



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Estudo da degradação forçada de Gliclazida sob a forma de comprimidos e
validação de método analítico indicativo de estabilidade empregando HPLC-DAD**

Olair Coradi Júnior

Toledo – PR, 2023



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Estudo da degradação forçada de Gliclazida sob a forma de comprimidos e
validação de método analítico indicativo de estabilidade empregando HPLC-DAD**

Olair Coradi Júnior

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Unioeste/*Campus* Toledo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Elvio Antonio de Campos

Coorientador: Dr. Cristiano Cabral Müller

Toledo – PR, 2023

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Coradi Júnior, Olair

Estudo da degradação forçada de Gliclazida sob a forma de comprimidos e validação de método analítico indicativo de estabilidade empregando HPLC-DAD / Olair Coradi Júnior; orientador Elvio Antonio de Campos; coorientador Cristiano Cabral Müller. -- Toledo, 2023.

176 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Toledo) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2023.

1. Hipoglicêmico. 2. Produtos de Degradação. 3. Doseamento. 4. Controle de Qualidade. I. Antonio de Campos, Elvio, orient. II. Cabral Müller, Cristiano, coorient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Neste momento, gostaria de agradecer primeiramente à Deus por ter me mantido forte e saudável durante essa trajetória. Um período difícil nesses anos, com uma pandemia que nos fez repensar sobre tudo o que está em nosso entorno. Da mesma forma, gostaria de agradecer a minha esposa Gabriela, que se manteve forte ao meu lado me apoiando, incentivando e por todo amor e compreensão neste período. Aos meus pais Olair e Madalena que sempre me incentivaram a buscar o que era melhor para mim, pela educação recebida e pelos valores que levarei por toda vida. Ao meu irmão Dyego que sempre foi um espelho para mim e agradeço por tê-lo ao meu lado. E, não menos importante aos meus sogros Ervino e Marilaine que oraram por mim e me aconselharam nos momentos difíceis, vocês também contribuíram imensamente e sou eternamente grato.

Agradeço ao prof. Dr. Elvio por ter me acolhido e aceitado encarar os desafios propostos neste projeto, pela atenção e ajuda em todos os detalhes. Sua compreensão foi importante para o desfecho deste trabalho.

Aos meus amigos, Pablo, Raul, Marcos e Bruno que me ajudaram com dicas e conselhos importantes na elaboração deste projeto. A parceria e as brincadeiras foram a cereja do bolo durante todo o período, sem vocês garanto que não conseguiria.

Da mesma forma, gostaria de agradecer a empresa Prati Donaduzzi e Cia LTDA por todo o suporte e incentivo na busca por novos conhecimentos. Ao gerente do setor Elvis onde autorizou e disponibilizou toda a estrutura para que o trabalho fosse desenvolvido. Ao pesquisador chefe Cleber pelas ideias e sugestões durante o período de análise e aos técnicos do laboratório que contribuíram com a execução do trabalho, ao pesquisador chefe Thiago por toda contribuição e auxílio para que o trabalho fosse executado.

E por fim gostaria de deixar meu sentimento de orgulho, chegar até aqui não foi uma tarefa fácil. Mas, a vida é cheia de desafios e obstáculos, no entanto, com dedicação e perseverança, no fim o resultado sempre é o esperado. Deixo uma frase de Leon C. Megginson para reflexão: “Não é o mais forte que sobrevive, nem mais o inteligente, mas o que melhor se adapta às mudanças”.

SUMÁRIO

RESUMO	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 Diabetes Mellitus tipo II	16
3.1.1 Indústria Farmacêutica.....	19
3.1.2 Impurezas em medicamentos	20
3.1.3 Impurezas orgânicas e produtos de degradação.....	21
3.2 Cromatografia Líquida.....	21
3.3 Gliclazida	24
3.4 Desenvolvimento e validação de métodos analíticos.....	25
3.5 Estudo de degradação forçada.....	26
4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	28
4.1 Equipamentos	28
4.2 Padrões, reagentes e solventes	28
4.4 Validação do método analítico	29
4.4.1 Linearidade Doseamento e de Impurezas	30
4.4.2 Fator Resposta Relativo do Ativo x Impurezas Controladas.....	31
4.4.3 Precisão Doseamento e de Impurezas.....	31
4.4.4 Exatidão Doseamento e Impurezas.....	33
4.4.5 Limite de Quantificação.....	34
4.4.6 Faixa de Trabalho	34
4.4.7 Robustez.....	34
4.4.8 Seletividade e estudo de degradação forçada.....	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1 Desenvolvimento do método analítico.....	37
5.1.1 Teste 01	37
5.1.2 Teste 02.....	40
5.1.3 Teste 03.....	43
5.1.4 Teste 04.....	50
5.2 Validação do método analítico	52
5.2.1 Linearidade	52
5.2.2 Fator Resposta Relativo.....	54
5.2.3 Precisão.....	54

5.2.4	Exatidão	58
5.2.5	Limite de Quantificação	59
5.2.6	Faixa de Trabalho	60
5.2.7	Robustez	60
5.2.8	Conclusão dos resultados dos parâmetros de validação	67
5.3	Estudo de Degradação Forçada	67
5.3.1	Exposição com Água Purificada	71
5.3.2	Estresse Ácido – HCl 0,1M	75
5.3.3	Estresse Alcalino – NaOH 1M	79
5.3.4	Estresse Oxidativo – H ₂ O ₂ 1,5%	85
5.3.5	Estresse por Íons Metálicos – FeCl ₃ 10 mM	89
5.3.6	Estresse Fitolítico, Úmido e Térmico	93
5.3.7	Conclusão da Estudo de degradação forçada	96
6.	CONCLUSÃO	97
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	98
8.	ELEMENTOS PÓS-TEXTUAIS	99
8.1	APÊNDICE I	99
8.2	APÊNDICE II	104
8.3	APÊNDICE III	115
8.4	APÊNDICE IV	123
	REFERÊNCIAS	174

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Os fármacos utilizados para o combate da diabetes mellitus tipo II e suas respectivas estruturas químicas.	17
Tabela 2: Sistema cromatográfico.....	30
Tabela 3: Gradiente.	30
Tabela 4: Condições de estresse e tempo de exposição do ativo.	35
Tabela 5: Gradiente de proporção de Fase Móvel do Teste 03.....	45
Tabela 6: Gradiente de proporção de Fase Móvel do Teste 04.....	50
Tabela 7: Resumo das conclusões do estudo de linearidade da Gliclazida.....	52
Tabela 8: Resumo das conclusões do estudo de linearidade da Gliclazida.....	53
Tabela 9: Resumo das conclusões do estudo de linearidade da Impureza A.....	53
Tabela 10: Resumo das conclusões do estudo de linearidade da Impureza G.	54
Tabela 11: Coeficiente angular e fator resposta relativo de Gliclazida, Impureza A e G.....	54
Tabela 12: Resultados de Precisão 1 e Precisão (repetibilidade) e da Precisão Intermediária – Doseamento de Gliclazida.	55
Tabela 13: Resultados de Precisão 1 e Precisão (repetibilidade) e da Precisão Intermediária – Uniformidade de Conteúdo de Gliclazida.....	55
Tabela 14: Resultados de Precisão 1 e Precisão (repetibilidade) e da Precisão Intermediária – Impurezas Inespecíficas.	56
Tabela 15: Resultados de Precisão 1 e Precisão (repetibilidade) e da Precisão Intermediária – Impureza A.....	57
Tabela 16: Resultados de Precisão 1 e Precisão (repetibilidade) e da Precisão Intermediária – Impureza G.....	58
Tabela 17: Resultados de Exatidão – Doseamento e Uniformidade de Conteúdo de Gliclazida.	58
Tabela 18: Sinal/ruído dos analito de interesse no limite de quantificação.....	59
Tabela 19: Teores de Gliclazida obtidos para as Soluções Teste Doseamento nos ensaios de robustez.	61
Tabela 20: Teores de Gliclazida obtidos para as Soluções Teste Inespecífica média nos ensaios de robustez.....	61
Tabela 21: Teores de Impureza A obtidos para as Soluções Teste Específica média nos ensaios de robustez.....	62
Tabela 22: Teores de Impureza G obtidos para as Soluções Teste Específica média nos ensaios de robustez.....	62
Tabela 23: Teores de Gliclazida obtidos para as Soluções Teste Doseamento no ensaio de robustez de tempo de extração.	63
Tabela 24: Robustez de filtro para Solução Padrão SR – Gliclazida.	64
Tabela 25: Robustez de filtro para Solução Padrão Doseamento – Gliclazida.	64
Tabela 26: Robustez de filtro para Solução Teste Doseamento – Gliclazida.....	64
Tabela 27: Teores de Gliclazida obtidos para a Solução Padrão Doseamento na 1ª e 2ª etapa de estabilidade.	65
Tabela 28: Teores de Gliclazida obtidos para a Solução Teste Doseamento na 1ª e 2ª etapa de	

estabilidade.	65
Tabela 29: Teores de Gliclazida obtidos para a Solução Padrão SR na 1ª e 2ª etapa de estabilidade.	66
Tabela 30: Teores de Impureza A obtidos para a Solução Teste Específica Média na 1ª e 2ª etapa de estabilidade.	66
Tabela 31: Teores de Impureza A obtidos para a Solução Teste Específica Média na 1ª e 2ª etapa de estabilidade.	66
Tabela 32: Teores de Gliclazida obtidos para a Solução Padrão SR na 1ª e 2ª etapa de estabilidade a temperatura ambiente.	67
Tabela 33: Resultados das soluções em exposição em água purificada para as amostras de matéria-prima e produto acabado.	72
Tabela 34: Resultados das soluções em estresse ácido para as amostras de matéria-prima e produto acabado.	76
Tabela 35: Resultados das soluções em estresse alcalino para as amostras de matéria-prima e produto acabado.	81
Tabela 36: Resultados das soluções em estresse oxidativo para as amostras de matéria-prima e produto acabado.	86
Tabela 37: Resultados das soluções em estresse por íons metálicos para as amostras de matéria-prima e produto acabado.	90
Tabela 38: Resultados das soluções em estresse físico (fotolítico, úmido e térmico) para as amostras de matéria-prima e produto acabado.	94
Tabela 39: Diluições para o preparo da Linearidade doseamento.	105
Tabela 40: Diluições para o preparo da Linearidade das impurezas específicas e inespecíficas.	107
Tabela 41: Instrução de como proceder no processo de filtragem.	114

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama ilustrativo dos principais módulos de um cromatógrafo líquido moderno.	23
Figura 2: Estrutura molecular da Gliclazida.	24
Figura 3: Grupos estruturais da Gliclazida.	25
Figura 4: Cálculo da resposta relativa de cada impureza específica controlada.	31
Figura 5: Cromatograma obtido na análise da Solução Padrão Doseamento, com os dados de tempo de retenção, área, altura do pico, fator de causa e pratos teóricos.	38
Figura 6: Cromatograma obtido para a Solução Amostra Doseamento 01, com os dados de tempo de retenção, área, altura do pico, fator de causa e pratos teóricos.	39
Figura 7: Cromatograma obtido para a Solução Amostra Doseamento 02, com os dados de tempo de retenção, área, altura do pico, fator de causa e pratos teóricos.	40
Figura 8: Cromatograma obtido para a análise da Solução Sensibilidade.	41
Figura 9: Cromatograma obtido para a análise da Solução Padrão SR.	42
Figura 10: Cromatograma obtido para a análise da Solução Amostra SR.	43
Figura 11: Cromatograma obtido da Solução Branco Diluente.	46
Figura 12: Cromatograma obtido na análise da Solução Padrão Impureza A.	46
Figura 13: Cromatograma obtido na análise da Solução Padrão Impureza B.	46
Figura 14: Cromatograma obtido na análise da Solução Padrão Impureza C.	47
Figura 15: Cromatograma obtido na análise da Solução Padrão Impureza D.	47
Figura 16: Cromatograma obtido na análise da Solução Padrão Impureza E.	47
Figura 17: Cromatograma obtido na análise da Solução Padrão Impureza F.	48
Figura 18: Cromatograma obtido na análise da Solução Padrão Impureza G.	48
Figura 19: Cromatograma obtido na análise da Solução Mix de Impurezas.	49
Figura 20: Cromatograma obtido na análise da Solução Mix de Impurezas.	49
Figura 21: Cromatograma obtido na análise da Solução Mix de Impurezas.	51
Figura 22: Cromatograma da Solução Teste Fortificada – Sem zoom.	68
Figura 23: Cromatograma da Solução Teste Fortificada – Com zoom.	68
Figura 24: Cromatograma da Solução Sensibilidade.	69
Figura 25: Cromatograma da Solução Placebo.	69
Figura 26: Cromatograma da Solução Branco.	70
Figura 27: Cromatograma Solução Padrão SR.	70
Figura 28: Cromatograma Solução Padrão Teor.	71
Figura 29: Caminho de degradação a partir de ataques de íons de OH-.	73
Figura 30: Cromatograma sobreposto da matéria-prima e produto acabado no controle e com a exposição em água purificada.	74
Figura 31: Sobreposição dos cromatogramas das Soluções Diluente, Diluente Água Purificada, Placebo Controle e Placebo Água Purificada.	75
Figura 32: Rota de degradação da Gliclazida em meio ácido. (Bansal et al., 2008).	77
Figura 33: Fragmentação representativa da Gliclazida.	78
Figura 34: Cromatograma sobreposto da matéria-prima e produto acabado sob estresse ácido.	79
Figura 35: Sobreposição dos cromatogramas das Soluções Diluente ácido e Placebo ácido.	79

Figura 36: Caminho de formação da impureza VI.....	83
Figura 37: Cromatograma sobreposto da matéria-prima e produto acabado sob estresse alcalino.	84
Figura 38: Sobreposição dos cromatogramas das Soluções Diluente alcalino e Placebo alcalino.	84
Figura 39: Cromatograma sobreposto matéria-prima e produto acabado da degradação oxidativa.	88
Figura 40: Sobreposição dos cromatogramas das Soluções Diluente oxidativo e Placebo oxidativo.	89
Figura 41: Cromatograma sobreposto da matéria-prima e produto acabado sob estresse por íons metálicos.	92
Figura 42: Sobreposição dos cromatogramas das Soluções Diluente íons metálicos e Placebo íons metálicos.	92
Figura 43: Cromatograma sobreposto da matéria-prima e produto acabado para degradação física (fotolítica, úmida e térmica).	95
Figura 44: Sobreposição dos cromatogramas das Soluções Placebo degradações físicas (fotolítico, úmido e térmico).....	96

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Área obtida nas 05 injeções da Solução Padrão Doseamento.....	39
Quadro 2: Áreas obtidas nas seis injeções da Solução Padrão SR.	42

ESTUDO DA DEGRADAÇÃO FORÇADA DE GLICLAZIDA SOB A FORMA DE COMPRIMIDOS E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO INDICATIVO DE ESTABILIDADE EMPREGANDO HPLC-DAD

Olair Coradi Júnior

RESUMO

Para comercializar um medicamento, é necessário que o mesmo seja submetido a testes de qualidade para avaliar sua segurança e eficiência. Diante disso, análises analíticas são realizadas para avaliar a qualidade, as principais são: identificação, doseamento, produtos de degradação, desintengração, friabilidade, dissolução, uniformidade de conteúdo e análise microbiológicas.. Portanto, no estudo foi desenvolvido um método analítico por HPLC-DAD, quantificando o teor e as impurezas na mesma corrida cromatográfica. Após os testes de desenvolvimento, os parâmetros cromatográficos foram definidos para sua validação. A coluna cromatográfica utilizada é uma Waters Xbridge™ C18 (250 x 4.6 mm, 3.5 µm) sob temperatura de 30 °C. O sistema apresenta um gradiente de eluição, com a mistura da solução de Trietilamina 0.1 % em água purificada com o ajuste de pH para 3.8 com ácido fosfórico e Acetonitrila. A vazão de fase móvel foi de 1.0 mL min⁻¹, com a detecção em 235 nm, em uma corrida analítica de 50 minutos. A validação do método analítico seguiu conforme a RDC 166/2017 da ANVISA, harmonizado com o ICH. Na avaliação estatística da Linearidade, tanto o método de doseamento quanto o de produtos de degradação se apresentou linear. O método de doseamento se apresentou preciso, com um DPR de 0.6 %. Igualmente para as impurezas inespecíficas, onde foi observado um DPR de 2 % para o nível baixo e alto, 3 % para o nível médio. A Impureza G, para o nível baixo o DPR foi de 3 %, no nível médio de 6 % e no alto de 4 %. Já a Impureza A, no nível baixo o DPR foi de 4 %, para o nível médio e alto foi de 3 %. Na Exatidão, o método de doseamento apresentou uma recuperação média de 100 % para o nível baixo e médio, para o nível alto foi de 99 %. Para as impurezas inespecíficas, a recuperação média foi de 95 % para o nível baixo, 100 % para o nível médio e 101 % para o nível alto. A Impureza G, obteve 102 % para o nível baixo, 96 % para o nível médio e 94 % para o nível alto de recuperação média. Da mesma forma, a Impureza A obteve 101 % para o nível baixo, 97 % para o nível médio e 96 % para o nível alto. Diante disso, os métodos se mostraram precisos, exatos e lineares na faixa de trabalho e para as impurezas, o limite de quantificação foi adequado. Na Seletividade, a condição de estresse por hidrólise ácida obteve um decaimento próximo de 10 % em 2 horas de exposição. A oxidação por íons metálicos ocasionou um decaimento de aproximadamente 15 % após 6 horas de exposição. As outras condições de estresse de hidrólise básica e oxidação por peróxido, apresentaram decaimento após 10 dias de exposição e para as condições físicas de estresse (térmica, úmida e actínica) não apresentou degradação em 10 dias.

Palavras Chave: Hipoglicêmico; Produtos de Degradação, Doseamento, Controle de Qualidade.

STUDY OF THE FORCED DEGRADATION OF GLICLAZIDE IN THE FORM OF TABLETS AND VALIDATION OF AN ANALYTICAL METHOD INDICATIVE OF STABILITY USING HPLC-DAD

Olair Coradi Júnior

ABSTRACT

To market a medicine, it must undergo quality tests to assess its safety and efficiency. Therefore, analytical analyzes are carried out to evaluate quality, the main ones being: identification, assay, degradation products, disintegration, friability, dissolution, uniformity of content and microbiological analysis. Therefore, in the study an analytical method was developed by HPLC- DAD, quantifying the content and impurities in the same chromatographic run. After development tests, chromatographic parameters were defined for validation. The chromatographic column used is a Waters Xbridge™ C18 (250 x 4.6 mm, 3.5 µm) at a temperature of 30 °C. The system has an elution gradient, with the mixture of 0.1% Triethylamine solution in purified water with the pH adjusted to 3.8 with phosphoric acid and Acetonitrile. The mobile phase flow rate was 1.0 mL min⁻¹, with detection at 235 nm, in an analytical run of 50 minutes. Validation of the analytical method followed RDC 166/2017 of ANVISA, harmonized with ICH. In the statistical evaluation of Linearity, both the dosing method and the degradation product method were found to be linear. The dosing method was accurate, with a DPR of 0.6%. Likewise for non-specific impurities, where a DPR of 2% was observed for the low and high level, 3% for the medium level. Impurity G, for the low level the DPR was 3%, at the medium level 6% and at the high level 4%. As for Impurity A, at the low level the DPR was 4%, for the medium and high level it was 3%. In Accuracy, the dosing method showed an average recovery of 100% for the low and medium level, for the high level it was 99%. For non-specific impurities, the average recovery was 95% for the low level, 100% for the medium level and 101% for the high level. Impurity G obtained 102% for the low level, 96% for the medium level and 94% for the high level of medium recovery. Likewise, Impurity A obtained 101% for the low level, 97% for the medium level and 96% for the high level. Therefore, the methods proved to be precise, exact and linear in the working range and for impurities, the limit of quantification was adequate. In Selectivity, the acid hydrolysis stress condition resulted in a decay of close to 10% in 2 hours of exposure. Oxidation by metal ions caused a decay of approximately 15% after 6 hours of exposure. The other stress conditions of basic hydrolysis and peroxide oxidation showed decay after 10 days of exposure and for the physical stress conditions (thermal, humid and actinic) there was no degradation in 10 days.

Keywords: Hypoglycemic; Degradation Products, Dosing, Quality Control.

1. INTRODUÇÃO

A gliclazida é um agente hipoglicêmico, utilizado principalmente no combate de diabetes do tipo 2 – Mellitus, indicada para pacientes não dependentes de insulina, sendo administrada em tratamentos a longo prazo [1,2].

Existem diferentes técnicas analíticas desenvolvidas para quantificar o ativo, seja por Espectrofotometria de Absorção no Ultravioleta, Ressonância Magnética Nuclear quantitativa de Hidrogênio (RMNq-1H), Eletroforese Capilar de Zona (ECZ) com detecção sem contato (C4D) ou Titulação potenciométrica [3,4,5].

No entanto, os órgãos reguladores nacionais e internacionais exigem que os métodos analíticos além de quantificar o ativo, deve identificar e quantificar os produtos de degradação ou impurezas presentes tanto no insumo farmacêutico ativo quanto no produto acabado, sendo definidos como métodos analíticos indicativos de estabilidade. Para que isso seja possível, a técnica analítica empregada precisa ser seletiva para separar e quantificar tais componentes. Diante disso, se destaca a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), amplamente utilizada na indústria farmacêutica [6].

