clarice Mitie Sano Yui, Diretora Técnica e Farmacêutica Responsável da Medley Indústria Farmacêutica, pela colaboração e auxílio durante a elaboração deste trabalho;

Aos amigos e colegas da Farmacopéia Brasileira;

Ao Luiz Carlos, pelo amor, carinho, paciência e apoio em todos os momentos de minha vida;

À minha filha Lara, pelo amor e alegria compartilhada todos os dias.

A todos, que embora não tenham sido citados, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	vii
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS	xvii
RESUMO	xviii
ABSTRACT	xix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivos	2
1.1.1 Objetivos gerais	2
1.1.2 Objetivos Específicos	3
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Considerações Gerais	3
2.2 Características farmacocinéticas	5
2.3 Mecanismo de ação	6
2.4 Reações adversas e interações	6
2.5 Indicações	7
2.6 Métodos de determinação	7
2.7 Descrição	8
3. CAPÍTULO I - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA (SQR)	9
3.1 Introdução	9
3.2 Substância química de referência (SQR)	9
3.3 Identificação da SQR	10
3.3.1 Determinação da faixa de fusão	10
3.3.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹H (RMN ¹H)	10
3.3.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹³C (RMN ¹³C)	12
3.3.4 Espectrofotometria na região do infravermelho	13

3.3.5 Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV).....	15
3.3.6 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	15
3.4 Determinação de água.....	16
3.5 Conclusões.....	17
4. CAPÍTULO II - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA DE ANÁLISE QUANTITATIVA PARA CÁPSULAS.	18
4.1 Introdução.....	18
4.2 Produtos farmacêuticos.....	20
4.3 Solventes e reagentes.....	21
4.4 Equipamentos e acessórios.....	21
4.5 Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)	22
4.5.1 Validação do método analítico.....	22
4.5.1.1 Especificidade.....	22
4.5.1.2 Preparo da Curva de Ringbom.....	23
4.5.1.3 Linearidade: Curva de calibração.....	23
4.5.1.4 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)	24
4.5.1.5 Precisão.....	24
4.5.1.6 Exatidão (Teste de recuperação).....	26
4.5.1.7 Robustez.....	27
4.5.2 Resultado.....	27
4.5.3 Discussão.....	32
4.6 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	33
4.6.1 Validação do método analítico.....	34
4.6.1.1 Especificidade.....	34
4.6.1.2 Linearidade: Curva de calibração.....	35
4.6.1.3 Precisão.....	35
4.6.1.4 Exatidão: Teste de recuperação.....	37
4.6.1.5 Robustez.....	38
4.6.2 Resultados	38
4.6.3 Discussão.....	44
4.7 Comparação dos métodos propostos.....	46

5. CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE DISSOLUÇÃO PARA CÁPSULAS.....	48
5.1 Ensaio de dissolução	48
5.2 Comparação de perfis de dissolução	51
5.3 Solventes e reagentes.....	53
5.4 Equipamentos e acessórios.....	53
5.5 Desenvolvimento do método para o teste de dissolução.....	54
5.5.1 Validação do método de quantificação da porcentagem de fármaco dissolvido.....	54
5.5.1.1 Linearidade: Curva de calibração.....	54
5.5.1.2 Avaliação da especificidade.....	57
5.5.1.3 Precisão.....	57
5.5.1.4 Exatidão.....	57
5.5.2 Perfil de dissolução.....	58
5.6 Resultados.....	58
5.7 Discussão.....	62
6. CAPÍTULO IV – ANÁLISE COMPARATIVA DE ALGUNS PRODUTOS CONTENDO SIBUTRAMINA.....	65
6.1 Introdução	65
6.2 Forma farmacêutica.....	66
6.3 Solventes e reagentes.....	67
6.4 Equipamentos e acessórios.....	67
6.5 Parte experimental.....	68
6.5.1 Análise das embalagens.....	68
6.5.2 Identificação da sibutramina em cápsulas.....	68
6.5.3 Análise física e físico-química das cápsulas	68
6.5.3.1 Determinação do peso médio das cápsulas de sibutramina.....	68
6.5.3.2 Desintegração das cápsulas de sibutramina.....	69
6.5.3.3 Determinação de água.....	69
6.5.4 Determinação do teor	69
6.5.5 Uniformidade de dose unitária das amostras.....	69
6.5.6 Teste de dissolução.....	70
6.5.7 Perfil de dissolução.....	71

6.6 Resultados.....	71
6.7 Discussão.....	78
7. CONCLUSÕES.....	81
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores obtidos na determinação da faixa de fusão da sibutramina SQR.....	10
Tabela 2 -	Valores obtidos na determinação de água na sibutramina SQR pelo método de Karl-Fischer.....	17
Tabela 3 -	Preparo das soluções para o teste de recuperação da sibutramina, utilizando espectrofotometria na região do ultravioleta.....	26
Tabela 4 -	Absorvâncias da sibutramina SQR obtidas para elaboração da curva de calibração por espectrofotometria na região do ultravioleta.....	28
Tabela 5 -	Análise de variância (ANOVA) das absorvâncias obtidas para elaboração da curva de calibração da sibutramina SQR, por espectrofotometria na região do ultravioleta.....	29
Tabela 6 -	Resultado da curva de calibração obtida pelo método dos mínimos quadrados, por espectrofotometria na região do ultravioleta.....	30
Tabela 7 -	Valores experimentais referentes à determinação de sibutramina e análise de variância (ANOVA) da precisão interdias, obtido por espectrofotometria na região do ultravioleta.....	31
Tabela 8 -	Resultados experimentais referentes ao teste de recuperação para as cápsulas de sibutramina, por espectrofotometria na região do ultravioleta.....	31
Tabela 9 -	Condições experimentais utilizadas no método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência.....	33
Tabela 10 -	Preparo das soluções para o teste de recuperação da sibutramina, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência.....	37

Tabela 11 - Áreas absolutas obtidas na determinação da curva de calibração da sibutramina SQR, por cromatografia líquida de alta eficiência.....	41
Tabela 12 - Resultados da curva de calibração, obtida pelo método dos mínimos quadrados, para o método, por cromatografia líquida de alta eficiência.....	42
Tabela 13 - Análise da variação (ANOVA) das áreas absolutas, obtidas para obtenção da curva de calibração da sibutramina SQR, por cromatografia líquida de alta eficiência.....	42
Tabela 14 - Valores experimentais referentes à determinação de sibutramina em cápsulas e análise de variância (ANOVA) da precisão interdias, por cromatografia líquida de alta eficiência.....	43
Tabela 15 - Resultados experimentais do teste de recuperação da sibutramina em cápsulas, por cromatografia líquida de alta eficiência.....	43
Tabela 16 - Análise de variância dos resultados obtidos nos doseamentos de sibutramina nas amostras, obtidos pelos métodos validados (Espectrofotometria na região do ultravioleta e Cromatografia líquida de alta eficiência).....	46
Tabela 17 - Condições testadas durante o desenvolvimento do método de dissolução para cápsulas de sibutramina.....	54
Tabela 18 - Áreas absolutas obtidas na determinação da curva de calibração da sibutramina SQR, em HCl, por cromatografia líquida de alta eficiência.....	55
Tabela 19 - Resultados experimentais referentes ao ensaio de validação do método para a dissolução, utilizando HCl 0,1M como diluente, por cromatografia líquida de alta eficiência.....	56
Tabela 20 - Análise da variação (ANOVA) das áreas absolutas, obtidas para obtenção da curva de calibração da sibutramina SQR, em HCl, por cromatografia líquida de alta eficiência.....	56

Tabela 21 - Valores percentuais de sibutramina dissolvida nos meios de dissolução obtidos, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), aparato cesta, em 75 rpm.....	58
Tabela 22 - Valores experimentais referentes à determinação da percentagem dissolvida de sibutramina em dias diferentes.....	60
Tabela 23 - Resultados experimentais referentes ao teste de recuperação para as cápsulas de sibutramina.....	61
Tabela 24 - Parâmetros utilizados para avaliação da porcentagem dissolvida de sibutramina.....	70
Tabela 25 - Valores individuais (mg) obtidos na determinação de peso médio (PM), desvio padrão (DP), limites inferior e superior permitidos, peso médio do conteúdo, desintegração (min.: seg.) e umidade (%), para as cápsulas.....	73
Tabela 26 - Valores experimentais obtidos na análise de teor da sibutramina nas cápsulas, por espectrofotometria na região do ultravioleta.....	74
Tabela 27 - Valores de porcentagens dissolvidas (%) da sibutramina nas cápsulas, obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência.....	75
Tabela 28 - Valores de eficiência de dissolução (%) das cápsulas de sibutramina, obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência.....	76
Tabela 29 - Valores individuais experimentais e médias, em porcentagens, obtidos na avaliação da uniformidade de conteúdo das cápsulas, por espectrofotometria na região do ultravioleta.....	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura química do cloridrato de sibutramina monoidratado).....	2
Figura 2 -	Estrutura química dos metabólitos M1 e M2, respectivamente, do cloridrato de sibutramina monoidratado.....	5
Figura 3 -	Espectro de RMN ¹ H da sibutramina SQR (400 MHz, CD ₃ OD).....	11
Figura 4 -	Espectro de RMN ¹³ C da sibutramina SQR (100 MHz, CD ₃ OD).....	12
Figura 5 -	Espectro na região do infravermelho da sibutramina SQR.....	14
Figura 6 -	Espectro de absorção molecular na região de 200 - 400 nm da solução de sibutramina SQR, na concentração de 10 µg/ml.....	15
Figura 7 -	Cromatograma obtido com a solução de sibutramina SQR, na concentração de 30 µg/ml. Condições cromatográficas: coluna Luna Phenomenex® RP ₁₈ (250 mm x 4 mm, 5 µm); fase móvel: metanol:água:triethylamina (80:20:0,5) pH 5,65 ajustado com ácido fosfórico; vazão: 1 ml min; volume injetado: 20 µl.....	16
Figura 8 -	Espectros de absorção molecular na região do ultravioleta das soluções de sibutramina SQR (1) e amostras simuladas de excipientes das cápsulas (2), na concentração de 10 µg/ml.....	27
Figura 9 -	Representação gráfica da curva de Ringbom da sibutramina SQR, obtida pelo método espectrofotométrico na região do ultravioleta	28
Figura 10 -	Representação gráfica das curvas de calibração e da equação da reta da sibutramina SQR, obtidas pelo método espectrofotométrico na região do ultravioleta.....	29

- Figura 11** - Cromatogramas da degradação forçada da sibutramina SQR (C = 30 µg/ml em meio ácido HCl 1M tempo zero (A1) e 4 horas (A2), em meio alcalino NaOH 1M em tempo zero (B1) e 4 horas (B2), meio oxidativo H₂O₂ em tempo zero (C1) e 4 horas (C2) e fotólise em tempo zero (D1) e 4 horas (D2). Condições cromatográficas: coluna Luna Phenomenex® RP₁₈ (250 mm x 4 mm, 5 µm); fase móvel: metanol:água:triethylamina (80:20:0,5) pH 5,65 ajustado com ácido fosfórico; vazão: 1 ml min; volume injetado: 20 µl..... 39
- Figura 12** - Cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência das soluções da sibutramina SQR (1) (TR= 4,28), cápsulas (2) (TR= 4,29), na concentração de 30 µg/ml Condições cromatográficas: coluna Luna Phenomenex® RP₁₈ (250 mm x 4 mm, 5 µm); fase móvel: metanol:água:triethylamina (80:20:0,5) pH 5,65 ajustado com ácido fosfórico; vazão: 1 ml/ min; volume injetado: 20 µl..... 40
- Figura 13** - Representação gráfica da curva de calibração da sibutramina SQR, por cromatografia líquida de alta eficiência..... 41
- Figura 14** - Representação gráfica da curva de calibração e da equação da reta da sibutramina SQR, em HCl, por cromatografia líquida de alta eficiência..... 55
- Figura 15** - Perfil de dissolução das cápsulas de sibutramina, obtidos, utilizando aparato cesta a 37 °C ± 0,5 °C..... 59
- Figura 16** - Cromatogramas obtidos com a SQR, amostra simulada de excipiente da cápsula (ASE – cápsula) e cápsula sem conteúdo, após dissolução em HCl 0,1N a 37 °C ± 0,5 °C, rotação de 75 rpm, com aparato 1..... 59
- Figura 17** - Perfil de dissolução das cápsulas de sibutramina, obtidos utilizando as condições validadas a 37 °C ± 0,5 °C..... 61

- Figura 18** - Representação gráfica dos espectros de absorção molecular obtidos por espectrofotometria na região do UV das soluções sibutramina SQR e dos Produtos A, B e C, na concentração de 10 µg/ml..... 72
- Figura 19** - Representação gráfica das porcentagens dissolvidas da sibutramina, empregando aparato 1, para as cápsulas, em meio HCl 0,1M a 37,0 °C ± 0,5 °C, 75 rpm, analisados cromatografia líquida de alta eficiência..... 75

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASE	Amostra simulada de excipiente
°C	Grau centígrado
µg	Microgramas
µl	Microlitros
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CV%	Coefficiente de variação percentual
DPR	Desvio padrão relativo
e.p.m	Erro padrão da média
ED	Eficiência de dissolução
FDA	Food and Drugs Administration
EMEA	Agência Européia de Medicamentos
gl	Graus de liberdade
5-HT	5-hidroxitriptamina
ICH	International Conference on Harmonization
IMC	Índice de massa corporal
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
ml	Mililitro
NS	Não significativo
NA	Noradrenalina
r	Coefficiente de correlação de Pearson
r.p.m	Rotações por minuto
RMN	Ressonância magnética nuclear
SQR	Substância química de referência
USP	United States Pharmacopoeia
UV	Ultravioleta
VIS	Visível

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

SIBUTRAMINA: VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA E AVALIAÇÃO BIOFARMACOTÉCNICA

AUTORA: Isabel Cristina Fração Diefenbach
ORIENTADOR: Prof. Dr. Celso Figueiredo Bittencourt
DATA E LOCAL DA DEFESA: Santa Maria, 17 de agosto de 2007.

A Sibutramina é classificada terapeuticamente como anorexígeno, sendo indicada para tratamento da obesidade e redução do peso corpóreo, em conjunto com dieta e exercícios. Sua atividade esperada é a perda de peso, conseguida através da inibição da recaptação de serotonina e de noradrenalina. O mecanismo de ação por inibição da recaptação por duas vias resulta na diminuição do peso corporal, diminuindo a ingestão de alimentos mediante a intensificação da saciedade pós-prandial. Encontra-se comercialmente disponível na forma de cápsulas industrializadas e cápsulas manipuladas. Na literatura consultada não se encontrou, até o momento, monografias em códigos oficiais para controlar a qualidade desse fármaco e de sua forma farmacêutica. Neste trabalho foram desenvolvidos e validados métodos de quantificação e de avaliação da dissolução do fármaco em cápsulas industrializadas. Bem como, realizou-se estudo comparativo entre algumas formulações disponíveis no comércio. Os métodos desenvolvidos e validados para determinação quantitativa foram: espectrofotometria na região do ultravioleta e cromatografia líquida de alta eficiência, os quais apresentaram linearidade, precisão e exatidão. As condições selecionadas para o teste de dissolução foram 500 ml de HCl 0,1M como meio, utilizando cesta para as cápsulas, com velocidade de rotação de 75 rpm. O estudo comparativo realizado demonstrou que os produtos não apresentaram desvios da qualidade.

Palavras-chaves: sibutramina, validação, cromatografia líquida de alta eficiência, espectrometria, dissolução, estudo comparativo.

ABSTRACT

Master Dissertation

Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

SIBUTRAMINE: VALIDATION OF METHODOLOGY AND BIOPHARMACEUTICAL EVALUATION

AUTHOR: Isabel Cristina Fração Diefenbach

ADVISER: Celso Figueiredo Bittencourt

LOCAL AND DATE OF DEFENSE: Santa Maria, August 17th, 2007.

Sibutramine is therapeutically classified as an anorexigen, being recommended for obesity treatment and reduction of body weight, combined with diet and exercises. Its expected activity is the weight loss through inhibiting serotonin and norepinephrine reuptakes. By dual inhibition, sibutramine reduces body weight, then reducing food ingestion through intensification of post-prandial satisfaction. The drug is commercially available as industrialized capsules and compounded capsules. There are no official monographs up to this moment, to control the quality of this drug in its pharmaceutical forms. In the present work, methods for the quantification and dissolution evaluation of the drug in industrialized capsules were developed and validated. Comparative studies among some commercially formulations were also performed. UV spectrophotometry and liquid chromatography methods were developed and validated for quantitative determination, and showed linearity, precision and accuracy. The selected conditions for the dissolution test were 500 mL of 0.1 M HCl as medium, using basket for capsules, with rotation speed of 75 rpm. The comparative study presented that products not showed quality deviations.

Keywords: sibutramine, validation, high-performance liquid chromatography, spectrophotometry, dissolution, comparative study.

1. INTRODUÇÃO

O emprego de metodologia analítica adequada é necessário nas diversas fases do desenvolvimento farmacêutico, tais como estudos de formulação e de estabilidade, controle de qualidade e, também, em testes farmacológicos e toxicológicos realizados em animais e humanos. A falta de métodos confiáveis de avaliação da qualidade dos produtos farmacêuticos limita a vigilância dos mesmos.

As especificações mínimas de qualidade dos produtos farmacêuticos, desde a matéria-prima até a embalagem e, conseqüentemente, de todos os insumos utilizados na fabricação de todas as formas farmacêuticas são de competência legal e exclusiva das farmacopéias. Entretanto, muitos fármacos, por serem de recente lançamento, não estão incluídos nesses códigos.

Para fármacos que não possuam métodos oficiais de análises, deve-se desenvolver e validar os mesmos através da avaliação de parâmetros, tais como: linearidade, exatidão, precisão, especificidade, limite de detecção e de quantificação (ICH, 1996; USP 29, 2006).

A obesidade há muito associada à falta de força de vontade e de autocontrole, é agora reconhecida pelos profissionais da área de saúde como uma doença médica crônica e grave, com várias causas subjacentes e um número significativo de complicações associadas, com morbidade e mortalidade aumentadas (BRAY, 1989).

A sibutramina (Figura 1) é o primeiro agente antiobesidade de ação central que atua como inibidor da recaptção em duas vias neurotransmissoras. Produz seus efeitos terapêuticos, primariamente, pela inibição de recaptção de noradrenalina (NA) e serotonina (5-HT) (BRAY *et al.*, 1996).

No mercado brasileiro este fármaco encontra-se disponível com nomes comerciais como Reductil® (Abbott), Plenty® (Medley), Cloridrato de sibutramina monoidratado (Medley), além de outros produtos que estão em lançamento e os formulados pelas farmácias magistrais. As principais apresentações farmacêuticas disponíveis no comércio são cápsulas de 10 e 15 mg, de preparação industrial, e cápsulas obtidas por manipulação. Embora esse fármaco se encontre comercializado em nível mundial, não se encontrou descrita metodologia para análise quantitativa dessa forma farmacêutica, quer em códigos oficiais ou na literatura científica consultada.

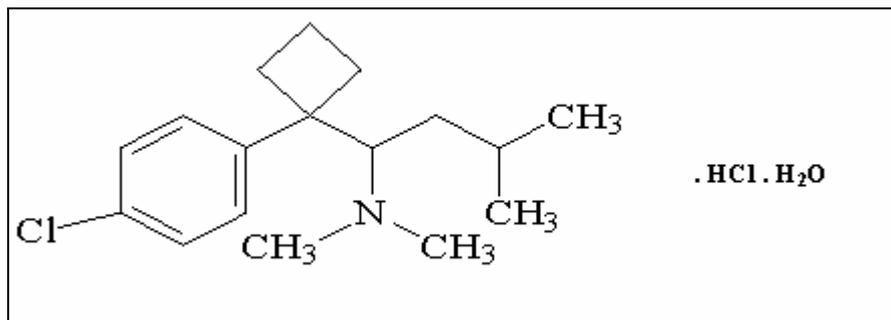


Figura 1 – Estrutura química do cloridrato de sibutramina monoidratado

A absorção de fármacos por via oral depende, dentre outros fatores, da liberação e dissolução dos mesmos nas condições fisiológicas. Os fatores biofarmacotécnicos influenciam, de forma considerável, os processos de dissolução e absorção.

O presente trabalho contempla o estudo do controle de qualidade da sibutramina, abrangendo o desenvolvimento e a validação de métodos analíticos, assim como, a liberação do fármaco *in vitro* para a forma farmacêutica de cápsulas obtidas em processo industrial.

A justificativa para realização deste trabalho se dá a partir da constatação da inexistência de metodologia analítica oficial para análise da sibutramina e de sua forma farmacêutica. Considerando que não existe monografia farmacopéica para este fármaco, esta pesquisa busca contribuir para o controle de qualidade da especialidade farmacêutica.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivos Gerais

Desenvolver e validar metodologia para avaliar a qualidade de cápsulas de sibutramina obtidas em processo industrial.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar a substância química de referência sibutramina através de análise por ressonância magnética nuclear de carbono e hidrogênio, espectroscopia na região do infravermelho e determinação da faixa de fusão;
- Desenvolver e validar métodos para análise quantitativa de sibutramina em cápsulas industrializadas com o emprego de espectrofotometria na região do ultravioleta e cromatografia líquida de alta eficiência;
- Realizar estudo comparativo entre os métodos propostos;
- Desenvolver e validar método de dissolução para sibutramina na forma farmacêutica cápsulas;
- Realizar estudo de equivalência farmacêutica para avaliar a intercambialidade de alguns produtos existentes no mercado, entre os quais o produto de referência e o seu genérico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Considerações Gerais

A obesidade é genericamente definida como um excesso de gordura corporal ou de tecido adiposo, acima do necessário para manter a saúde (LISSNER, 1993). Excesso de peso se refere a um excesso da quantidade de peso corporal total, que inclui todos os tecidos (por exemplo, gordura, ossos e músculos) e água. A obesidade se refere especificamente a um excesso de gordura corporal (SICHIERI *et al.*, 1994). O excesso do acúmulo de gordura está associado a um aumento do tamanho das células adiposas. Em pessoas com obesidade extrema, o número de células adiposas também está aumentado. O excesso de gordura corporal em indivíduos obesos frequentemente resulta em prejuízos significativos para a saúde (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH CONSENSUS DEVELOPMENT PANEL

ON THE HEALTH IMPLICATIONS OF OBESITY, 1985). O Índice de massa corporal é um parâmetro clinicamente útil para definir a obesidade e para se avaliar o estado do peso corporal, o grau de adiposidade e o risco de complicações relacionadas à obesidade.

Muitos fatores estão envolvidos na patogênese da obesidade, incluindo o controle do comportamento alimentar, os mecanismos de armazenamento de gordura, a regulação do aporte de energia e do gasto energético, e as influências genéticas e psicológicas (AGRAS, 1996). Embora os mecanismos exatos do desenvolvimento da obesidade ainda tenham de ser determinados, esta etiologia de maneira genérica resulta de um desequilíbrio entre a ingestão de alimentos (energia) e o gasto energético (STUNKARD, 1996). Conseqüentemente, o tratamento ideal da obesidade seria o que reduzisse a ingestão de alimentos e aumentasse o gasto energético (BRAY, 1993). A obesidade reduz a longevidade aumentando os riscos de doenças concomitantes, que são freqüentemente crônicas e que podem causar prejuízos funcionais significativos. A obesidade freqüentemente está acompanhada de dislipidemia, pressão arterial elevada e resistência à insulina (VANITALLIE, 1985), o que, por sua vez, pode dar origem a um risco aumentado de mortalidade por diabetes, hipertensão arterial e doença coronariana. Segundo relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS, 1998), a obesidade já atingiu características de epidemia, afetando atualmente cerca de 1 bilhão de adultos em todo o mundo. Em países em desenvolvimento, como o Brasil, a obesidade já se tornou um problema de saúde pública tão grave como a desnutrição.