Contudo, os órgãos reguladores apresentam certa semelhança na condução da validação do método analítico desenvolvido. Conforme a International Conference on Harmonisation (ICH) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), define em seu guia e legislação, que para um método analítico seja considerado válido, o mesmo deverá ser preciso, exato, linear, seletivo e robusto para determinadas variações das etapas analíticas [7,8].

Além disso, para comprovar que o método seja indicativo de estabilidade, o ativo é submetido às condições de estresse forçado, para determinar os principais produtos e vias de degradação. A Anvisa apresenta a resolução RDC 53 e o Guia 4, onde determina as condições que o estudo de degradação forçada deverá ser realizada, sendo elas: Hidrólise ácida e básica, oxidação por íons metálicos e peróxido de hidrogênio, além da via térmica, úmida e actínia. Tais condições simulam as condições que o medicamento sofrerá durante o período de estabilidade [8].

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar o desenvolvimento e validação de método analítico indicativo de estabilidade e estudar a degradação forçada por HPLC-UV em Gliclazida sob a forma de comprimidos.

2.2 Objetivos específicos

Desenvolver o método analítico indicativo de estabilidade para a quantificação do doseamento e produtos de degradação de Gliclazida comprimidos;

Realizar a validação do método analítico indicativo de estabilidade para a quantificação do doseamento e produtos de degradação de Gliclazida comprimidos;

Estudar a degradação forçada e os produtos de degradação em Gliclazida comprimidos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Diabetes Mellitus tipo II

A enfermidade Diabetes Mellitus, também conhecida apenas como diabetes, consiste em uma síndrome metabólica que é caracterizada pelos elevados níveis de glicose na corrente sanguínea, também descrita como hiperglicemia, de pessoas acometidas pela doença. Esta síndrome é causada pela deficiência ou resistência a insulina, um hormônio produzido no pâncreas que responsável por ligar-se aos receptores de insulina que por sua vez desencadeiam cascatas de sinalização intracelular que levam a ativação de proteínas transportadoras de glicose, que transportam estas moléculas até o interior das células onde elas são empregas no metabolismo das mesmas. A Diabetes é dividida em duas classes, sendo estas nomeadas como tipo I e tipo II [9,10].

A Diabetes de tipo I é uma doença autoimune onde células do sistema imunológico, principalmente linfócitos T, atacam as células beta do pâncreas que são responsáveis pela produção de insulina. Como resultado o organismo não produz nenhuma insulina ou a quantidade produzida não é suficiente. O tratamento da diabetes tipo I, geralmente, ocorre através da administração de insulina através de injeções subcutâneas.

A principal característica da Diabetes Mellitus tipo II é a baixa captação de glicose pelo organismo, ocorrendo uma certa resistência periférica à insulina, fazendo com que os músculos e o tecido adiposo responsáveis pela absorção da glicose não faça de forma eficiente, ocorrendo um aumento da liberação da glicose pelo fígado. Com a alta concentração de glicose no sangue, ocasiona uma super produção de insulina pelas células β pancreáticas, a fim de realizar a metabolização do açúcar na corrente sanguínea. No entanto, após um período ocorre a sobrecarga de produção e as células ficam danificadas, ocasionando na redução de produção do hormônio [11]. Ferreira & Campos (2014) relatam que cerca de 90 – 95% dos casos de diabetes são do tipo II e o aumento exponencial da doença em todo o planeta se dá pelo aumento da obesidade da população e os maus hábitos alimentares, atrelado ao estilo de vida sedentário e no envelhecimento populacional.

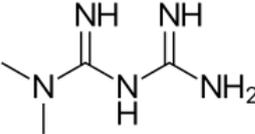
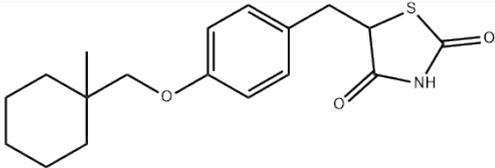
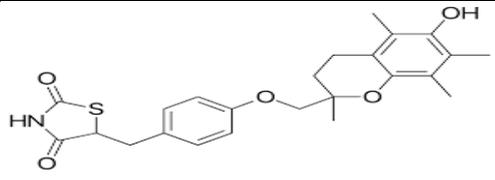
No entanto, esta enfermidade não é atual, pois historicamente possui registros de pessoas que apresentaram quadros clínicos que poderiam ser a doença . Estes relatos são de 1500 a.C. em um papiro encontrado no antigo Egito, cujo autor Ebers, mencionou o tratamento de uma poliúria, uma micção excessiva [12]. Já em 500 a.C. três médicos hindus Vaghbata, Charaka e Sushruta foram os pioneiros a perceber a doçura na urina dos pacientes com poliúria, pois observaram que a urina estava atraindo a presença de formigas e moscas [13].

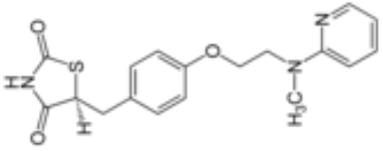
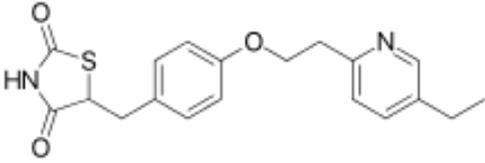
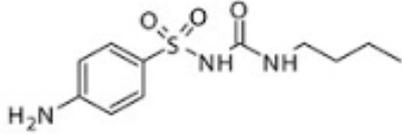
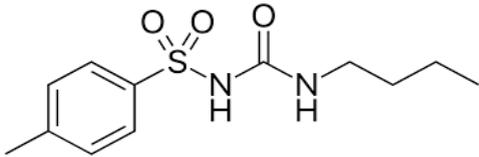
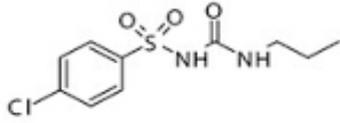
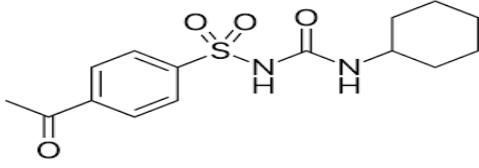
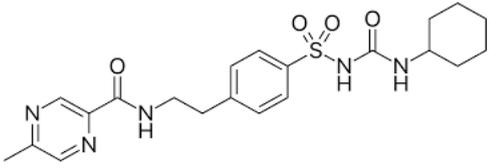
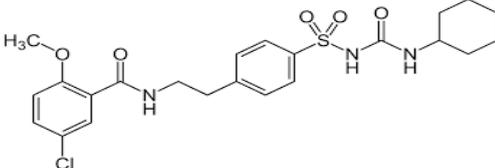
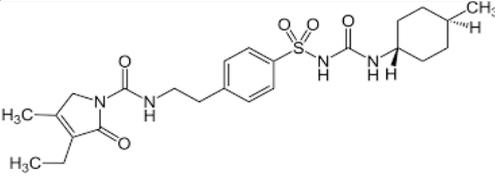
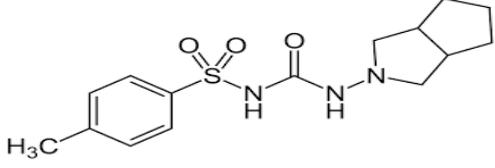
Só no século XVII, o médico inglês Thomas Willis ao tratar a doença provou a urina de um de seus pacientes e descreveu como “incrivelmente doce, como se contivesse mel ou açúcar”. No século seguinte, a partir da expressão de Willis, o químico inglês William Cullen foi o responsável a nomear a doença como “*diabetes mellitus*” pois *mellitus* = *mel* em latim, devido a doçura da urina nos portadores de tal enfermidade [13].

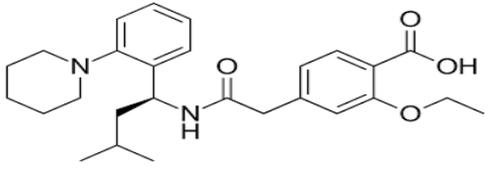
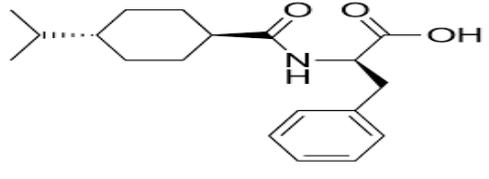
No século XXI, devido aos maus hábitos alimentares, vida sedentária da população e aumento da obesidade nas pessoas, ocorreu a explosão de casos em todo o planeta [12]. Estudos mostram que somente no Brasil existem 12 milhões de pessoas que apresentam diabetes e, na maioria dos casos, são indivíduos com idade superior a 40 anos e obesos [10]. Segundo dados do *International Diabetes Federation (IDF)* em 2021, em todo o planeta 537 milhões de pessoas apresentaram o quadro da doença. E, conforme os pesquisadores, existe a previsão para aumentar em 46% nos próximos anos, estimando que até 2030 cerca de 643 milhões apresentem o quadro da doença e em 2045 cerca de 783 milhões de pessoas.

Diante deste cenário, soluções para o combate à doença foram desenvolvidos, sendo que muitos medicamentos foram pesquisados para que apresente uma redução dos sintomas causados pela enfermidade. Os fármacos utilizados para o tratamento de diabetes *mellitus* tipo II são os seguintes: Metformina; as Tiazolidinodionas (Glitazonas) que apresentam em sua classe a Ciglitazona, Troglitazona, Rosiglitazona e Pioglitazona; as sulfonilureias com a Carbutamida, Tolbutamida, Clorpropamida, Acetoexamida, Glipizida, Glibenclamida, Glimiperida e Gliclazida; Meglitinidas com a Repaglinida e a Nateglinida, onde suas estruturas químicas podem ser visualizadas na Tabela 1 [15].

Tabela 1: Os fármacos utilizados para o combate da diabetes *mellitus* tipo II e suas respectivas estruturas químicas.

Fármaco	Molécula
Metformina	
Ciglitazona	
Troglitazona	

Rosiglitazona	
Pioglitazona	
Carbutamida	
Tolbutamida	
Clorpropamida	
Acetoexamida	
Glipizida	
Glibenclamida	
Glimeperida	
Gliclazida	

Repaglinida	
Nateglinida	

Fonte: Google imagens.

3.1.1 Indústria Farmacêutica

A indústria farmacêutica nos últimos anos vêm avançando no setor industrial, sendo uma das áreas de maior relevância mundialmente, pois é a responsável pela produção, distribuição e comercialização dos medicamentos. Com o aumento populacional, e, por consequência, o número de pessoas com alguma enfermidade está aumentando, necessitando um alto investimento financeiro na pesquisa e inovação de novos medicamentos, a fim de atender e suportar a demanda de saúde em âmbito mundial. Para que isso aconteça, a exigência de uma tecnologia avançada, bem como uma mão de obra qualificada, são necessários para que o consumidor possa realizar o tratamento com um medicamento que apresente a eficácia necessária para o combate da doença, e da mesma forma que apresente segurança para que não ocorra efeitos adversos não desejados nos pacientes [16,17].

Cada vez mais a indústria farmacêutica e os centros de pesquisa vêm formando parcerias para que novos produtos sejam desenvolvidos, visto que a busca pela inovação é o principal atrativo para este ramo industrial, pois a cada dia o público alvo vêm se tornando mais exigente, tornando a busca de patentes algo rentável economicamente para quem a obtém [16].

No entanto, para que o medicamento chegue no consumidor final, é realizado uma longa jornada de etapas exigidas pelos órgãos regulamentadores, para que possa garantir que o consumidor do medicamento está ingerindo um fármaco com segurança e qualidade. Com isso, uma série de pesquisas clínicas em moléculas biologicamente ativas, a reprodução de produção em escala industrial e, o processamento final do produto [16]. Além disso, o conhecimento do efeito terapêutico em que a molécula biologicamente ativa acomete no organismo é de suma importância para garantir o desenvolvimento de um fármaco que tenha uma ação desejada. Além do fármaco em si, outras substâncias estão presentes no produto para que possa auxiliar na chegada do princípio ativo no sítio de

absorção, essas substâncias são farmacologicamente inativas e são denominadas excipientes e participam na composição dos medicamentos [17].

Portanto, para que se desenvolva um fármaco inovador e com importância no mercado, as indústrias investem milhões ou até bilhões para que se obtenha uma conclusão satisfatória [18]. Na antiguidade os fármacos eram produzidos de extratos realizados com plantas naturais, no entanto hoje em dia a síntese orgânica de substâncias é a principal via de produção dos fármacos. A síntese artificial de substâncias facilitou que inúmeras inovações fossem realizadas, o estudo se tornou mais promissor e junto com a tecnologia, é facilmente prever o mecanismo de ação de determinada substância, a partir de algoritmos analisados em software computacional [17,19].

No entanto, ao realizar a produção sintética de tais substâncias, vários solventes orgânicos são utilizados para construir e purificar a molécula, sendo necessários várias etapas de síntese no processo produtivo. Com isso, a pureza do produto desejado está diretamente relacionado com a rota sintética utilizada, no qual o fabricante da substância tem a responsabilidade de garantir o controle das impurezas formadas no processo. Diante deste cenário, a indústria investe em soluções que minimizem as etapas reacionais e, que as impurezas formadas no processo mantenham a integridade do produto, garantindo sua qualidade, livre de substâncias que possam prejudicar a saúde dos consumidores [20,21].

3.1.2 Impurezas em medicamentos

Com a grande quantidade de solventes orgânicos utilizados no processo de síntese de um fármaco, nem todos os compostos conseguem ser eliminados totalmente, permanecendo impurezas remanescentes do processo de síntese [22]. Diante disso, estratégias de controle dessas substâncias são realizadas, visto que essas substâncias, em alguns casos, possam se tornar tóxicas ao organismo humano em concentrações acima do que é permitido.

Nesse contexto, as agências regulamentadoras de todo o mundo criam estratégias e orientações para poder lidar com os problemas causados pelas impurezas formadas. Por ser um problema de caráter mundial, o ICH (do inglês, *International Conference on Harmonization*) e o FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) desenvolvem discussões e especificações permitidas para os compostos, pensando na segurança e bem estar do consumidor. Já no Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) é a responsável por criar leis e resoluções que exigem o controle de tais substâncias, garantindo a qualidade dos produtos produzidos no mercado nacional [8,23].

O guia Q3B [8] possui em suas diretrizes que todas as impurezas, independente de sua classe, deve ser controlada, sendo que a técnica analítica utilizada para sua quantificação deve ser sensível e seletiva, conseguindo quantificar tais moléculas em níveis baixos de concentração. Com isso, é necessário o conhecimento prévio das moléculas que serão quantificadas, para optar pela melhor técnica de quantificação.

3.1.3 Impurezas orgânicas e produtos de degradação

De acordo com a RDC 53 [24], impureza “é qualquer componente presente no insumo farmacêutico ou no produto terminado que não seja o insumo farmacêutico ativo e nem o(s) excipiente(s)”.

Pode existir semelhança entre as impurezas orgânicas e os produtos de degradação, sendo que a diferença está na relação da mesma com o fármaco. A impureza orgânica é uma molécula gerada na síntese da molécula alvo que foi formada por meio das reações com os solventes orgânicos. Já os produtos de degradação são as impurezas geradas a partir da degradação do ativo, após o período de fabricação, durante o período de estocagem e armazenamento [25].

Diante disso, a indústria responsável pela fabricação dos medicamentos, precisará ter o controle das impurezas após o período de fabricação, bem como em todo o período de estabilidade do produto, dentro do que exige as legislações e resoluções do órgão regulador. Portanto, a fim de prever as possíveis impurezas formadas durante o período de estabilidade, de acordo com a RDC 53/2015 [24] o estudo de degradação forçada do ativo “permite a geração de produtos de degradação através da exposição do insumo farmacêutico ativo e produto acabado a condições de estresse, como por exemplo, luz, calor, umidade, hidrólise ácida/básica e oxidação, entre outras”.

A importância da identificação, qualificação e quantificação dos compostos relacionados, vêm crescendo cada vez mais em todo universo farmacêutico. Por isso, diversos métodos analíticos são devolvidos, para garantir a qualidade e o processo de fabricação.

3.2 Cromatografia Líquida

A cromatografia consiste na separação dos componentes de uma determinada mistura, utilizando métodos físico-químico de distribuição de componentes a partir de duas fases que estão em contato, na qual umas das fases permanece estática e a outra é fluída através da primeira, ocorrendo a separação dos componentes da mistura. A maneira em que a separação vai ocorrer depende muito da técnica cromatográfica escolhida, bem como

a composição da fase estacionária e a fase fluída, definindo o tipo de cromatografia empregada. Os mecanismos mais comuns encontrados são por adsorção, bioafinidade, exclusão, partição e troca iônica [26].

A cromatografia de adsorção, baseia-se na capacidade que algumas moléculas possuem de se unirem especificamente e de forma não covalente com outras moléculas (ligandos) situadas em uma matriz insolúvel. A cromatografia por bioafinidade, a fase estacionária é modificada através da imobilização de ligantes específicos. A mistura é aplicada em uma coluna que apresenta em seu conteúdo o ligante seletivo dos compostos que deseja separar. Diante disso, os compostos que não apresentam os ligantes que interagem com a fase estacionária da coluna, fluem pela fase móvel sem interagir com a coluna. A cromatografia por exclusão, está relacionado no tamanho das partículas que se deseja separar. A fase móvel com as substâncias desejadas para a separação, fluem em uma coluna que contém grânulos de zeólitos, apresentando uma função de “peneiras moleculares”, onde as moléculas com grandes dimensões não conseguem penetrar e eluem mais rapidamente e as moléculas com menores dimensões penetram e eluem mais tardiamente. A cromatografia por partição, baseia-se na diferença de solubilidade dos componentes da mistura onde duas fases líquidas não miscíveis entre si se relacionam. A fase estacionária geralmente é um líquido que apresenta uma substância inerte, insolúvel e hidratada, onde uma fase móvel flui sobre ela. Tal fase móvel consiste em um solvente não miscível com o líquido da fase estacionária, onde está a substância a separar. Por fim, a cromatografia de troca iônica, está baseada na diferença de comportamento ácido-base das substâncias que serão separadas. A coluna cromatográfica é preenchida por uma resina iônica e através dela flui uma fase móvel com as substâncias que se deseja separar. Se a resina for aniônica, as moléculas positivas serão retidas e as negativas serão eluídas. Por outro lado, se a resina for catiônicas, as moléculas negativas serão retidas e as positivas serão eluídas [27].

A cromatografia líquida foi definida no início do século XX pelos trabalhos do botânico russo Mikhail S. Tswett. Suas pesquisas eram baseadas na separação de pigmentos em uma coluna cromatográfica empacotada com partículas e, tais pigmentos eram extraídos das plantas mediante o uso de solventes orgânicos [27]. A cromatografia líquida está entre as principais técnicas utilizadas na separação de compostos, desde materiais biológicos, amostras pluviais, até na análise de fármacos e impurezas na indústria farmacêutica. Isso ocorre, pois a cada dia a tecnologia ligada a técnica vêm se aperfeiçoando e sua aplicação é ampla, abrangendo vários setores industriais. Este avanço levou a uma gama de possibilidades, sendo que a coluna cromatográfica apresenta sua fase estacionária sólida e os analitos são “empurrados” pela fase móvel, ocorrendo a

separação dos compostos [16,28].

A cromatografia líquida moderna necessita de uma instrumentação mais complexa e sofisticada em relação a cromatografia líquida clássica desenvolvida por Tswett. Diferente da cromatografia gasosa, em que todos os componentes dos equipamento ficam dispostos em uma “caixa fechada”, na cromatografia líquida a maioria dos equipamentos são modulares. Assim, é possível que seja realizada uma intercambialização de um módulo de um equipamento, como um detector por exemplo, por outro equivalente de uma “marca” diferente. Com isso, de acordo com a necessidade do usuário o equipamento poderá apresentar módulos de diferentes marcas e funcionará da mesma forma, apresentando certa flexibilidade em relação ao cromatógrafo gasoso.

A Figura 1 representa o esquema de um cromatógrafo à líquido com os seus módulos de operação. O solvente utilizado, chamado de eluente ou fase móvel, é acondicionado na parte superior do equipamento sendo impulsionado ou aspirado, por uma bomba de alta pressão diretamente na coluna cromatográfica. Durante este trajeto, a amostra é inserida (injetada) na fase móvel antes de chegar na coluna, por uma válvula de injeção e é arrastada, ocorrendo a separação dos compostos presentes na mesma. Após a separação, o efluente com a amostra é levado ao detector, que irá acusar e emitir um sinal com as moléculas encontradas na amostra. Este sinal do detector é avaliado e tratado em um software específico, que fará a leitura e emitirá o resultado obtido para a separação.



Figura 1: Diagrama ilustrativo dos principais módulos de um cromatógrafo líquido moderno.

Fonte: Google imagens.