O principal desafio para os profissionais da saúde e pacientes obesos, atualmente, é melhorar a capacidade de manter a perda de peso, em vez de apenas conseguir perder peso. A Força Tarefa Nacional para prevenção e tratamento da obesidade, dos EUA, sugere que terapias farmacológicas para a obesidade podem ser usadas durante um longo prazo em pacientes cuidadosamente selecionados, o que é consistente com as abordagens de tratamento para outras doenças crônicas, incluindo diabetes do tipo II, hipertensão arterial e hipercolesterolemia (ATKINSON *et al.*, 1994).

Várias classes de agentes farmacológicos foram usadas para reduzir o peso, incluindo medicamentos que agem periféricamente e que têm propriedades termogênicas, aumentando a taxa metabólica, e agentes de ação central, que suprimem o apetite ou aumentam a saciedade mediante vias noradrenérgicas (mazindol, femproporex, por exemplo) ou mediante vias serotoninérgicas (fenfluramina e dexfenfluramina). Esses supressores do apetite reduzem a ingestão de alimentos pelo aumento de liberação de neurotransmissores (BRAY, 1993).

A sibutramina é o primeiro agente antiobesidade que atua como inibidor da recaptação em duas vias neurotransmissoras, produzindo seus efeitos terapêuticos, primariamente, pela inibição da recaptação de noradrenalina (NA) e serotonina (5-TH).

A sibutramina é uma amina terciária que sofre desmetilação rápida ao ser ingerida e vem sendo usada para o tratamento da obesidade. A perda do radical metil origina o Metabólito 1, que é uma amina secundária. A seguir forma-se o Metabólito 2, que é uma amina primária e ambos com atividade farmacológica (CHEN *et al.*, 2002).

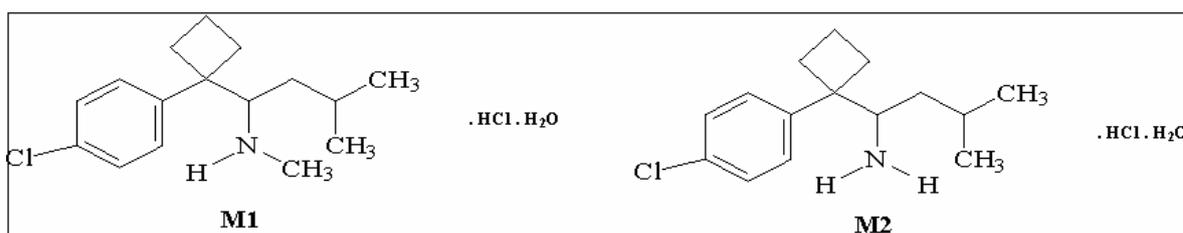


Figura 2 – Estrutura química dos metabólitos M1 e M2, respectivamente, do cloridrato de sibutramina monoidratado

2.2 Características farmacocinéticas

Estudos farmacocinéticos demonstram que a sibutramina é rapidamente e eficientemente absorvida no trato gastrointestinal. Sofre pré-eliminação sistêmica e biotransformação hepática através das isoenzimas do citocromo P450, principalmente 3A4, produzindo dois metabólitos ativos (M_1 e M_2). Logo após sua administração oral, atinge concentração plasmática máxima em 1,2 hora. A sibutramina e seus metabólitos são amplamente distribuídos nos tecidos, altamente ligados à proteínas plasmáticas e eliminados, principalmente, pelas vias hepática e renal. Os seus metabólitos atingem concentração plasmática máxima em cerca de 3 horas, alcançando o estado de equilíbrio dentro de 4 dias. A ligação às proteínas plasmáticas é de 97% para a sibutramina e 94% para os seus metabólitos (M_1 e M_2). A meia-vida da sibutramina é de 1,1 hora e dos metabólitos M_1 e M_2 de 14 e 16 horas, respectivamente. O metabolismo hepático é a principal via de eliminação da sibutramina e de seus metabólitos. Outros metabólitos (inativos) são excretados, principalmente, através da urina, com uma proporção na urina: fezes de 10:1. 77% dos metabólitos são excretados, principalmente, pela urina (BUCKETT *et al.*, 1988).

2.3 Mecanismo de ação

A sibutramina age como um inibidor de recaptação através de duas vias de neurotransmissores inibindo a recaptação da serotonina (5-HT) e da noradrenalina (NA). Não causa liberação de neurotransmissores em doses farmacológicas usuais. Estudos demonstram que o mecanismo de ação por inibição da recaptação por duas vias resulta na diminuição do peso corporal, diminuindo a ingestão de alimentos mediante a intensificação da saciedade pós-prandial e por reduzir a fome. Adicionalmente, previne o declínio do gasto energético que segue a perda de peso (HALFORD *et al.*, 1994; STRICKER *et al.*, 1996). Age primariamente em duas vias neurotransmissoras (inibição da recaptação de 5-HT e de NA) para reduzir a ingestão de alimentos. A sibutramina deve ser administrada simultaneamente com exercícios físicos e alimentação adequada, e somente quando dietas e atividades físicas não produzirem os resultados desejados (STOCK *et al.*, 1997; HANSEN *et al.*, 1999).

A noradrenalina é um hormônio liberado pela supra-renal e serve também como precursor da adrenalina, tendo como principais efeitos: elevação do metabolismo, aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial. Ao evitar a recaptação da noradrenalina na fenda sináptica a sibutramina potencializa os efeitos deste hormônio, aumentando o gasto energético (STOCK *et al.*, 1997; HANSEN *et al.*, 1999).

A serotonina é um neurotransmissor produzido no cérebro a partir do aminoácido triptofano, atuando como vasoconstritor, estimulador da musculatura lisa (presente nos órgãos), regulador do sono, do apetite e do humor. Ao inibir a recaptação da serotonina, aumenta-se sua concentração, diminuindo a ansiedade e aumentando a saciedade. Portanto, a sibutramina atua através de dois mecanismos: aumento do gasto energético e diminuição de apetite (CHAPELOT *et al.*, 2000).

2.4 Reações adversas e interações

Os efeitos adversos mais frequentes da sibutramina encontrados em estudos clínicos ocorrem no início do tratamento (durante as quatro semanas). Sua gravidade e frequência diminuem no decorrer do tempo. Os efeitos adversos, em geral, não são graves e não levam a descontinuação do tratamento, sendo reversíveis. Os efeitos adversos mais comuns encontrados nos estudos foram: secura na boca, pressão alta, fadiga, constipação, taquicardia, anorexia, dores de cabeça e insônia (RICHTER WO, 1999; FANGHANEL *et al.*, 2000).

A sibutramina em geral não deve ser administrada com outros agentes serotoninérgicos. Deve-se ter cautela ao se prescrever a sibutramina em pacientes que utilizam medicamentos que podem aumentar a pressão arterial e ou a frequência cardíaca, como descongestionantes e antitussígenos, que contêm substâncias como a efedrina ou pseudoefedrina (ABBOTT LABORATORIES, 2006; FANGHANEL *et al.*, 2000).

A administração concomitante de uma dose de etanol (0,5 ml/Kg) com 20 mg de sibutramina não resultou em interações psicomotoras clinicamente significativas, porém, o uso concomitante de excesso de álcool com a sibutramina não é recomendado. A supressão da ovulação pelos contraceptivos orais não foi inibida pela sibutramina (ABBOTT LABORATORIES, 2006).

2.5 Indicações

A sibutramina é indicada para redução do peso e no tratamento da obesidade devendo ser usada em conjunto com dieta e exercícios, como parte de um programa de controle de peso, desde que a orientação alimentar e a atividade física não sejam suficientes para atingir o objetivo clínico (STOCK *et al.*, 1997; HANSEN *et al.*, 1999).

2.6 Métodos de determinação

Na literatura científica foram encontrados artigos que relatam métodos analíticos aplicados à sibutramina. Todavia, não foi encontrado método de análise para a sibutramina na forma de cápsulas.

CHEN *et al* (2002) e DING *et al* (2003) desenvolveram método para determinação de metabólito ativo de sibutramina em plasma humano, por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas.

RADHAKRISHNA *et al* (2000) desenvolveram método para determinação quantitativa e pureza da sibutramina por cromatografia líquida de alta eficiência, bem como método para separação de seus enantiômeros por cromatografia quiral.

SEGALL et al (2003) desenvolveram método para a determinação de cloridrato de sibutramina na presença de produtos de degradação induzidos oxidativamente, por cromatografia líquida de alta eficiência.

2.7 Descrição (THE MERCK INDEX, 2003)

- **Nome químico:** cloridrato de (\pm) ciclobutanometanamina, 1-(4-clorofenil)-N,N-dimetil- α -(2-metilpropila), monoidratado;
- **Fórmula molecular:** $C_{17}H_{29}Cl_2NO$;
- **Peso molecular:** 334,33;
- **Composição elementar:** C 61,07%, H 8,74%, Cl 21,21%, N 4,19%, O 4,79%;
- **Ponto de fusão:** 193,0°C -195,5°C;
- **Solubilidade:** 2,9 mg/ml em água a pH 5,2.

3. CAPÍTULO I - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA (SQR)

3.1 Introdução

A pureza das substâncias de referência é de fundamental importância para a validação dos métodos analíticos. Segundo o FDA (1997), existem duas categorias de SQR: as compendiais, que são obtidos de fontes como USP 29 (2006) e não necessitam de caracterização posterior e as não compendiais, que são aquelas com elevado teor de pureza, mas que devem ser, cuidadosamente, caracterizadas para garantir sua identidade, potência e pureza (SWARTZ & KRULL, 1998).

A sibutramina, disponível na forma de cloridrato monoidratado de sibutramina, não possui monografia para análise de sua matéria-prima nos códigos oficiais. Em virtude da SQR do fármaco em estudo ser classificada como não compendial, realizou-se sua caracterização e identificação utilizando diferentes metodologias analíticas, como determinação da faixa de fusão, métodos espectroscópicos (RMN ^1H e RMN ^{13}C), espectrofotométricos (ultravioleta e infravermelho) e cromatográficos (cromatografia líquida).

3.2 Substância química de referência (SQR)

Utilizou-se como SQR matéria-prima proveniente da Opção Fênix Distribuidora de Insumos Ltda (São Paulo/SP, Brasil). O teor declarado (99,92%), lote (050614) e validade (06 de agosto de 2008) encontram-se especificados no certificado de análise número 05/02234 enviado pelo fornecedor.

3.3 Identificação da SQR

3.3.1 Determinação da faixa de fusão

A faixa de fusão da sibutramina SQR foi determinada através de aparelho digital modelo MQAPF-301 Microquímica, em triplicata, através do método do bloco metálico aquecido.

A Tabela 1 apresenta os valores das determinações da faixa de fusão de SQR.

Tabela 1- Valores obtidos na determinação da faixa de fusão da sibutramina SQR.

Amostra	Faixa de fusão
1	193,3 - 195,4 °C
2	193,2 - 195,4 °C
3	193,3 - 195,4 °C
Média	193,26 -195,4 °C

Os valores obtidos encontram-se em acordo com a faixa de fusão de 193,0 – 195,5°C estabelecido pelo THE MERCK INDEX.

3.3.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H (RMN ^1H)

O espectro de RMN ^1H da sibutramina SQR foi obtido em espectrofotômetro BRUKER modelo DPX 400, registrado a 400 MHz, usando metanol deuterado como solvente estando apresentado na Figura 3.

As atribuições dos hidrogênios da sibutramina SQR não foram encontradas na literatura consultada. As mesmas foram descritas baseadas nos deslocamentos químicos encontrados na literatura pertinente (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000).

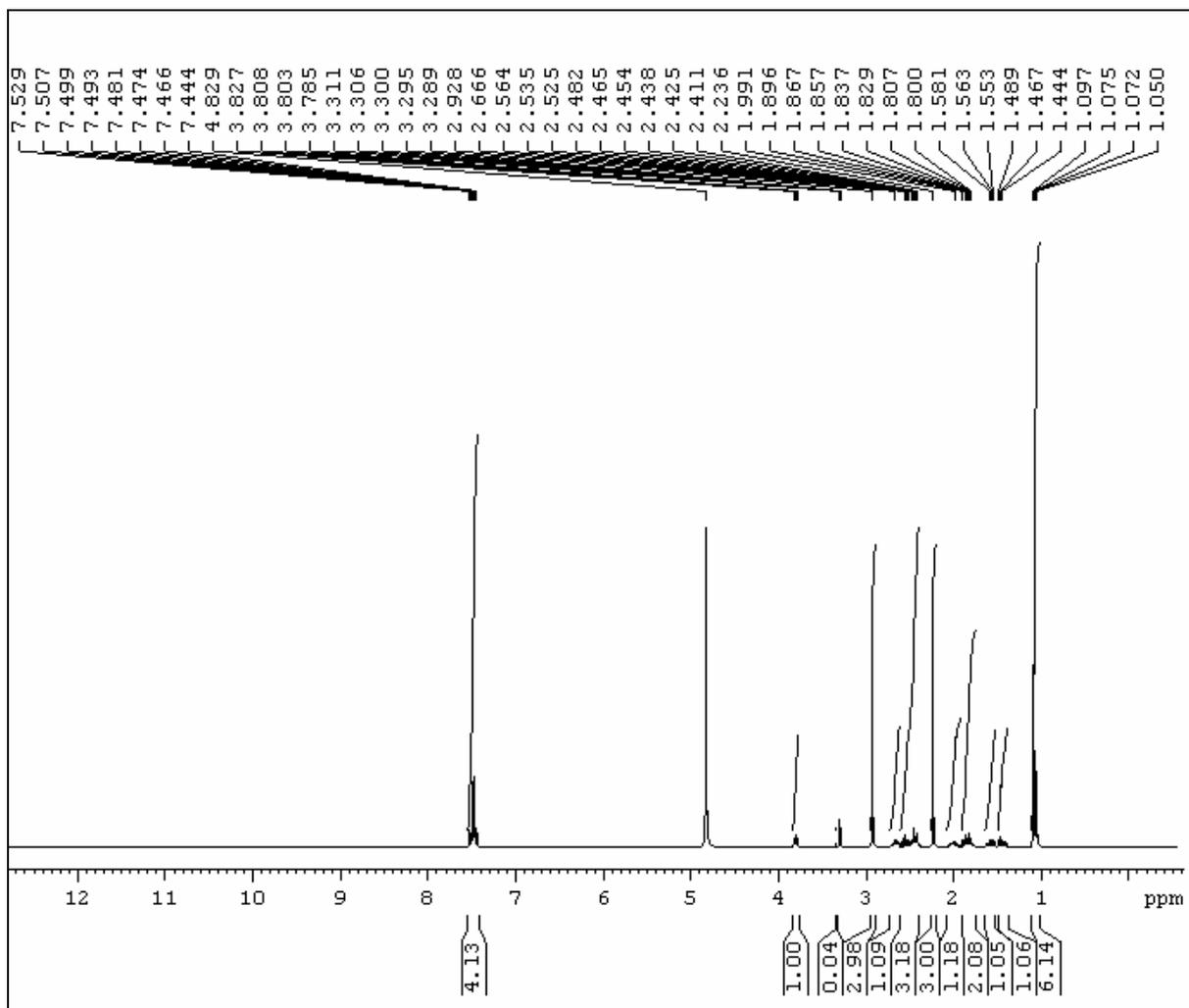


Figura 3 - Espectro de RMN ¹H da sibutramina SQR (400 MHz, CD₃OD).

Uma análise detalhada do espectro de RMN ¹H (Figura 3) permitiu identificar todos os hidrogênios pertencentes à estrutura da sibutramina (Figura 1). A presença do anel aromático 1,4-di-substituído, na estrutura, foi confirmada através dos sinais em δ 7,44 - 7,52 ppm. O grupo $-N(CH_3)_2$ foi atribuído pelos sinais, na forma de singletos, em δ 2,92 e 2,23 ppm. A presença do hidrogênio metínico $-CH-N(CH_3)_2$ é verificada pelo sinal em δ 3,8 ppm na forma de um duplo dubleto. Os sinais em δ 2,46 - 2,71 e 1,76 - 1,89 ppm podem ser atribuídos aos hidrogênios metilênicos ($-CH_2-$) do ciclobutano e metínicos ($-CH-$) desta estrutura. O sinal em δ 1,99 ppm, na forma de multipletos, bem como, os sinais em δ 1,44 e 1,58 ppm, na forma de multipletos, e os dois dubletos observados entre δ 1,05 - 1,09 ppm, com uma constante de acoplamento de J 6,5 Hz, correspondem ao hidrogênio metínico e aos hidrogênios metilênicos e metílicos, respectivamente, do grupo isobutil $-CH_2CH(CH_3)_2$ desta estrutura.

3.3.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^{13}C (RMN ^{13}C)

O espectro de RMN ^{13}C da sibutramina SQR foi obtido em espectrofotômetro Bruker modelo DPX 100, registrado a 100 MHz, usando metanol deuterado como solvente. O mesmo encontra-se na Figura 4.

As atribuições dos carbonos da sibutramina SQR não foram encontradas na literatura consultada. As mesmas foram descritas baseadas nos deslocamentos químicos encontrados na literatura pertinente (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000).

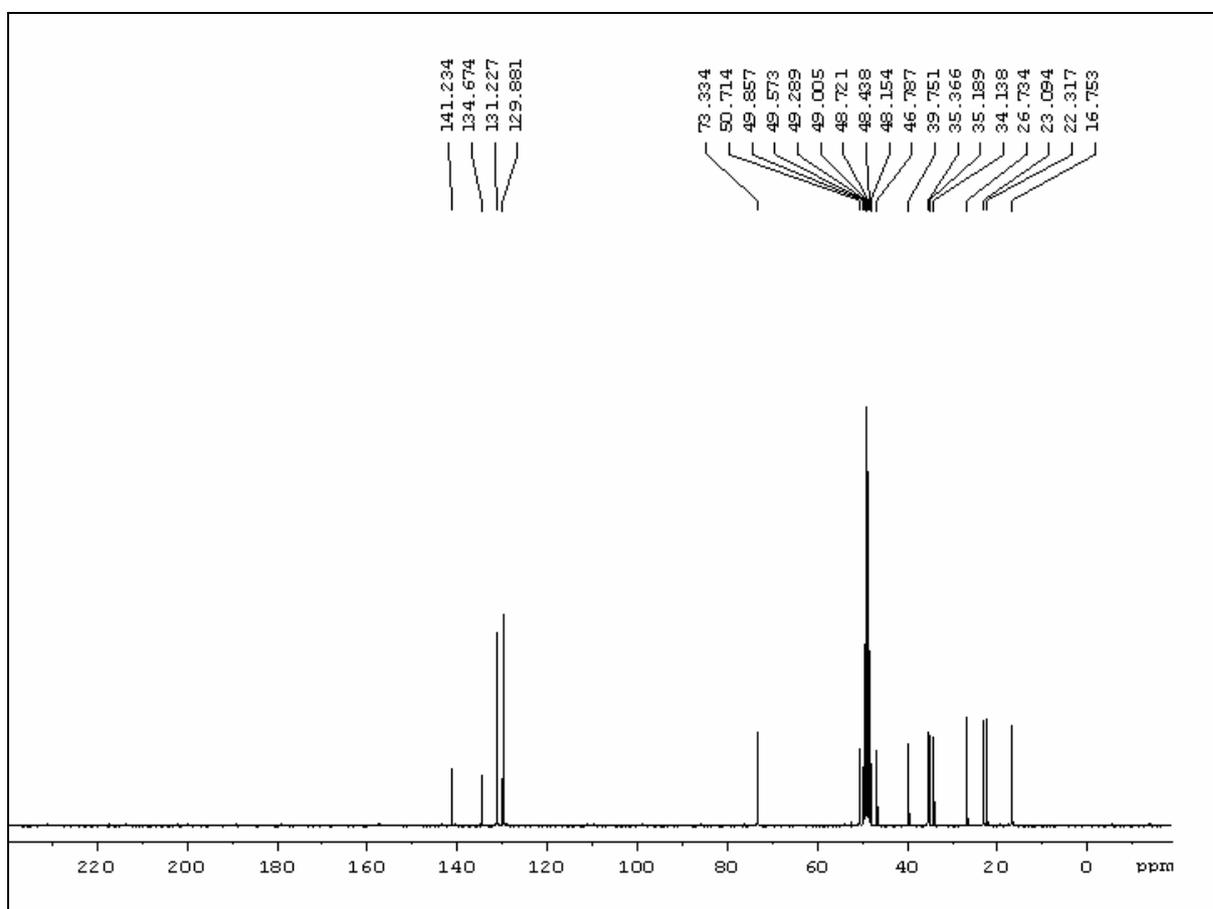


Figura 4 - Espectro de RMN ^{13}C da sibutramina SQR (100 MHz, CD_3OD).

O espectro de RMN de ^{13}C totalmente desacoplado (Figura 4), que reduz singletos todos os multipletos resultantes do acoplamento ^{13}C - ^1H , apresentou quinze sinais, distribuídos numa região espectral entre δ 16,7 - 141,2 ppm. Desses sinais, dois (δ 129,8 e 131,2 ppm) indicam a presença de dois núcleos de carbonos, através de suas intensidades, perfazendo, em consequência, um total de dezessete átomos de carbono, que correspondem ao número

observado na estrutura da sibutramina (Figura 1) Os sinais em δ 129,8 - 141,2 ppm correspondem aos carbonos do anel aromático, enquanto que o sinal em δ 73,3 ppm pertence ao carbono metínico (-CH-N(CH₃)₂) ligado ao grupo -N(CH₃)₂. O restante dos sinais presentes neste espectro (δ 16,7 - 50,7 ppm) correspondem aos carbonos metínicos (-CH-), metilênicos (-CH₂-) e metílicos (-CH₃) desta estrutura.

3.3.4 Espectrofotometria na região do infravermelho

O espectro de absorção na região do infravermelho foi obtido em espectrofotômetro FOURIER, marca PERKIN, utilizando pastilhas contendo sibutramina SQR e brometo de potássio. Para a obtenção da mesma, misturou-se 1,5 mg da SQR com 150 mg de brometo de potássio, previamente dessecado a 105 °C. A Figura 5 apresenta o espectro na região do infravermelho da sibutramina SQR onde verificam-se as seguintes bandas principais (cm⁻¹): 3274, 2963, 2700, 1651, 1492, 1407, 1244, 1181, 1091, 1010.