O cromatógrafo à líquido é compatível com diversos detectores, como por exemplo: Índice de Refração (IR), Ultravioleta (UV), Espalhamento de Luz, Fluorescência

e outros. A união entre os detectores e o software, é capaz de quantificar diversos analitos de características completamente distintas entre si, desde concentrações elevadas de substâncias até concentrações extremamente baixas. Apesar de toda a tecnologia envolvida, esta técnica exige um grande esforço do responsável pela operação do método, visto que é necessário um estudo prévio antes de iniciar as análises em equipamento, pois o método de análise precisa quantificar e separar os ativos e nem sempre isso é possível. Com isso, na atualidade existe uma gama de colunas cromatográficas com fases estacionárias distintas entre si, abrangendo a característica para cada composto analisado. A interação ativo x fase estacionária norteia a separação dos compostos e, se dois compostos apresentam a mesma interação, uma co-eluição será visualizada. Portanto, é necessário vários testes para que se tenha um método analítico que seja capaz de quantificar de maneira seletiva e específica as substâncias desejadas [28].

3.3 Gliclazida

A gliclazida 1-(3-azabicyclo[3.3.0]oct-3-il)-3-(p-tolilsulfonil)urea (Figura 2) é um dos representantes dos fármacos denominados como sulfonilureias de segunda geração. Apresenta fórmula molecular empírica $C_{15}H_{21}N_3O_3S$, com massa molar de $323,41 \text{ g mol}^{-1}$ [29]. Conforme a descrição da Farmacopeia Britânica (2021), o fármaco é um pó branco ou quase branco, praticamente insolúvel na água, um pouco solúvel em diclorometano, moderadamente solúvel em acetona e levemente solúvel em etanol.

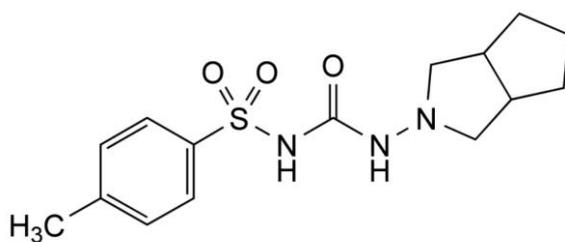


Figura 2: Estrutura molecular da Gliclazida.
Fonte: Farmacopeia Britânica 2021.

A Gliclazida pode ser encontrada comercialmente como Diamicon®. É um medicamento utilizado para pacientes que apresentam quadros clínicos de Diabetes *Mellitus* – Tipo II. O fármaco possui sítio de ação no pâncreas, e o agrupamento sulfonilureia apresenta uma alta afinidade e seletividade na ligação com os receptores presentes nas células β -pancreáticas. Além disso, é capaz de ocasionar proteção cardiovascular em relação a outros fármacos sulfoniureias, já que a mesma não apresenta ligação nos receptores de sulfoniureia no coração [31].

A estrutura molecular consiste em duas funções terminais: tolueno e 3-azabicyclo-[3,3,0]-octano, além de sua porção central e principal, referente a uma sulfonilureia. Essa função é essencial ao fármaco, sendo responsável pela interação com os sítios biológicos, além de ser mais susceptível ao processo de degradação, principalmente por hidrólise do agrupamento funcional. As sulfonilureias também são indicadas como as responsáveis pela capacidade de capturar radicais livres [32]. A Figura 3 apresenta a estrutura molecular da Gliclazida e seus respectivos grupos estruturais.

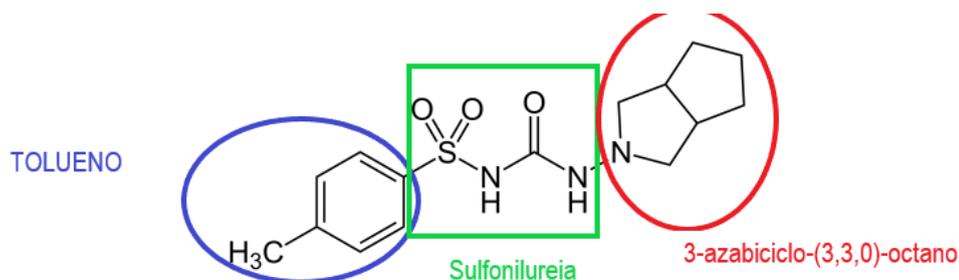


Figura 3: Grupos estruturais da Gliclazida.

Fonte: O autor, 2023.

3.4 Desenvolvimento e validação de métodos analíticos

Com o aumento da exigência para se garantir a qualidade de um método de análise que seja capaz de quantificar e identificar o princípio ativo e suas impurezas ou produtos de degradação, o desenvolvimento do método analítico quer uma avaliação detalhada, a fim de obter resultados confiáveis sobre a amostra que está sendo testada. Posteriormente, este método desenvolvido é submetido a um processo com diversos testes para confirmar sua eficácia, a validação.

Portanto, a validação do método analítico possui como principal objetivo demonstrar se o mesmo é adequado a que se pretende realizar, obtendo resultados com qualidade e confiabilidade. Com isso, busca-se ter um método capaz de gerar resultados esperados nas condições estabelecidas [33].

Órgãos reguladores nacionais e internacionais apresentam guias e resoluções que orientam as indústrias sobre como proceder com a validação de métodos. A ANVISA no Brasil é a agência reguladora que controla e avalia as documentações. Já no âmbito mundial, a Conferência Internacional em Harmonização (ICH, do inglês, *International Conference on Harmonisation*), a Associação Oficial de Químicos Analíticos (AOAC, do inglês, *Association of Official Analytical Chemists*), a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*).

Para realizar a validação do método analítico, o mesmo deverá ser aprovado em alguns parâmetros específicos, como por exemplo, precisão, exatidão, linearidade, limite

de detecção, quantificação e robustez. A precisão avalia a concordância de várias determinações para uma mesma amostra. A exatidão apresenta a concordância obtida entre o resultado experimental com o resultado teórico ou referencial. A linearidade é a resposta analítica relacionada com a concentração do analito na amostra, sendo estudada em um determinado intervalo de concentração. Neste parâmetro em específico os resultados geralmente são demonstrados a partir de gráfico e tratamentos estatísticos a fim de comprovar a aprovação dos resultados. O limite de detecção como o próprio nome já diz, corresponde a menor concentração do analito que pode ser detectada, no entanto, não necessariamente será quantificada com um valor exato. Por outro lado, o Limite de Quantificação corresponde a menor concentração do ativo que pode ser quantificada de maneira precisa, exata e linear. Como a amostra geralmente apresenta mais que um ativo (o ativo principal e suas impurezas ou produtos de degradação), é necessário que o método analítico apresente seletividade, ou seja, que o método é capaz de apresentar uma separação (resolução) entre os compostos presentes na amostra garantindo a quantificação confiável de cada composto [33].

3.5 Estudo de degradação forçada

O estudo de degradação forçada consiste em submeter ao princípio a ser testado a condições extremas de estresse por fatores químicos e físicos, a fim de prever um possível perfil de degradação, bem como os principais compostos (impurezas) formadas a partir do estudo. Os fatores químicos, são por exemplo, a exposição do ativo em hidrólise ácida e básica, a oxidação e íons metálicos. Os fatores físicos, são por exemplo, a exposição do ativo em temperaturas elevadas, condições altas de umidade e fotólise por luz UV [24].

Com este estudo, além de prever os possíveis produtos de degradação formados, o método analítico também é colocado em prova, pois se o mesmo não for seletivo, não é capaz de identificar e quantificar todos os compostos. Para garantir isso, é realizado o balanço de massa, um cálculo que relaciona o decaimento de ativo a partir da exposição de degradação, bem como o somatório das impurezas formadas. O valor ideal a ser obtido é a recuperação próxima ao 100%, no entanto mediante as variações analíticas relacionadas em todo o processo de análise, os resultados próximos também são aceitos e considerados adequados [34].

Portanto, o estudo de degradação forçada pode ser considerado o principal estudo para o desenvolvimento de um fármaco, visto que além de prever suas impurezas e como determinará a estabilidade do produto em longo prazo, ele irá avaliar se o método

de análise também é eficaz para que seja possível a quantificação e identificação dos produtos de degradação, garantindo a qualidade de avaliação do fármaco a ser produzido [34].

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 Equipamentos

Os equipamentos utilizados foram um cromatógrafo líquido UHPLC da marca *Waters* modelo H-Class e o cromatógrafo líquido da marca *Shimadzu* modelo série 20/30, ambos com detector DAD. Foram utilizados balanças analíticas, pHmetro, ultrassom, centrífuga, pipetadores automáticos e eletrônicos. Para análise e quantificação dos resultados, foi utilizado o software *Waters Empower™ 3*, e para a avaliação estatística da linearidade o *Action Stat™* como extensão do *Excel™*.

4.2 Padrões, reagentes e solventes

As análises foram realizadas nas dependências da empresa Prati-Donaduzzi, sendo utilizados todos os recursos necessários para a execução deste projeto. Os padrões utilizados foram adquiridos da farmacopeia europeia e caracterizados. Os padrões adquiridos da farmacopeia europeia são: Impureza B (CAS: 54786-86-6) e Impureza F (CAS: 1076198-18-9). Os padrões caracterizados foram: Gliclazida (CAS: 21187-98-4), Impureza A (CAS:70-55-3), Impureza C (CAS: 5577-13-9), Impureza D (CAS:113626-19-1), Impureza E (CAS:1808087-53-7) e Impureza G (CAS: não aplicável). No entanto, apenas a Impureza A e a Impureza G foram controladas, as demais impurezas foram apenas identificadas.

Como diluente foi utilizado o reagente Acetonitrila Grau HPLC da marca Merck com pureza de 100% e água purificada pelo purificador de água de laboratório *Milli-Q® Advantage A10*. Para a Fase móvel foi utilizado a Trietilamina Grau HPLC da marca Scharlau com pureza de 99,7%, o Ácido Fosfórico Grau HPLC da marca Scharlau com pureza de 85%.

Os critérios de especificação adotados na validação para desvio padrão relativo (DPR) e recuperação estão conforme preconiza o “*Guidelines for Standard Method Performance Requirements*” e o capítulo geral da USP <621 Chromatography>. Tais especificações são baseadas na concentração de ativo e na razão massa do analito pela massa da amostra, sendo que quanto menor for sua relação, mais abrangente será o critério.

As etapas iniciais teve como base o método da farmacopeia europeia para a quantificação de produtos de degradação da Gliclazida matéria-prima. No entanto, tal método não teve aplicações e o desenvolvimento local foi necessário para o produto acabado, contendo todas as aplicações e evidências que poderá se tornar viável para a

quantificação do ativo Gliclazida e seus produtos de degradação, conforme a legislação brasileira vigente RDC 166/2017 [7,35].

4.3 Desenvolvimento de método analítico

Como os primeiros testes se basearam no método analítico disponível na farmacopeia britânica, todos os parâmetros cromatográficos foram reproduzidos na íntegra. A coluna cromatográfica utilizada foi uma Phenomenex Superspher RP-8 250 milímetros (mm) de tamanho, 4,0 milímetros (mm) de diâmetro e com o tamanho de partícula de 4 micras (μm). De fase móvel, foi realizada uma mistura de Água Purificada, Acetonitrila, Trietilamina e Ácido Fluoracético na proporção de 55:45:0,1:0,1. A vazão da fase móvel foi de 0.9 mL min^{-1} .

Na sequência dos testes realizados algumas alterações foram necessárias para uma melhor adequação do método. Para isso foi utilizado o reagente Ácido Fosfórico como componente da fase móvel e a coluna cromatográfica Waters X-Bridge C18 com 250 mm de tamanho, 4.6 mm de diâmetro e 3 μm de tamanho de partícula.

A amostra utilizada foi o produto acabado com a presença de excipientes. Para que fosse feito o preparo da amostra, foram realizados os cálculos de massa média dos comprimidos, a fim de obter a pesagem correta de ativo na determinação da concentração da amostra. A concentração de trabalho é algo crucial na avaliação da amostra, visto que uma concentração baixa de amostra poderá resultar num sinal analítico baixo para as impurezas prejudicando sua quantificação.

4.4 Validação do método analítico

Após a determinação dos parâmetros cromatográficos bem como a concentração de trabalho, o método analítico foi submetido a validação dos parâmetros cromatográficos de acordo com a legislação brasileira vigente (RDC 166/2017).

Nas Tabelas 2 e 3 estão apresentadas as condições do sistema cromatográfico e as alterações do gradiente durante a corrida cromatográfica.

Tabela 2: Sistema cromatográfico.

Condições cromatográficas		
Soluções de Limpeza:	Coluna: Acetonitrila 10% Injetor: Acetonitrila 70%	
Vazão:	1,0 mL/min	
Volume de Injeção:	5 µL	
Coluna:	Waters X-Bridge C18 250 mm x 4.6 mm x 5 µm	
Temperatura do forno da coluna:	30°C	
Temperatura do amostrador:	5°C	
Detector	Tipo: UV/Vis Comp. de Onda: 235 nm	Freq. de Aquisição: 1-2 Hz Slit Width: 8 nm e 1,2 nm (Seletividade e Robustez)
Tempo de Retenção:	Gliclazida: Aprox.34 minutos	
Tempo de corrida:	50 minutos	

Tabela 3: Gradiente.

Tempo (min)	Trietilamina 0,1% pH 3,8 (%)	Acetonitrila (%)
0	70	30
6	70	30
39	60	40
40	70	30
50	70	30

A partir do sistema cromatográfico cada parâmetro foi validado utilizando as condições cromatográficas indicadas acima e suas avaliações individuais, seguindo a especificação individual para cada um. No Apêndice II estão disponíveis as informações para o preparo das soluções de adequação do sistema, bem como informações sobre o preparo das amostras de todos os parâmetros validados.

4.4.1 Linearidade Doseamento e de Impurezas

A Linearidade foi avaliada por meio da análise da curva analítica com cinco níveis e três réplicas em cada nível compreendendo o intervalo de 70% a 130% da concentração nominal de Gliclazida ($600 \mu\text{g mL}^{-1}$) na Solução Teste Doseamento/SR, abrangendo o intervalo de concentração de 420 a $780 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ativo para o doseamento.

Para as impurezas inespecíficas e específicas a linearidade foi avaliada por meio da análise da curva analítica com cinco níveis e três réplicas de cada nível compreendendo o intervalo de quantificação 0,10% ($0,6 \mu\text{g mL}^{-1}$) a 1,20% ($7,2 \mu\text{g mL}^{-1}$) da concentração nominal do ativo na Solução Teste Doseamento/SR, abrangendo todo o intervalo para as impurezas inespecíficas e específicas controladas.

Foi avaliado visualmente se os dados obtidos apresentam uma relação linear

aparente. Após isso, com o auxílio do Software Action Stat™ foi realizada a regressão linear da curva analítica por meio do método por mínimos quadrados ordinários e avaliado o coeficiente angular da reta, coeficiente linear da reta e o coeficiente de correlação (R) e de determinação (R²). Foi realizada a análise de variância para a regressão linear (ANOVA) com nível de significância de 5%. O teste de igualdade de variâncias também foi realizado (Teste de Breusch Pagan) com nível de significância de 5%. Por fim, os valores aberrantes foram avaliados por meio da análise de resíduos padronizados e t-student, para que a linearidade se considere aprovada o coeficiente de correlação (R) deve ser maior que 0,990, na análise de variância (ANOVA) o coeficiente angular da reta deve ser significativamente diferente de zero e o intercepto não deve ser significativamente de zero e, caso encontre resultado diferente, deverá ser justificado tal interferência. No Teste de Breusch Pagan deve indicar homogeneidade entre as variâncias dos diversos níveis da linearidade (homocedasticidade). Já os resíduos precisam apresentar distribuição normal e não deve haver nenhum valor extremo na resposta (resíduos padronizados e t-student devem estar dentro do intervalo de ± 3). Já para a independência das observações, a hipótese não deve ser rejeitada.

4.4.2 Fator Resposta Relativo do Ativo x Impurezas Controladas

A partir do coeficiente angular obtido no parâmetro de Linearidade para o ativo Gliclazida e suas impurezas específicas (Impureza A e G), deve ser avaliado a resposta relativa para a aplicação no cálculo da exatidão no parâmetro adequado. A fórmula para que tal cálculo seja realizado pode ser visualizada na Figura 4.

$$\text{Resposta relativa Impureza A} = \frac{\text{Coef angular da Gliclazida}}{\text{Coef angular de Impureza A}}$$

$$\text{Resposta relativa Impureza G} = \frac{\text{Coef angular da Gliclazida}}{\text{Coef angular de Impureza G}}$$

Figura 4: Cálculo da resposta relativa de cada impureza específica controlada.

Fonte: o Autor.

4.4.3 Precisão Doseamento e de Impurezas

A precisão do método foi avaliada em dois níveis: Repetibilidade e Precisão Intermediária. *Repetibilidade Doseamento:* Foi verificado por meio de seis determinações no nível 100% em relação a concentração nominal da Solução Teste Doseamento/SR

preparadas conforme o método analítico. De acordo com o *appendix f* da AOAC (Association of Official Analytical Chemists), por apresentar 16,67% de ativo na formulação do produto acabado de Gliclazida (a massa média do comprimido é de 360 mg e a dosagem de ativo é de 60 mg), o critério de aceitação para a repetibilidade é de 1,9% de Desvio Padrão Relativo (DPR).

Precisão Intermediária Doseamento: foi avaliada a partir de doze determinações no nível 100% em relação a concentração nominal da Solução Teste Doseamento/SR preparadas conforme método analítico (seis amostras de repetibilidade 1 e seis amostras de repetibilidade 2, preparada em dias diferentes com pessoas diferentes). De acordo com o *appendix f* da AOAC (Association of Official Analytical Chemists), por apresentar 16,67% de ativo na formulação do produto acabado de Gliclazida ((a massa média do comprimido é de 360 mg e a dosagem de ativo é de 60 mg), o critério de aceitação para a repetibilidade é de 3% de Desvio Padrão Relativo (DPR).

Repetibilidade Impurezas Inespecíficas: foi avaliado por meio de nove determinações contemplando os níveis baixo, médio e alto em triplicata, compreendendo o intervalo do limite de desconsideração (quantificação) a 120% da especificação limite da impureza. Para as impurezas inespecíficas foram avaliados os níveis de 0,10%; 0,17% e 0,24%. De acordo com o *appendix f* da AOAC (Association of Official Analytical Chemists), por apresentar 0,017% de ativo na formulação do produto acabado de Gliclazida, o critério de aceitação para a repetibilidade é de 5,3% de Desvio Padrão Relativo (DPR).

Precisão Intermediária Impurezas Inespecíficas: foi avaliada a partir de dezoito determinações de cada nível baixo, médio e alto (três amostras de repetibilidade 1 e três amostras de repetibilidade 2 para cada nível, preparadas em dias diferentes com pessoas diferentes). De acordo com o *appendix f* da AOAC (Association of Official Analytical Chemists), por apresentar 0,017% de ativo na formulação do produto acabado de Gliclazida, o critério de aceitação para a precisão intermediária é de 8% de Desvio Padrão Relativo (DPR).

Repetibilidade Impurezas Específicas: foi avaliado por meio de nove determinações contemplando os níveis baixo, médio e alto em triplicata, compreendendo o intervalo do limite de desconsideração (quantificação) a 120% da especificação limite da impureza. Para a Impureza A foram avaliados os níveis de 0,10%; 0,65% e 1,20%. Para a Impureza G será avaliado os níveis de 0,10%; 0,17% e 0,24%. De acordo com o *appendix f* da AOAC (Association of Official Analytical Chemists), a Impureza G por apresentar 0,017%, 0,028% e 0,040% nos pontos baixo, médio e alto de ativo na formulação do produto acabado de Gliclazida, o critério de aceitação para a repetibilidade é de 5,3% de Desvio Padrão Relativo (DPR). Já a Impureza A por apresentar 0,017% no ponto baixo, apresenta o critério

de aceitação de 5,3% e, 0,108% e 0,200% nos pontos médio e alto de ativo na formulação do produto acabado de Gliclazida, o critério de aceitação para a repetibilidade é de 3,7% de Desvio Padrão Relativo (DPR).

Precisão Intermediária Impurezas Específicas: foi avaliada a partir de dezoito determinações de cada nível baixo, médio e alto (três amostras de repetibilidade 1 e três amostras de repetibilidade 2 para cada nível, preparadas em dias diferentes com pessoas diferentes). De acordo com o *appendix f* da AOAC (Association of Official Analytical Chemists), a Impureza G por apresentar 0,017%, 0,028% e 0,040% nos pontos baixo, médio e alto de ativo na formulação do produto acabado de Gliclazida, o critério de aceitação para a repetibilidade é de 8% de Desvio Padrão Relativo (DPR). Já a Impureza A por apresentar 0,017% no ponto baixo, apresenta o critério de aceitação de 5,3% e, 0,108% e 0,200% nos pontos médio e alto de ativo na formulação do produto acabado de Gliclazida, o critério de aceitação para a repetibilidade é de 6% de Desvio Padrão Relativo (DPR).

4.4.4 Exatidão Doseamento e Impurezas

A Exatidão do método analítico foi verificada por meio de nove determinações contemplando o nível baixo, médio e alto (70%, 100% e 130%), compreendendo o intervalo do método analítico para o ensaio de doseamento. Foi necessário calcular a recuperação obtida em cada determinação, realizando a razão do teor obtido pelo teórico e de acordo com o *appendix f* da AOAC (Association of Official Analytical Chemists), por apresentar 12,2% de ativo na formulação para a concentração de 70%, 17,4% de ativo para a concentração de 100% e 22,7% de ativo para a concentração de 130% no produto acabado de Gliclazida, o critério de aceitação para a recuperação é de 98% - 102%.

Para as impurezas inespecíficas, foi verificado a partir de nove determinações contemplando o nível baixo, médio e alto (0,10%, 0,17% e 0,24%), compreendendo o intervalo de limite de quantificação a 120% da especificação da impureza. De acordo com o *appendix f* da AOAC (Association of Official Analytical Chemists), por apresentar 0,017%% de ativo na formulação para a concentração de 0,10%, 0,030% de ativo para a concentração de 0,17%% e 0,042% de ativo para a concentração de 0,24% no produto acabado de Gliclazida, o critério de aceitação para a recuperação é de 90% - 107%.

Para as impurezas específicas, foram verificadas a partir de nove determinações contemplando o nível baixo, médio e alto (0,10%, 0,17% e 0,24% para a Impureza G e 0,10%, 0,65% e 1,2% para a Impureza A), compreendendo o intervalo de limite de quantificação a 120% da especificação das impurezas. De acordo com o *appendix f* da AOAC (Association of Official Analytical Chemists), a Impureza G por apresentar 0,017%,

0,028% e 0,040% nos pontos baixo, médio e alto de ativo na formulação do produto acabado de Gliclazida, o critério de aceitação para a recuperação é de 90% - 107%. Já a Impureza A por apresentar 0,017% no ponto baixo, apresenta o critério de aceitação de 90% - 107% e, 0,108% e 0,200% nos pontos médio e alto de ativo na formulação do produto acabado de Gliclazida, o critério de aceitação para a recuperação é de 95% - 105%.

4.4.5 Limite de Quantificação

O Limite de Quantificação é a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser quantificada com confiabilidade. No caso de métodos instrumentais, a estimativa do limite de quantificação pode ser feita levando em consideração a relação sinal/ruído 10:1. Este estudo será realizado experimentalmente, de acordo com o menor nível utilizado nas análises de precisão/exatidão das impurezas específicas e inespecíficas. Com isso, para que este parâmetro seja aprovado, as amostras no limite de quantificação deverão apresentar relação sinal/ruído superior a 10.

4.4.6 Faixa de Trabalho

Para Doseamento, a faixa de trabalho será estabelecida por meio da confirmação de que o método apresenta linearidade, precisão e exatidão adequados dentro da faixa de 420 a 780 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Gliclazida, o que corresponde ao intervalo de 70 a 120% da concentração nominal de ativo de 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Para as impurezas específicas e inespecíficas, a faixa de trabalho para o método analítico será estabelecida pela confirmação de que o método apresente linearidade, precisão e exatidão adequados dentro da faixa de 0,60 a 1,44 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para as impurezas inespecíficas e Impureza G, correspondendo o intervalo de 0,10 a 0,24% da concentração nominal de ativo de 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$. No entanto, para a Impureza A, será necessário estabelecer na faixa de 0,60 a 7,20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, correspondendo o intervalo de 0,10 a 1,20% da concentração nominal de ativo.

4.4.7 Robustez

A Robustez do método será avaliada comparando o teor da Solução Teste Doseamento, Solução Teste Inespecífica Média e Solução Teste Específica Média utilizada para o ensaio de precisão/exatidão, quantificada no método original e sendo comparada com as alterações propostas. As alterações testadas serão as seguintes: Variação no lote de coluna; variação na vazão da fase móvel, variação na temperatura do forno da coluna,

alteração no pH do preparo da Solução A, variação na composição da fase móvel, alteração no tempo de extração das amostras e variação na membrana de filtração das amostras.

4.4.8 Seletividade e estudo de degradação forçada

A Seletividade do método foi avaliada por meio da comprovação que os picos quantificados no cromatograma da Solução Teste de fato se referem aos analitos de interesse mediante comparação dos tempos de retenção destes picos com seus respectivos picos obtidos na Solução Padrão preparadas com substância química de referência e/ou caracterizada. Também, foi realizado a comprovação de que nenhum pico de produto de degradação coelua com o pico da Gliclazida na Solução Teste por meio da análise e amostras do produto acabado e placebo submetidos à degradação forçada nas condições ácidas, básicas, oxidativas, metálicas, térmicas, fotolíticas e úmidas, com avaliação de pureza espectral para comprovação de tal fato.

As amostras serão submetidas ao estresse forçado serão analisados até o decaimento mínimo de 5% de teor do princípio ativo, idealmente sem ocorrer geração de produtos de degradação secundários. Caso não ocorra degradação após 10 dias de exposição, 2 ciclos de fotoestabilidade e/ou 24 horas em exposição aos íons metálicos, o ativo será considerado estável para a condição testada.

Diante disso, o estudo de degradação forçada foi realizado de acordo com os tempos de degradação e concentração de cada estressante indicado na Tabela 4.

Tabela 4: Condições de estresse e tempo de exposição do ativo.

Amostra	Condição de estresse	Tempo de exposição
Controle	-	-
Controle Água Purificada	-	10 dias
Estresse ácido	HCl 0,1 N	2 horas
Estresse alcalino	NaOH 1 N	10 dias
Estresse oxidativo	H ₂ O ₂ 1,5 %	10 dias
Estresse íons metálicos	FeCl ₃ 10 Mm	6 horas
Estresse fotolítico	1,2 milhões lux/h	Tempo suficiente para 2 ciclos
Estresse térmico	60 °C	10 dias
Estresse úmido	40 °C e 75% UR	10 dias

Portanto, estes são os parâmetros avaliados para que se tenha certeza que o

método analítico proposto apresenta confiabilidade e integridade para avaliar e quantificar o ativo Gliclazida bem como suas impurezas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento do método analítico

O desenvolvimento de métodos analíticos para o controle do doseamento do ativo bem como seus produtos de degradação inicia-se com o estudo prévio de métodos analíticos disponibilizados na farmacopeia e o estudo sobre a molécula que será analisada e suas impurezas. Após este estudo prévio, dever-se-á avaliar quais os possíveis produtos de degradação que poderão ser formados durante o estudo de estabilidade para que sejam controlados de maneira específica no método analítico. Posteriormente, é definido o sistema cromatográfico, avaliando a fase móvel utilizada bem como o gradiente e a coluna cromatográfica utilizada.

O desenvolvimento do método analítico iniciou com base nas características moleculares do ativo, com o levantamento bibliográfico realizado. A Farmacopeia Europeia 10th edition apresenta a monografia para a análise da matéria-prima, com isso os testes preliminares terá como base este método analítico.

Com o estudo da molécula e possíveis rotas de degradação, Bansal e seus colaboradores (2008) relataram que a Gliclazida apresenta grande suscetibilidade a hidrólise. Diante disso, a fim de assegurar uma estabilidade de solução na análise, optou-se por adicionar ao método analítico o controle de temperatura no amostrador de 5°C, deixando os vials com os padrões e amostras em uma condição resfriada, reduzindo a cinética de degradação por causa da baixa temperatura. Um fato determinante, é que o método analítico disponível no compêndio europeu, ele apresenta apenas a quantificação das substâncias relacionadas ao ativo e, o doseamento é por outra técnica analítica, a titulação potenciométrica.

5.1.1 Teste 01

Primeiramente foi avaliado a capacidade do método em reproduzir uma análise de doseamento, com isso foi realizado o preparo da fase móvel, que consiste em uma mistura de água purificada, acetonitrila, trietilamina e ácido trifluoroacético na proporção de 55:45:0,1:0,1 (v/v). Da mesma forma, foi realizado o preparo do diluente, sendo uma mistura de água purificada e acetonitrila na proporção de 55:45 (v/v). A coluna cromatográfica utilizada para tal teste, foi uma Phenomenex Superspher RP-8 com 250 mm de tamanho, 4,0 mm de diâmetro e 4 µm de tamanho de partícula. A vazão da fase móvel foi de 0,9 mL/min e o tempo de análise foi de 20 minutos. O comprimento de onda escolhido para

análise foi de 235 nm. Foi realizado o preparo de um padrão caracterizado e duas amostras de produto acabado, extraída com o diluente em um banho ultrassônico por 10 minutos. A concentração final de amostra foi de 60 µg/mL tanto para o padrão quanto para as amostras.

Para a análise e quantificação das amostras, foi utilizado o cromatógrafo líquido Waters, modelo H-Class devidamente qualificado. A fim de garantir a adequação do sistema, foi realizado cinco injeções do padrão a fim de avaliar a repetibilidade do equipamento em conseguir fornecer o mesmo resultado, confirmando sua calibração.

Conforme o capítulo geral da Farmacopeia Americana, a mesma indica que para a análise de doseamento de um insumo farmacêutico, é indicado a realização de cinco injeções e o DPR obtido para tal adequação, não deve ser maior que 2%. Outro critério importante avaliado na análise foi o fator de simetria do pico referente ao ativo, pois picos com deformações podem apresentar resultados não confiáveis e uma seletividade não eficaz e, conforme o capítulo geral do compêndio oficial americano, o fator de simetria também conhecido como fator de cauda ou “tailing” em inglês, deverá apresentar valores entre 0,8 e 2,0. Além disso, a eficiência da coluna cromatográfica também foi avaliada, verificando se a mesma apresenta uma boa interação com o ativo, apresentando especificação de no mínimo 2000 pratos teóricos, unidade utilizada para avaliar tal eficiência. Tal especificação também é encontrada no capítulo geral da farmacopeia americana [36].

A partir dos critérios mencionados e com o auxílio do software Empower para a quantificação, a Figura 5 apresenta o perfil cromatográfico e os resultados obtidos para análise da solução padrão.

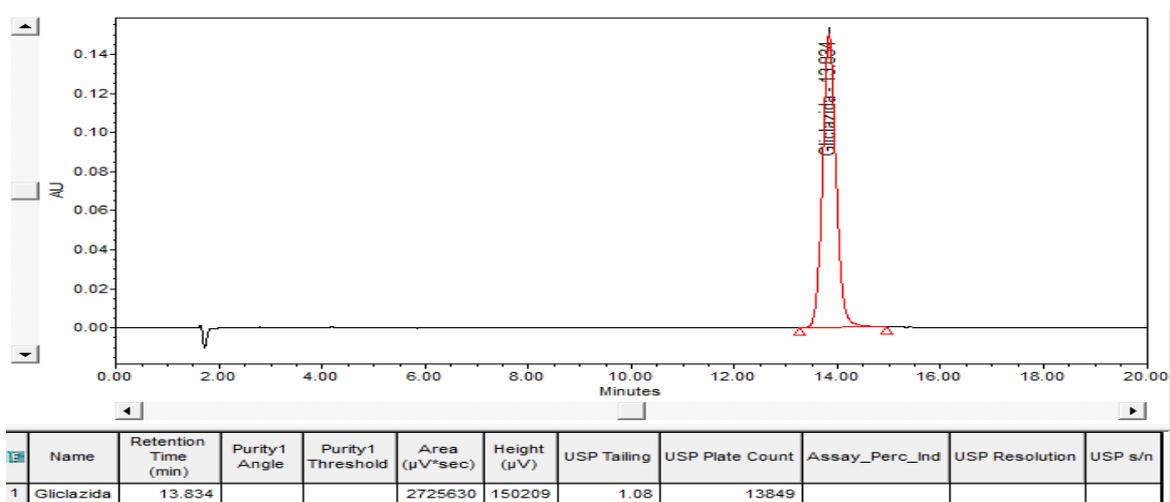


Figura 5: Cromatograma obtido na análise da Solução Padrão Doseamento, com os dados de tempo de retenção, área, altura do pico, fator de causa e pratos teóricos.

Conforme observado no Figura 5, nota-se que o pico de Gliclazida apresentou o tempo de retenção em 13,8 minutos, o fator de cauda (USP Tailing) ficou em 1,08 e o número de pratos teóricos foi de 13849, apresentando uma boa interação com a coluna cromatográfica. Todos os critérios apresentaram resultados positivos e aceitáveis.

Prosseguindo com a avaliação, o Quadro 1 apresenta a resposta obtida nas cinco injeções da solução padrão, a fim de determinar o DPR para garantir a adequação do sistema.

	Level	Response
1	Level 1	2725630
2	Level 1	2725037
3	Level 1	2724546
4	Level 1	2723852
5	Level 1	2720919

Quadro 1: Área obtida nas 05 injeções da Solução Padrão Doseamento.

As áreas obtidas nas reinjeções ficaram próximas entre si, apresentaram uma média de 2723997 e o DPR apresentou o valor de 0,07%, mostrando que o sistema está apto para a quantificação da amostra. Diante disso, a Figura 6 e Figura 7 apresentam o perfil cromatográfico obtido para a amostra, verificando se o ativo apresenta a mesma retenção que o padrão (Figura 5) e também se o teor obtido apresenta resultado satisfatório.

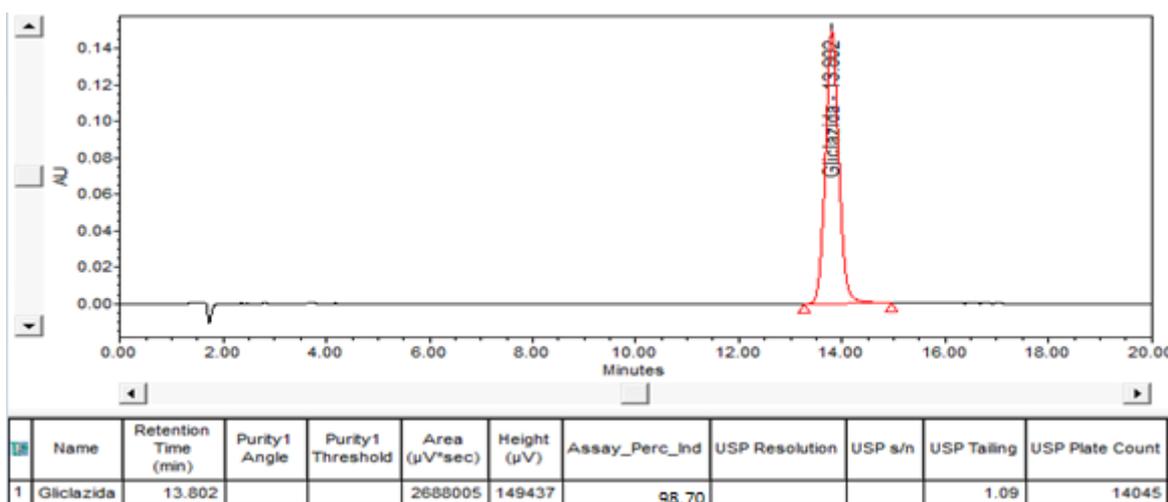


Figura 6: Cromatograma obtido para a Solução Amostra Doseamento 01, com os dados de tempo de retenção, área, altura do pico, fator de causa e pratos teóricos.

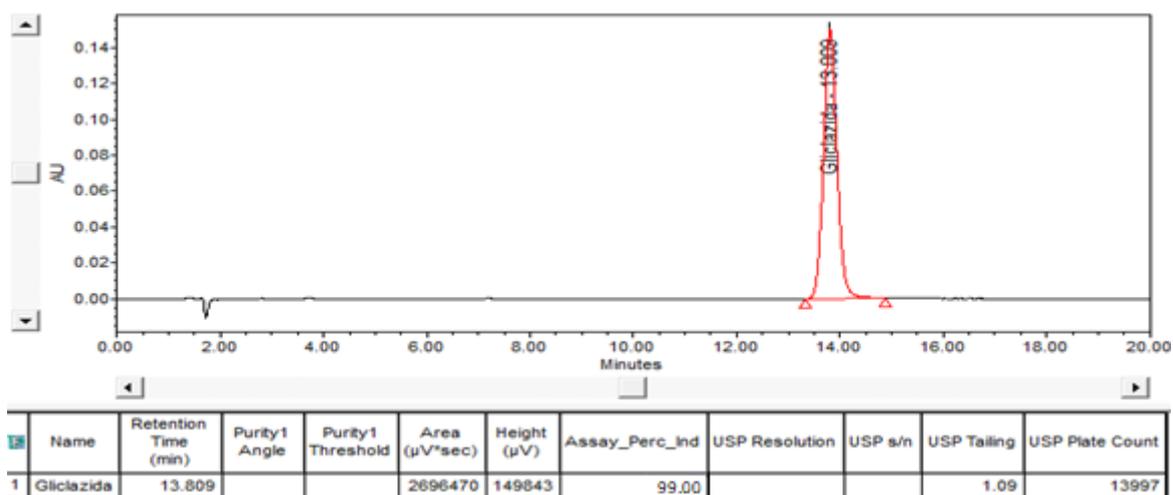


Figura 7: Cromatograma obtido para a Solução Amostra Doseamento 02, com os dados de tempo de retenção, área, altura do pico, fator de causa e pratos teóricos.

Com os resultados demonstrados nas Figuras 6 e 7, nota-se que o pico de Gliclazida apresentou o mesmo tempo de retenção em relação a Solução Padrão e os teores obtidos apresentaram resultados próximos entre si e também com teores próximos a 100%, mostrando que o diluente utilizado na extração da amostra é apto para uma extração total da amostra. Portanto, com os resultados obtidos para o teste inicial, mostrou que o método farmacopeico para a análise de substâncias relacionadas na matéria-prima apresenta aplicabilidade na análise de doseamento no produto acabado, prosseguindo com testes na metodologia.

5.1.2 Teste 02

Após avaliar se o método analítico era capaz de quantificar o doseamento do ativo, a análise com as substâncias realizadas foi realizada, a fim de verificar a separação das impurezas conhecidas da farmacopeia europeia. Uma alteração foi realizada em relação ao diluente, as amostras foram solubilizadas em acetonitrila submetidas a banho ultrassônico por 10 minutos. As condições cromatográficas, bem como a fase móvel se mantiveram as mesmas do teste 01 demonstrado anteriormente. As concentrações das amostras de doseamento se mantiveram as mesmas, já para avaliação das substâncias relacionadas e produtos de degradação o padrão apresentou a concentração de $1,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ e uma solução para avaliar a sensibilidade do sistema, com a concentração de $0,6 \mu\text{g mL}^{-1}$. Já a amostra utilizada para avaliar as impurezas presentes no produto, possui uma concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, para que seja possível a incidência e detecção dos compostos no método analítico.

A avaliação da adequação do sistema teve algumas alterações em relação ao

teste anterior. A solução sensibilidade preparada tem o intuito de verificar se o sistema cromatográfico é passível de quantificar impurezas que apresentem teor no limite de quantificação, a partir da avaliação da relação sinal/ruído. Além disso, o Padrão SR foi submetido a seis reinjeções, a fim de avaliar se o resultado foi o mesmo para esta solução. As especificações novamente estão de acordo com o capítulo geral da farmacopeia americana e o sistema se tornará apto se a relação sinal/ruído na solução sensibilidade apresente resultado igual ou superior a 10 e o DPR das injeções da solução Padrão SR apresente resultado menor ou igual a 5%.

A Figura 8 está representado o cromatograma da solução sensibilidade, onde seu perfil cromatográfico, bem como o valor obtido para a relação sinal/ruído.

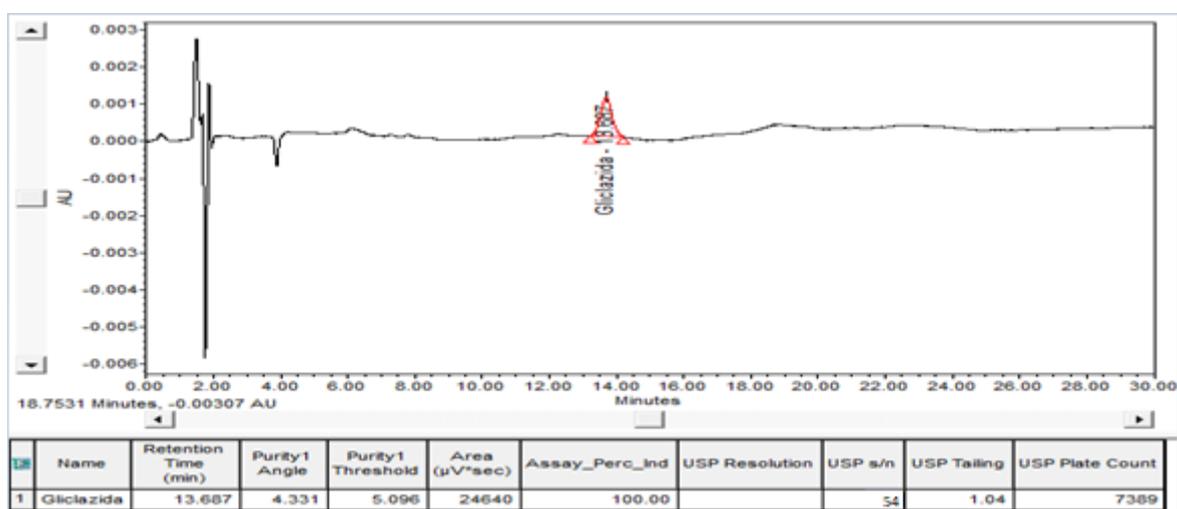


Figura 8: Cromatograma obtido para a análise da Solução Sensibilidade.

Diante do resultado exposto, nota-se que a retenção do ativo se manteve a mesma em relação ao teste anterior. Já a relação sinal/ruído apresentou um valor elevado de 54, mostrando que o método analítico é capaz de quantificar as impurezas na concentração do limite de quantificação. Também, é possível visualizar que o fator de cauda e os números de pratos teóricos se mantiverem dentro das especificações discutidas no teste. Na Figura 9 o perfil cromatográfico obtido na análise da Solução Padrão SR, avaliando o perfil cromatográfico.