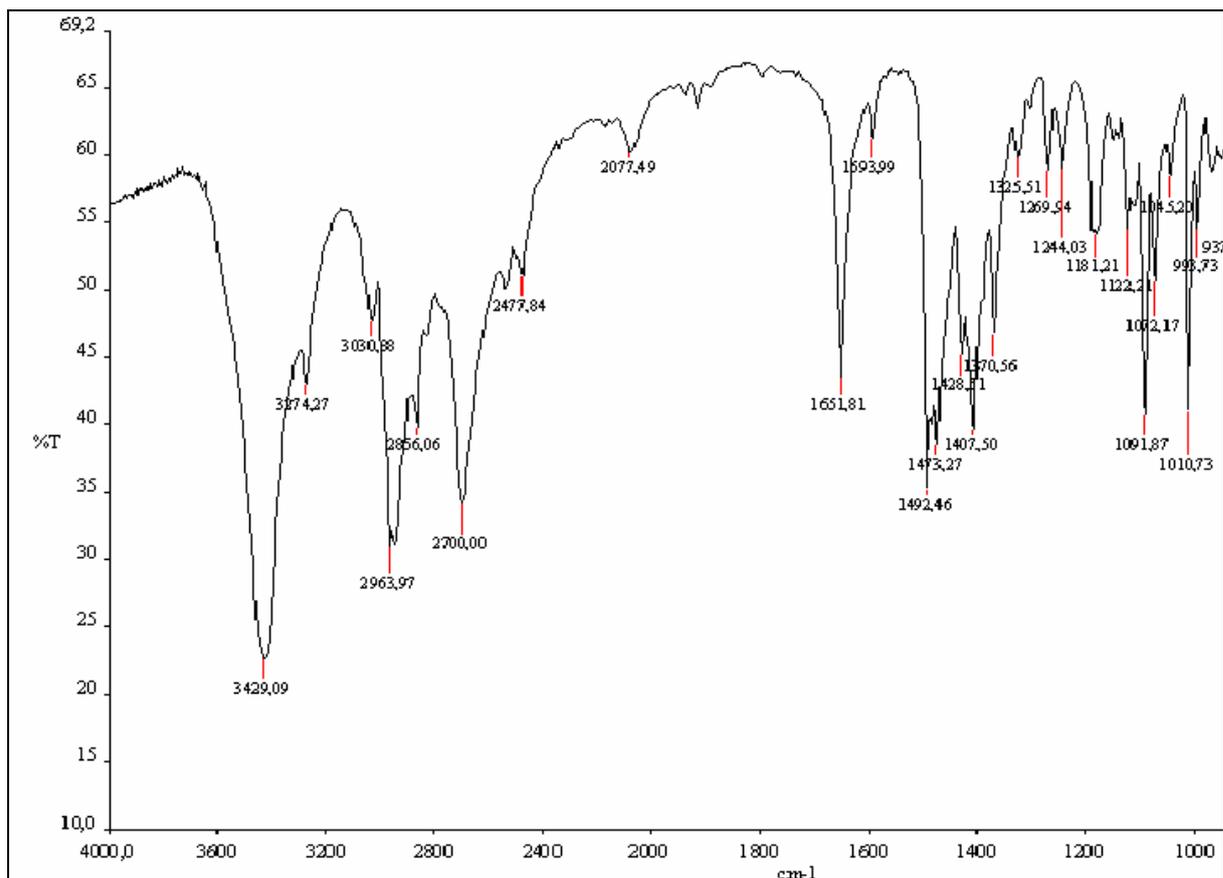


Figura 5 - Espectro na região do infravermelho da sibutramina SQR.

As atribuições das bandas características não foram encontradas na literatura consultada. As mesmas foram descritas baseadas na literatura pertinente (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000). Em 3274 cm^{-1} podemos observar uma banda de fraca intensidade e em 1651 cm^{-1} uma banda de intensidade média que podem ser referentes ao anel aromático. Em 2963 , 1492 e 1407 cm^{-1} podemos observar bandas de intensidade média que podem ser atribuídas às ligações C-C de alcanos. Na região de 2700 cm^{-1} podemos observar uma banda de intensidade média, que pode ser referente ao sal terciário presente na estrutura da sibutramina. Em 1244 cm^{-1} podemos observar uma banda de intensidade fraca, que pode ser atribuído à amina terciária. A presença do átomo de halogênio poderia ser atribuída na banda presente na região de 1181 cm^{-1} que poderia referir-se ao grupamento aril-Cl. Podemos tentar atribuir o grau de substituição do sistema aromático através da análise das bandas de intensidade média observadas em 1091 e 1010 cm^{-1} que seriam referentes a um sistema aromático di-substituído nas posições 1,4.

3.3.5 Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)

Foi traçado espectro de absorção molecular na região de 200-400 nm, da solução de sibutramina SQR, na concentração de 10 µg/ml em espectrofotômetro UV/VIS, Shimadzu.

No espectro de absorção molecular da sibutramina SQR, apresentado na Figura 6, observa-se somente um máximo de absorção no comprimento de onda de 223 nm.

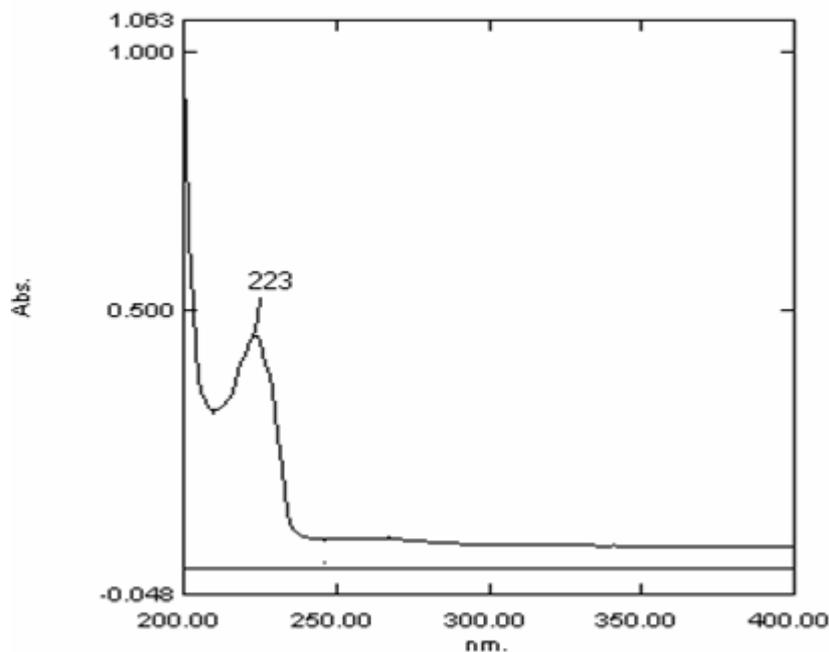


Figura 6 – Espectro de absorção molecular na região de 200 - 400 nm da solução de sibutramina SQR em metanol (primeira diluição) e água (segunda diluição), na concentração de 10 µg/ml.

3.3.6 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência utilizaram método validado de acordo com o item 4.6.1 do Capítulo II, sendo realizadas em equipamento, Shimadzu SLC-10 Avp. O cromatograma da solução de sibutramina SQR, na concentração de 30 µg/ml, está apresentado na Figura 7.

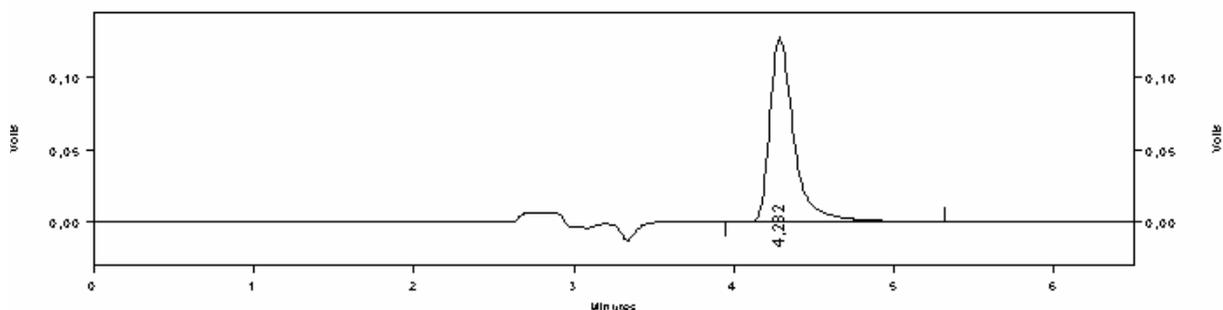


Figura 7 - Cromatograma obtido com a solução de sibutramina SQR, na concentração de 30 µg/ml. Condições cromatográficas: coluna Luna Phenomenex® RP₁₈ (250 mm x 4 mm, 5 µm); fase móvel: metanol:água:triethylamina (80:20:0,5) pH 5,65 ajustado com ácido fosfórico; vazão: 1 ml/ min; volume injetado: 20 µl.

3.4 Determinação de água

Para determinar a umidade contida na sibutramina SQR foi utilizado o método de Karl-Fischer, empregando titulador automático, conforme preconiza a Farmacopéia Brasileira IV ed. (1988). Foram pesados, exatamente, cerca de 200 mg do conteúdo da matéria-prima. Para determinar a porcentagem de umidade contida nos produtos utilizou-se o seguinte cálculo:

$$\% \text{ de umidade} = \frac{(\text{gasto do reagente de Karl Fischer} \times \text{FC}) \times 100}{\text{quantidade de amostra (mg)}}$$

Onde:

FC = fator de correção do reagente de Karl-Fischer

A Tabela 2 apresenta os valores encontrados na análise da determinação da porcentagem de água, em triplicata, da sibutramina SQR por Karl-Fischer.

Tabela 2 - Valores obtidos na determinação de água presente na sibutramina SQR pelo método de Karl-Fisher.

Amostra	Quantidade pesada	Umidade (%)
1	0,200	5,41
2	0,200	5,41
3	0,199	5,40
Média		5,406

Os resultados obtidos demonstram que a sibutramina SQR apresentou um percentual inferior a 6% de umidade. Não existe, no entanto, especificação farmacopéica para o limite de umidade da sibutramina em matéria-prima.

3.5 Conclusões

Tendo em vista os resultados das análises qualitativas da sibutramina utilizada como referência e a correspondência do teor declarado pelo fornecedor desta, quando analisado contra padrão fornecido pelo laboratório fabricante da especialidade farmacêutica, se empregou esta substância nas análises quantitativas.

4. CAPÍTULO II - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA DE ANÁLISE QUANTITATIVA PARA CÁPSULAS

4.1 Introdução

A credibilidade nos procedimentos aplicados no controle de qualidade de medicamentos é um fator essencial na indústria farmacêutica, para isto é necessário que o método analítico empregado seja validado, assegurando, assim, a confiabilidade dos resultados obtidos (GOMES, 2003).

A escolha de um método analítico depende de vários fatores, tais como: natureza do fármaco, complexidade, pureza e quantidade de amostra, bem como, do propósito do método, ou seja, qualitativo, semiquantitativo ou quantitativo. Devem, também, ser consideradas as disponibilidades econômicas, de equipamentos e reagentes (AVENDAÑO, 1993; MEHTA, 1997).

As Diretrizes sobre a validação de procedimentos analíticos encontram-se disponíveis no ICH, 1996, USP 29, 2006 e em outras publicações, como a Resolução RE nº 899 (BRASIL, 2003) as quais indicam que os principais parâmetros a serem avaliados na validação de um método devem ser:

- **Especificidade ou sensibilidade**

Representa a capacidade do método de avaliar de forma inequívoca a substância em exame na presença de componentes, como excipientes, impurezas ou produtos de degradação, que possam interferir na determinação de uma mistura complexa.

- **Linearidade**

Corresponde à capacidade do método de fornecer resultados proporcionais à concentração da substância em estudo, dentro de uma faixa de variação conhecida. Os resultados devem ser analisados por métodos estatísticos apropriados, como, por exemplo, o cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. A curva padrão obtida deve

demonstrar o coeficiente de correlação linear e o intercepto da reta, sendo estabelecida pela análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes.

- **Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)**

O LD representa a menor concentração do fármaco que o processo analítico pode diferenciar, mas não quantificar com precisão sob condições experimentais e o LQ representa a menor concentração da substância em análise avaliada pelo método, com exatidão e precisão aceitáveis.

- **Precisão**

Corresponde ao grau de concordância entre os resultados de análises individuais quando o método é aplicado diversas vezes em uma mesma amostra homogênea, em idênticas condições de testes.

A precisão pode ser avaliada pelo grau de repetibilidade, precisão intermediária ou reprodutibilidade. A repetibilidade (ICH, 1996) é determinada através de várias análises, nas mesmas condições, em um curto intervalo de tempo. Essa determinação deve ser feita a partir de um mínimo de nove determinações, contemplando o limite de variação do método, ou seja, três concentrações (baixa, média, alta), com três réplicas cada, ou a partir de no mínimo de seis determinações a 100% da concentração teste. A precisão intermediária expressa o efeito de variações intralaboratoriais devido a eventos diferentes como diferentes dias, analistas ou equipamentos. A reprodutibilidade refere-se ao uso do procedimento analítico em diferentes laboratórios, como parte de um estudo colaborativo.

É expressa normalmente através do coeficiente de variação percentual (CV%) ou desvio padrão relativo (DPR), e pode ser avaliada através de testes estatísticos como o teste F.

- **Exatidão**

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência. Pode ser expressa como o percentual de resposta obtido através do ensaio de uma quantidade conhecida da substância em exame incorporada em um meio de composição definida. Este parâmetro deve ser analisado após o estabelecimento da

linearidade e da especificidade, podendo ser calculada como a porcentagem de recuperação da quantidade conhecida da substância química de referência adicionada à amostra.

- **Robustez**

Corresponde à capacidade de um método não ser afetado por uma pequena e deliberada modificação em seus parâmetros, como por exemplo: proporção e pH da fase móvel, temperatura, comprimento de onda, estabilidade da solução analítica, tempo de extração, entre outras.

A literatura indica que não existe necessidade de avaliar todos os parâmetros de performance analítica. O tipo de método e seu respectivo uso determinam quais parâmetros devem ser investigados. Para os ensaios de determinação quantitativa a especificidade, a precisão, a exatidão e a linearidade devem ser consideradas (ICH, 1996; USP, 2006; KRULL & SWATZ, 1998).

No presente capítulo serão descritos os métodos por espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) e cromatografia líquida (CLAE), os quais foram validados para determinação quantitativa da sibutramina em cápsulas. A comparação dos métodos propostos está, igualmente, apresentada neste capítulo através de análise estatística.

4.2 Produtos farmacêuticos

- Medicamento referência (Produto A): Reductil[®] (Abbott) cápsulas contendo 15 mg de cloridrato de sibutramina monoidratado.
Excipientes: celulose microcristalina; dióxido de silício; estearato de magnésio e lactose.
- Medicamento similar (Produto B): Plenty[®] (Medley) cápsulas contendo 15 mg de cloridrato de sibutramina monoidratado.
Excipientes: celulose microcristalina; dióxido de silício; estearato de magnésio e lactose.
- Medicamento genérico (Produto C): cloridrato de sibutramina monoidratado[®] (Medley) cápsulas contendo 15 mg de cloridrato de sibutramina monoidratado.
Excipientes: celulose microcristalina; dióxido de silício; estearato de magnésio e lactose.

4.3 Solventes e reagentes

- Água destilada purificada;
- Água purificada Milli-Q;
- Ácido fosfórico PA, Merck;
- Gás Hélio, White Martins;
- Metanol grau cromatográfico, Merck;
- Metanol PA, Merck;
- Solução tampão pH 4,0, Merck;
- Solução tampão pH 7,0, Merck;
- Trietilamina, Merck;
- Ácido clorídrico PA, Merck.

4.4 Equipamentos e acessórios

- Balança analítica, Bosch, modelo SAE 200;
- Banho ultra-sônico, Unique, USC 1400;
- Bomba de vácuo, Primatec;
- Coluna cromatográfica, Luna Phenomenex RP-18 (250 mm x 4,0, 5 μ m);
- Cromatógrafo líquido Shimadzu SLC-10 ADvp equipado com bomba modelo LC-10AD, detector com comprimento de onda variável UV/VIS modelo SPD-10 ADvp, controlador SCL-10 ADvp, integrador automático computadorizado através de programa Class VP® software e injetor automático Rheodyne com “loop” de 20 μ l (Shimadzu; Kyoto, Japan);
- Cubetas de quartzo 10 mm, Hellma 100 QS;
- Espectrofotômetro UV-1650 PL/VIS, Shimadzu;
- Filtro de celulose regenerada 13 mm x 0,45 μ m, Sartorius;
- Membrana filtrante de acetato de celulose 0,45 μ m, Millipore;
- Papel filtro quantitativo faixa preta, Framex;
- Pipetador, Tranferpette Brand;
- Potenciômetro digital Schott Field LAB pH;
- Sistema de filtração, Millipore;

- Aparelho de desintegração, PHARMA TEST, modelo PTZ;
- Aparelho de dissolução, PHARMA TEST, modelo PTWS-3E
- Câmara ultravioleta 254nm, Gardener Byko-spectra;
- Mesa agitadora, TECNAL, modelo TE 140;
- Centrífuga, CENTRIBIO, modelo TDL80-2B.

4.5 Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)

Na análise da sibutramina, através do método espectrofotométrico na região do ultravioleta, empregou-se como diluente metanol (primeira diluição) e água (segunda diluição) e detecção em 223 nm. Para validação do método utilizou-se, inicialmente, o Produto A, com posterior aplicação aos demais.

4.5.1 Validação do método analítico

Parâmetros como especificidade, linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e robustez foram utilizados para a validação do método.

4.5.1.1 Especificidade

Avaliou-se a possível interferência dos excipientes na determinação da sibutramina. As soluções foram comparadas quanto ao perfil dos espectros obtidos.

Pesou-se, exatamente, 20 mg de sibutramina SQR, transferiu-se para balão volumétrico de 100 ml e completou-se o volume com metanol. Transferiu-se uma alíquota de 5 ml desta solução para balão volumétrico de 100 ml e completou-se o volume com água a fim de se obter solução de 10 µg/ml.

Paralelamente, foi preparada solução simulada da amostra contendo os excipientes (ASE) presentes nas cápsulas. Utilizou-se diluição equivalente à solução de sibutramina SQR, em conformidade com o peso médio das cápsulas.

A composição expressa em porcentagem da amostra simulada dos excipientes foi determinada de acordo com as especificações percentuais médias descritas para cada excipiente (KIBBE, 2000).

Os excipientes foram transferidos para balão volumétrico de 100 ml, solubilizando-os com auxílio de 50 ml de metanol. Após agitação mecânica por 30 minutos e banho ultrassônico por mais 20 minutos, completaram-se os volumes com o mesmo solvente. Centrifugou-se uma porção da solução resultante por 2 minutos a 3300 rpm. Transferiram-se alíquotas de 5 ml da solução sobrenadante para balões volumétricos de 100 ml, completando-se o volume com água, a fim de se obter soluções de 10 µg/ml.

Os espectros de absorção foram comparados, verificando a possível interferência dos excipientes na determinação do teor de sibutramina.

4.5.1.2 Preparo da Curva de Ringbom

Com a finalidade de determinar a faixa ideal de concentração, na qual o método espectrofotométrico na região do ultravioleta apresenta linearidade, foi construída curva de Ringbom, utilizando metanol (primeira diluição) e água (segunda diluição) como diluentes. A partir de uma solução metanólica de 100 µg/ml da SQR transferiram-se, com auxílio de bureta, alíquotas, variando entre 1 a 30 ml, para balões volumétrico de 100 ml. Completaram-se os volumes com água, obtendo-se soluções com concentrações variáveis entre 1 a 30 µg/ml. As leituras das absorvâncias foram realizadas em 223 nm, utilizando-se cubetas de 1 cm de caminho óptico e o respectivo diluente como branco. A partir dos resultados construiu-se a curva de Ringbom plotando-se os valores de 100% - %T *versus* concentração em escala logarítmica.

4.5.1.3 Linearidade: Curva de calibração

A partir da solução metanólica de sibutramina SQR de 100 µg/ml transferiram-se, com auxílio de bureta, alíquotas de 6,0; 8,0; 10,0; 12,0; 14,0 e 16,0 ml para balões volumétricos de 100 ml. Completaram-se os volumes, com água, obtendo-se soluções com concentrações de 6, 8, 10, 12, 14 e 16 µg/ml. As leituras foram efetuadas em 223 nm utilizando o mesmo diluente como branco. As curvas foram preparadas em três dias diferentes. Com os valores das absorvâncias (eixo das ordenadas), em função da concentração da sibutramina (eixo das

abscissas), foram calculados os coeficientes de correlação e a equação da reta de calibração. Os resultados foram submetidos à análise estatística de variância (ANOVA).

4.5.1.4 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os LD e LQ foram determinados a partir dos dados da curva de calibração, utilizando a seguinte equação (ICH, 1996):

$LD = \frac{3,3 \sigma}{IC}$	$LQ = \frac{10 \sigma}{IC}$
------------------------------	-----------------------------

Onde:

σ : Desvio padrão médio do intercepto;

IC: Inclinação da curva de calibração.

4.5.1.5 Precisão

A precisão do método foi avaliada através dos coeficientes de variação percentual obtidos durante a determinação da sibutramina em cápsulas nos testes de repetibilidade (intradia, n = 6) e precisão intermediária (interdias, n = 2) realizados.

- Preparo das amostras

Determinou-se o peso do conteúdo de 20 cápsulas, conforme Farmacopéia Brasileira IV Edição (1988). Misturaram-se os conteúdos das cápsulas. Foram transferidos, desta mistura, o equivalente a 20 mg de sibutramina, para balões volumétricos de 100 ml, solubilizando-se com auxílio de 50 ml de metanol. Após agitação por 30 minutos e banho ultra-sônico por mais 20 minutos, completaram-se os volumes com o mesmo solvente. Centrifugou-se uma porção da solução resultante por 2 minutos a 3300 rpm. Transferiram-se alíquotas de 5 ml da solução sobrenadante para balões volumétricos de 100 ml, completando-se o volume com água, a fim de se obter soluções de 10 µg/ml. Em paralelo, preparou-se solução de sibutramina SQR na mesma concentração.

- Preparo da SQR

Pesou-se, exatamente, 20 mg de sibutramina SQR, transferiu-se para balão volumétrico de 100 ml e completou-se o volume com metanol. Transferiu-se uma alíquota de 5 ml desta solução para balão volumétrico de 100 ml e completou-se o volume com água a fim de se obter solução de 10 µg/ml.

- Cálculos

A concentração de sibutramina nas cápsulas foi determinada pela seguinte equação:

$$C = (A_A \cdot C_{SQR}) / A_{SQR}$$

Onde:

A_A : Absorvância da solução de sibutramina nas amostras;

C_{SQR} : Concentração da SQR;

A_{SQR} : Absorvância média da SQR.

A porcentagem de sibutramina nas amostras comerciais foi calculada pela seguinte equação:

$$C\% = (C_A \cdot P) / C_T$$

Onde:

C_A : Concentração percentual das amostras;

P: Pureza da SQR;

C_T : Concentração teórica da solução de sibutramina amostra.

4.5.1.6 Exatidão: Teste de Recuperação

Para a elaboração do teste de recuperação foram preparadas soluções de sibutramina SQR e de sibutramina cápsulas, diluídas em metanol, ambas na concentração de 100 µg/ml, conforme descrito no item 4.5.1.5 Preparo das amostras.

Transferiram-se alíquotas de 5,0 ml da solução centrifugada das amostras para balões volumétricos de 100 ml, denominados A, R₁, R₂, R₃ e R₄. Adicionaram-se alíquotas de 2,5, 5,0, 7,5 e 10,0 ml da solução de SQR aos balões R₁, R₂, R₃ e R₄, respectivamente e completou-se o volume com água. Simultaneamente, foi transferida alíquota de 5,0 ml da solução de SQR para balão volumétrico de 100 ml denominado SQR conforme Tabela 3.

Tabela 3 - Preparo das soluções para o teste de recuperação da sibutramina, utilizando espectrofotometria na região do ultravioleta.