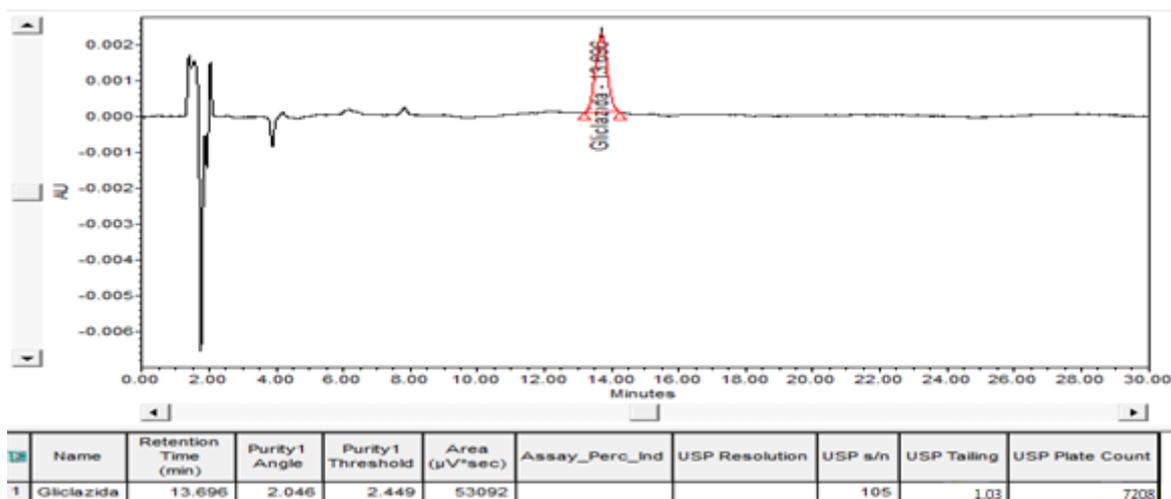


Figura 9: Cromatograma obtido para a análise da Solução Padrão SR.

Com o cromatograma demonstrado, nota-se que o pico de Gliclazida manteve seu tempo de retenção, mostrando uma precisão em atender o critério de retenção do ativo. Também, apresentou fator de cauda e pratos teóricos acima da especificação exigida, garantindo a adequação do sistema. A última avaliação realizada antes de verificar o perfil cromatográfico das amostras, foi o valor obtido para DPR das seis injeções da Solução Padrão SR. Com isso, o Quadro 2 apresenta a resposta obtida em área do pico em cada injeção.

	Level	Response
1	Level 1	52425
2	Level 1	53092
3	Level 1	53333
4	Level 1	54085
5	Level 1	53308
6	Level 1	53119

Quadro 2: Áreas obtidas nas seis injeções da Solução Padrão SR.

As áreas obtidas nas reinjeções ficaram próximas entre si, apresentaram uma média de 53227 e o DPR apresentou o valor de 1,0%, mostrando que o sistema está apto para a quantificação da amostra. Diante disso, a Figura 10 apresenta o perfil cromatográfico obtido para a amostra SR, verificando se o ativo apresenta a mesma retenção que o padrão e também se a amostra apresenta alguma impureza.

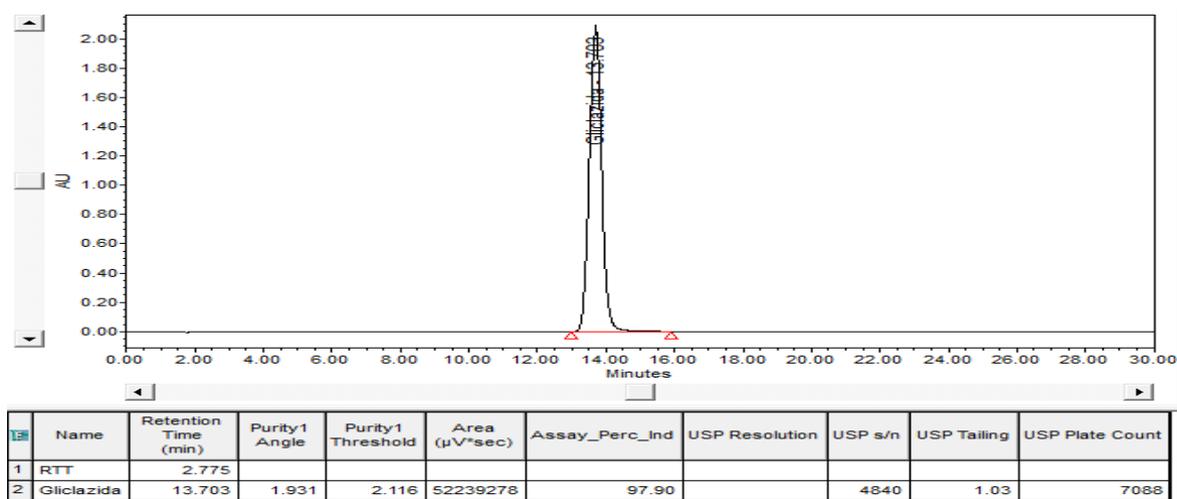


Figura 10: Cromatograma obtido para a análise da Solução Amostra SR.

De acordo com o observado, novamente a Gliclazida apresentou sua retenção próxima a 13,7 minutos e não foi observado nenhum interferente próximo, mostrando que a amostra está livre de impurezas e, que a alteração realizada no diluente, juntamente com a temperatura do amostrador controlada em 5°C, promoveu uma estabilidade para amostra, sendo possível uma quantificação correta da amostra.

Apesar dos resultados positivos encontrados nos testes, um problema foi visualizado ao longo das injeções dos testes. Foi observado que a coluna cromatográfica apresentou perda de eficiência, alterando o formato do pico e perdendo seletividade. Um motivo para que tal efeito esteja sendo observado, seria o pH da Fase Móvel, por apresentar ácido trifluoracético na solução, o mesmo por ser um ácido forte que se dissocia facilmente em água, reduz o pH da Fase Móvel para valores abaixo de 3 e de acordo com o manual da coluna cromatográfica fornecido pela empresa Phenomenex, a mesma suporta pH até 3, mostrando que o problema da perda de eficiência realmente esteja ligada a Fase Móvel.

Diante do resultado discutido, a reprodução do método farmacopeico para a rotina laboratorial não se tornou eficaz, sendo necessário um desenvolvimento de método alterando as condições cromatográficas, como a coluna cromatográfica, fase móvel e gradiente, bem como o diluente da amostra.

5.1.3 Teste 03

Após entender as características do analito, bem como suas impurezas, verificou-se que a melhor maneira de conseguir a separação dos compostos seria a criação de um sistema gradiente, diferente do que encontrado no método farmacopeico. Este sistema gradiente alternando a proporção de orgânico e aquoso facilita com que compostos que apresentem estruturas semelhantes entre si consigam ser separadas e quantificadas.

Conforme Chemicalize, a Gliclazida apresenta um pKa de aproximadamente 4,07, ou seja, em pH ácidos abaixo de 3,5 são encontradas as espécies não ionizadas do ativo. Para a cromatografia em Fase Reversa, utilizando coluna cromatográfica C18, aconselha-se utilizar a forma não ionizável da molécula, garantindo uma interação com a coluna e separação dos compostos. Diante disso, o teste inicial utilizou uma coluna Waters Xbridge C18, com 250 mm de comprimento, 4,6 mm diâmetro e tamanho de partícula 3,5 µm. Conforme Guia da Agilent para separação cromatográfica, quanto menor o tamanho de partícula, maior é a interação dos ativos com a coluna e conseqüentemente melhor a separação de compostos. A Fase Móvel determinada basea-se em uma solução de 0,1% de Trietilamina em água purificada, com o ajuste de pH para 3,8 com ácido fosfórico. O diluente se manteve do teste anterior, onde a acetonitrila apresentou uma solubilização eficaz do ativo.

Um gradiente foi elaborado a fim de avaliar o comportamento dos ativos com a variação. O teste baseou em um início da análise com uma proporção maior de aquoso e posteriormente o gradiente foi alterado para uma proporção igual de aquoso e orgânico. O gradiente com as alterações é observado na Tabela 5.

Tabela 5: Gradiente de proporção de Fase Móvel do Teste 03

Tempo (min)	Solução A (%)	Acetonitrila (%)
0	75	25
24	50	50
32	50	50
34	75	25
40	75	25

O detector utilizado para a análise é o UV-Vis, utilizando uma ampla faixa de comprimentos de onda, a fim de determinar o melhor comprimento de onda para a avaliação da Gliclazida e seus produtos de degradação. A faixa utilizada foi a de 190 – 400 nm. A vazão da fase móvel determinada foi a de 1,0 mL min⁻¹. Para a avaliação das impurezas, bem como o ativo Gliclazida foram utilizados padrões caracterizados e solubilizados com solução diluente. Cada impureza foi preparada individualmente na concentração final de 2,4 µg mL⁻¹ e posteriormente uma amostra de produto na concentração de 1200 µg mL⁻¹, com contaminação de cada impureza, a fim de avaliar a separação de cada composto e do ativo na mesma análise cromatográfica. Da mesma forma, uma amostra apenas com as impurezas sem o ativo foi preparada para avaliar a separação entre elas sem a interferência do produto com o ativo principal e seus excipientes. Uma solução diluente também foi analisada, com o intuito de identificar possíveis picos oriundos do diluente, para que os mesmos não sejam confundidos com impureza.

Diante disso as Figuras 13 a 20 apresenta os cromatogramas obtidos para a análise da Solução Diluente, Padrão Impureza A (Figura 12), Padrão Impureza B (Figura 13), Padrão Impureza C (Figura 14), Padrão Impureza D (Figura 15), Padrão Impureza E (Figura 16), Padrão Impureza F (Figura 17), Padrão Impureza G (Figura 18), respectivamente.

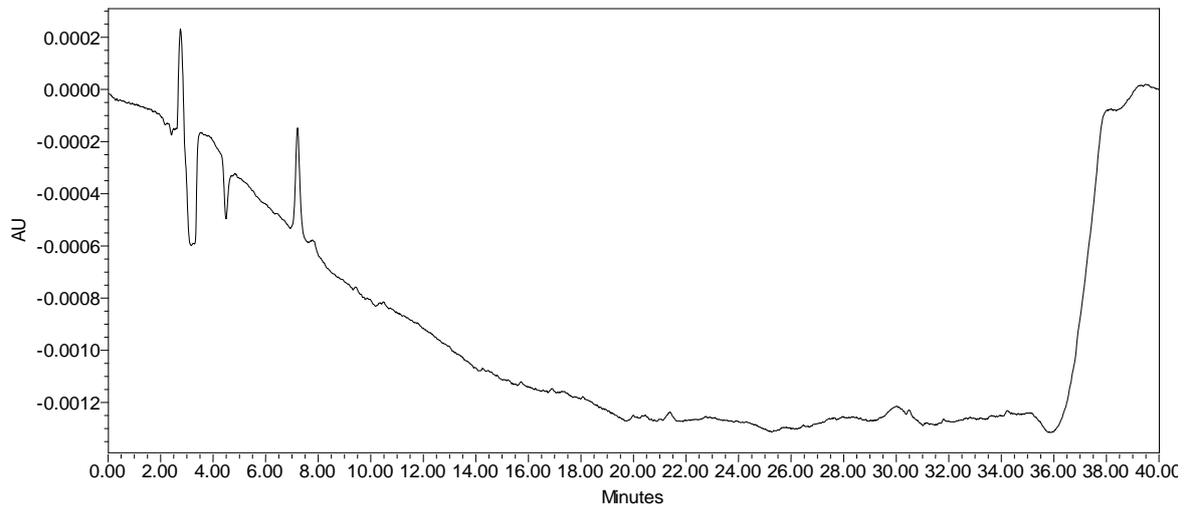


Figura 11: Cromatograma obtido da Solução Branco Diluente.

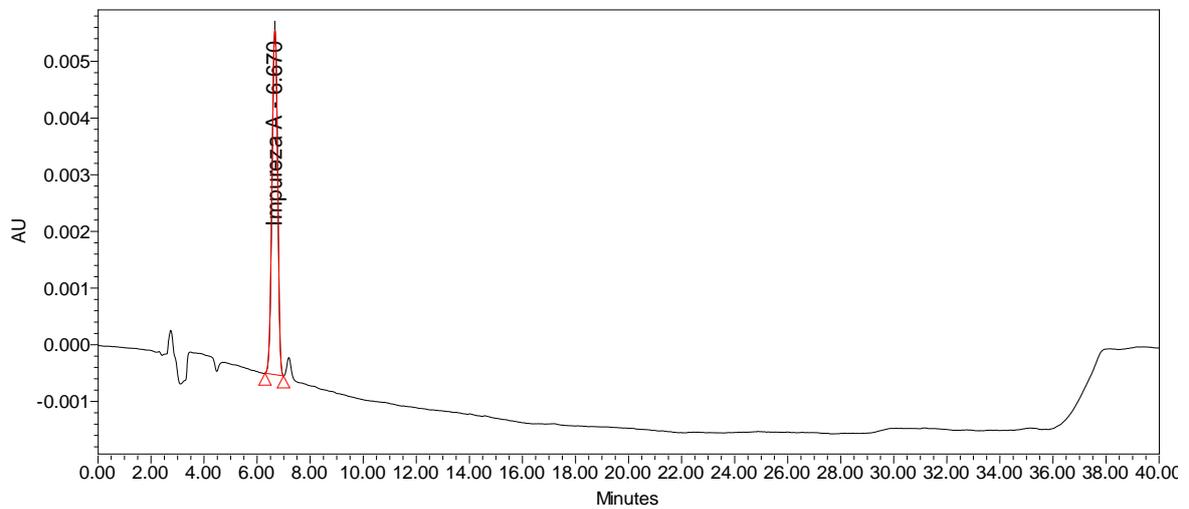


Figura 12: Cromatograma obtido na análise da Solução Padrão Impureza A.

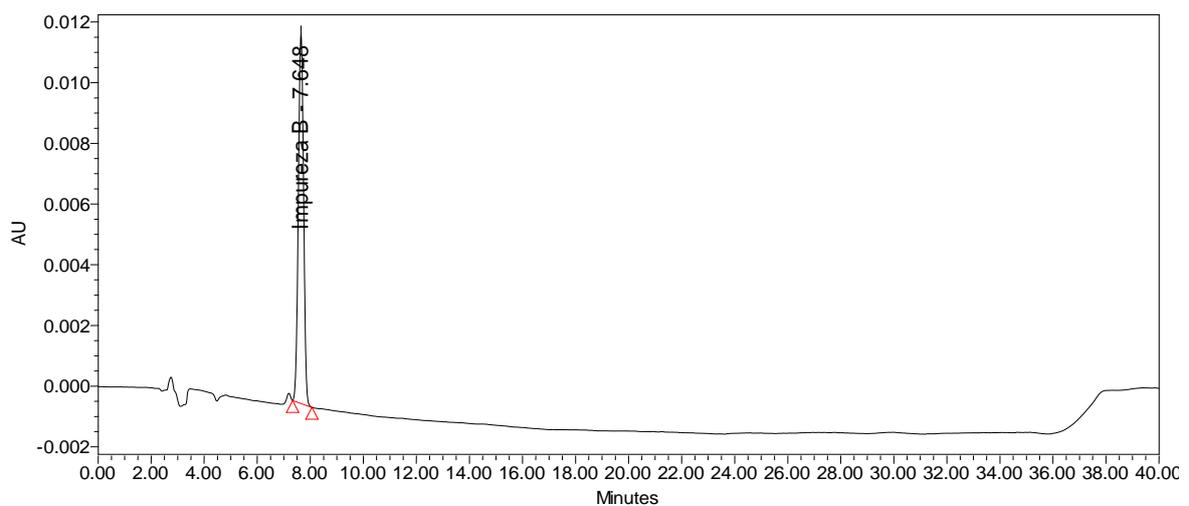


Figura 13: Cromatograma obtido na análise da Solução Padrão Impureza B.

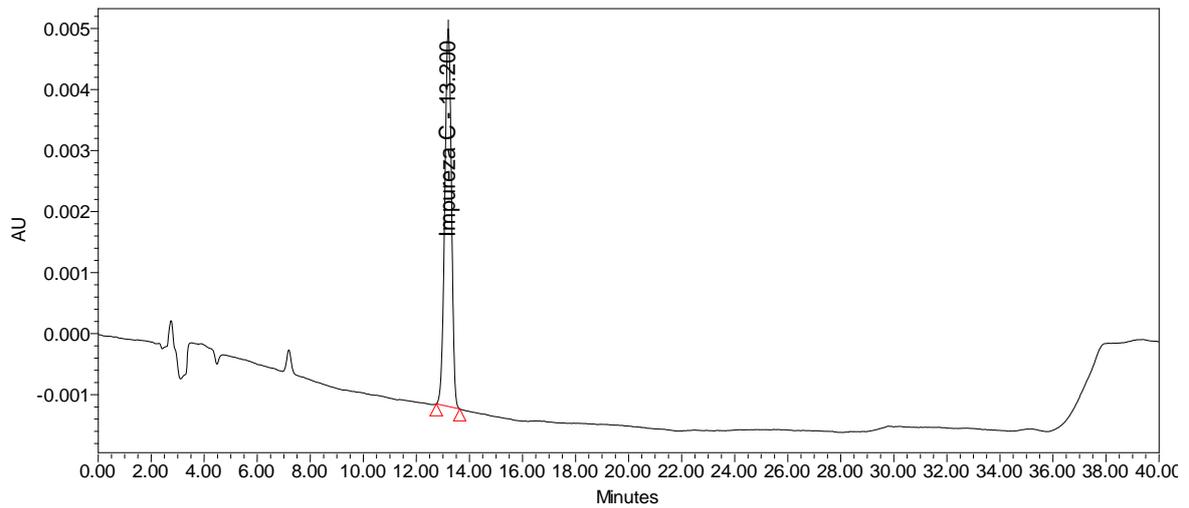


Figura 14: Cromatograma obtido na análise da Solução Padrão Impureza C.

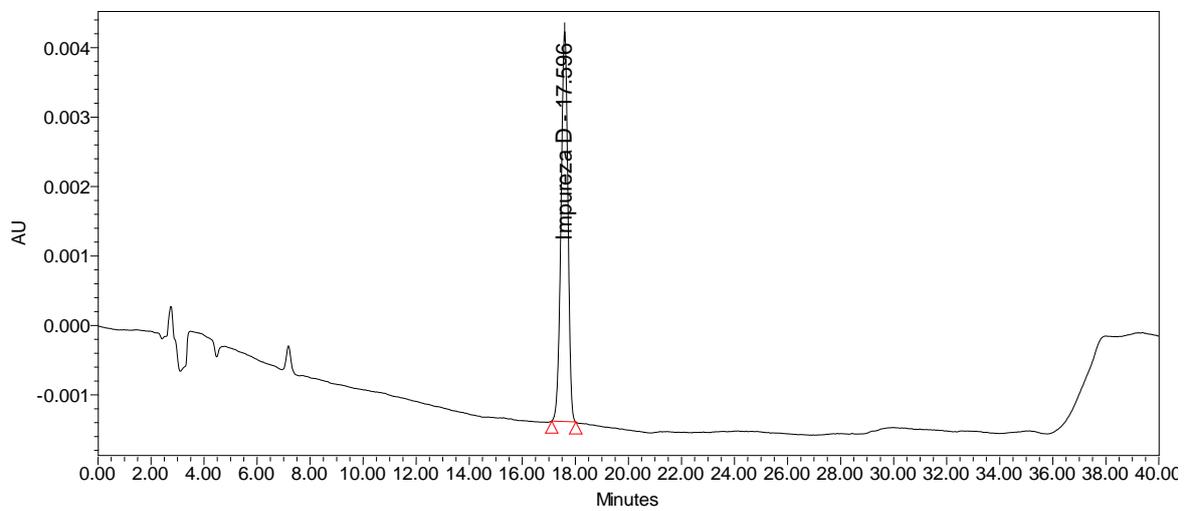


Figura 15: Cromatograma obtido na análise da Solução Padrão Impureza D.

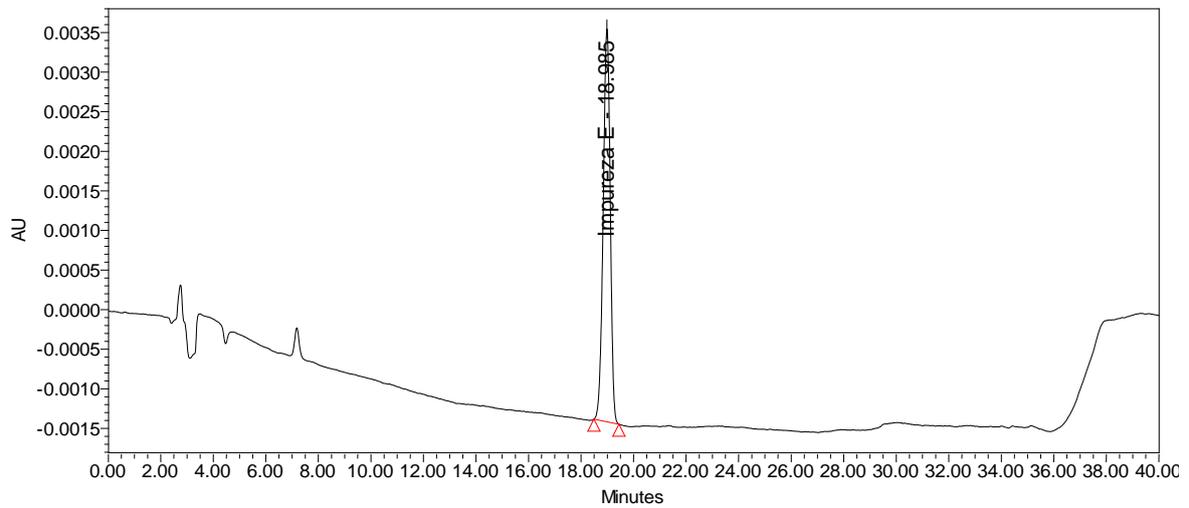


Figura 16: Cromatograma obtido na análise da Solução Padrão Impureza E.