Balão volumétrico de 100 ml	Volume (ml) da solução amostra (100 µg/ml)	Volume (ml) da solução SQR (100 µg/ml)	Concentração (µg/ml)
A	5,0	-	5,0
R1	5,0	2,5	7,5
R2	5,0	5,0	10,0
R3	5,0	7,5	12,5
R4	5,0	10,0	15,0
SQR	-	5,0	5,0

- Cálculo para o teste de recuperação

As porcentagens de recuperação da sibutramina SQR foram calculadas através da seguinte equação:

$$R\% = [(C_A - C_{NA}) / C_P] \cdot P$$

Onde:

C_A: Concentração de sibutramina encontrada na amostra adicionada de SQR;

C_{NA}: Concentração de sibutramina encontrada na amostra não adicionada de SQR;

C_P: Concentração de sibutramina SQR (µg/ml) adicionada à amostra;

P: Pureza da SQR.

4.5.1.7 Robustez

A robustez do método foi avaliada através da análise da estabilidade da solução de sibutramina SQR, na concentração de 10 µg/ml, a 4°C e a temperatura ambiente. Após os tempos de 0 e 24 horas, leituras foram realizadas em 223 nm, utilizando o mesmo diluente como branco.

4.5.2 Resultados

A Figura 8 apresenta os espectros obtidos no estudo da interferência dos excipientes no método proposto.

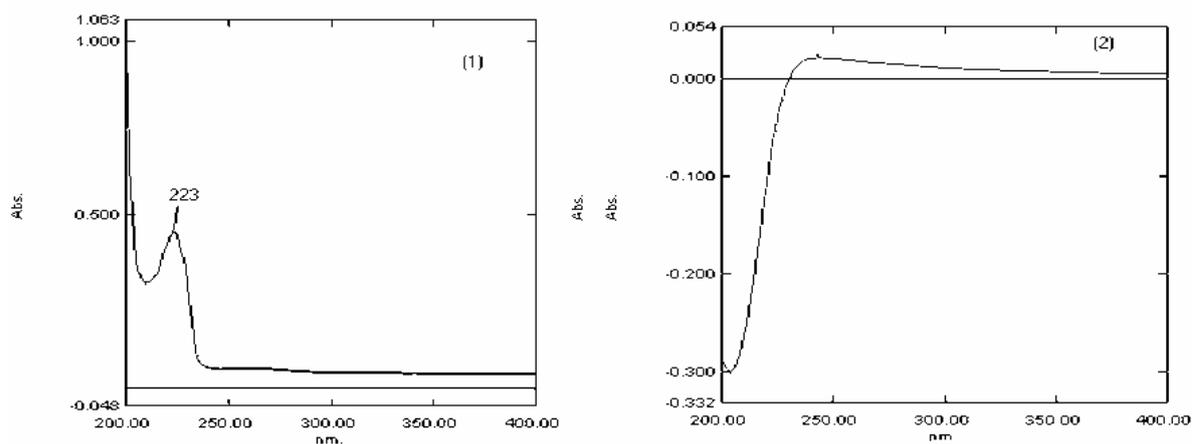


Figura 8 – Espectros de absorção molecular na região do ultravioleta das soluções de sibutramina SQR (1) e amostras simuladas de excipientes das cápsulas (2), na concentração de 10 µg/ml.

A Figura 9 representa a curva de Ringbom, obtida após conversão dos valores de transmitância encontrados para um intervalo de concentração de 1,0 a 30,0 µg/ml.

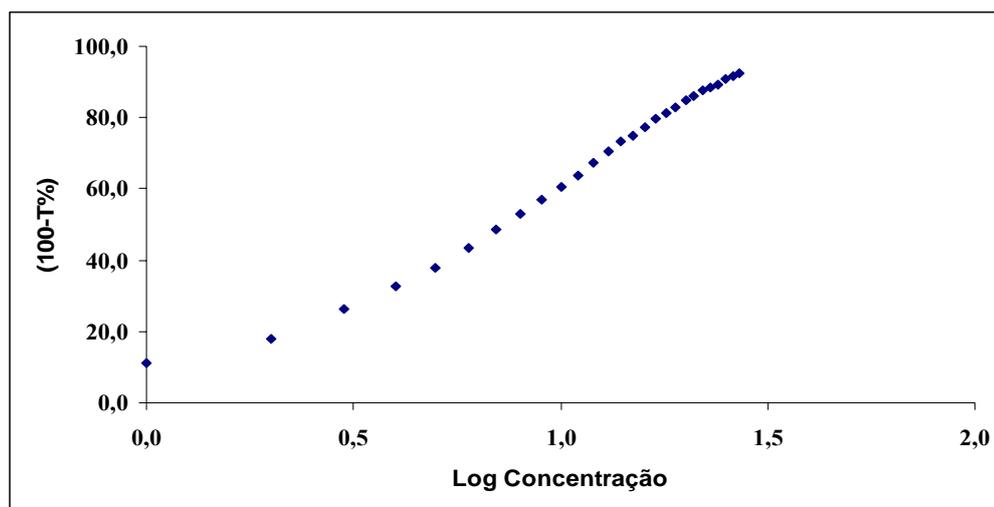


Figura 9 - Representação gráfica da curva de Ringbom da sibutramina SQR obtida pelo método espectrofotométrico na região do ultravioleta.

Na Tabela 4 encontram-se as absorvâncias médias correspondentes à sibutramina, obtidas na curva de calibração, referentes a cada diluição da SQR. O coeficiente de variação percentual médio obtido das médias das concentrações usadas na curva de calibração foi 0,66 por cento.

Tabela 4 - Absorvâncias da sibutramina SQR obtidas para elaboração da curva de calibração por espectrofotometria na região do ultravioleta.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvâncias			Média \pm e.p.m	CV%
	1º dia	2º dia	3º dia		
6,0	0,240	0,245	0,241	0,242 \pm 0,0015	1,09
8,0	0,315	0,313	0,317	0,315 \pm 0,0011	0,63
10,0	0,384	0,387	0,386	0,386 \pm 0,0009	0,39
12,0	0,458	0,458	0,458	0,458 \pm 0,0000	0,00
14,0	0,522	0,529	0,532	0,528 \pm 0,0030	0,97
16,0	0,600	0,598	0,608	0,602 \pm 0,0031	0,88

e.p.m = erro padrão da média

CV% = coeficiente de variação percentual

A representação da curva de calibração e da equação da reta obtida por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, encontra-se na Figura 10.

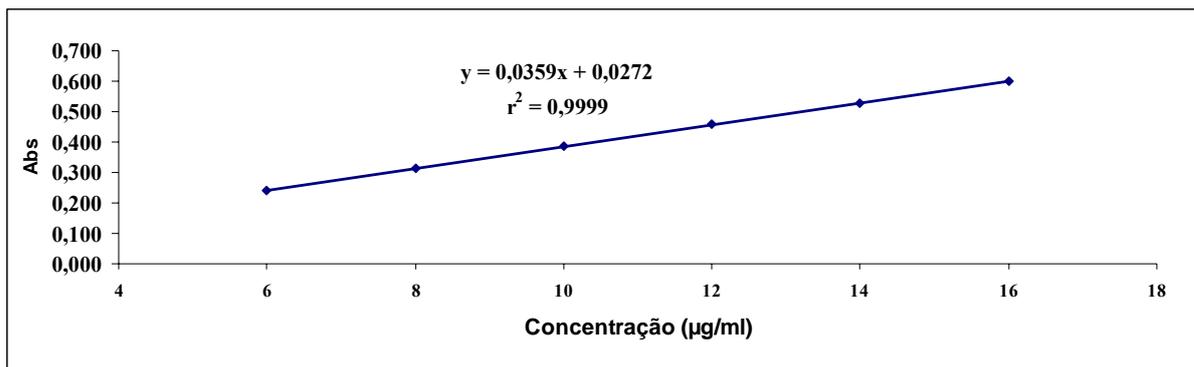


Figura 10 - Representação gráfica da curva de calibração e da equação da reta da sibutramina SQR obtida pelo método espectrofotométrico na região do ultravioleta.

As Tabelas 5 e 6 apresentam os valores dos tratamentos estatísticos sobre os valores experimentais obtidos para a curva de calibração através de análise de variância. Os valores referentes à análise dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), calculados através das equações descritas no item 4.5.1.6, encontram-se na Tabela 6.

Tabela 5 - Análise de variância (ANOVA) das absorvâncias obtidas para elaboração da curva de calibração da sibutramina SQR, por espectrofotometria na região do ultravioleta.

Fontes de variação	gl	Soma dos Quadrados	Variância	F.C	F.T
Entre concentrações	5	0,27009	0,054018	4789,78*	3,11
-regressão linear	1	0,27008	0,27008	23947,63*	4,75
-desvio da linearidade	4	0,00001	0,000004	0,32**	3,26
Resíduo	12	0,00014	0,000011		
Total	17	0,27023			

* Significativo para $p < 0,05$.

** Não significativo para $p > 0,05$.

Tabela 6 - Resultado da curva de calibração obtida pelo método dos mínimos quadrados, por espectrofotometria na região do ultravioleta.

Parâmetros	Resultados
Faixa de linearidade	6 – 16 µg/ml
Equação: $y = bx + a$	$y = 0,0359x + 0,0272$
Inclinação (b) ± desvio padrão	$0,0359 \pm 0,00055$
Intercepto (a) ± desvio padrão	$0,0272 \pm 0,00438$
Coefficiente de correlação (r^2)	0,9999
Limite de detecção (LD)	0,40 µg/ml
Limite de quantificação (LQ)	1,22 µg/ml

Os valores experimentais obtidos nos doseamentos das cápsulas de sibutramina, referentes à precisão do método, assim como os valores dos tratamentos estatísticos por análise de variância (ANOVA) interdias, encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7 - Valores experimentais referentes à determinação de sibutramina e análise de variância (ANOVA) da precisão interdias, obtido por espectrofotometria na região do ultravioleta.

Amostras	Cápsulas (%)	
	1º dia	2º dia
1	98,57	101,71
2	99,96	100,88
3	99,12	99,20
4	100,52	-
5	101,07	-
6	99,68	-
Média	99,82	100,60
e.p.m	0,37	0,74
CV%	0,91	1,27
ANOVA	F calculado	
Interdias	1,14	

e.p.m = erro padrão da média.

CV % = coeficiente de variação percentual.

F calculado para $p > 0,05$ (5,59).

Na Tabela 8 encontram-se os resultados obtidos nos testes de exatidão por recuperação da SQR das cápsulas de sibutramina, obtidos por espectrofotometria na região do ultravioleta.

Tabela 8 - Resultados experimentais referentes ao teste de recuperação para as cápsulas de sibutramina, por espectrofotometria na região do ultravioleta.

Amostra	SQR ($\mu\text{g/ml}$)	SQR ($\mu\text{g/ml}$)	% Recuperação
	Adicionada	Recuperada *	
Cápsulas	2,5	2,46	98,46
	5,0	4,98	99,55
	7,5	7,48	99,70
	10,0	10,08	100,84

* cada valor corresponde à média de três determinações

4.5.3 Discussão

A espectrofotometria na região do ultravioleta, por ser um método fácil, rápido e de custo relativamente baixo, tem sido amplamente utilizada para a quantificação de fármacos (CLURCZAK, 1998).

Muitos solventes estão disponíveis para análise na região do ultravioleta e a escolha dos mesmos deve ser baseada na solubilidade da substância a ser analisada. Para testar a solubilidade da sibutramina, a literatura descreve a utilização do metanol e o THE INDEX MERCK indica que a sibutramina é solúvel em água. Em decorrência das solubilidades indicadas, avaliou-se, experimentalmente, o emprego de ambos diluentes.

A especificidade do método foi avaliada através da pesquisa da possível interferência dos excipientes das cápsulas na determinação quantitativa da sibutramina. De acordo com os espectros obtidos para a SQR e a respectiva amostra simulada das cápsulas (Figura 8), constatou-se que o método foi específico, demonstrando não haver interferência dos excipientes no comprimento de onda de máxima absorção. Foi empregada a curva de Ringbom para verificar o intervalo ótimo de concentração para qual o método pode ser utilizado. Observou-se, através dessa, que houve linearidade na faixa de 6 a 16 µg/ml, conforme apresentado na Figura 9.

Foram elaboradas três curvas em diferentes dias, sendo calculadas as absorvâncias médias obtidas para traçar a curva padrão, conforme Figura 10. Os resultados apresentaram boa correlação linear entre as absorvâncias obtidas e a concentração da sibutramina SQR, nos intervalos de 6,0 a 16,0 µg/ml. A equação da reta para o método foi $y = 0,0359x + 0,0272$, com coeficiente de correlação de 0,9999. A Tabela 6 resume os parâmetros da curva padrão. Os dados da linearidade foram validados pela análise de variância (ANOVA) que demonstrou significativa regressão linear ($p < 0,05$) e nenhum desvio significativo da linearidade ($p > 0,05$). Os resultados comprovaram a validade do método em relação à linearidade.

A sensibilidade do método espectrofotométrico foi avaliada através da determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) da sibutramina (Tabela 6). Os valores obtidos para o LD e LQ foram de 0,40 µg/ml e 1,22 µg/ml, indicando boa sensibilidade do método.

A precisão do método analítico foi demonstrada através da repetibilidade (intradia) e precisão intermediária (interdias). O valor experimental obtido para a determinação da sibutramina na amostra, no mesmo dia e nas mesmas condições, foi 99,82%. Nas análises

realizadas no segundo dia obteve-se 100,60% (Tabela 7). Os baixos valores de coeficiente de correlação (< 2%) obtidos neste estudo caracterizam o método como preciso. A ANOVA indicou que não houve diferença significativa entre as análises realizadas na avaliação da precisão interdias do método (Tabela 7).

A exatidão do método proposto (Tabela 8) foi determinada através do teste de recuperação da sibutramina SQR. A porcentagem de recuperação média obtida foi de 99,64%. Os resultados encontrados caracterizam o método como exato.

Na análise dos resultados referentes à robustez do método, observou-se que a solução de sibutramina SQR submetida ao teste de estabilidade, na concentração de 10 µg/ml, estocada a 4 °C e a temperatura ambiente não apresentou variação significativa no valor da leitura de sua absorvância em relação ao valor original, após 24 horas. Não houve alteração no máximo de absorvância.

O método proposto mostrou-se adequado, apresentando simplicidade, linearidade, precisão e exatidão.

4.6 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As condições cromatográficas experimentais padronizadas encontram-se descritas na Tabela 9.

Tabela 9 - Condições experimentais utilizadas no método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência.

Características	Descrição
Coluna	Luna Phenomenex® RP-18 (250 mm x 4,0 mm, 5 µm)
Fase móvel	Metanol : Água : Trietilamina (80:20:0,5) pH 5,65 (ajustado com ácido fosfórico)
Comprimento de onda	223 nm
Temperatura	25 °C
Vazão	1,0 ml/minuto
Volume de injeção	20 µl

Os componentes da fase móvel foram misturados e filtrados, sob vácuo, através de membrana de nylon 0,45 µm e 47 mm de diâmetro, e degazeificados com gás hélio durante

10 minutos. A coluna foi previamente estabilizada, através da passagem da fase móvel, durante 30 minutos, na vazão de 1 ml/minuto. Após estabilização do sistema as soluções da SQR e das amostras foram filtradas em membrana de celulose regenerada com porosidade de 0,45 μm , antes de serem injetadas no cromatógrafo líquido no volume de 20 μl .

4.6.1 Validação do método analítico

A validação do método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência utilizou os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, LD e LQ (foram utilizados os mesmos procedimentos descritos em 4.5.1.4), precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e robustez.

4.6.1.1 Especificidade

A especificidade do método foi avaliada através de estudos de degradação forçada da SQR sob condições hidrolíticas (ácida e alcalina), oxidativas (H_2O_2 30V) e fotolíticas (luz UV 254 nm).

- Preparo da SQR nas condições normais (tempo zero)

Pesou-se, analiticamente, 20 mg da SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 100 ml. Completou-se o volume com metanol, obtendo-se solução na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$. Transferiu-se alíquota de 1,5 ml para balão volumétrico de 10 ml e completou-se o volume com o mesmo solvente, obtendo-se solução na concentração de 30 $\mu\text{g/ml}$.

- Hidrólise ácida e alcalina

Soluções de sibutramina SQR, na concentração de 1 mg/ml, preparadas em HCl 1M e NaOH 1M, foram mantidas, sob temperatura de 80 °C, durante 4 horas. Após este período, transferiram-se alíquotas de 3 ml da solução para balões volumétricos de 100 ml e efetuaram-se as neutralizações das amostras com 3 ml de NaOH 1N e HCl 1N, respectivamente, para

hidrólise ácida e alcalina. Completaram-se os volumes com metanol para obtenção de soluções com concentração de 30 µg/ml.

- **Degradação oxidativa**

Preparou-se solução de sibutramina SQR na concentração de 1 mg/ml, à temperatura ambiente e protegida da luz, em peróxido de hidrogênio 30V. Após o intervalo de 4 horas, alíquotas de 3 ml foram retiradas para balões volumétricos de 100 ml. Completaram-se os volumes com metanol para obtenção de solução com concentração de 30 µg/ml.

- **Degradação fotolítica**

Solução metanólica de sibutramina SQR, na concentração de 1 mg/ml, foi transferida para cubeta de quartzo e vidro. A solução foi irradiada por luz UV 254 nm a uma distância de 40 cm da lâmpada. Alíquota de 3 ml da solução foi transferida, após o intervalo de 4 horas, para balão volumétrico de 100 ml. Completou-se o volume com o mesmo diluente para obtenção de solução de 30 µg/ml.

4.6.1.2 Linearidade: Curva de calibração

A partir da solução metanólica de sibutramina SQR de 100 µg/ml transferiram-se, com auxílio de bureta, alíquotas de 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 e 4,0 ml para balões volumétricos de 100 ml. Completaram-se os volumes, com metanol, obtendo-se soluções com concentrações de 15, 20, 25, 30, 35 e 40 µg/ml. As curvas foram preparadas em três dias diferentes. Com os valores das áreas (eixo das ordenadas), em função da concentração da sibutramina (eixo das abscissas), foram calculados os coeficientes de correlação e a equação da reta de calibração. Os resultados foram submetidos à análise estatística de variância (ANOVA).

4.6.1.3 Precisão

A precisão do método foi avaliada através dos coeficientes de variação percentual obtidos durante a determinação da sibutramina em cápsulas nos testes de repetibilidade (intradia, n = 6) e precisão intermediária (interdias, n = 2) realizados.

- Preparo das amostras

Determinou-se o peso do conteúdo de 20 cápsulas, conforme Farmacopéia Brasileira IV Edição (1988). Misturaram-se os conteúdos das cápsulas. Foram transferidos, dessa mistura, o equivalente a 20 mg de sibutramina, para balões volumétricos de 100 ml, solubilizando-se com auxílio de 50 ml de metanol. Após agitação por 30 minutos e banho ultra-sônico por mais 20 minutos, completaram-se os volumes com o mesmo solvente. Centrifugou-se uma porção da solução resultante por 2 minutos a 3300 rpm. Transferiram-se alíquotas de 1,5 ml da solução sobrenadante para balões volumétricos de 10 ml, completando-se o volume com metanol, a fim de se obter soluções de 30 µg/ml. Em paralelo, preparou-se solução de sibutramina SQR na mesma concentração.

- Preparo da SQR

Pesou-se, exatamente, 20 mg de sibutramina SQR, transferiu-se para balão volumétrico de 100 ml e completou-se o volume com metanol. Transferiu-se uma alíquota de 1,5 ml desta solução para balão volumétrico de 10 ml e completou-se o volume com água a fim de se obter solução de 30 µg/ml.

- Cálculos

A concentração de sibutramina nas cápsulas foi determinada pela seguinte equação:

$$C = (A_A \cdot C_{SQR}) / A_{SQR}$$

Onde:

A_A : Área absoluta da solução de sibutramina nas amostras;

C_{SQR} : Concentração da SQR;

A_{SQR} : Área absoluta média da SQR.

A porcentagem de sibutramina nas amostras comerciais foi calculada pela seguinte equação:

$$C\% = (C_A \cdot P) / C_T$$

Onde:

C_A : Concentração percentual das amostras;

P: Pureza da SQR;

C_T : Concentração teórica da solução de sibutramina amostra.

4.6.1.4 Exatidão: Teste de Recuperação

Para a elaboração do teste de recuperação foram preparadas soluções de sibutramina SQR e de sibutramina cápsulas, diluídas em metanol, ambas na concentração de 100 µg/ml, conforme descrito no item 4.5.1.5 Preparo das amostras.

Transferiram-se alíquotas de 15,0 ml da solução centrifugada das amostras para balões volumétricos de 100 ml, denominados A, R₁, R₂, R₃ e R₄. Adicionaram-se alíquotas de 7,5, 15,0, 22,5 e 30,0 ml da solução de SQR aos balões R₁, R₂, R₃ e R₄, respectivamente e completou-se o volume com metanol. Simultaneamente, foi transferida alíquota de 15,0 ml da solução de SQR para balão volumétrico de 100 ml denominado SQR conforme Tabela 10.

Tabela 10 - Preparo das soluções para o teste de recuperação da sibutramina, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência.

Balão volumétrico de 100 ml	Volume (ml) da solução amostra (100 µg/ml)	Volume (ml) da solução SQR (100 µg/ml)	Concentração (µg/ml)
A	15,0	-	15,0
R1	15,0	7,5	22,5
R2	15,0	15,0	30,0
R3	15,0	22,5	37,5
R4	15,0	30,0	45,0
SQR	-	15,0	15,0

- Cálculo para o teste de recuperação

As porcentagens de recuperação da sibutramina SQR foram calculadas através da seguinte equação:

$$R\% = [(C_A - C_{NA}) / C_P] \cdot P$$

Onde:

C_A : Concentração de sibutramina encontrada na amostra adicionada de SQR;

C_{NA} : Concentração de sibutramina encontrada na amostra não adicionada de SQR;

C_P : Concentração de sibutramina SQR ($\mu\text{g/ml}$) adicionada à amostra;

P: Pureza da SQR.

4.6.1.5 Robustez

A robustez do método analítico foi avaliada através de variações nas condições cromatográficas estabelecidas, tais como: utilização de colunas de diferentes fabricantes (Merck e Luna Phenomenex) com as mesmas dimensões e especificações, modificação na temperatura de análise e mudança no fluxo da fase móvel. Para este teste foram preparadas soluções de sibutramina SQR e das cápsulas, na concentração de 30 $\mu\text{g/ml}$, conforme descrito no item 4.6.1.3.

4.6.2 Resultados

A especificidade do método foi testada através dos estudos de degradação forçada da SQR em meios ácido, alcalino, oxidativo e fotolítica. Os cromatogramas das soluções, na concentração teórica de 30,0 $\mu\text{g/ml}$, obtidos nos tempos iniciais (tempo zero) e após o período de degradação estão apresentados na Figura 11. O tempo inicial zero refere-se à alíquota da amostra retida antes de ser submetida à condição de degradação.

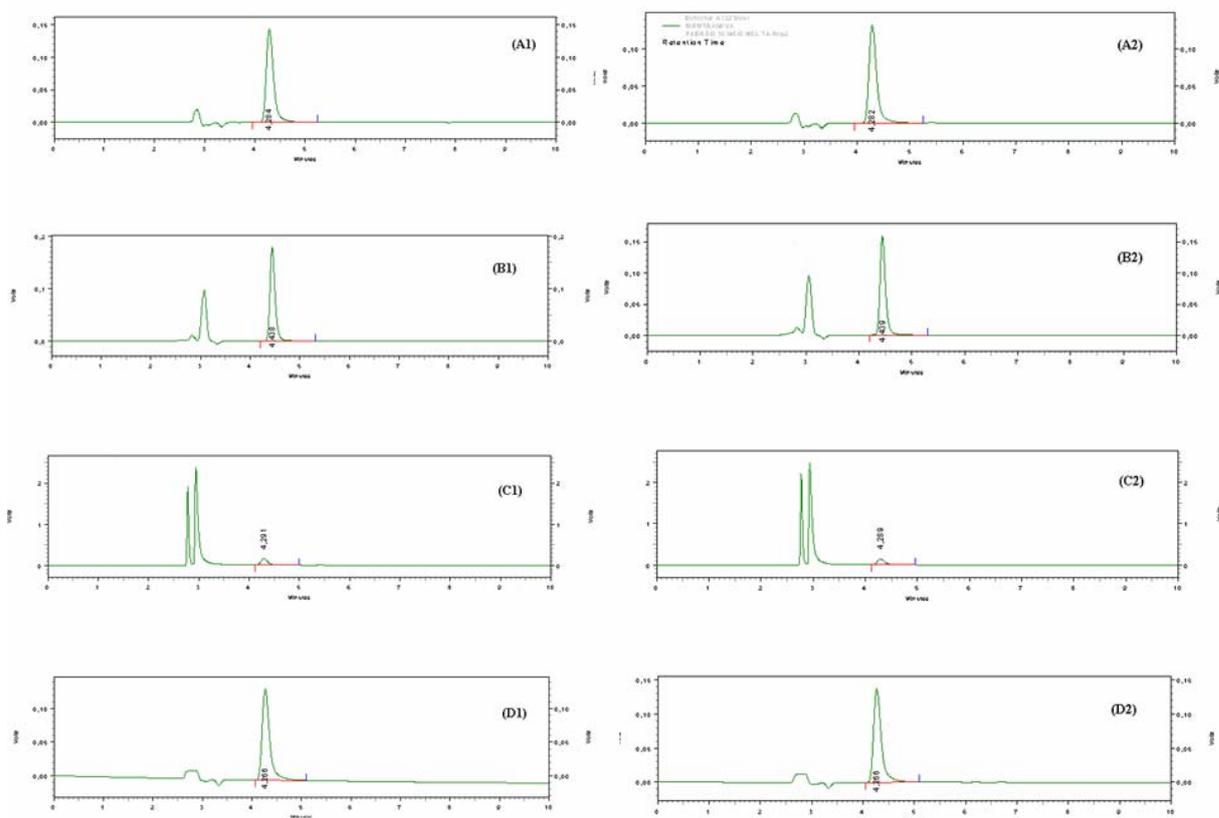


Figura 11 - Cromatogramas da degradação forçada da sibutramina SQR ($C = 30 \mu\text{g/ml}$) em meio ácido HCl 1M tempo zero (A1) e 4 horas (A2), em meio alcalino NaOH 1M em tempo zero (B1) e 4 horas (B2), meio oxidativo H_2O_2 em tempo zero (C1) e 4 horas (C2) e fotólise em tempo zero (D1) e 4 horas (D2). Condições cromatográficas: coluna Luna Phenomenex® RP₁₈ (250 mm x 4 mm, 5 μm); fase móvel: metanol:água:triethylamina (80:20:0,5) pH 5,65 ajustado com ácido fosfórico; vazão: 1 ml/ min; volume injetado: 20 μl .

Na Figura 12 estão apresentados os cromatogramas obtidos para a sibutramina SQR e para as amostras de cápsulas. Os tempos de retenção das amostras foram semelhantes com aquele obtido com a SQR.

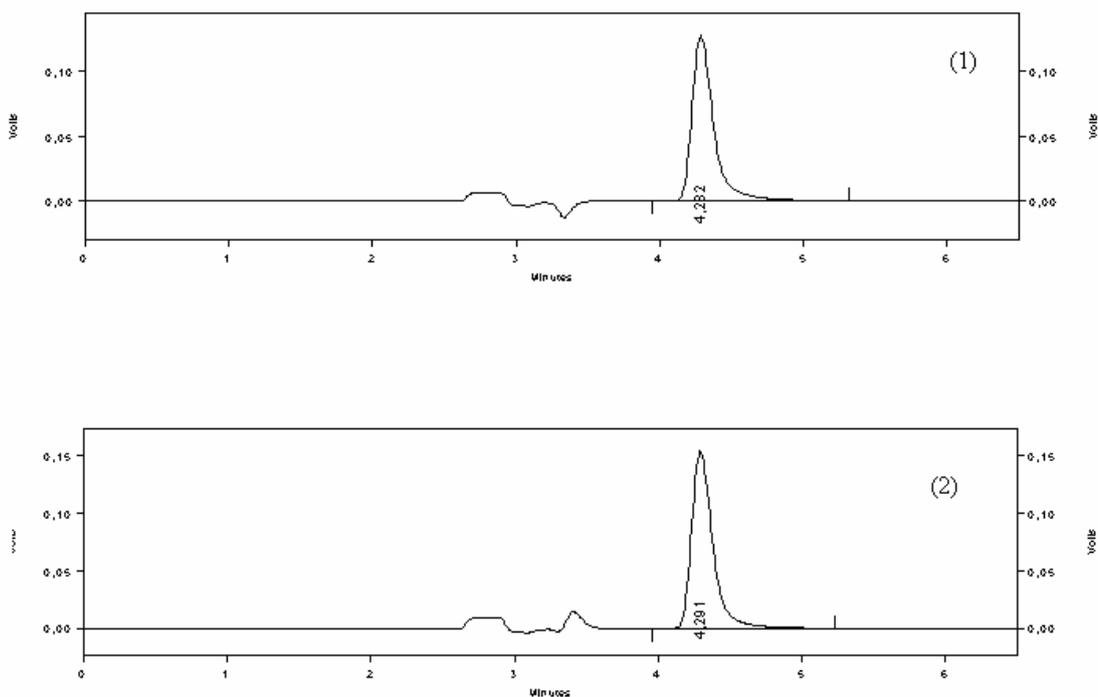


Figura 12 - Cromatogramas obtidos por cromatografia líquida das soluções de sibutramina SQR (1) (TR=4,28) e cápsulas (2) (TR= 4,29), na concentração de 30 $\mu\text{g/ml}$. Condições cromatográficas: coluna Luna Phenomenex® RP₁₈ (250 mm x 4 mm, 5 μm); fase móvel: metanol:água:triethylamina (80:20:0,5) pH 5,65 ajustado com ácido fosfórico; vazão: 1 ml/ min; volume injetado: 20 μl .

A Tabela 11 apresenta os valores experimentais obtidos na construção da curva de calibração da sibutramina. A representação da curva de calibração e a equação da reta, obtida por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, encontram-se na Figura 13. O coeficiente de variação percentual médio das áreas obtidas foi de 0,48%.

Tabela 11 - Áreas absolutas obtidas na determinação da curva de calibração da sibutramina SQR, por cromatografia líquida de alta eficiência.

Concentração (µg/ml)	Áreas Absolutas			Média ± e.p.m	CV%
	1º dia	2º dia	3º dia		
15,0	747159	747158	748093	747470 ± 312	0,07
20,0	961086	955921	953604	956870 ± 2211	0,40
25,0	1171677	1182727	1162435	1172280 ± 5866	0,87
30,0	1371989	1376066	1380682	1376246 ± 2511	0,32
35,0	1590368	1592551	1582087	1588335 ± 3187	0,35
40,0	1808716	1836535	1807171	1817474 ± 9541	0,91

e.p.m = erro padrão da média

CV% = coeficiente de variação percentual

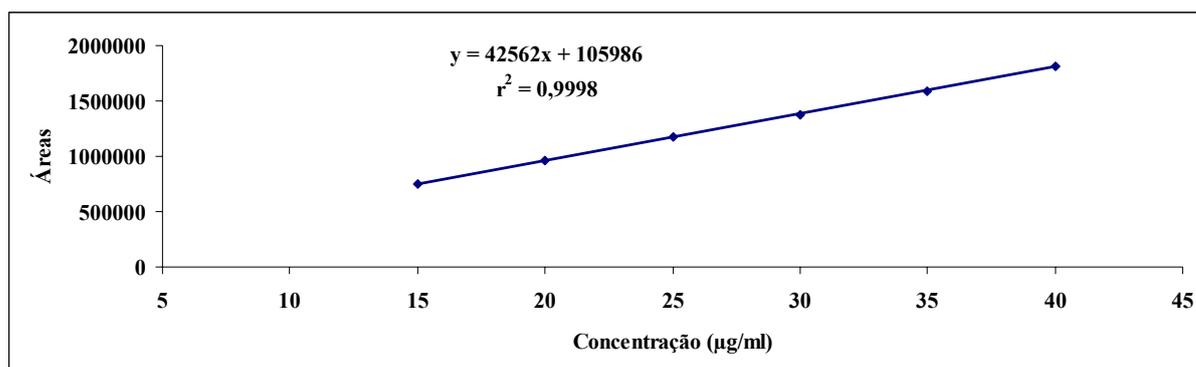


Figura 13 - Representação gráfica da curva de calibração da sibutramina SQR, por cromatografia líquida de alta eficiência.

As Tabelas 12 e 13 apresentam os valores dos tratamentos estatísticos sobre os valores experimentais obtidos para a curva padrão. Os valores dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), calculados através da equação descrita no item 4.5.1.6, encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12 - Resultados da curva de calibração, obtida pelo método dos mínimos quadrados, para o método, por cromatografia líquida de alta eficiência.

Parâmetros	Resultados
Faixa de linearidade	15 – 40 µg/mL
Equação: $y = bx + a$	$y = 42562x + 105986$
Inclinação (b) ± desvio padrão	42562 ± 504
Intercepto (a) ± desvio padrão	105986 ± 9334
Coefficiente de correlação (r^2)	0,9998
Limite de detecção (LD)	0,72 µg/mL
Limite de quantificação (LQ)	2,19 µg/mL

Tabela 13 - Análise da variação (ANOVA) das áreas absolutas, obtidas para obtenção da curva de calibração da sibutramina SQR, por cromatografia líquida de alta eficiência.

Fontes de variação	gl	Soma dos Quadrados	Variância	F.C	F.T
Entre concentrações	5	$2,3782 \cdot 10^{12}$	$4,7564 \cdot 10^{11}$	$6,48 \cdot 10^3^*$	3,11
-regressão linear	1	$2,3776 \cdot 10^{12}$	$2,3776 \cdot 10^{12}$	$3,24 \cdot 10^4^*$	4,75
-desvio da linearidade	4	$5,7840 \cdot 10^8$	$1,4460 \cdot 10^8$	1,97**	3,26
Resíduo	12	$8,8130 \cdot 10^8$	$7,3441 \cdot 10^7$		
Total	17	$2,3791 \cdot 10^{12}$			

* Significativo para $p < 0,05$.

** Não significativo para $p > 0,05$

Os valores experimentais obtidos nos doseamentos das cápsulas de sibutramina, referentes à precisão do método, encontram-se na Tabela 14.

Na Tabela 15, encontram-se os resultados do teste de exatidão por recuperação da SQR cápsulas de sibutramina.

Tabela 14 - Valores experimentais referentes à determinação de sibutramina em cápsulas e análise de variância (ANOVA) da precisão interdias, por cromatografia líquida de alta eficiência.

Amostras	Cápsulas (%)	
	1º dia	2º dia
1	100,07	98,81
2	99,33	100,88
3	98,87	99,20
4	100,50	-
5	100,80	-
6	101,00	-
Média	100,10	99,63
e.p.m	0,34	0,64
CV%	0,84	1,10
ANOVA	F calculado	
Interdias	0,48	

e.p.m = erro padrão da média.

CV % = coeficiente de variação percentual.

F calculado para $p > 0,05$ (5,59).

Tabela 15 - Resultados experimentais do teste de recuperação da sibutramina em cápsulas, por cromatografia líquida de alta eficiência.

Amostra	SQR ($\mu\text{g/mL}$)	SQR ($\mu\text{g/mL}$)	% Recuperação
	Adicionada	Recuperada *	
Cápsulas	7,5	7,55	100,66
	15,0	14,98	99,89
	22,5	22,51	100,05
	30,0	29,89	99,64

* cada valor corresponde à média de três determinações

4.6.3 Discussão

Dentre os métodos cromatográficos, a cromatografia líquida de alta eficiência constitui-se em procedimento bastante utilizado em razão de sua versatilidade. A possibilidade de variação dos mecanismos de separação pela adequada escolha da coluna, fase móvel e método de detecção permite a utilização dessa técnica nas mais diversas fases de estudo de produtos farmacêuticos. A cromatografia líquida necessita, entretanto, de equipamento e reagentes de maior custo, o que pode tornar-se uma limitação para alguns laboratórios de controle de qualidade de medicamentos (SKOOG *et al.*, 2002).

O desenvolvimento de métodos em CLAE requer cuidadosa combinação entre polaridade do soluto, da fase móvel e da fase estacionária de modo a garantir boas separações em tempos razoáveis (SKOOG *et al.*, 2002).

O método proposto empregou coluna cromatográfica C₁₈, em virtude desta ser a mais utilizada em laboratórios de controle de qualidade e a utilização de fases móveis sem tampão, as quais são danosas para as colunas.

Em virtude da solubilidade da sibutramina testou-se diferentes proporções da mistura água:metanol para a obtenção da fase móvel. A fase móvel constituída de metanol:água:trietilamina (80:20:0,5), com pH 5,65, ajustado com ácido fosfórico, mostrou-se a mais adequada, por proporcionar tempo de retenção reprodutível de aproximadamente 4 minutos, com picos de boa resolução, seletividade e simetria (< 2%).

Para testar-se a especificidade do método submeteu-se a sibutramina SQR à degradação forçada em meio ácido, alcalino, oxidativo e fotolítico.

Na hidrólise ácida e alcalina, após 4 horas, houve decréscimo de 5% e 8%, respectivamente, das áreas referentes ao pico da SQR, sem variação no tempo de retenção. Não houve a formação de picos adicionais em ambas as condições testadas (Figura 11).

Na oxidação química com H₂O₂ 30V, por 4 horas, observou-se o decréscimo de 6% da área referente ao pico da SQR. Não houve formação de picos adicionais nem variação do tempo de retenção (Figura 11).

Após 4 horas de fotólise, não houve redução significativa da área do pico referente à SQR (< 0,5%) e nem variação no tempo de retenção (Figura 11).

Como pode ser observado nos cromatogramas obtidos no estudo de degradação forçada não ocorreu a formação de picos adicionais em relação à sibutramina. Não foram

verificadas, também, interferência de solventes, impurezas ou excipientes nos cromatogramas (Figura 11).

Os resultados obtidos na avaliação da linearidade do método mostraram que as soluções de sibutramina SQR apresentaram correlação linear entre as áreas e as concentrações obtidas nos intervalos utilizados. Gráficos da concentração *versus* área foram plotados e demonstraram boa linearidade na faixa de 15,0 a 40,0 µg/ml (Figura 13). A equação da reta obtida para o método foi: $y = 42562x + 105986$, com coeficiente de correlação de 0,9998.

A análise de variância (ANOVA), efetuada sobre os valores das áreas absolutas obtidas das curvas de calibração da sibutramina, cujos elementos estão determinados na Tabela 13, demonstrou que a regressão linear é significativa ($p < 0,05$), não havendo desvio de linearidade ($p > 0,05$).

O método cromatográfico foi avaliado em relação a sua sensibilidade, através da determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ). Os valores calculados para o LD e LQ foram 0,72 µg/ml e 2,19 µg/ml, respectivamente (Tabela 12). Os baixos valores indicam a sensibilidade do método.

A precisão do método analítico foi demonstrada através da repetibilidade (intradia) e precisão intermediária (interdias). O valor experimental médio obtido para a determinação da sibutramina nas amostras, no mesmo dia e nas mesmas condições, foi de 100,10%. Nas análises realizadas no segundo dia obteve-se 99,63%. A ANOVA indicou que não houve diferença significativa entre as análises realizadas em diferentes dias (Tabela 14). Os baixos valores de coeficiente de correlação (< 2%) obtidos neste estudo caracterizam o método como preciso.

A exatidão do método proposto pode ser determinada através do teste de recuperação da sibutramina SQR. Neste teste a porcentagem de recuperação média foi de 100,06 %, conforme descrito na Tabela 15. Os resultados encontrados demonstraram que o método apresenta boa exatidão.

Para testar-se a robustez do método efetuaram-se pequenas modificações nas condições cromatográficas propostas. A fim de verificar a simetria do pico foram testadas duas colunas cromatográficas C₁₈ (250 mm x 4,0 mm d.i., 5µ) das marcas Merck e Luna Phenomenex e com vazões de 1,0 ml/minuto. Os cromatogramas revelaram que a coluna Luna Phenomenex apresentou picos com melhor resolução e simetria. O aumento da temperatura do forno da coluna de 25 °C para 30 °C não resultou em variação significativa dos resultados. A partir da alteração da vazão da fase móvel de 1,0 ml/min para 0,7 ml/min, constatou-se um pequeno aumento no tempo de retenção, sem alterações significativas nos valores de teor para

a sibutramina. Desse modo, pôde-se constatar que as condições utilizadas caracterizam o método como robusto.

4.7 Comparação dos métodos propostos

No presente trabalho, foram desenvolvidos e validados dois métodos: espectrofotometria na região do ultravioleta e cromatografia líquida de alta eficiência.

Os dois métodos propostos apresentam diferenças significativas entre si em termos de simplicidade, rapidez e custo. A espectrofotometria na região do ultravioleta é um método de fácil execução e baixo custo. A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica versátil e amplamente utilizada, mas apresenta custo mais elevado que a espectrofotometria. Requer, também, maior treinamento por parte do analista, no entanto possui a vantagem da automação. Esse método apresentou resultados precisos e exatos, com tempo de análise bastante curto.

Os resultados experimentais obtidos para a determinação quantitativa de sibutramina em cápsulas nos testes de repetibilidade (intradia, $n = 6$) referente à precisão, pelos dois métodos validados neste estudo (Espectrofotometria na região do ultravioleta e Cromatografia líquida de alta eficiência) foram comparados estatisticamente por ANOVA e estão representados na Tabela 16.

Tabela 16 – Análise de variância dos resultados obtidos nos doseamentos de sibutramina nas amostras, obtidos pelos métodos validados (Espectrofotometria na região do ultravioleta e Cromatografia líquida de alta eficiência).

Produto	Fontes de variação	gl	Soma dos quadrados	Variância	F.C	F.T
	Entre métodos	1	0,23	0,22	0,29*	4,96
Cápsulas	Resíduo	10	7,71	0,77		
	Total	11	7,94			

* Não significativo para $p > 0,05$.

Os resultados da análise comparativa através da análise de variância (ANOVA) demonstraram que não houve diferença significativa entre os teores obtidos com os diferentes métodos ($p > 0,05$) para a forma farmacêutica em questão.

Contatou-se, desse modo, que ambos os métodos desenvolvidos podem ser intercambiáveis e adequados para análise de rotina em controle de qualidade da sibutramina em cápsulas.

5. CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE DISSOLUÇÃO PARA CÁPSULAS

5.1 Ensaio de dissolução

A absorção de um fármaco após administração oral, a partir de uma forma farmacêutica sólida, depende da liberação do mesmo de sua forma farmacêutica, da sua dissolução ou solubilização sob condições fisiológicas e de sua permeabilidade através do trato gastrointestinal (ANSARI *et al.*, 2004). Fatores relacionados ao paciente, tais como fisiologia da membrana, fluxo sanguíneo e pH do trato gastrointestinal, bem como fatores relacionados ao fármaco e formulação, como solubilidade e natureza química do fármaco, polimorfismo, coeficiente de partição, quiralidade, tamanho de partículas, entre outros, tornam o processo de absorção complexo e variável. Qualquer fator que afete a desagregação ou a dissolução pode afetar a biodisponibilidade do fármaco (STORPIRTIS, 1999).

Os estudos de dissolução *in vitro* constituem-se em um dos instrumentos essenciais para avaliação das propriedades biofarmacêuticas das formas farmacêuticas sólidas de uso oral, fornecendo informações úteis tanto para a pesquisa e desenvolvimento quanto para a produção e controle de qualidade. O desenvolvimento farmacotécnico permite avaliar novas formulações e estabelecer correlação com os dados obtidos *in vivo*, através da cinética de dissolução (MANADAS *et al.*, 2002). Durante a fase de produção e controle de qualidade permite-se detectar desvios de fabricação, uniformidade do produto e reprodutibilidade lote a lote (MARQUES, 2002).

O teste de dissolução avalia a quantidade de fármaco dissolvido, em um determinado volume de meio, mantido à temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, após determinado período de tempo, utilizando-se equipamento com dispositivo para promover agitação do meio, a uma dada velocidade de agitação (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV ed, 1988; USP 29, 2006). Para formulações de liberação imediata a porcentagem dissolvida de fármaco é determinada, normalmente, após um único tempo de coleta. A avaliação da porcentagem dissolvida em vários tempos de coleta (perfil de dissolução) é, no entanto, mais conclusiva em relação à coleta em um único ponto (ADAMS *et al.*, 2001; MARCOLONGO, 2003).

Atualmente, os estudos de dissolução estão sendo usados para demonstrar a equivalência farmacêutica de medicamentos genéricos e similares para fins de registro, bem como, para isentar os estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência para algumas

dosagens do mesmo produto. Conforme legislação específica (BRASIL, 2004), essa isenção pode ser obtida se existir estudo de bioequivalência realizado com o produto referência para uma das dosagens (geralmente a mais alta) e se houver comprovação de que todas as dosagens do produto apresentam perfis semelhantes. Para os fármacos classificados como classe I (alta solubilidade e alta permeabilidade), acredita-se que possam ser isentos de estudos de bioequivalência, desde que os produtos apresentem dissolução rápida, ou seja, superior a 85% em 15 minutos (STORPIRTIS *et al.*, 2004).

Muitos fármacos não possuem monografia oficial, e são ainda escassos na literatura os estudos de desenvolvimento de métodos de dissolução. Para esses fármacos, existe a necessidade de desenvolver ensaios de dissolução que possam prever o comportamento *in vivo* dos mesmos (MANADAS *et al.*, 2002). A avaliação do perfil de dissolução, em três diferentes meios, na faixa de pH fisiológico (pH de 1,5 a 7,5) é recomendada como suporte no desenvolvimento e otimização do método de dissolução, bem como no estabelecimento de correlações *in vivo-in vitro* (ADAMS *et al.*, 2001; MOORE & FLANNER *et al.*, 1996; FDA, 1997).

Segundo MARQUES (2002), são inúmeros os desafios no desenvolvimento e validação de métodos de dissolução, devido à variabilidade intrínseca do método e à variabilidade de fatores que podem afetar o processo de dissolução. Alguns estudos têm demonstrado e discutido essa variabilidade (QURESHI & MCGILVEKAY, 1999; SIEWERT *et al.*, 2002)

Dessa forma, é necessário um controle cuidadoso das condições experimentais para reduzir a variabilidade teste-a-teste, garantir a confiabilidade e reprodutibilidade do teste e, também, para que pequenas alterações na formulação ou no processo de produção sejam detectadas (FORTUNATO, 2005, MARQUES, 2002).