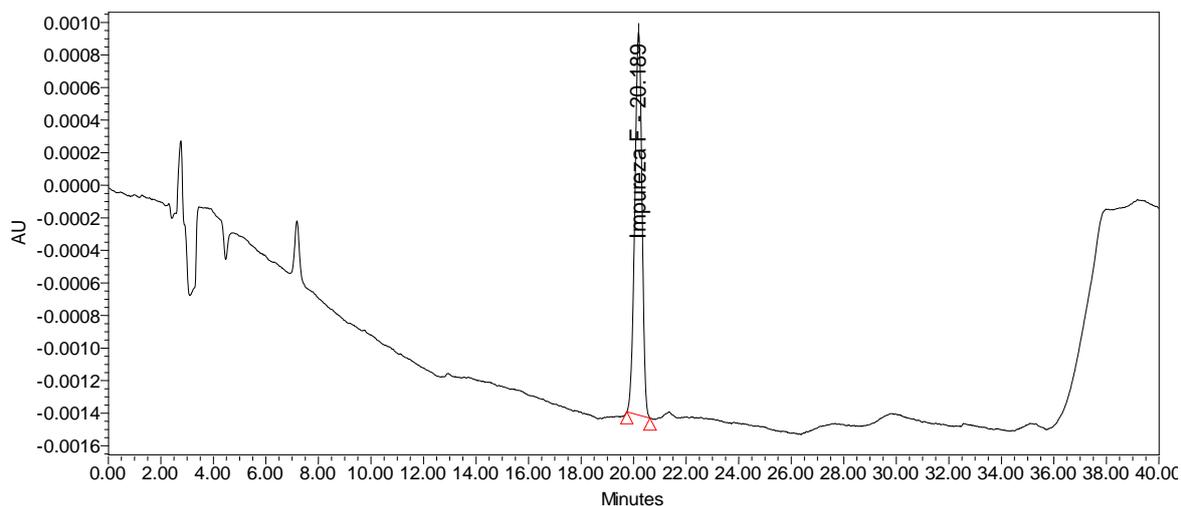


Figura 17: Cromatograma obtido na análise da Solução Padrão Impureza F.

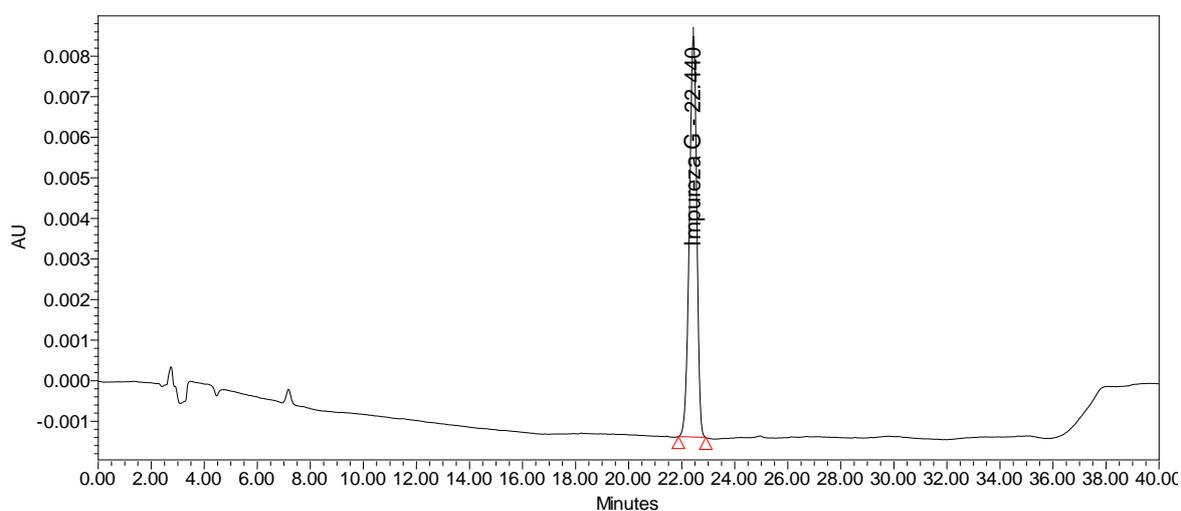


Figura 18: Cromatograma obtido na análise da Solução Padrão Impureza G.

Conforme os cromatogramas demonstrados extraídos em comprimento de onda de 235 nm, nota-se na Figura 11 que o diluente apresentou um pico em aproximadamente 7 minutos. Tal pico apresentou retenção muito próxima com a Impureza A conforme indicado na Figura 12, no entanto apresentou uma separação eficaz e não causa interferência na quantificação da mesma. Nos demais cromatogramas demonstrados, foi possível identificar cada composto e pelo tempo de retenção obtido, não apresentam coeluição entre si.

Após a identificação individual de cada impureza no cromatograma, uma solução com todas as impurezas foi analisada, com o intuito de verificar a separação de cada impureza na mesma análise cromatográfica, conforme demonstrado na Figura 19.

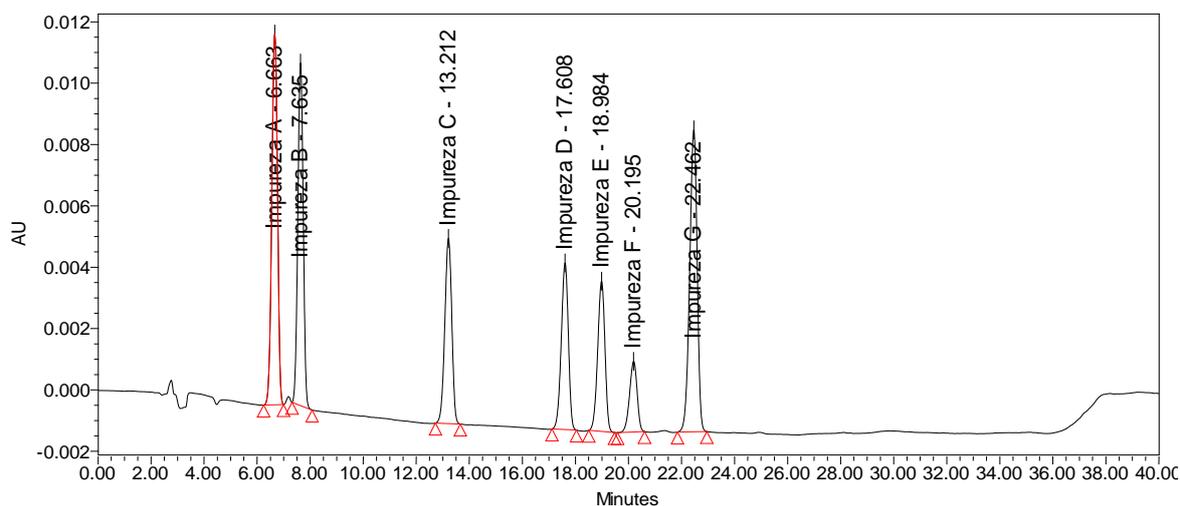


Figura 19: Cromatograma obtido na análise da Solução Mix de Impurezas.

Um problema foi observado neste perfil cromatográfico. A separação foi eficaz entre os compostos, no entanto nota-se que a separação das Impurezas A e B com o pico do diluente, apresentaram retenção muito próxima e a base da integração da Impureza B ficou prejudicada por causa dessa retenção próxima. Prosseguindo com a avaliação, a Figura 20 apresenta o cromatograma obtido para a Solução Teste contaminada com as impurezas, a fim de verificar o perfil cromatográfico com a presença do ativo Gliclazida na concentração de trabalho proposta.

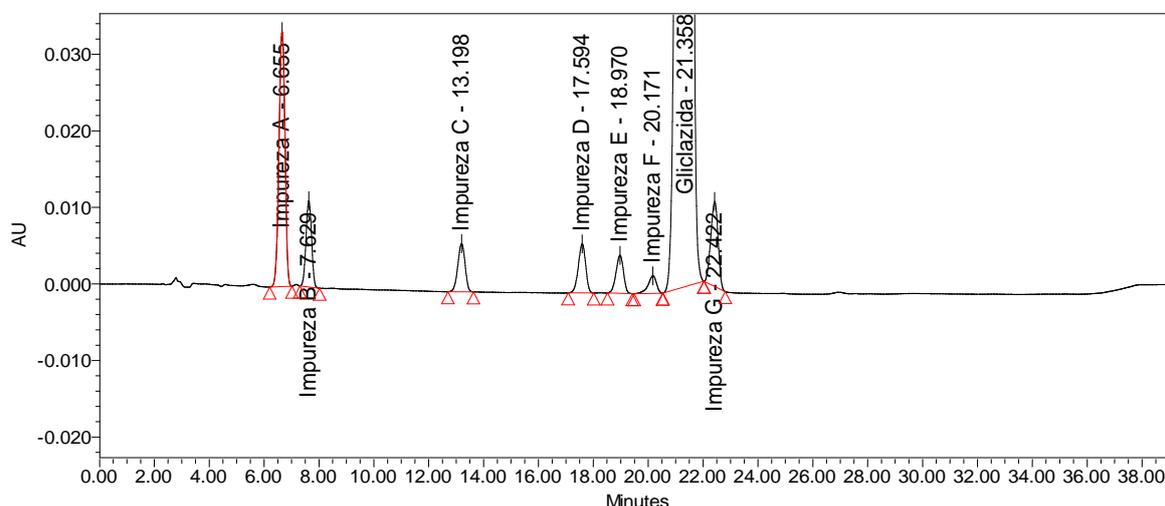


Figura 20: Cromatograma obtido na análise da Solução Mix de Impurezas.

Novamente um problema de separação foi observada. A Impureza G apresentou uma retenção muito próxima em relação ao pico da Gliclazida, prejudicando em uma quantificação eficaz de ambos os compostos. Com isso, foi necessário ajustar o gradiente da fase móvel para que essa separação apresente uma maior resolução entre os compostos.

Diante dos resultados expostos, foram observados pontos a serem melhorados

e também pontos positivos, visto que as impurezas já apresentaram uma certa separação entre si, sendo necessário ajustes para que se obtenha o melhor perfil cromatográfico para um método que possa quantificar todos os compostos sem interferências.

5.1.4 Teste 04

A partir dos resultados obtidos no teste anterior, algumas alterações foram pensadas a fim de obter o gradiente ideal para a separação dos compostos. Primeiramente, a fim de obter uma separação entre o pico proveniente do diluente, um gradiente isocrático inicial foi determinado a fim de obter a eluição do pico da impureza e diluente e posteriormente a eluição destes picos, inicia-se um gradiente gradativo de acetonitrila para assim eluir a Impureza B e demais compostos. Tal situação, deverá retardar a eluição da Impureza B, fazendo com que ocorra a separação efetiva. Outra alteração se dá na concentração final de orgânico do diluente, sendo que no teste anterior a proporção chegava em 50:50 (aquoso:orgânico), neste caso foi de 60:40 (aquoso:orgânico) visto que a redução da velocidade de mistura de composições pode ser o cenário ideal para que se ocorra a separação das demais impurezas.

Adicionado o controle de temperatura do forno da coluna, pelo fato de que variações de temperatura na sala pode determinar alteração no perfil cromatográfico. Portanto, foi adicionado o controle de temperatura a 30°C. Outros parâmetros cromatográficos se mantiveram dos testes anteriores, como a fase móvel, coluna cromatográfica e diluente. A Tabela 6 apresenta o gradiente detalhado utilizado no teste.

Tabela 6: Gradiente de proporção de Fase Móvel do Teste 04.

Tempo (min)	Solução A (%)	Acetonitrila (%)
0	70	30
6	70	30
39	60	40
40	70	30
50	70	30

Em relação as amostras, uma alteração foi realizada a fim de otimiza o preparo de solução. Nos testes anteriores, o cenário era de que a amostra para a avaliação de impurezas apresentava a concentração de trabalho de 1200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e a concentração da amostra de doseamento era de 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A fim de unificar as duas amostras, ou seja,

a mesma amostra ser passível de quantificação tanto do ativo para doseamento quanto para a avaliação das impurezas, foi determinado a concentração de trabalho de 600 µg mL⁻¹. No entanto, foi necessário avaliar o impacto nas impurezas, visto que a concentração da amostra determina a concentração de trabalho da impureza. Tal impacto foi verificado na Solução Sensibilidade do método, visto que se o ativo Gliclazida apresentar relação sinal/ruído superior a 10 na concentração reduzida, o método será apto para quantificar no limite de quantificação.

Portanto, com o intuito de avaliar de forma rápida e otimizada se o teste proposto terá aplicabilidade e separação adequada, será analisada a Solução Teste Contaminada da análise anterior, visto que com a concentração maior e, conseqüentemente uma maior intensidade e área das impurezas, a separação é mais difícil de realizar em relação a concentrações menores. Contudo, por ser o pior caso essa amostra servirá de parâmetro para avaliar a resolução. O perfil cromatográfico obtido na análise desta solução pode ser observado na Figura 21.

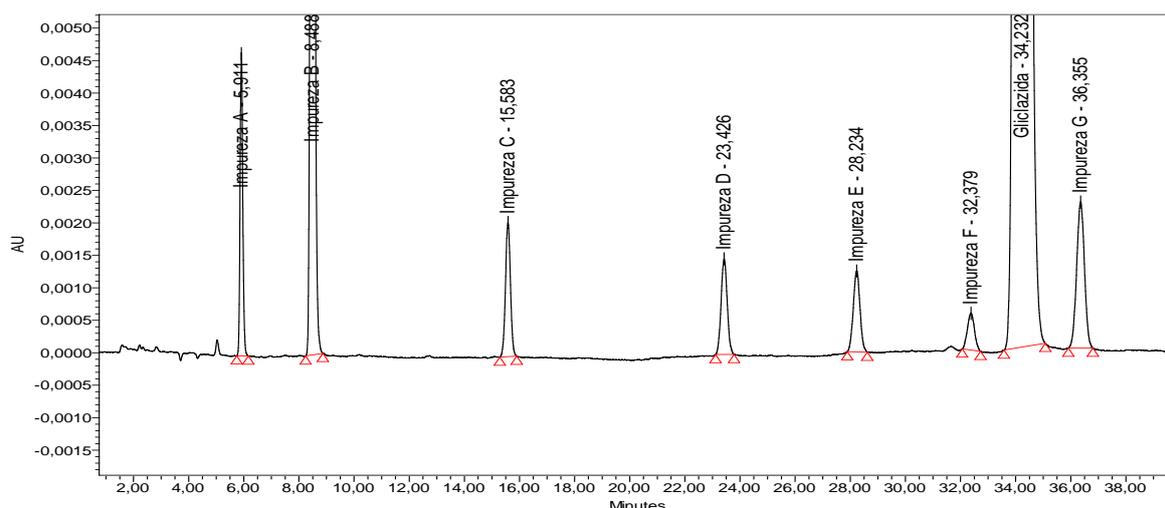


Figura 21: Cromatograma obtido na análise da Solução Mix de Impurezas.

A partir do cromatograma obtido, nota-se que as alterações no gradiente foram determinantes para que se obtenha uma separação entre os compostos. Vale ressaltar a separação do pico da Impureza A com o pico proveniente do diluente, visto que no teste anterior apresentaram retenção próximas. Outro ponto a destacar foi a separação entre o pico proveniente da Gliclazida e da Impureza G, apresentando uma resolução dentro do critério estabelecido entre os compostos, conseguindo quantificar os compostos.

Com isso, com os resultados positivos na separação dos compostos, o sistema cromatográfico está definido e poderá ser submetido a teste de validação a fim de avaliar sua aplicabilidade e capacidade de reproduzir os resultados dentro de um limite de variação

aceitável.

5.2 Validação do método analítico

A validação do método analítico foi realizada seguindo a confirmação de sua aplicação baseada em parâmetros exigidos pela RDC 166/2017 [24]. A execução de como será realizado cada parâmetro, está relatado no Apêndice II.

5.2.1 Linearidade

A avaliação da linearidade do método para doseamento e uniformidade de conteúdo foi efetuada mediante a obtenção de curva analítica com cinco níveis de concentração e três réplicas em cada nível, compreendendo o intervalo de 70% a 130% da concentração nominal de Gliclazida ($600 \mu\text{g mL}^{-1}$) na Solução Teste Doseamento/SR, abrangendo o intervalo de concentração de 420 a $780 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ativo para o doseamento.

Para avaliação estatística foi utilizado a aplicação Action Stat® e os resultados completos encontram-se no Apêndice IV. A Tabela 7 apresenta o resumo das conclusões obtidas da análise estatística da linearidade de Gliclazida.

Tabela 7: Resumo das conclusões do estudo de linearidade da Gliclazida.

Teste	Conclusão
Teste F da ANOVA	Não rejeitamos a significância do modelo linear
Teste do Intercepto	Intercepto igual a zero
Coefficiente de Correlação de Pearson	$R = 0.9995$ que é maior que o proposto (0,99)
Teste de Normalidade dos Resíduos	Não rejeitamos a hipótese de normalidade dos resíduos
Teste de Homocedasticidade	Não rejeitamos a homocedasticidade da variância
Valores extremos na resposta	Não detectamos pontos extremos
Teste de independência das observações	Não detectado dependência das observações

A análise estatística apresentada no relatório Action Stat® demonstrou cumprimento dos critérios estabelecidos para o parâmetro de linearidade. Desta forma, podemos considerar o método linear, homocedástico, normal, independente nas observações e sem valores extremos (*outliers*). Portanto o método é linear para Gliclazida na faixa de 420 a $780 \mu\text{g mL}^{-1}$ estabelecida para o método.

A avaliação da linearidade do método para as impurezas inespecíficas e específicas foi efetuada mediante a obtenção de curva analítica com cinco níveis de concentração e com três réplicas em cada nível, compreendendo o intervalo de desconsideração 0,10% ($0,6 \mu\text{g mL}^{-1}$) a 1,20% ($7,2 \mu\text{g mL}^{-1}$) da concentração nominal do

ativo na Solução Teste Doseamento/SR (600,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Para avaliação estatística foi utilizado a aplicação Action Stat® e os resultados completos encontram-se no Apêndice IV.

Na Tabela 8 está apresentado o resumo das conclusões obtidas da análise estatística da linearidade do Gliclazida.

Tabela 8: Resumo das conclusões do estudo de linearidade da Gliclazida.

Teste	Conclusão
Teste F da ANOVA	Não rejeitamos a significância do modelo linear
Teste do Intercepto	Intercepto igual a zero
Coefficiente de Correlação de Pearson	R = 0.9996 que é maior que o proposto (0,99)
Teste de Normalidade dos Resíduos	Não rejeitamos a hipótese de normalidade dos resíduos
Teste de Homocedasticidade	Não rejeitamos a homocedasticidade da variância
Valores extremos na resposta	Não detectamos pontos extremos
Teste de independência das observações	Não detectado dependência das observações

A análise estatística apresentada no relatório Action Stat® demonstrou cumprimento dos critérios estabelecidos para o parâmetro de linearidade. Desta forma, podemos considerar o método linear, homocedástico, normal, independente nas observações e sem valores extremos (*outliers*). Portanto o método é linear para Gliclazida na faixa de 0,60 a 7,20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ estabelecida para o método.

Na Tabela 9 está apresentado o resumo das conclusões obtidas da análise estatística da linearidade da Impureza A.

Tabela 9: Resumo das conclusões do estudo de linearidade da Impureza A.

Teste	Conclusão
Teste F da ANOVA	Não rejeitamos a significância do modelo linear
Teste do Intercepto	Intercepto igual a zero
Coefficiente de Correlação de Pearson	R = 0.9999 que é maior que o proposto (0,99)
Teste de Normalidade dos Resíduos	Não rejeitamos a hipótese de normalidade dos resíduos
Teste de Homocedasticidade	Não rejeitamos a homocedasticidade da variância
Valores extremos na resposta	Não detectamos pontos extremos
Teste de independência das observações	Não detectado dependência das observações

A análise estatística apresentada no relatório Action Stat® demonstrou cumprimento dos critérios estabelecidos para o parâmetro de linearidade. Desta forma, podemos considerar o método linear, homocedástico, normal, independente nas observações e sem valores extremos (*outliers*). Portanto o método é linear para Impureza A na faixa de 0,60 a 7,20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ estabelecida para o método.

Na Tabela 10 está apresentado o resumo das conclusões obtidas da análise estatística da linearidade da Impureza G.

Tabela 10: Resumo das conclusões do estudo de linearidade da Impureza G.