Dentre os principais parâmetros que devem ser avaliados no desenvolvimento de um método de dissolução citam-se: a avaliação da influência dos filtros, a escolha de método de quantificação preciso e específico, bem como, a utilização de equipamento calibrado. Para a escolha do meio de dissolução, características como pKa, solubilidade e estabilidade do fármaco em função do pH, bem como a faixa de dosagem do mesmo devem ser avaliadas (FDA, 1997; MARQUES, 2002; MARCOLONGO, 2003; FORTUNATO, 2005).

O Sistema de Classificação Biofarmacêutica deve ser considerado na escolha do meio de dissolução. Fármacos da classe I (alta solubilidade e alta permeabilidade) dissolvem-se bem em qualquer meio aquoso, enquanto que para os da classe II (baixa solubilidade e alta

permeabilidade) deve-se avaliar o grau de ionização do fármaco na escolha do meio (MARCOLONGO, 2003).

O volume de meio a ser utilizado em um teste de dissolução depende da condição *sink*, que pode ser definida como uma quantidade de solvente não inferior a três vezes o volume de meio necessário para obter a solução saturada do fármaco. Entretanto, atualmente, aceita-se que um volume de 5 a 10 vezes o necessário para saturação, seja suficiente para manter as condições *sink* (MARQUES, 2002; ABDU, 1989).

A validação de métodos analíticos utilizados para determinação de características de desempenho, como é o caso dos testes de dissolução, deve incluir a avaliação da linearidade, precisão e exatidão, especificidade, limite de detecção e quantificação (USP 29, 2006). Dentre esses fatores, a precisão tem sido o parâmetro considerado de extrema importância para garantir a confiabilidade dos resultados (ANSARI *et al.*, 2004).

As cápsulas de sibutramina eram produzidas por duas diferentes indústrias farmacêuticas, recentemente, outros laboratórios iniciaram sua fabricação. Existem ainda as cápsulas manipuladas desse anorexígeno, as quais são produzidas por uma infinidade de farmácias magistrais. Neste contexto desenvolveu-se e validou-se método para avaliar a porcentagem dissolvida desse fármaco em cápsulas industrializadas através de cromatografia líquida.

Não se encontrou na literatura consultada dados referentes à dissolução de cápsulas de sibutramina.

5.2 Comparação de perfis de dissolução

Como mencionado anteriormente, a avaliação do perfil de dissolução em diferentes meios é recomendada como suporte no desenvolvimento dos testes de dissolução. Esta avaliação é utilizada, também, para comparar produtos de diferentes fabricantes, otimizar formulações e para avaliar a influência de alterações realizadas na formulação (ADAMS *et al.*, 2001; MOORE & FLANNER *et al.*, 1996).

Diversos métodos têm sido propostos na literatura para realizar a comparação entre perfis de dissolução, os quais podem ser classificados como métodos estatísticos, método modelo independente e modelo dependente. Anova e teste *t* são classificados no primeiro grupo. Testes de razão ou testes combinatórios, como f_1 e f_2 , são considerados modelos independentes, enquanto que alguns métodos como ordem zero, primeira ordem, Hixson-Crowell, Higushi, quadrático, Baker-Lonsdale, Korsmeyer-Peppas e modelo de logística são considerados modelos dependentes (COSTA & LOBO, 2001).

Dentre os métodos citados os fatores f_1 (semelhança) e f_2 (diferença) são os de mais fácil aplicação e interpretação e têm sido adotados por órgãos como FDA, ANVISA e EMEA para comparar perfis de dissolução. Para estimar esses fatores são utilizadas duas equações que avaliam a diferença entre a porcentagem de fármaco dissolvido por unidade de tempo entre um produto teste e outro de referência (MOORE & FLANNER, 1996).

Os fatores f_1 e f_2 são calculados através das equações 1 e 2 abaixo. Para que exista semelhança entre os perfis, os fatores devem encontrar-se na faixa de 0 a 15 e 50 a 100, respectivamente para f_1 e f_2 .

$$f_1 = \left\{ \left[\sum_{t=1}^n (R_t - T_t) \right] / \left[\sum_{t=1}^n R_t \right] \right\} \times 100$$

Equação 1

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left[1 + (1/n) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0,5} \times 100 \right\}$$

Equação 2

Onde:

R_t = porcentagem de fármaco dissolvido do produto de referência em um tempo t ;

T_t = porcentagem de fármaco dissolvido do produto teste em um tempo t ;

n = número de coletas.

Para aplicação dos fatores f_1 e f_2 deve-se (FDA, 1997, BRASIL, 2003):

- avaliar doze unidades;
- empregar no mínimo cinco pontos de coleta;
- incluir apenas um ponto acima de 85% de dissolução para ambos os produtos;
- para permitir o uso de médias, os coeficientes de variação para os primeiros pontos

(15 minutos, por exemplo) não devem exceder 20%. Para os demais pontos considera-se o máximo de 10%.

A aplicação desses métodos, principalmente do f_2 , é criticada por alguns autores, que indicam que os critérios de aceitação são muito amplos, o que faz com que o método seja muito liberal em concluir pela semelhança de perfis e pouco discriminativos (MARCOLONGO, 2003). Além disso, a comparação de perfis através desses métodos fica prejudicada para fármacos com alta liberação.

A eficiência de dissolução (ED) é outra forma de comparar perfis e pode ser definida pela seguinte equação:

$$ED \% = \frac{ASC (t_0-t_f)}{ASC (TR)} \times 100$$

Onde:

ASC: Área sobre a curva;

t_0 : Tempo inicial;

t_f : Tempo final;

$ASC (TR)$: Área sobre a curva total do retângulo.

Para realizar comparações através da ED% é necessário estabelecer previamente o intervalo e aplicá-lo a todas as formulações testadas. O conceito de eficiência de dissolução apresenta algumas vantagens. A primeira é que a plotagem dos dados em um único gráfico permite que se faça uma comparação rápida entre um grande número de formulações. A

segunda é que esses dados podem estar teoricamente relacionados com dados *in vivo* (KHAN, 1975; MARCOLONGO, 2003).

Foi realizada a comparação dos perfis de dissolução dos produtos farmacêuticos citados no Capítulo II, item 4.2. Os resultados dessa comparação estão apresentados no Capítulo IV, referente ao estudo de equivalência farmacêutica.

5.3 Solventes e reagentes

Os solventes e reagentes utilizados foram os descritos no Capítulo II, item 4.3.

5.4 Equipamentos e acessórios

- Balança analítica, Bosch SAE 200;
- Banho ultra-sônico, Unique, USC 1400;
- Bomba de vácuo, Primatec;
- Cromatógrafo líquido Shimadzu SLC-10 ADvp equipado com bomba modelo LC-10AD, detector com comprimento de onda variável UV/VIS modelo SPD-10 ADvp, controlador SCL-10 ADvp, integrador automático computadorizado através de programa Class VP® software e injetor automático Rheodyne com “loop” de 20 µl (Shimadzu; Kyoto, Japan);
- Coluna cromatográfica, Luna Phenomenex RP-18 (250 mm x 4,0, 5 µm);
- Cubetas de quartzo 10 mm, 6030-UV Hellma;
- Dissolutor, Pharma Test WII Dissolution Test instrument Apparatus, modelo VK 7000 (Germany);
- Filtro de celulose regenerada 13 mm x 0,45 µm, Sartorius;
- Chapa de aquecimento, Fisatom;
- Membrana filtrante de acetato de celulose 0,45 µm, Millipore;
- Papel filtro quantitativo faixa preta, Framex;
- Pipetador, Tranferpette Brand;
- Potenciômetro digital Field Lab;
- Sistema de filtração, Millipore;
- Termômetros, Incoterm.

5.5 Desenvolvimento e validação do método de dissolução

Diversas condições de dissolução foram testadas, de acordo com o método geral da USP 29 (2006), as quais encontram-se descritas na Tabela 17. Utilizou-se equipamento Pharma Test, equipado com seis cubas. Nessa etapa, aplicaram-se as condições de I a III, para as cápsulas (Produto A), utilizando três unidades da forma farmacêutica. A temperatura foi mantida a $37,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. A validação do método de quantificação e o perfil de dissolução, com doze unidades da forma farmacêutica foi realizado posteriormente.

Tabela 17 - Condições testadas durante o desenvolvimento do método de dissolução para cápsulas de sibutramina.

Condições	Aparato	Meio (500 ml)	Velocidade (rpm)
I	1 (cesta)	HCl 0,1M	75
II	1 (cesta)	Tampão pH 6,8	75
III	1 (cesta)	Água	75

Realizou-se coleta manual de 10 ml de meio nos intervalos de 15, 20 e 45 minutos, com reposição imediata do mesmo volume de meio a $37,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. A determinação da porcentagem de fármaco dissolvido foi realizada por cromatografia líquida, sem posterior diluição, após filtração das amostras através de filtro quantitativo e membrana de acetato de celulose $0,45\ \mu\text{m}$.

Nos cálculos da porcentagem do fármaco dissolvida levou-se em consideração o seu teor, as concentrações nas alíquotas retiradas e as devidas correções referentes às retiradas de fármaco e reposição de meio em cada tempo.

5.5.1 Validação do método de quantificação da porcentagem de fármaco dissolvido

5.5.1.1 Linearidade: Curva de calibração

Procedeu-se a validação do método por cromatografia líquida de alta eficiência, empregando-se as mesmas condições descritas na Tabela 9, capítulo II, item 4.6.

A partir da solução metanólica de sibutramina SQR de $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ transferiram-se, com auxílio de bureta, alíquotas de 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 e 4,0 ml para balões volumétricos de 100

ml. Completaram-se os volumes, com HCl 0,1M, obtendo-se soluções com concentrações de 15, 20, 25, 30, 35 e 40 µg/ml. As curvas foram preparadas em três dias diferentes. Com os valores das áreas (eixo das ordenadas), em função da concentração da sibutramina (eixo das abscissas), foram calculados os coeficientes de correlação e a equação da reta de calibração.

A Tabela 18 apresenta os valores experimentais obtidos na construção da curva de calibração da sibutramina para a validação do teste de dissolução. A representação da curva e a equação da reta, obtidas por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, encontram-se na Figura 14.

Tabela 18 - Áreas absolutas obtidas na determinação da curva de calibração da sibutramina SQR, em HCl, por cromatografia líquida de alta eficiência.

Concentração (µg/ml)	Áreas Absolutas			Média ± e.p.m	CV%
	1º dia	2º dia	3º dia		
15,0	692078	688778	694314	691723 ± 1608	0,40
20,0	919586	909176	908991	912584 ± 3501	0,66
25,0	1129204	1122933	1123111	1125083 ± 2061	0,32
30,0	1356371	1337066	1348379	1347272 ± 5600	0,72
35,0	1585903	1562737	1571417	1573352 ± 6757	0,74
40,0	1810046	1782809	1797365	1796740 ± 7869	0,76

e.p.m = erro padrão da média

CV% = coeficiente de variação percentual

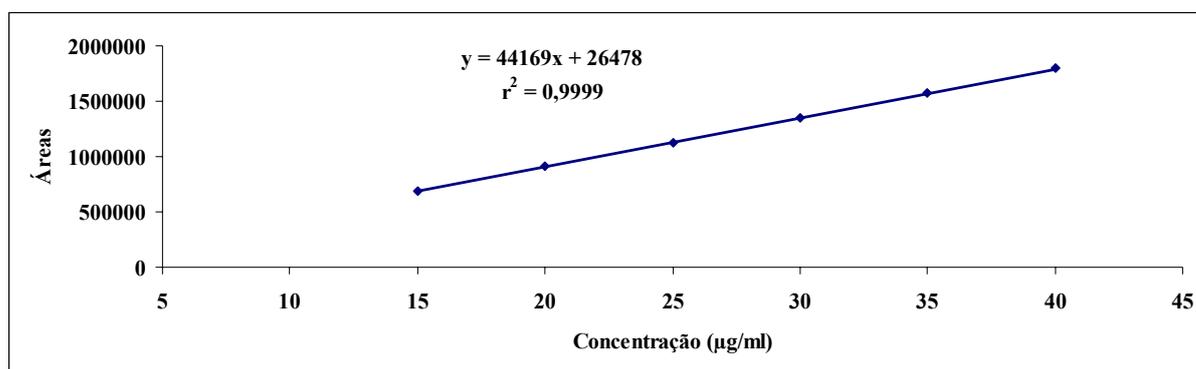


Figura 14 - Representação gráfica da curva de calibração da sibutramina SQR, em HCl, por cromatografia líquida de alta eficiência.

As Tabelas 19 e 20 apresentam os valores dos tratamentos estatísticos sobre os valores experimentais obtidos para a curva padrão. Os valores dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), calculados através da equação descrita no item 4.5.1.6, encontram-se na Tabela 19.

Tabela 19 - Resultados da curva de calibração, obtida pelo método dos mínimos quadrados, para o método, por cromatografia líquida de alta eficiência.

Parâmetros	Resultados
Faixa de linearidade	15 – 40 µg/mL
Equação: $y = bx + a$	$y = 44169x + 26478$
Inclinação (b) ± desvio padrão	44169 ± 489
Intercepto (a) ± desvio padrão	26478 ± 5964
Coefficiente de correlação (r^2)	0,9999
Limite de detecção (LD)	0,44 µg/mL
Limite de quantificação (LQ)	1,35 µg/mL

Tabela 20 - Análise da variação (ANOVA) das áreas absolutas, obtidas para obtenção da curva de calibração da sibutramina SQR, em HCl, por cromatografia líquida de alta eficiência.

Fontes de variação	gl	Soma dos Quadrados	Variância	F.C	F.T
Entre concentrações	5	$2,5608 \cdot 10^{12}$	$5,1216 \cdot 10^{11}$	$6,48 \cdot 10^3$ *	3,11
-regressão linear	1	$2,5606 \cdot 10^{12}$	$2,5606 \cdot 10^{12}$	$3,24 \cdot 10^4$ *	4,75
-desvio da linearidade	4	$2,3351 \cdot 10^8$	$5,8377 \cdot 10^7$	0,74**	3,26
Resíduo	12	$9,4820 \cdot 10^8$	$7,9017 \cdot 10^7$		
Total	17	$2,5617 \cdot 10^{12}$			

* Significativo para $p < 0,05$.

** Não significativo para $p > 0,05$

5.5.1.2 Avaliação da especificidade

Foram utilizadas ASE das cápsulas, empregando-se as seguintes condições: 500 ml HCl 0,1M a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, 75 rpm, aparato 1 e tempo de 45 minutos. Análise utilizando as cápsulas sem conteúdo foi igualmente realizada. As amostras foram filtradas e avaliadas por cromatografia líquida de alta eficiência.

5.5.1.3 Precisão

Determinou-se a repetibilidade do método através da análise de seis cápsulas do mesmo lote, em dois dias consecutivos. Após decorridos 45 minutos do teste, empregando as seguintes condições: 500 ml de HCl 0,1M a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, 75 rpm, aparato 1, a porcentagem dissolvida do fármaco foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência para a forma farmacêutica em questão. Foram calculados a média e o coeficiente de variação. Os resultados das porcentagens dissolvidas de sibutramina em cápsulas, obtidas pelo respectivo método em dias diferentes, foram comparados estatisticamente.

5.5.1.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através do percentual de recuperação de uma quantidade conhecida da SQR adicionada à ASE.

Foram preparadas três amostras simuladas de excipientes, às quais foram transferidas concentrações de sibutramina SQR correspondentes a porcentagens da quantidade de fármaco declarada pelo fabricante, respectivamente: 80% (24 $\mu\text{g/ml}$), 100% (30 $\mu\text{g/ml}$) e 120% (36 $\mu\text{g/ml}$).

Procedeu-se a dissolução por 45 minutos, empregando-se as seguintes condições: 500 ml de HCl 0,1M a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, 75 rpm, aparato 1. Foram retiradas alíquotas de 10 ml de cada cuba, as quais foram filtradas e analisadas.

5.5.2 Perfil de dissolução

O perfil de dissolução (porcentagem de fármaco dissolvida *versus* tempo) foi conduzido utilizando doze unidades, na condição I. Alíquotas de 10 ml foram retiradas nos intervalos de 5, 10, 15, 20 e 45 minutos, repondo-se o mesmo volume com HCl 0,1M a 37 °C \pm 0,5 °C, e filtradas, sem posterior diluição, para análise.

5.6 Resultados

Os resultados obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência para a condição I proposta no desenvolvimento do método de dissolução para cápsulas encontram-se nas Tabela 21 e Figura 15.

Tabela 21 – Valores percentuais de sibutramina dissolvida nos meios de dissolução obtidos, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), aparato cesta, em 75 rpm.

Rotações	Tempo (minutos)	HCl 0,1M	Água	Tampão pH 6,8
		CLAE	CLAE	CLAE
75 rpm	15	93,59	30,88	40,32
	20	95,68	31,04	42,27
	45	99,94	40,53	50,88

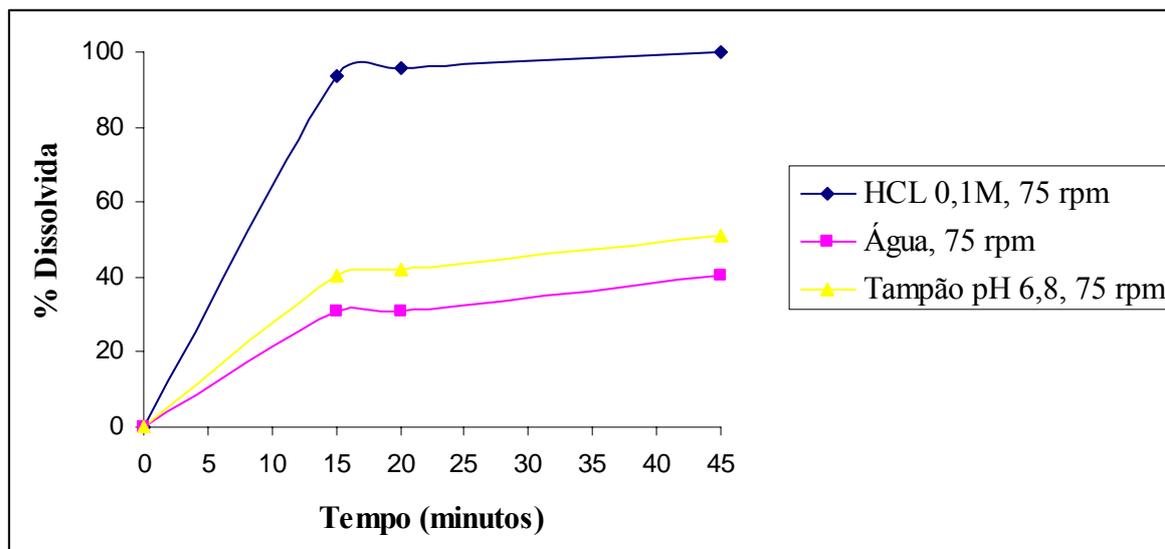


Figura 15 - Perfil de dissolução das cápsulas de sibutramina, obtidos, utilizando aparato cesta, 75 rpm a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Os espectros das amostras simuladas de excipientes de cápsulas e dos invólucros das cápsulas sem conteúdo estão apresentados, na Figura 16.

A Figura 16 apresenta os cromatogramas das ASE de cápsulas de sibutramina e dos invólucros das cápsulas sem conteúdo.

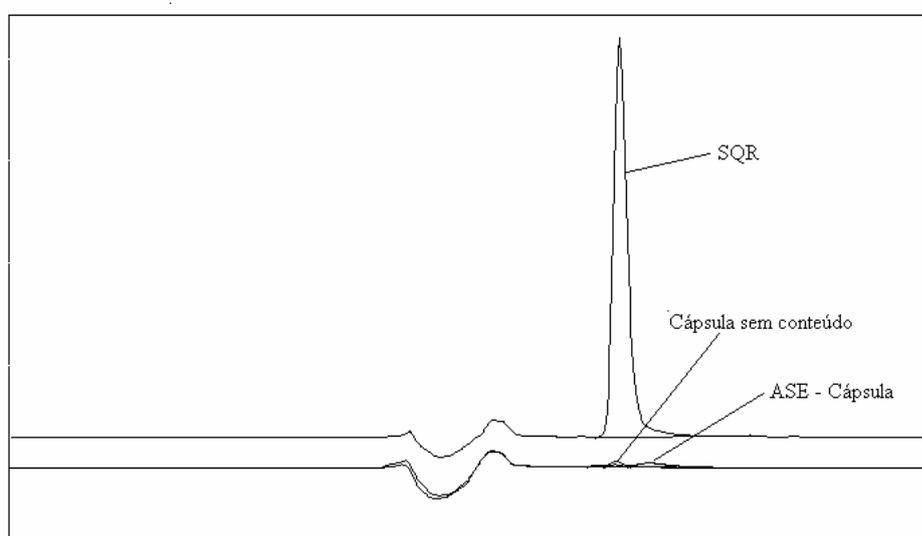


Figura 16 - Cromatogramas obtidos com a SQR, amostra simulada de excipiente da cápsula (ASE – cápsula) e cápsula sem conteúdo, após dissolução em HCL 0,1M a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, rotação de 75 rpm, com aparato 1.

A Tabela 22 apresenta os valores experimentais obtidos na determinação da porcentagem dissolvida de sibutramina, em cápsulas, bem como a análise de variância entre dias obtidos.

Tabela 22 - Valores experimentais referentes à determinação da porcentagem dissolvida de sibutramina em dias diferentes.

Amostras	Porcentagem dissolvida de sibutramina	
	Primeiro dia	Segundo dia
	CLAE	CLAE
1	87,53	89,92
2	90,90	91,90
3	90,95	93,94
4	92,79	88,92
5	91,38	91,85
6	91,73	90,35
Média	90,71	91,14
CV%	1,74	1,79
ANOVA	<i>F</i> calculado	
	CLAE	
Interdias	0,07	

CV % = coeficiente de variação percentual.
F calculado para $p > 0,05$ (4,96).

Os resultados encontrados no teste de recuperação da SQR de ASE das cápsulas de sibutramina, obtidos por cromatografia líquida, encontram-se na Tabela 23.

Tabela 23 - Resultados experimentais referentes ao teste de recuperação para as cápsulas de sibutramina.

Amostras	Quantidade de SQR (μg)		Porcentagem de Recuperação
	Adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperada	
Cápsulas	24,0	24,19	100,70
	30,0	29,66	98,80
	36,0	35,81	99,80

O resultado obtido para o perfil de dissolução com doze unidades, nas condições validadas, está representado na Figura 17.