Teste	Conclusão
Teste F da ANOVA	Não rejeitamos a significância do modelo linear
Teste do Intercepto	Intercepto igual a zero
Coefficiente de Correlação de Pearson	R = 0.999 que é maior que o proposto (0,99)
Teste de Normalidade dos Resíduos	Não rejeitamos a hipótese de normalidade dos resíduos
Teste de Homocedasticidade	Não rejeitamos a homocedasticidade da variância
Valores extremos na resposta	Não detectamos pontos extremos
Teste de independência das observações	Não detectado dependência das observações

A análise estatística apresentada no relatório Action Stat® demonstrou cumprimento dos critérios estabelecidos para o parâmetro de linearidade. Desta forma, podemos considerar o método linear, homocedástico, normal, independente nas observações e sem valores extremos (*outliers*). Portanto o método é linear para Impureza G na faixa de 0,60 a 7,20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ estabelecida para o método.

5.2.2 Fator Resposta Relativo

O fator resposta relativo das impurezas foi calculado como sendo a razão entre os coeficientes angulares dos padrões das impurezas em questão frente ao padrão de Gliclazida (agli/aimp), obtidos a partir do parâmetro de linearidade. Os resultados são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11: Coeficiente angular e fator resposta relativo de Gliclazida, Impureza A e G.

Identificação	Média dos Coeficientes Angulares	Fator Resposta
Gliclazida	9491,428314	-
Impureza A	10251,180436	0,93
Impureza G	18423,120079	0,52

Assim, os fatores resposta relativos encontrados acima foram utilizados no cálculo do teor das impurezas nos demais parâmetros da validação.

5.2.3 Precisão

Os resultados obtidos para a Precisão 1 e Precisão 2 repetibilidade no preparo

das amostras de doseamento, bem como a avaliação da Precisão Intermediária com o comparativo dos dois dias, estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12: Resultados de Precisão 1 e Precisão (repetibilidade) e da Precisão Intermediária – Doseamento de Gliclazida.

Nível (%)	Teor Médio da Prec. 1 (%)	Teor Médio da Prec. 2 (%)	Média da Prec. Interm. (%)	DPR da Prec. 1 (%)	DPR da Prec. 2 (%)	DPR da Prec. Interm. (%)	Especificação da Prec. Repeteb. DPR (%)	Especificação da Prec. Interm. DPR (%)
100	98,29	97,62	97,95	0,4	0,6	0,6	≤ 1,9	≤ 3

Conforme os resultados apresentados, os valores individuais a média e o desvio padrão relativo (DPR%) entre os preparos das amostras de Gliclazida produto acabado estão de acordo com os critérios de aceitação estabelecidos para o parâmetro de precisão (repetibilidade). Sendo assim, o método analítico possui precisão (repetibilidade) adequada no nível 100% da concentração de trabalho de 600 µg mL⁻¹.

Já para determinação da precisão intermediária, o seu conteúdo expressa a proximidade entre os resultados obtidos da análise de uma mesma amostra no mesmo laboratório em pelo menos dois dias diferentes, realizadas por operadores distintos, contemplando as mesmas concentrações e mesmo número de determinações. Com os resultados demonstrados na Tabela 12, demonstram que o método é preciso uma vez que a proximidade dos resultados das duas precisões (1º e 2º dia) cumpre com os critérios de aceitação estabelecidos para o parâmetro.

Os resultados obtidos para o ensaio da uniformidade de conteúdo para a Precisão 1 e Precisão 2 repetibilidade, bem como a avaliação da Precisão Intermediária com o comparativo dos dois dias, estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13: Resultados de Precisão 1 e Precisão (repetibilidade) e da Precisão Intermediária – Uniformidade de Conteúdo de Gliclazida.

Nível (%)	Teor Médio da Prec. 1 (%)	Teor Médio da Prec. 2 (%)	Média da Prec. Interm. (%)	DPR da Prec. 1 (%)	DPR da Prec. 2 (%)	DPR da Prec. Interm. (%)	Especificação da Prec. Repeteb. DPR (%)	Especificação da Prec. Interm. DPR (%)
100	96,61	99,61	98,11	1,2	0,4	1,8	≤ 1,9	≤ 3

Conforme os resultados apresentados, os valores individuais a média e o desvio padrão relativo (DPR%) entre os preparos das amostras de Gliclazida produto acabado

estão de acordo com os critérios de aceitação estabelecidos para o parâmetro de precisão (repetibilidade). Sendo assim, o método analítico possui precisão (repetibilidade) adequada no nível 100% da concentração de trabalho de 600 µg mL⁻¹.

Já para determinação da precisão intermediária, o seu conteúdo expressa a proximidade entre os resultados obtidos da análise de uma mesma amostra no mesmo laboratório em pelo menos dois dias diferentes, realizadas por operadores distintos, contemplando as mesmas concentrações e mesmo número de determinações. Com os resultados demonstrados na Tabela 13, demonstram que o método é preciso uma vez que a proximidade dos resultados das duas precisões (1° e 2° dia) cumpre com os critérios de aceitação estabelecidos para o parâmetro.

A Precisão/Exatidão do método para quantificação de impurezas inespecíficas foi avaliada através da recuperação do ativo no intervalo de concentração de 0,10% a 0,24% em relação a concentração nominal de Gliclazida na amostra (Gliclazida 600 µg mL⁻¹). Os valores de recuperação e a avaliação da proximidade entre os resultados de mesmo nível (DPR) estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14: Resultados de Precisão 1 e Precisão (repetibilidade) e da Precisão Intermediária – Impurezas Inespecíficas.

Nível (%)	Teor Médio da Prec. 1 (%)	Teor Médio da Prec. 2 (%)	Média da Prec. Interm. (%)	DPR da Prec. 1 (%)	DPR da Prec. 2 (%)	DPR da Prec. Interm. (%)	Especificação da Prec. Repeteb. DPR e Rec. (%)	Especificação da Prec. Interm. DPR e Rec. (%)
0,10	95	96	95	3,0	1,2	2,1		
0,17	100	99	100	3,3	3,6	3,2	DPR = ≤ 5,3 Rec. = 90-107	DPR = ≤ 8 Rec. = 90-107
0,24	101	100	101	1,9	1,5	1,6		

Conforme os resultados apresentados na Tabela 14, os valores individuais, as médias de recuperação e o desvio padrão relativo (DPR) entre os preparos das amostras nas concentrações avaliadas estão de acordo com os critérios de aceitação estabelecidos para o parâmetro de Precisão/Exatidão (repetibilidade). Sendo assim, é possível concluir que o método analítico possui Precisão/Exatidão (repetibilidade) adequados nos níveis de concentração entre 0,60 a 1,44 µg mL⁻¹.

A Precisão/Exatidão do método para quantificação da impureza específica A foi avaliada através da recuperação do analito no intervalo de concentração de 0,10% a 1,20%

em relação a concentração nominal de Gliclazida na amostra (Gliclazida 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Os valores de recuperação e a avaliação da proximidade entre os resultados de mesmo nível (DPR) estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15: Resultados de Precisão 1 e Precisão (repetibilidade) e da Precisão Intermediária – Impureza A.

Nível (%)	Teor Médio da Prec. 1 (%)	Teor Médio da Prec. 2 (%)	Média da Prec. Interm. (%)	DPR da Prec. 1 (%)	DPR da Prec. 2 (%)	DPR da Prec. Interm. (%)	Especificação da Prec. Repeteb. DPR e Rec. (%)	Especificação da Prec. Interm. DPR e Rec. (%)
0,10	98	101	99	4,3	4,3	4	DPR = $\leq 5,3$ Rec. = 90-107	DPR = ≤ 8 Rec. = 90-107
0,65	102	97	100	1,9	0,5	3	DPR = $\leq 3,7$ Rec. = 95-105	DPR = ≤ 6 Rec. = 95-105
1,20	101	96	99	2,0	0,4	3		

Conforme os resultados apresentados na Tabela 15, os valores individuais, as médias de recuperação e o desvio padrão relativo (DPR) entre os preparos das amostras nas concentrações avaliadas estão de acordo com os critérios de aceitação estabelecidos para o parâmetro de Precisão/Exatidão. Sendo assim, é possível concluir que o método analítico possui Precisão/Exatidão (repetibilidade) adequados nos níveis de concentração entre os 0,60 a 7,20 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A Precisão/Exatidão do método para quantificação da impureza específica G foi avaliada através da recuperação do analito no intervalo de concentração de 0,10% a 0,24% em relação a concentração nominal de Gliclazida na amostra (Gliclazida 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Os valores de recuperação e a avaliação da proximidade entre os resultados de mesmo nível (DPR) estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16: Resultados de Precisão 1 e Precisão (repetibilidade) e da Precisão Intermediária – Impureza G

Nível (%)	Teor Médio da Prec. 1 (%)	Teor Médio da Prec. 2 (%)	Média da Prec. Interm. (%)	DPR da Prec. 1 (%)	DPR da Prec. 2 (%)	DPR da Prec. Interm. (%)	Especificação da Prec. Repeteb. DPR e Rec. (%)	Especificação da Prec. Interm. DPR (%)
0,10	102	102	102	1,6	3,7	3		
0,17	104	96	100	5,2	2,1	6	DPR = ≤ 5,3 Rec. = 90-107	DPR = ≤ 8 Rec. = 90-107
0,24	99	94	97	3,1	3,1	4		

Conforme os resultados apresentados na Tabela 16, os valores individuais, as médias de recuperação e o desvio padrão relativo (DPR) entre os preparos das amostras nas concentrações avaliadas estão de acordo com os critérios de aceitação estabelecidos para o parâmetro de Precisão/Exatidão. Sendo assim, é possível concluir que o método analítico possui Precisão/Exatidão (repetibilidade) adequados nos níveis de concentração entre os 0,60 a 1,44 µg mL⁻¹.

5.2.4 Exatidão

A exatidão permite a determinação da proximidade entre os resultados experimentais e os valores reais do analito presente na amostra, sendo avaliada através da recuperação.

Para determinação da exatidão do método analítico, as amostras foram avaliadas em três níveis de concentração: baixo (70%), médio (100%) e alto (130%) em relação a concentração nominal de Gliclazida na amostra (Gliclazida 600 µg mL⁻¹). Os valores de recuperação e a avaliação da proximidade entre os resultados de mesmo nível (DPR) estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17: Resultados de Exatidão – Doseamento e Uniformidade de Conteúdo de Gliclazida.

Nível (%)	Média Rec. (%)	Especificação Rec. (%)	DPR (%)	Especificação DPR (%)
70	100	98-102	0,3	≤ 1,9

100	100	0,9
130	99	0,4

Conforme os resultados apresentados na Tabela 17, os valores individuais, as médias de recuperação e o desvio padrão relativo (DPR) entre os preparos das amostras nas concentrações avaliadas estão de acordo com os critérios de aceitação estabelecidos para o parâmetro de Exatidão. Sendo assim, é possível concluir que o método analítico possui Exatidão adequada nos níveis de concentração entre 420 a 780 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

5.2.5 Limite de Quantificação

O limite de quantificação para o método analítico de produtos de degradação foi de 0,10% (0,60 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para as impurezas inespecíficas e específicas A e G. A Tabela 18 apresenta os valores de sinal/ruído para os analitos de interesse, avaliados no parâmetro Precisão/Exatidão.

Tabela 18: Sinal/ruído dos analito de interesse no limite de quantificação.

Nível	Analito	Réplica	S/N
0,10 %	Impurezas inespecíficas	1.	23
		2.	19
		3.	53
	Impureza A	1.	110
		2.	97
		3.	135
	Impureza G	1.	56
		2.	50
		3.	67

Na concentração equivalente ao limite de desconsideração, os resultados demonstraram precisão, exatidão e linearidade além de ser observado relação sinal/ruído maior que 10. Portanto, pode-se considerar que o limite de quantificação do método é de 0,60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (equivalente ao nível 0,10%) para as impurezas inespecíficas e específicas de Gliclazida.

5.2.6 Faixa de Trabalho

A faixa de trabalho (intervalo) compreende os limites de quantificação superior e inferior do método analítico.

O método foi considerado validado quanto ao intervalo dentro da faixa de concentração de 420 a 780 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para doseamento e uniformidade de conteúdo de Gliclazida 60 mg comprimido de liberação prolongada, apresentando linearidade, precisão e exatidão adequados nesta faixa.

O método foi considerado validado quanto ao intervalo dentro da faixa de concentração de 0,60 a 1,44 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para Impurezas inespecíficas e Impureza G, assim como também demonstrou-se validado para o intervalo dentro da faixa de 0,60 a 7,20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a Impureza A de Gliclazida 60 mg comprimido de liberação prolongada, apresentando linearidade, precisão e exatidão adequados nas faixas determinadas.

5.2.7 Robustez

As alterações analíticas foram comparadas frente ao método analítico sem alteração, qualitativamente por meio da resolução das impurezas específicas e inespecíficas em relação ao pico de Gliclazida, assim como a pureza do pico de Gliclazida nas Soluções teste e quantitativamente através do cálculo da recuperação de Gliclazida na *Solução Teste Doseamento e Solução Teste Impurezas Inespecíficas* e recuperação das Impurezas A e G na *Solução Teste Impurezas Específicas*. Esta avaliação se refere a comprovação da robustez conforme os critérios de exatidão, demonstrando que a alteração proposta não resulta em diferença na quantificação dos analitos de interesse.

As amostras foram submetidas às alterações nos seguintes parâmetros cromatográficos:

- Lote da coluna;
- Fluxo da fase móvel;
- Temperatura da coluna;
- pH da solução A;
- Proporção da fase móvel;
- Tempo de ultrassom das amostras.
- Tipo de filtro
- Estabilidade das soluções

Ao comparar os resultados qualitativos (System Suitability, perfil cromatográfico, pureza e homogeneidade espectral) obtidos com as soluções injetadas com as diferentes condições de variação, pode-se constatar que os critérios de aceitação pré-definidos foram atendidos. Tais informações podem ser observadas nos cromatogramas em anexo.

Os resultados quantitativos obtidos foram comparados às condições descritas no método e podem ser visualizados na Tabela 19, Tabela 20, Tabela 21 e Tabela 22.

Tabela 19: Teores de Gliclazida obtidos para as Soluções Teste Doseamento nos ensaios de robustez.

Variação	Gliclazida Teor Médio (%)	Recuperação (%)	Especificação Rec. (%)
Sem Alteração CL079	98,09	NA	
Lote de coluna	98,58	100	
Fluxo 1 (0,9 mL/min)	98,72	101	
Fluxo 2 (1,1 mL/min)	98,67	101	
Temperatura da coluna 1 (28 °C)	98,51	100	
Temperatura da coluna 2 (32 °C)	98,87	101	98 - 102
Sem Alteração CL049	98,35	NA	
pH da Solução A 1 (3,7)	97,63	99	
pH da Solução A 2 (3,9)	99,80	101	
Proporção da fase móvel 1	98,05	100	
Proporção da fase móvel 2	97,92	100	

Tabela 20: Teores de Gliclazida obtidos para as Soluções Teste Inespecífica média nos ensaios de robustez.

Variação	Gliclazida Teor (%)	Recuperação (%)	Especificação Rec. (%)
Sem Alteração CL079	103	NA	
Lote de coluna	95	93	
Fluxo 1 (0,9 mL/min)	99	96	
Fluxo 2 (1,1 mL/min)	101	98	
Temperatura da coluna 1 (28 °C)	100	105	
Temperatura da coluna 2 (32 °C)	103	100	90 - 107
Sem Alteração CL049	105	NA	
pH da Solução A 1 (3,7)	104	99	
pH da Solução A 2 (3,9)	103	98	
Proporção da fase móvel 1	103	99	
Proporção da fase móvel 2	105	100	

Tabela 21: Teores de Impureza A obtidos para as Soluções Teste Específica média nos ensaios de robustez.

Variação	Impureza A Teor (%)	Recuperação (%)	Especificação Rec. (%)
Sem Alteração CL079	104	NA	
Lote de coluna	97	93	
Fluxo 1 (0,9 mL/min)	104	99	
Fluxo 2 (1,1 mL/min)	105	100	
Temperatura da coluna 1 (28 °C)	99	101	
Temperatura da coluna 2 (32 °C)	105	101	95 - 105
Sem Alteração CL049	100	NA	
pH da Solução A 1 (3,7)	104	104	
pH da Solução A 2 (3,9)	98	98	
Proporção da fase móvel 1	105	105	
Proporção da fase móvel 2	102	102	

Tabela 22: Teores de Impureza G obtidos para as Soluções Teste Específica média nos ensaios de robustez.

Variação	Impureza G Teor (%)	Recuperação (%)	Especificação Rec. (%)
Sem Alteração CL079	104	NA	
Lote de coluna	106	102	
Fluxo 1 (0,9 mL/min)	103	98	
Fluxo 2 (1,1 mL/min)	101	97	
Temperatura da coluna 1 (28 °C)	103	97	
Temperatura da coluna 2 (32 °C)	106	102	90 - 107
Sem Alteração CL049	106	NA	
pH da Solução A 1 (3,7)	106	100	
pH da Solução A 2 (3,9)	104	98	
Proporção da fase móvel 1	100	94	
Proporção da fase móvel 2	101	95	

É possível concluir que a recuperação dos teores de Gliclazida, Impureza A e Impureza G estão compreendidas dentro da faixa do critério de aceitação da exatidão para todas as variações as quais o método foi submetido.

De acordo com os resultados apresentados, é possível comprovar que ao alterar o método analítico com as condições de variação descritas anteriormente, os parâmetros de System Suitability, perfil cromatográfico, pureza, homogeneidade espectral e recuperação dos analitos de interesse continuam sendo atendidos, indicando uma boa separação e quantificação cromatográfica, demonstrando que o método é robusto para

todas as condições testadas.

A Tabela 23 apresenta os dados referentes à análise na condição de robustez de tempo de ultrassom das amostras. Avaliou-se o impacto com diminuição (5 minutos) e aumento (15 minutos) do tempo de ultrassom no preparo da amostra frente à condição descrita no método (10 minutos).

Tabela 23: Teores de Gliclazida obtidos para as Soluções Teste Doseamento no ensaio de robustez de tempo de extração.

Condição	Teor (%)	Teor Médio (%)	Recuperação (%)	Especificação Rec. (%)
Sem alteração (10 min)	95,70	94,51	NA	
	93,30			
	94,53			
Tempo de extração (5 min)	94,16	93,81	99	98 - 102
	93,96			
	93,30			
Tempo de extração (15 min)	93,39	93,76	99	
	95,17			
	92,73			

Observa-se que a recuperação do ativo na *Solução Teste Doseamento* em ambas condições de tempo de extração frente a condição proposta no método analítico apresentaram-se dentro da faixa especificada, evidenciando portanto que o método proposto é robusto para variação de tempo de ultrassom entre 5 a 15 minutos.

A robustez do tipo de filtro foi avaliada comparando a recuperação das áreas de Gliclazida na Solução padrão SR, Solução padrão Doseamento e Solução Teste Doseamento/SR, preparadas com o método sem alteração e com alterações propositais.

Na Tabela 24 à Tabela 26 estão apresentados os dados referentes à análise de robustez de filtro, com os descartes e filtros utilizados, conforme o descrito no Apêndice II.

Tabela 24: Robustez de filtro para Solução Padrão SR – Gliclazida.

Teste	Área	Recuperação (%)	Especificação Rec. (%)
Centrifugar a 5000 rpm por 5 minutos	10398	NA	
PTFE hidrofílico 0,45 µm 0 mL	10899	105	
PTFE hidrofílico 0,45 µm 2 mL	10948	105	
PTFE hidrofílico 0,45 µm 4 mL	10940	105	95-105
PVDF 0,45 µm 0 mL	10874	105	
PVDF 0,45 µm 2 mL	10354	100	
PVDF 0,45 µm 4 mL	10290	99	

Tabela 25: Robustez de filtro para Solução Padrão Doseamento – Gliclazida.

Teste	Área	Recuperação (%)	Especificação Rec. (%)
Centrifugar a 5000 rpm por 5 minutos	5676161	NA	
PTFE hidrofílico 0,45 µm 0 mL	5738462	101	
PTFE hidrofílico 0,45 µm 2 mL	5758601	101	
PTFE hidrofílico 0,45 µm 4 mL	5691006	100	98-102
PVDF 0,45 µm 0 mL	5686708	100	
PVDF 0,45 µm 2 mL	5617510	99	
PVDF 0,45 µm 4 mL	5716968	101	

Tabela 26: Robustez de filtro para Solução Teste Doseamento – Gliclazida.

Teste	Área	Recuperação (%)	Especificação Rec. (%)
Centrifugar a 5000 rpm por 5 minutos	5452656	NA	
PTFE hidrofílico 0,45 µm 0 mL	5441493	100	
PTFE hidrofílico 0,45 µm 2 mL	5501163	101	
PTFE hidrofílico 0,45 µm 4 mL	5453215	100	98-102
PVDF 0,45 µm 0 mL	5494947	101	
PVDF 0,45 µm 2 mL	5470268	100	
PVDF 0,45 µm 4 mL	5491871	101	

Conforme pode-se observar nos resultados apresentados na Tabela 24, Tabela 25 e Tabela 26, não houve diferença significativa na recuperação das áreas do analito de interesse (Gliclazida) na Solução Padrão SR, Solução Padrão Doseamento e Solução Teste Doseamento/SR com as diferentes condições de filtração testada.

Por meio dos cromatogramas em anexo, também é possível notar que não há diferença significativa no perfil cromatográfico, quando comparado todas as diferentes condições de filtração com as respectivas soluções centrifugadas, não havendo o surgimento de picos interferentes.