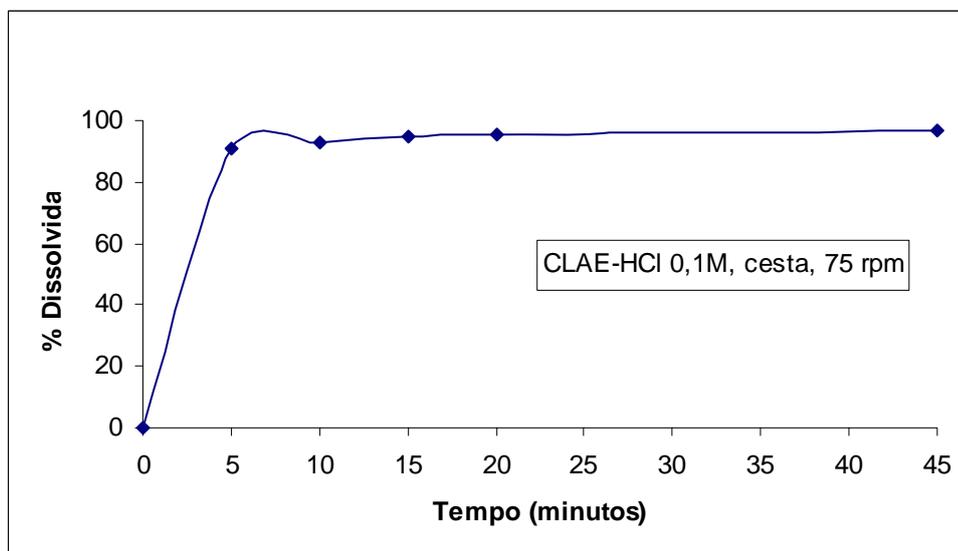


Figura 17 - Perfil de dissolução das cápsulas de sibutramina, obtidos utilizando as condições validadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.7 Discussão

As formas farmacêuticas sólidas administradas por via oral são amplamente prescritas na prática médica. A eficácia do fármaco a partir dessas formulações depende, dentre outros fatores, da desagregação, solubilização e absorção do mesmo. Medicamentos fabricados sob diferentes condições, com diferentes componentes na formulação ou mesmo lotes sucessivos de um mesmo produto podem apresentar desempenhos distintos no organismo. Devido a isso, é necessário avaliar as propriedades biofarmacotécnicas dos diferentes produtos existentes para um mesmo fármaco através dos estudos de dissolução *in vitro* (MARCOLONGO, 2003).

Com base no exposto, foi desenvolvido e validado método para verificar essa importante característica da forma farmacêutica sólida de uso oral, que é a análise da porcentagem de liberação do fármaco contribuindo, assim, para indicar a intercambialidade ou não entre as formulações existentes (referência e genérico).

Para o desenvolvimento de um teste de dissolução necessita-se de seleção criteriosa das condições de ensaio, que deve ser orientada no sentido de se obter o máximo poder discriminatório e resultar na capacidade de detecção de eventuais desvios dos padrões de qualidade inicialmente propostos (MANADAS *et al.*, 2002), o que ensejou os diferentes procedimentos realizados nesta pesquisa para obter a metodologia proposta.

O delineamento do ensaio de dissolução foi baseado nas propriedades físico-químicas da sibutramina, a qual é facilmente solúvel em água (2,9 mg/ml em pH 5.2) (THE INDEX MERCK *et al.*, 2003). A sibutramina é disponibilizada na concentração máxima de 15 mg. É rapidamente absorvida pelo organismo, atingindo concentração máxima em aproximadamente 1,2 horas (BUCKETT *et al.*, 1988). Devido a essas características, é um fármaco que pode ser classificado na classe I de acordo com a Classificação Biofarmacêutica (KASIM *et al.*, 2004).

Com base nessas considerações foram testadas algumas condições, enumeradas de I a III, com o intuito de definir aquela com melhor poder discriminatório na liberação de sibutramina da forma farmacêutica em estudo. Testaram-se diferentes aparatos, meios e rotações em busca das melhores condições (Tabela 17). Para isto, utilizou-se do aparato 1 (cesta) devido ao fato das cápsulas permanecerem flutuando durante o uso do aparato 2 (pá), podendo originar, desse modo, resultados com grande variabilidade. Para a dissolução de cápsulas é preconizado, geralmente, o uso de 75 a 100 rpm. Optou-se, no entanto, pela rotação de 75 rpm, por ter apresentado resultados satisfatórios, não havendo a necessidade de uma velocidade de agitação maior para a dissolução. Embora a sibutramina seja facilmente

solúvel em água, optou-se por não avaliar a dissolução nesse meio, principalmente, por não apresentar resultados satisfatórios para a dissolução deste fármaco. Não utilizou-se, também, o tampão pH 6,8 pelo fato de não apresentar resultados satisfatórios para a dissolução da sibutramina (Tabela 21).

O volume de meio de dissolução pode variar entre 500 a 1000 ml, sendo o volume de 900 ml o mais empregado (MARQUES, 2002). Devido ao fato da sibutramina ser um fármaco que pode ser classificado como de alta solubilidade e alta permeabilidade, optou-se por usar 500 ml de meio.

Os perfis de dissolução obtidos nas diferentes condições testadas estão apresentados na Figura 15.

Verificou-se, que no meio escolhido a porcentagem dissolvida de sibutramina foi superior a 85%, já em 15 minutos, como seria esperado para fármacos com alta solubilidade. As porcentagens de sibutramina dissolvidas em água e em tampão pH 6,8 foram baixas, indicando que estes meios não são adequados para a dissolução do fármaco.

Através da comparação das porcentagens dissolvidas entre os meios testados, constatou-se que o melhor entre eles seria o HCl 0,1M, por ter apresentado maior porcentagem de sibutramina liberada, ao contrário do tampão pH 6,8 e da água, que revelaram resultados semelhantes entre si, mas inferiores ao HCl 0,1M (Tabela 21). Por este motivo, optou-se por escolher o HCl 0,1M como meio de dissolução.

Um dos parâmetros que devem ser avaliados, como citado anteriormente, no desenvolvimento de um método de dissolução é a avaliação da influência dos filtros. Como o método utilizado para a avaliação da dissolução foi a cromatografia líquida de alta eficiência, não se avaliou esta influência, pois não se deve utilizar amostras não filtradas em cromatografia líquida para evitar danos no equipamento e/ou na coluna cromatográfica.

A possível interferência de impurezas nas análises foi avaliada através das leituras das amostras simuladas de excipientes (ASE) e do invólucro das cápsulas (cápsula vazia). Os resultados comprovaram que tanto as ASE quanto os invólucros não apresentam interferência significativa em relação à porcentagem de sibutramina dissolvida (< 1%), conforme pode ser verificado na Figura 16.

A precisão do método foi demonstrada pela repetibilidade (intradia) e precisão intermediária (interdias), através da avaliação de seis unidades, utilizando o método de quantificação proposto. O valor experimental médio da porcentagem dissolvida de sibutramina foi de 90,71% para amostras analisadas no mesmo dia e de 91,14% para análises

realizadas no 2º dia. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$), entre as análises interdias (Tabela 22).

A exatidão do método de dissolução foi determinada através do teste de recuperação da sibutramina SQR adicionada às amostras simuladas dos excipientes (ASE) de cápsulas diluídas em HCl 0,1M. As porcentagens de recuperação médias obtidas foram de 99,76% (Tabela 23). Os resultados encontrados caracterizam o método como exato.

Os resultados apresentaram precisão e exatidão, demonstrando que o método proposto é adequado para avaliação da porcentagem dissolvida de sibutramina.

As especificações para determinação da quantidade de fármaco dissolvido envolvem o estabelecimento de uma concentração mínima, expressa em porcentagem, dissolvida em determinado intervalo de tempo. Muitas monografias oficiais estabelecem que não menos que 75% do fármaco deve estar dissolvido em 45 minutos. A FARMACOPÉIA BRITÂNICA (2003) adota esse critério para quase totalidade das monografias. No entanto, o FDA recomenda que para teste de controle de qualidade lote a lote de fármacos altamente solúveis, a especificação de um único ponto, com 85% de princípio ativo dissolvido em 60 minutos ou menos, é considerada suficiente. Face ao exposto, sugere-se como especificação para sibutramina, 75% de fármaco dissolvido em 45 minutos, em HCl 0,1M (Figura 15), já que satisfaz os critérios da Farmacopéia Britânica e o FDA.

6. CAPÍTULO IV – ANÁLISE COMPARATIVA DE PRODUTOS CONTENDO SIBUTRAMINA

6.1 Introdução

Atualmente, no mercado brasileiro é possível encontrar três tipos de medicamentos: referência, genérico e similar.

O medicamento referência é, geralmente, o inovador cuja biodisponibilidade foi determinada durante o desenvolvimento do produto e que teve sua eficácia e segurança comprovadas por meio de ensaios clínicos, antes da obtenção do registro para comercialização (STORPIRTIS, 1999).

O medicamento genérico é aquele que contém o mesmo fármaco, mesma dose, mesma forma farmacêutica e é administrado pela mesma via e com a mesma indicação terapêutica apresentando mesma eficácia e segurança que o medicamento referência, comprovada por testes de bioequivalência, sendo com esse intercambiável.

O medicamento similar possui o mesmo fármaco, mesma concentração, forma farmacêutica, via de administração, posologia e indicação terapêutica, preventiva ou diagnóstica do medicamento de referência, podendo diferir, somente, em características relativas ao tamanho e forma do produto, prazo de validade, embalagem, rotulagem, excipientes e veículos, devendo sempre ser identificado por nome comercial ou marca. O medicamento similar não pode ser intercambiável. Trata-se de uma alternativa terapêutica cujos resultados podem ser diferentes do medicamento referência.

A intercambiabilidade entre o genérico e seu respectivo medicamento de referência baseia-se no conceito de equivalência terapêutica entre os mesmos, geralmente assegurada pela comprovação de equivalência farmacêutica, da bioequivalência e das boas práticas de fabricação e controle de qualidade (SHARGEL & YU, 1999; STORPIRTIS, 2004; BRASIL, 2003b).

A comparação da equivalência farmacêutica entre dois medicamentos pode ser avaliada por meio de testes *in vitro* (SHARGEL & YU, 1999; STORPIRTIS, 2004).

Neste contexto, de acordo com STORPIRTIS *et al.* (2004), é importante salientar que a bioequivalência e, conseqüentemente, a intercambiabilidade entre os medicamentos genéricos e referência pode estar comprometida se características como as propriedades físicas e físico-químicas do fármaco, bem como, os componentes da formulação e processo de fabricação não

forem levados em consideração durante o desenvolvimento farmacotécnico de ambos os produtos.

Para o medicamento genérico, o fabricante deve investir no desenvolvimento farmacotécnico de um produto que cumpra com as mesmas especificações *in vitro*, em relação ao medicamento de referência (DIGHE, 1999).

Por essa razão, é determinado que os estudos de equivalência farmacêutica para comprimidos e cápsulas devem ser compostos por testes de identificação da matéria-prima, análises físicas e físico-químicas como peso médio, porcentagem de umidade, uniformidade de conteúdo, teor, desintegração, friabilidade e dureza apenas para os comprimidos. O perfil de dissolução deve ser realizado para ambas formas farmacêuticas. Caso não conste nos compêndios oficiais, o método analítico deve ser desenvolvido e validado pela indústria fabricante e co-validada pelos centros habilitados em análises de medicamentos genéricos (BRASIL, 2004).

Como base no exposto, objetivou-se, através desse estudo, avaliar a qualidade de um lote do medicamento referência (Produto A), um lote do medicamento similar (Produto B) e um lote do medicamento genérico (Produto C), contendo sibutramina, na forma de cápsulas.

6.2 Forma farmacêutica

- Cápsulas de 15 mg de cloridrato de sibutramina monidratado. (Produto A).
Excipientes: celulose microcristalina; dióxido de silício; estearato de magnésio e lactose.
- Cápsulas de 15 mg de cloridrato de sibutramina monidratado. (Produto B).
Excipientes: celulose microcristalina; dióxido de silício; estearato de magnésio e lactose.
- Cápsulas manipuladas de 15 mg de cloridrato de sibutramina monidratado. (Produto C).
Excipientes: celulose microcristalina; dióxido de silício; estearato de magnésio e lactose.

6.3 Solventes e reagentes

- Água destilada purificada;
- Água purificada Milli-Q;
- Metanol grau cromatográfico, Merck;
- Ácido fosfórico PA, Merck;
- Metanol PA, Merck;
- Gás Hélio, White Martins;
- Reagente de Karl Fisher, Merck;
- Solução tampão pH 4,0, Merck;
- Solução tampão pH 7,0, Merck;
- Trietilamina, Merck;
- Ácido clorídrico PA, Merck.

6.4 Equipamentos e acessórios

- Aparelho digital de ponto de fusão, ELECTRO THERMAL 9100;
- Aparelho de Karl Fisher, Schott, modelo: Titroline KF;
- Balança analítica, Bosch, modelo SAE 200;
- Banho ultra-sônico, Unique, USC 1400;
- Bomba de vácuo, Primatec;
- Cromatógrafo líquido Shimadzu SLC-10 ADvp equipado com bomba modelo LC-10AD, detector com comprimento de onda variável UV/VIS modelo SPD-10 ADvp, controlador SCL-10 ADvp, integrador automático computadorizado através de programa Class VP® software e injetor automático Rheodyne com “loop” de 20 µl (Shimadzu; Kyoto, Japan);
- Coluna cromatográfica Luna Phenomenex RP-18 (250 mm x 4,0, 5 µm);
- Cubetas de quartzo 10 mm, Hellma 100 QS;
- Aparelho de desintegração, Pharma Test, modelo PTZ;
- Aparelho de dissolução, Pharma Test, modelo PTWS-3E;
- Espectrofotômetro UV-1650 PL/VIS, Shimadzu;
- Filtro de celulose regenerada 13 mm x 0,45 µm, Sartorius;
- Centrífuga, CENTRIBIO, modelo TDL80-2B;

- Chapa de aquecimento, Fisatom;
- Membrana filtrante de acetato de celulose 0,45 μm , Millipore;
- Papel filtro quantitativo faixa preta, Framex;
- Pipetador, Tranferpette Brand;
- Potenciômetro digital Schott Field Lab pH;
- Sistema de filtração, Millipore;
- Mesa agitadora, tecnal, modelo TE 140;
- Termômetros, Incoterm.

6.5 Parte experimental

6.5.1 Análise das embalagens

Avaliaram-se as seguintes informações: teor, lote, data de fabricação, validade e excipientes.

6.5.2 Identificação da sibutramina em cápsulas

Realizou-se a identificação da sibutramina em cápsulas por espectrofotometria na região do ultravioleta, conforme procedimentos descritos nos Capítulos I e II.

6.5.3 Análise física e físico-química das cápsulas

6.5.3.1 Determinação do peso médio das amostras

O peso médio das amostras de cápsulas de sibutramina foi realizado conforme a Farmacopéia Brasileira IV ed. (1988). Foram pesadas, individualmente, 20 unidades escolhidas de modo aleatório da forma farmacêutica em questão. Posteriormente, calculou-se o peso médio e a variação permitida, conforme a Farmacopéia Brasileira IV ed. (1988). Calculou-se, também, o peso médio do conteúdo das cápsulas.

6.5.3.2 Desintegração das formas farmacêuticas

A determinação do tempo de desintegração das cápsulas foi realizada segundo a Farmacopéia Brasileira IV ed. (1988). Para este teste foram utilizadas seis unidades e água, a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, como meio de desintegração. Considerou-se como tempo de desintegração o tempo em minutos e segundos em que foi percebida a desintegração total de todas as cápsulas, ou quando se observou apenas restos de seus fragmentos.

6.5.3.3 Determinação de água

Para determinar a umidade nas formulações foi utilizado o método de Karl-Fischer, empregando titulador automático, segundo a Farmacopéia Brasileira IV ed. (1988). Foram pesados aproximadamente 120 mg do conteúdo das cápsulas. Para determinar a porcentagem de umidade contida nos produtos utilizou-se o seguinte cálculo:

$$\text{Porcentagem de umidade} = \frac{(\text{gasto do reagente de Karl Fischer} \times \text{FC}) \times 100}{\text{quantidade de amostra (mg)}}$$

Onde:

FC = fator de correção do reagente de Karl-Fischer

6.5.4 Determinação do teor

Realizou-se determinação do teor de sibutramina nas cápsulas através de espectrofotometria na região do ultravioleta. As amostras foram preparadas de acordo com o item 4.5.1.5 do Capítulo II. Foram realizadas quatro determinações para cada amostra, na concentração de $10 \mu\text{g/ml}$, utilizando as condições descritas no item 4.5.

6.5.5 Uniformidade de dose unitária das amostras

Foram avaliadas, individualmente, dez unidades de cada produto, por espectrofotometria na região do ultravioleta. As amostras foram preparadas, transferindo-se o conteúdo de uma unidade para balão volumétrico de 100 ml, com auxílio de 50 ml de

metanol. Após agitação por 30 minutos e banho ultra-sônico por mais 20 minutos, completaram-se os volumes com o mesmo solvente. Centrifugou-se uma porção da solução resultante por 2 minutos a 3300 rpm. Transferiram-se alíquotas de 5 ml da solução sobrenadante para balões volumétricos de 100 ml, completando-se o volume com água, a fim de se obter soluções de 7,5 µg/ml.

A quantidade de fármaco presente em cada unidade foi avaliada de acordo com as especificações da Farmacopéia Brasileira IV ed. (1988).

6.5.6 Teste de dissolução

Realizou-se o teste de dissolução da sibutramina nas amostras em estudo utilizando seis unidades de cápsulas nas condições determinadas na presente pesquisa no Capítulo III, e apresentadas na Tabela 24. A porcentagem dissolvida do fármaco foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência.

Tabela 24 – Parâmetros utilizados para avaliação da porcentagem dissolvida de sibutramina.

Parâmetros	
Meio	HCl 0,1M
Volume	500 ml
Aparato	cesta
Velocidade de rotação	75 rpm
Volume coletado	10 ml
Tempo de coleta	45 minutos
Temperatura	37,0°C ± 0,5°C

6.5.7 Perfil de dissolução

O procedimento empregado para avaliação dos produtos foi o mesmo utilizado no item 6.5.6, conforme Tabela 23. As coletas foram realizadas nos tempos de 5, 10, 15, 20 e 45 minutos. Doze unidades de cada produto foram submetidas ao teste. A cromatografia líquida foi utilizada para a quantificação da porcentagem dissolvida de sibutramina em cápsulas.

Através do programa computacional GraphPrism – Versão 4.0 foram determinadas as áreas sob a curva da porcentagem de dissolução de sibutramina *versus* tempo individualmente para doze unidades de cápsulas de cada produtor, calculando-se a eficiência de dissolução (Capítulo III, item 5.2).

6.6 Resultados

Na caixa do medicamento foram encontradas as informações: lote, concentração, quantidade, fabricante e validade. As bulas estavam de acordo com a legislação vigente (BRASIL, 2003c) contendo: informações ao paciente e informações técnicas.

A identificação da sibutramina nos produtos foi realizada por espectrofotometria na região do ultravioleta. A Figura 18 apresenta os espectros de absorção molecular obtidos das soluções da sibutramina SQR e dos Produtos A (Referência), B (Similar) e C (Genérico).

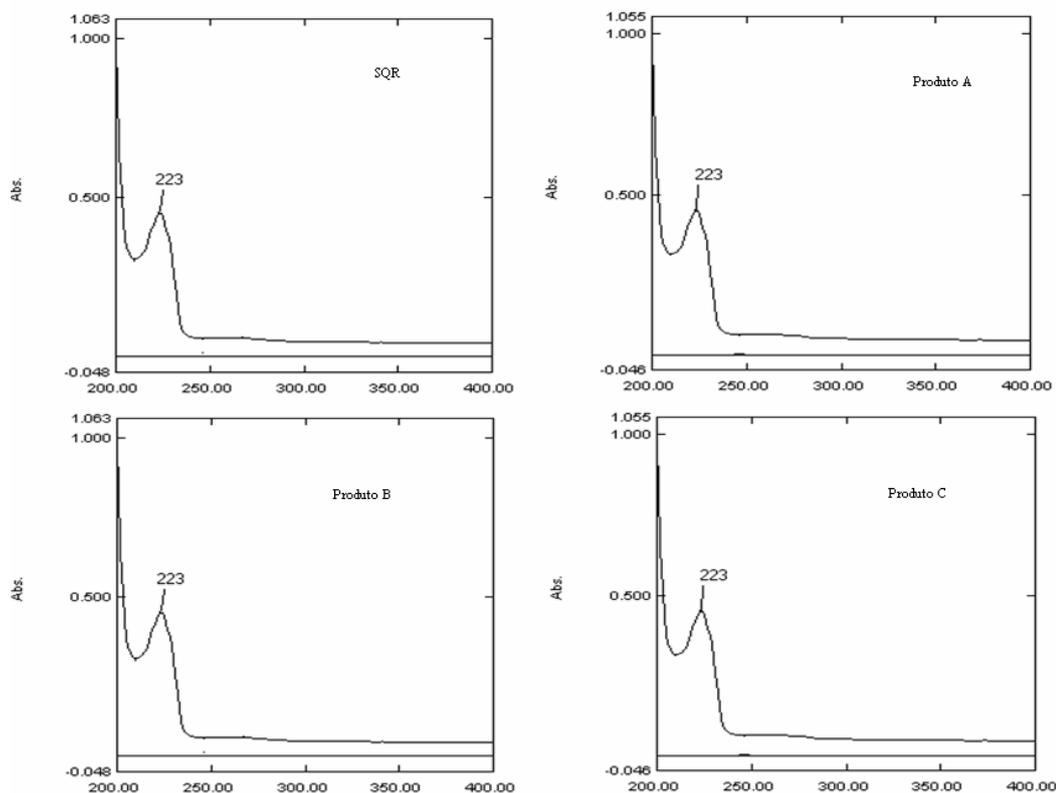


Figura 18 – Representação gráfica dos espectros de absorção molecular obtidos por espectrofotometria na região do UV das soluções sibutramina SQR e dos Produtos A, B e C, na concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$.

Os resultados referentes às determinações individuais de peso médio, tempo de desintegração e umidade das cápsulas de sibutramina encontram-se na Tabela 25.

Tabela 25 - Valores individuais (mg) obtidos na determinação de peso médio (PM), desvio padrão (DP), limites inferior e superior permitidos, peso médio do conteúdo, desintegração (min.: seg.) e umidade (%), para as cápsulas.

Quantidade de Cápsulas	Produto A	Produto B	Produto C
1	306,3	307,5	305,6
2	310,4	307,3	313,0
3	303,1	312,6	305,1
4	298,0	300,6	311,3
5	299,8	304,6	306,0
6	286,9	305,2	302,1
7	300,0	296,1	300,1
8	307,7	299,2	303,5
9	303,0	301,7	300,7
10	302,7	305,2	300,7
11	308,7	305,0	299,4
12	308,6	308,8	306,5
13	303,5	306,7	312,4
14	308,2	307,3	313,5
15	310,4	303,3	304,8
16	307,7	299,8	296,7
17	294,5	300,2	311,4
18	311,1	304,6	308,0
19	304,7	299,3	310,4
20	305,2	299,0	312,7
PM ± DP	304,0 ± 6,0	303,7 ± 4,1	306,2 ± 5,2
Limite inferior	281,22	280,92	283,23
Limite superior	326,83	326,48	329,16
PMc ± CV%	244,0 ± 4,0	242,0 ± 1,68	245,6 ± 2,0
Desintegração (min: seg)	5:80	5:95	6:05
Umidade (%)	6,93	6,43	6,40

Os resultados encontrados na determinação quantitativa de sibutramina nas cápsulas, por espectrofotometria na região do ultravioleta, encontram-se na Tabela 26.

Tabela 26 - Valores experimentais obtidos na análise de teor da sibutramina nas cápsulas, por espectrofotometria na região do ultravioleta.

Amostra	Produto A	Produto B	Produto C
1	98,92	99,65	99,62
2	99,76	99,89	100,14
3	100,04	100,13	101,78
4	98,67	101,57	100,74
Média (%)	99,34	100,31	100,57
CV%	0,57	0,74	0,80

CV% = Coeficiente de variação percentual.

Os resultados do teste de dissolução *in vitro* obtidos nas amostras de cápsulas, utilizando como meio HCl 0,1M a $37,0 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$, podem ser observados na Tabela 27.

Tabela 27 - Valores de porcentagens dissolvidas (%) da sibutramina nas cápsulas, obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência.

Amostra	Produto A	Produto B	Produto C
1	87,53	91,04	94,28
2	90,90	89,32	89,63
3	90,95	93,73	87,25
4	92,79	91,48	90,82
5	91,38	88,60	92,68
6	91,73	93,52	94,77
Média (%)	90,71	91,28	91,57
CV%	1,74	2,10	2,88

CV% = Coeficiente de variação percentual.

Os resultados dos perfis de dissolução *in vitro* das cápsulas, encontram-se na Figura 19.

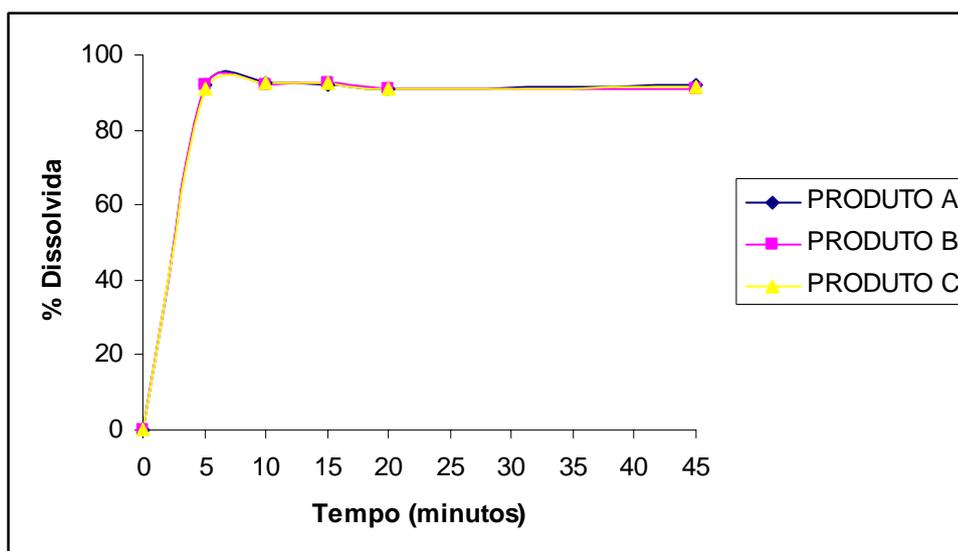


Figura 19 - Representação gráfica das porcentagens dissolvidas da sibutramina, empregando aparato 1, para as cápsulas, em meio HCl 0,1M a 37,0 °C ± 0,5 °C, 75 rpm, analisados por cromatografia líquida de alta eficiência.

Os valores de eficiência de dissolução com seus respectivos coeficientes de variação (CV%) e análise de variância (ANOVA) obtidos para as cápsulas, analisados por cromatografia líquida, encontram-se na Tabela 28.

Tabela 28 - Valores de eficiência de dissolução (%), coeficiente de variação percentual (CV%) e análise de variância (ANOVA) das cápsulas de sibutramina, obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência.

Amostra	Produto A	Produto B	Produto C
1	88,73	89,20	86,64
2	88,53	86,96	87,56
3	88,00	86,62	86,33
4	88,02	88,40	86,78
5	90,03	88,22	88,11
6	90,11	89,00	89,11
7	88,91	90,11	88,82
8	89,51	87,27	87,38
9	89,20	87,02	86,36
10	88,71	89,24	89,71
11	90,31	86,69	88,33
12	90,73	89,98	90,89
Média	89,23	88,39	88,34
CV%	1,01	1,35	1,42
ANOVA	F calculado		
	2,38*		

CV% = Coeficiente de variação percentual.

F calculado para $p > 0,05$ (3,28).

*Valor não significativo.

Os valores experimentais obtidos na determinação da uniformidade de conteúdo das amostras por espectrofotometria na região do ultravioleta estão apresentados na Tabela 29.

Tabela 29 – Valores individuais experimentais e média, em porcentagem, obtidos na avaliação da uniformidade de conteúdo das cápsulas, por espectrofotometria na região do ultravioleta.

Amostra	Produto A	Produto B	Produto C
1	98,05	97,35	99,38
2	97,10	99,40	96,78
3	100,05	96,25	97,47
4	99,24	100,03	95,05
5	97,30	101,40	100,06
6	95,40	98,90	96,01
7	98,25	97,30	97,30
8	100,50	95,37	99,15
9	99,54	98,20	95,97
10	101,00	97,36	101,60
Média (%)	98,64	98,18	97,88
CV%	1,67	1,72	2,02

CV% = Coeficiente de variação percentual.

6.7 Discussão

A integração do setor produtivo com o controle de qualidade, na indústria de medicamentos, exerce papel fundamental na garantia da execução das boas práticas de fabricação e de laboratórios para que o fármaco possa alcançar sua forma farmacêutica final, garantindo ao paciente medicamento de ótima qualidade (SANTORO, 1988).

Para avaliar a qualidade de cápsulas devem ser realizados testes que incluam determinações quantitativas e qualitativas através de processos físico-químicos, químicos ou biológicos, bem como avaliações das propriedades biofarmacotécnica dos produtos.

Na análise das caixas verificou-se que as respectivas bulas (BRASIL, 2003c) apresentavam informações importantes, tais como as características da formulação, excipientes, principais indicações, contra-indicações, posologia e efeitos colaterais.

A presença do fármaco nos produtos farmacêuticos foi demonstrada por espectrofotometria na região do ultravioleta. Os espectros de absorção molecular (Figura 18) e de todas as amostras foram semelhantes àqueles obtidos para SQR, confirmando a identidade da sibutramina.

Quanto à análise do peso-médio, cada unidade das cápsulas deve conter uma quantidade específica de princípio ativo relacionada a uma determinada quantidade da formulação do medicamento proposto (LACHMAN *et al.*, 1986). Por essa razão, durante a produção de comprimidos e cápsulas, o ajuste correto dos pesos constitui-se em etapa importante. As amostras submetidas à determinação do peso médio devem estar dentro das especificações indicadas pela Farmacopéia Brasileira IV ed. (1988), onde a variação individual permitida para as cápsulas com peso-médio superior a 300 mg, é $\pm 7,5\%$. Os resultados da variação de peso obtidos para cápsulas (Tabela 25) mostraram que os produtos analisados apresentaram todas as unidades dentro dos limites especificados, cumprindo, assim, com os requisitos do teste.

O processo de desintegração do fármaco constitui uma etapa importante para a absorção do princípio ativo pelo organismo. Para que ocorra a absorção do fármaco pelo organismo, este deve apresentar-se na forma de solução e, para isso, é necessário que ocorra primeiro a desagregação do mesmo em partículas menores ou grânulos. O tempo de desintegração de todos os produtos encontrou-se dentro das especificações estabelecidas pela Farmacopéia Brasileira IV ed. (1988): 45 minutos para as cápsulas (Tabelas 25).

A determinação da umidade em formas farmacêuticas é considerada um teste de relevada importância, uma vez que a água contida junto ao fármaco e aos excipientes pode interferir no peso-médio, teor, uniformidade, estabilidade, desintegração e dissolução do fármaco podendo alterar a biodisponibilidade do medicamento. As cápsulas apresentaram porcentagem de umidade entre 6,4 a 6,9. Não existe, no entanto, especificação para teor de umidade na forma farmacêutica contendo sibutramina.

Na determinação quantitativa, verificou-se que os teores médios de sibutramina obtidos encontraram-se dentro da faixa de 98,0 a 102,0%, da quantidade declarada do fármaco, nas amostras, conforme Tabela 26. A variação de teor entre cápsulas foi menor que 5%. Conforme a ANVISA, um medicamento para ser submetido a estudo de bioequivalência deve apresentar uma diferença de no máximo 5% entre o teor do produto de referência e o teste (BRASIL, 2004). Verificou-se, assim, que os produtos poderiam ser submetidos a esses estudos.

O teste de dissolução (Tabela 27), de acordo com a Farmacopéia Brasileira IV ed. (1988), determina a porcentagem da quantidade de princípio ativo, declarado no rótulo do produto, liberado no meio de dissolução, dentro do período especificado, sob aparelhagem e condições experimentais descritas. As porcentagens dissolvidas obtidas para os produtos encontraram-se acima dos limites de 85% em 45 minutos (Tabela 27).

Os resultados dos perfis de dissolução demonstraram que os valores das porcentagens de sibutramina dissolvidas foram superiores a 85% já em 15 minutos (Figura 17). A partir dos perfis de dissolução foi possível calcular o parâmetro de eficiência de dissolução, o qual foi avaliado estatisticamente para permitir a conclusão sobre a semelhança entre os perfis estudados.

Verificou-se, através de ANOVA, que não houve diferença significativa entre os perfis de dissolução, para as cápsulas de sibutramina das especialidades ensaiadas (Tabela 28).

Segundo CONNORS *et al.* (1995), produtos contendo fármacos com alta solubilidade e alta permeabilidade, como é o caso da sibutramina, ou alta solubilidade e baixa permeabilidade podem ser considerados bioequivalentes desde que apresentem dissolução de 85% do fármaco em menos de 15 minutos. Neste estudo todos os produtos cumpriram com esta especificação. A real comprovação da existência de bioequivalência entre os produtos (referência e genérico) só poderá ser confirmada com a realização de estudo *in vivo* para as formas avaliadas, entretanto, fica demonstrada a equivalência em conformidade com a legislação vigente.

A avaliação da distribuição uniforme do fármaco em cada unidade é considerada muito importante, principalmente para fármacos com baixa concentração ou com janela terapêutica estreita. De acordo com os critérios recomendados pela Farmacopéia Brasileira IV ed. (1988), os valores individuais podem variar de 85 a 115%, com CV% máximo de 6%. Todos os produtos cumpriram com as especificações para o teste de uniformidade de conteúdo (Tabela 29).

Os produtos A, B e C, respectivamente, referência, similar e genérico, apresentaram resultados adequados em todos os testes a que foram submetidos, demonstrando que estes não apresentam desvios da qualidade.

7. CONCLUSÕES

- As análises espectroscópicas (RMN ^1H , ^{13}C , IV) e a determinação da faixa de fusão permitiram a caracterização da substância química utilizada como referência no presente estudo;
- A espectrofotometria na região do ultravioleta e a cromatografia líquida de alta eficiência podem ser utilizadas como métodos de identificação da sibutramina em cápsulas;
- O método desenvolvido através da espectrofotometria na região do ultravioleta em 223 nm, mostrou-se sensível, linear, preciso e exato para análise quantitativa da sibutramina em cápsulas;
- O método por cromatografia líquida de alta eficiência, nas condições estabelecidas demonstrou precisão, sensibilidade, especificidade, exatidão e robustez para análise quantitativa da sibutramina em cápsulas;
- A análise comparativa entre os métodos propostos para a determinação quantitativa da sibutramina demonstrou não haver diferença estatística significativa entre eles, sendo caracterizada a equivalência entre os mesmos ($p > 0,05$);
- O uso de 500 ml de ácido clorídrico 0,1M a $37\text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5\text{ }^\circ\text{C}$, aparato cesta com velocidade de 75 rpm, demonstrou resultado satisfatório para análise da dissolução da forma farmacêutica contendo sibutramina;
- Sugere-se que a especificação de 75% de dissolução em 45 minutos seja suficiente para avaliar a porcentagem dissolvida de sibutramina para as cápsulas;
- O método por cromatografia líquida de alta eficiência demonstrou ser adequado para determinação da porcentagem de sibutramina dissolvida nas cápsulas;

- No estudo comparativo realizado constatou-se que os três produtos analisados cumpriram com as especificações indicadas nas farmacopéias quanto às características gerais para a forma farmacêutica cápsulas;
- Os teores de sibutramina, nos produtos analisados, encontraram-se dentro da faixa de 98 - 102%;
- Todos os produtos analisados apresentaram porcentagem de dissolução superior a 85% em 45 minutos;
- Com base nos resultados encontrados, concluiu-se que os produtos A (referência) e C (genérico) são equivalentes podendo ser intercambiáveis, conforme legislação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOU, H. M. **Dissolution, Bioavailability & Bioequivalence**. Easton: Mack Publishing Company, 1989.

ABBOTT LABORATORIES. Disponível em: <<http://www.abbott.com>>. Acesso em: 30 abr. 2006.

ADAMS, E.; COOMANS, D; SMEYERS-VERBEKE, J; MASSART, D.L. Application of linear mixed models to the evaluation of dissolution profiles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 226, p. 107-125, 2001.

AGRAS, W. S., Obesity. In: Dale DC, Federman DD, Cassel CK. **Scientific American Medicine**. New York: Scientific American Inc., section 9, chapter 3, p.1-9, 1996.

AMIDON, G. L.; LENNERNAS, H; SHAH, V.P.; CRISON, J.R. Theoretical basis of a biopharmaceutic drug classification: correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Review.**, v. 12, n. 3, p.413 - 420, 1995.

ANSARI, M.; KAZEMMIPOUR, M.; TALEBNIA, J. The Development and Validation of Dissolution Method for Clomipramine Solid Dosage Form. **Dissolution Technologies**, p. 16 - 24, 2004.

ATKINSON, R. L.; KAZEMIPPOUR, M.; TALEBNIA, J. Report on the NIH workshop on pharmologic treatment of obesity. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 60, p.153 -156, 1994.

AVENDAÑO, C. Síntesis de fármacos. Principios generales e introducción al análisis farmacêutico. In: LOPES, M. C. A. **Introducción a la Química Farmacêutica** – Madri: Intramerica McGraw-Hill, 1993. Cap. 19, p. 549 e Cap. 27, p. 843 – 857.

_____ Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 jun. 2003 a.

_____ Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE nº 135, de 29 de maio de 2003. Regulamento técnico para medicamentos genéricos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 jun. 2003 b.

_____ Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE nº 140, de 29 de maio de 2003. Estabelece regras das bulas de medicamentos para pacientes e para profissionais de saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 jun. 2003 c.

_____ Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE nº 901, de 29 de maio de 2003. Guia para ensaios de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 jun. 2003 d.

_____ Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 33, de 25 de fevereiro de 2003. Regulamento Técnico para o Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 05 março, 2003 e.

_____ Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE nº 310, de 01 de setembro de 2004. Guia para realização do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 03 set. 2004.

BRAY, G. A. Obesity: basic considerations and clinical approaches. **Disease-a-month.**, v. 35, issue 7, p. 451-538, 1989.

BRAY, G. A.; RYAN, D. H.; GORDON, D.; HEIDINGSFELDER, S.; CERISE, F.; WILSON, K. A. A double-blind randomized placebo-controlled trial of sibutramine. **Obesity Research**, v.4, 263-270, 1996.

BRAY, G. A.. Use and abuse of appetite-suppressant drugs in the treatment of obesity. **Annals of Internal Medicine.**, v. 119, issue 7, part 2, p. 707-713, 1993.

BRITISH PHARMACOPOEIA (BP). Her Majesty's Stationary Office, London, v. I, 2003.

BUCKETT, W. R.; THOMAS, P. C.; LUSCOMBE, G. P. The pharmacology of sibutramine hydrochloride, a new antidepressant which induces rapid noradrenergic down-regulation. **Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry**, v. 12, p. 575-584, 1988.

CONNORS, K.A.; AMIDON, G. L.; STELLA, V. J. Chemical stability of pharmaceuticals. **A handbook for pharmacists**, 2th. ed., New York, John Wiley & Sons, 1986.

CHAPELOT, D.; MARMONIER C, THOMAS F, HANOTIN, C. Modalities of the food intake-reducing effect of sibutramine in humans. **Physiology Behavior**, v. 68, p.299-308, 2000.

CHEN, JUN; LU, WEI; ZHANG, QIZHI; JIANG, XINGUO. "Determination of the active metabolite of sibutramine by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry". **Journal of Chromatography B**. v.785, p.197-203, 2002.

CLURCZAK, E. W. Validação de métodos em espectroscopia para análises farmacêuticas. **Pharmaceutical Technology**. Junho, 1998.

COSTA, P. An alternative method to the evaluation of similarity factor in dissolution testing. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 220, p. 77 – 83, 2001.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Influence of dissolution medium agitation on release profile of sustained-release tablets. **Drug Development Industrial Pharmacy**., v. 27, n. 8, p. 811 – 817, 2001.

DIGHE, S. V. A review of safety of generic drugs. **Transplant**, v. 31, suppl. 3A, p. 235 – 245, 1999.

DING, LI; HÃO, XINYO; XIN, HUANG; SHENGQIANG, ZHANG. "Simultaneous determination of sibutramine and its *N*-desmethyl metabolites in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry Method and clinical applications". **Analytica Chimica Acta**, v. 492, p. 241-248, 2003.

FARMACOPÉIA Brasileira 4 ed. São Paulo, Atheneu, 1988.

FANGHANEL, G.; CORTINAS, L.; SANCHEZ-REYES, L.; BERBER, A. A clinical trial of the use of sibutramine for the treatment of patients suffering essential obesity. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 24(2), p.144-50, 2000.

FDA, Guidance for Industry Dissolution Testing of Intermediate Release Solid Oral Dosage Forms, US Department of Health and Human Services (CDER), August, 1997.

FORTUNATO, D. Dissolution Method Development for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. **Dissolution Technologies**, p. 12 – 14, 2005.

GOMES, P. **Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para o controle de qualidade de Rosiglitazona em comprimidos revestidos**. 2003. 126f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

HALFORD, J. C. G.; HEAL, D. J.; BLUNDELL, J. E. Effects in the rat of sibutramine on food intake and the behavioural satiety sequence. **Br. J. Pharmacol.**, v. 114, 1994.

HANSEN, D. L.; TOUBRO, S; STOCK, M. J.; MACDONALD, I. A.; ASTRUP, A. The effect of sibutramine on energy expenditure and appetite during chronic treatment without dietary restriction. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 23(10), p.1016-1024, 1999.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE, ICH – quality: Stability Testing of New Drugs Substances and Products Q 1A (R2), 2003.

_____ ICH Steering Committee, Validation of Analytical Procedures: Methodology, 1996.

KHAN, K.A. The concept of dissolution efficiency. **J. Pharm. Pharmacol.**, london, v. 28, p. 48 – 49, 1975.

KASIM, N.A.; WHITEHOUSE, M.; RAMACHANDRAN, C.; BERMEJO, M.; LENNERNAS, H.; HUSSAIN, S.A.; JUNGINGER, H.E.; STAVICHANSKY, S.A.; MIDHA, K.K.; SHAH, V.P.; AMIDON, G.L. Molecular Properties of WHO Essential Drugs and Provisional Biopharmaceutical Classification. **Molecular Pharmaceutics**, v.1, n.1, p. 85 -96, 2004.

KIBBE, A. H. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. Washington: American Pharmaceutical Association, 2000.

KOMMANABOYINA, B.; RHODES, C. T. Trends in stability testing, with emphasis on stability during distribution and storage. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, n. 7, p. 857 – 868, 1999.

LACKMAN. L.; LIERMAN, H.; KANIG, J. The theory and practice of industry pharmacy. 30th. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986.

LISSNER, L. **Causes, diagnosis and risks of obesity**. *PharmacoEconomics*, v. 5, p. 8-17, 1993.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F.A. Dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, p. 375 – 399, 2002.

MARCOLONGO, R. **Dissolução de medicamentos:** fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica. 2003. 117f. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MARQUES, M. R. C. Desenvolvimento e Validação de Métodos de Dissolução para Formas Farmacêuticas Sólidas Orais. **Revista Analytica**, nº 1, p. 48-51, 2002.

MATTHEWS, B. R. Regulatory aspects of stability testing in Europe. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, n. 7, p. 831-57 – 856, 1999.

MEHTA, A. C. Quality management in drug analysis. **Analyst**, v. 122, p. 83R – 88R, 1997.

MOORE, J. W., FLANNER, H.H. Mathematical comparison of dissolution profiles. **Pharmaceutical. Technology.**, New York, v. 20, n. 6, p. 64-74, 1996.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH CONSENSUS DEVELOPMENT PANEL ON THE HEALTH IMPLICATIONS OF OBESITY. Health implications of obesity. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement. **Annals of Internal Medicine**, v. 103, p. 1073-1077, 1985.

NORTH AMERICAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF OBESITY. **Guidelines for the approval and use of drugs to treat obesity.** Obesity Research, v. 3, 473-478, 1995.

QURESHI, S.A; MCGILVEKAY, I.J. Typical variability in drug dissolution testing: study with USP and FDA calibrator tablets and marketed drug (glibenclamide) product. **European Journal of Pharmaceutical Sciences.** v.7, p. 249 – 258, 1999.

RADHAKRISHNA, T.; LAKSHMI NARAYANA, Ch.; SREENIVAS RAO, D.; VYAS, K.; REDDY, G.Om. LC method for the determination of assay and purity of sibutramine hydrochloride and its enantiomers by chiral chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.** v. 22, n. 4, p. 627-639, 2000.

RICHTER WO. [How safe are the new obesity drugs? Indications and contra indications of orlistat and sibutramine]. **MMW Fortschr Med.**, v.141, p. 49-50, 1999.

SANTORO, M. I. R. M. Introdução ao controle de qualidade de medicamentos, São Paulo: Atheneu, 1988.

SEGALL A. I., COLLADO, E. A.; RICCI, R. A.; PIZZORNO, M. T. Reversed-Phase HPLC Determination of Sibutramine Hydrochloride in the Presence of its Oxidatively-Induced Degradation Products. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.26, n.6, p. 977-986, 2003.

SHARGEL, L & YU, A. B.C **Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics**. 4^a ed. Stamford: Appleton & Lange, p. 768, 1999.

SICHERI, R.; COUTINHO, D. C.; LEÃO, M. M.; RECINE, E. & EVEHART, E. High temporal, geographic, and income variation in body mass index among adults in Brazil. **Am. J. of Health**, v. 84, n. 5, p. 793-798, 1994.

SIEWERT, M.; WEINANDY, L.; WITHEMAN, D.; JUDKINS, C. Typical variability and evaluation of sources of variability in drug dissolution testing. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 53, p. 9 – 14, 2002.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação Espectrofotométrica de Compostos Orgânicos**, 6 ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2000.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T.A. *Princípios de Análise Instrumental*. Tradução Ignez Caracelli *et al.* 5 ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

STOCK, M. J. Sibutramine: a review of the pharmacology of a novel anti-obesity agent. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 21, suppl. 1: S25-9, 1997.

STORPIRTIS, S. *Biofarmacotécnica: Fundamentos de biodisponibilidade, bioequivalência, dissolução e intercambiabilidade de medicamentos genéricos*. São Paulo: [s.n.], p. 78, 1999.

STORPIRTIS, S.; MARCOLONGO, R.; GASPAROTTO, F.S.; VILANOVA, C. M. A. Equivalência farmacêutica no contexto da intercambiabilidade entre medicamentos genéricos e de referência: Bases técnicas e científicas. **Infarma**, v. 16, n. 9 – 10, 2004.

STRICKER-KRONGRAD, A.; SOUQUET, A. M.; JACKSON, H. C.; BURLET, C. Effects of various monoamine receptor antagonists on the decrease in food intake induced by sibutramine in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, v. 117, 1996.

STUNKARD, A. J. Currents views on obesity. **America Journal of Medicine**, v. 100, p. 230-236, 1996.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, v. 2, p. 12 – 20, 1998.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP) 29th ed. Rockville, United States Convention, 2006.

THE MERCK INDEX, an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. Whitehouse Station, NJ. 13 ed., 2003.

VAN ITALLIE, T. B. Health implications of overweight and obesity in United States. **Annals of Internal Medicine.**, v. 103, p. 983-988, 1985.

WHO. **Obesity: preventing and managing the global epidemic.** Report of a WHO Consultation on Obesity. Geneva, 1998.