Desta maneira, pode-se concluir que todos as condições de filtração analisadas demonstraram-se adequados para utilização na rotina laboratorial, uma vez que todos os critérios de aceitabilidade foram atendidos

Durante aplicação de métodos na rotina analítica, nem sempre é possível realizar a análise das amostras imediatamente após o preparo, assim como na própria validação, um mesmo preparo é utilizado em mais de um parâmetro.

Desta forma, a estabilidade das soluções analíticas foi testada analisando o teor das amostras após um período de espera *na rack do equipamento*. Na Tabela 27 e Tabela 28 estão reportados os resultados obtidos na primeira e segunda etapa de verificação para a Solução Padrão Doseamento e Solução Teste Doseamento respectivamente.

Tabela 27: Teores de Gliclazida obtidos para a Solução Padrão Doseamento na 1^a e 2^a etapa de estabilidade.

Etapa	Tempo (hh:mm)	Gliclazida Teor (%)	Recuperação (%)	Especificação Rec. (%)
1 ^a	00:00	100,0	NA	98 - 102
	52:00	97,8	98	
2 ^a	122:00	100,8	101	
	136:00	100,6	101	

Tabela 28: Teores de Gliclazida obtidos para a Solução Teste Doseamento na 1^a e 2^a etapa de estabilidade.

Etapa	Tempo (hh:mm)	Gliclazida Teor (%)	Recuperação (%)	Especificação Rec. (%)
1 ^a	00:00	98,57	NA	98 - 102
	52:00	97,87	101	
2 ^a	122:00	100,09	98	
	136:00	99,54	99	

Verifica-se que não houve incremento e/ou decaimento do teor de Gliclazida no período de armazenamento.

Uma vez que as recuperações obtidas estão dentro dos critérios de aceitação, comprova-se que a *Solução Padrão Doseamento* é estável por até 136 horas e a *Solução Teste Doseamento* é estável por até 136 horas após o seu preparo, isso quando as

soluções estiverem acondicionados no rack do equipamento, em temperatura de 5 °C.

Avaliou-se também a estabilidade da Solução Padrão SR e Solução Teste SR de modo a garantir a integridade destas soluções durante o procedimento.

Na Tabela 29, Tabela 30 e Tabela 31 *estão reportados os resultados obtidos na primeira e segunda etapa de verificação da estabilidade para a Solução Padrão SR e Solução Teste Específica Média respectivamente.*

Tabela 29: Teores de Gliclazida obtidos para a Solução Padrão SR na 1ª e 2ª etapa de estabilidade.

Etapa	Tempo (hh:mm)	Gliclazida Teor (%)	Recuperação (%)	Especificação Rec. (%)
1ª	00:00	100,0	NA	
	52:00	98,1	98	
2ª	77:00	95,0	95	95 - 105
	122:00	105,0	105	
	136:00	101,5	102	

Tabela 30: Teores de Impureza A obtidos para a Solução Teste Específica Média na 1ª e 2ª etapa de estabilidade.

Etapa	Tempo (hh:mm)	Impureza A Teor (%)	Recuperação (%)	Especificação Rec. (%)
1ª	00:00	101,0		
	52:00	103,5	102	
2ª	77:00	105,3	104	95 - 105
	122:00	105,1	104	
	136:00	103,0	102	

Tabela 31: Teores de Impureza A obtidos para a Solução Teste Específica Média na 1ª e 2ª etapa de estabilidade.

Etapa	Tempo (hh:mm)	Impureza G Teor (%)	Recuperação (%)	Especificação Rec. (%)
1ª	00:00	106,3		
	52:00	102,6	96	
2ª	77:00	105,7	99	90 - 107
	122:00	100,4	94	
	136:00	103,4	97	

Na Tabela 29, verifica-se que não houve incremento e/ou decaimento do teor de Gliclazida no período de armazenamento para a Solução Padrão SR. Uma vez que as

recuperações obtidas estão dentro dos critérios de aceitação, comprova-se que a *Solução Padrão SR* é estável por até 136 horas após o seu preparo, isso quando as soluções estiverem acondicionados no rack do equipamento, em temperatura de 5 °C.

Como na *Solução Teste SR* não houve a formação de impurezas no período de armazenamento em ambas as soluções analisadas e a recuperação do teor de Impureza A e Impureza G na *Solução Teste Específica Média* em cada tempo avaliado frente ao teor obtido na *1ª etapa* ficaram compreendido dentro dos critérios de aceitação da exatidão (Impureza A Rec. 95 – 105%) e (Impureza G Rec. 90 – 107%), comprovou-se que a *Solução Teste SR* é estável por até 136 horas após o seu preparo, isso quando as soluções estiverem acondicionados no rack do equipamento, em temperatura de 5 °C.

Por fim, a Tabela 32 apresenta os resultados obtidos na primeira e segunda etapa de verificação da estabilidade a temperatura ambiente para a *Solução padrão SR*.

Tabela 32: Teores de Gliclazida obtidos para a *Solução Padrão SR* na 1ª e 2ª etapa de estabilidade a temperatura ambiente.

Etapa	Tempo (hh:mm)	Impureza G Teor (%)	Recuperação (%)	Especificação Rec. (%)
1ª	00:00	100		
2ª	10:00	99	99	95 - 105
	20:00	107	107	

Verifica-se que não houve incremento e/ou decaimento do teor de Gliclazida na *Solução Padrão SR* após até 10 horas de armazenamento a temperatura ambiente. Porém, ao estender o tempo de armazenamento desta solução para 20 horas, houve o aumento significativo do teor de Gliclazida, caracterizando a instabilidade da solução a temperatura ambiente por longos períodos (superiores a 10 horas).

5.2.8 Conclusão dos resultados dos parâmetros de validação

Após realizar com êxito todas as análises pertinentes a validação do método analítico, seguindo rigorosamente o protocolo de validação, conclui-se que o método proposto é adequado para identificação, uniformidade de conteúdo, doseamento e produtos de degradação em Gliclazida produto acabado.

5.3 Estudo de Degradação Forçada

O estudo de degradação forçada foi realizado a partir da exposição do ativo

Gliclazida em soluções estressantes, promovendo reações a partir da hidrólise ácida, hidrólise básica, oxidação, exposição a íons metálicos, fotólise, umidade e temperatura. Tais estresses estão de acordo com as exigências da RDC 53/2015 [24]. A execução de como será realizado o estudo, está relatado no Apêndice III.

Para comprovar a seletividade do método, foi preparada a Solução Padrão Impureza A, B, C, D, E, F e G, além da Solução Teste Fortificada, para identificação das Impurezas conhecidas pela *British Pharmacopeia*, 2021.

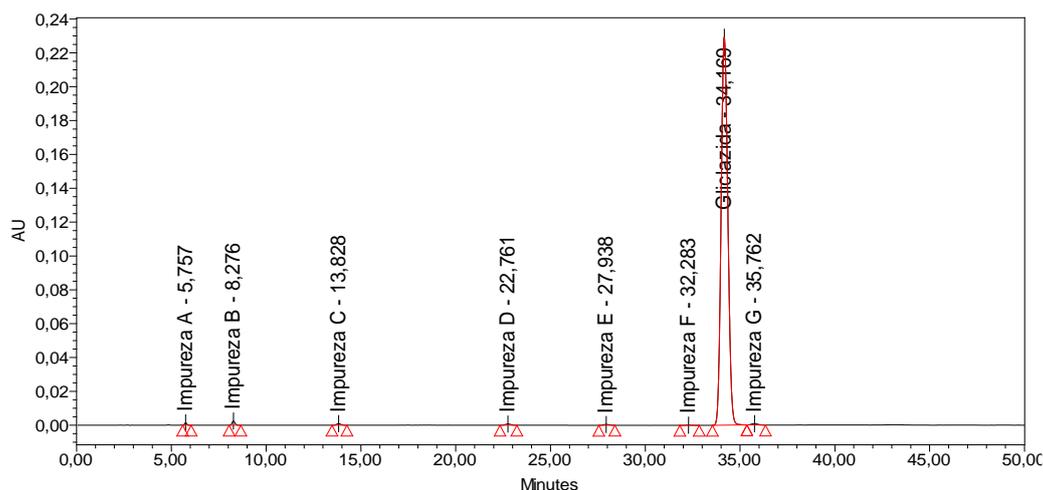


Figura 22: Cromatograma da Solução Teste Fortificada – Sem zoom.

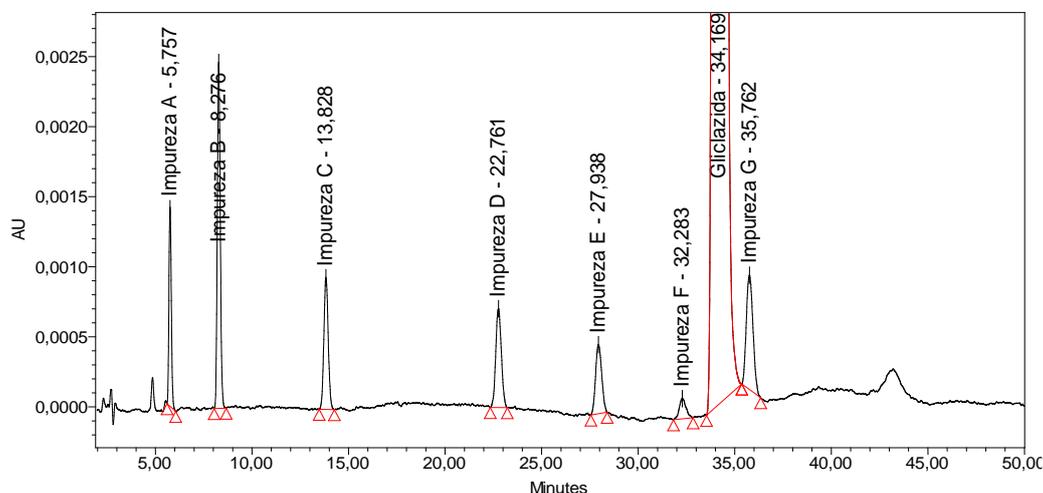


Figura 23: Cromatograma da Solução Teste Fortificada – Com zoom.

Conforme observado na Figura 22 e Figura 23, pode ser observado que as impurezas apresentaram uma separação entre elas e também em relação do pico de Gliclazida, conforme observado no cromatograma da Solução Teste Fortificada.

Para comprovar a sensibilidade do método, foi preparada a Solução Sensibilidade no limite de desconsideração (0,1%) da Gliclazida, no qual a relação sinal/ruído para o pico deve ser superior a 10.

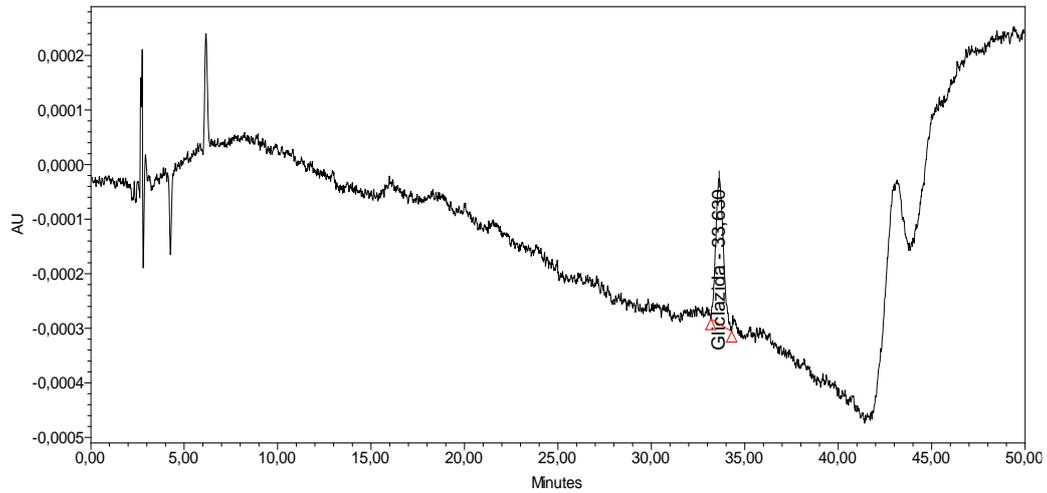


Figura 24: Cromatograma da Solução Sensibilidade.

Além disso, para comprovar que picos oriundos do placebo e diluente não co-eluem com o pico dos analitos de interesse, foram injetados *Solução Placebo* e *Solução Diluente*, cujo cromatogramas estão apresentados na Figura 25 e Figura 26.

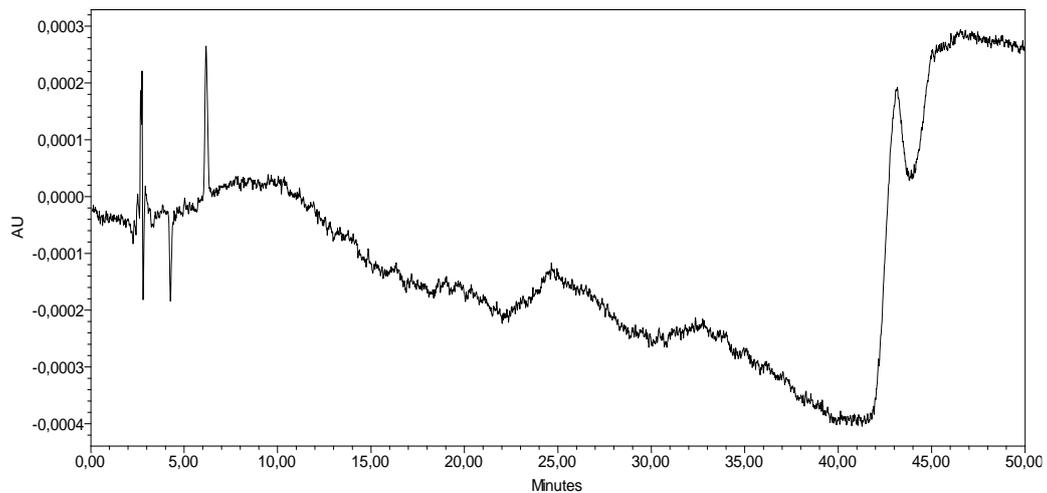


Figura 25: Cromatograma da Solução Placebo.

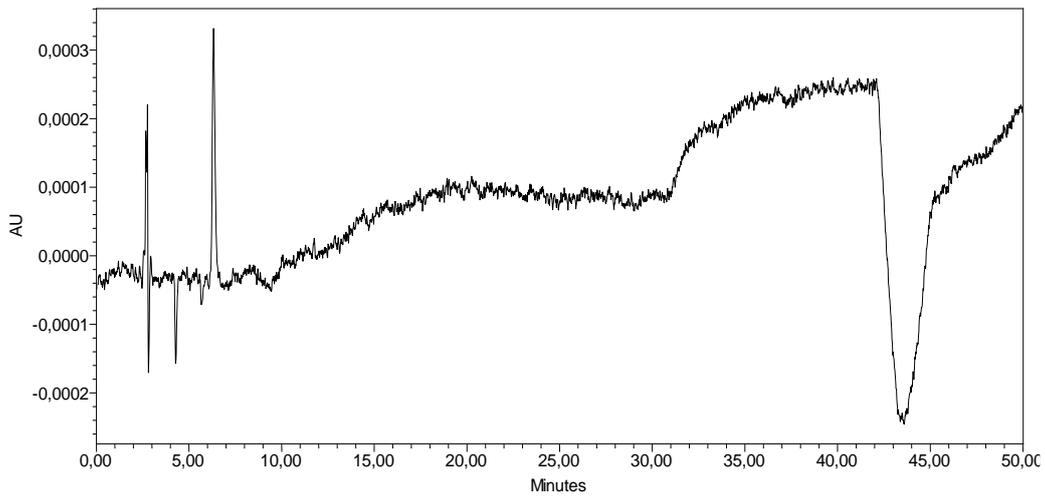


Figura 26: Cromatograma da Solução Branco.

Desta forma, para confirmar o tempo de retenção da Gliclazida, foi injetado uma Solução Padrão SR e uma Solução Padrão Doseamento, cujo cromatograma estão apresentados na Figura 27 e Figura 28, com tempo de retenção aproximado de 34 minutos, conforme descrito em metodologia.

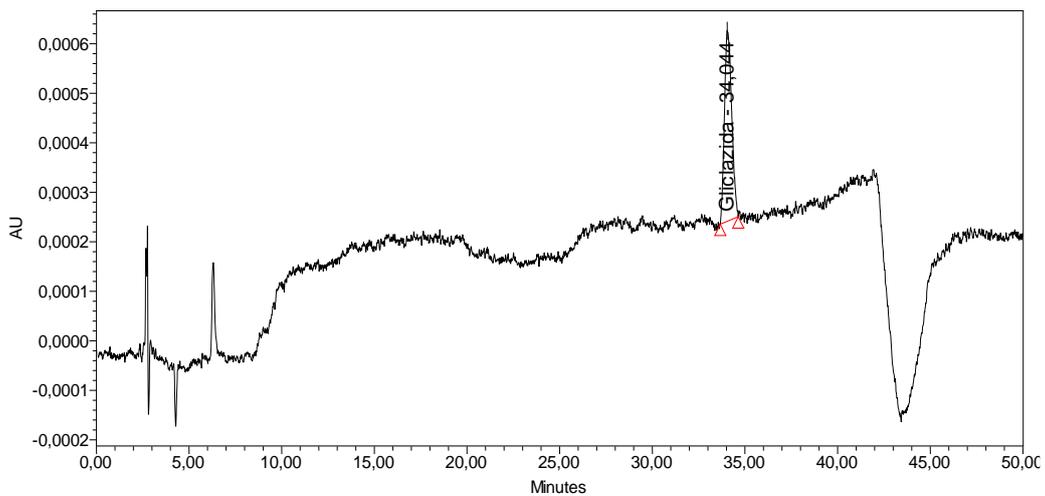


Figura 27: Cromatograma Solução Padrão SR.

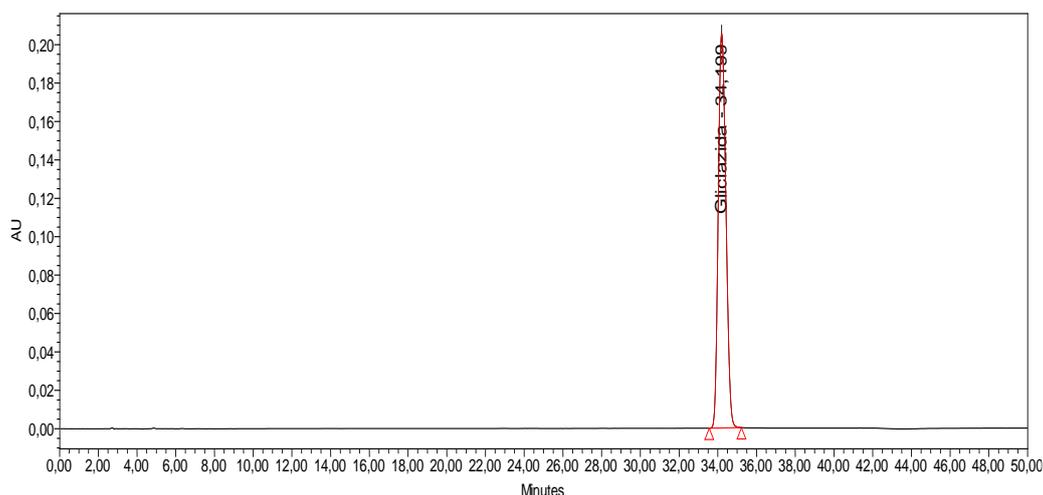


Figura 28: Cromatograma Solução Padrão Teor.

5.3.1 Exposição com Água Purificada

Na Tabela 33, estão apresentados os resultados dos teores e impurezas/produtos de degradação obtidos para as amostras de Gliclazida, tanto para as *Soluções Controle* quanto para as *Soluções Teste* de produto acabado e matéria-prima submetidas a exposição. Foram realizadas duas coletas durante o estudo: a primeira coleta ocorreu no tempo 0 (T0) e a segunda coleta após 10 dias da solução armazenada em bancada. O T0 apresentou o teor semelhante a controle, no entanto após 10 dias de exposição foi observado o decaimento do teor do ativo com resultados próximos a 10%, sendo que a matéria-prima apresentou uma queda de teor maior que no produto acabado e a recuperação das soluções frente a Solução Controle apresentou um balanço de massa dentro do esperado.

Tabela 33: Resultados das soluções em exposição em água purificada para as amostras de matéria-prima e produto acabado.

Amostra	Tipo de Amostra	Teor (%)	Impurezas				Decaimento (%)	Balanço de Massa
			Produtos de Degradação	Impureza A	Impureza G	Total de Impureza		
Matéria - Prima	Controle	98,96	-	-	-	-	-	-
	H2O T0	99,72	-	0,10	-	0,10	-	101
	H2O 10 dias	88,89	0,16	4,78	-	4,94	10,07	95
Produto Acabado	Controle	93,81	-	-	-	-	-	-
	H2O T0	94,81	-	0,12	-	0,12	-	101
	H2O 10 dias	87,08	0,33	4,57	-	4,89	6,73	98

acabado e da matéria-prima para ambos os fabricantes na solução controle, T0 e após 10 dias de exposição em água purificada. A análise de pureza espectral do pico de Gliclazida se mostrou satisfatória e o balanço de massas para todas amostras em todos os tempos foi satisfatório.

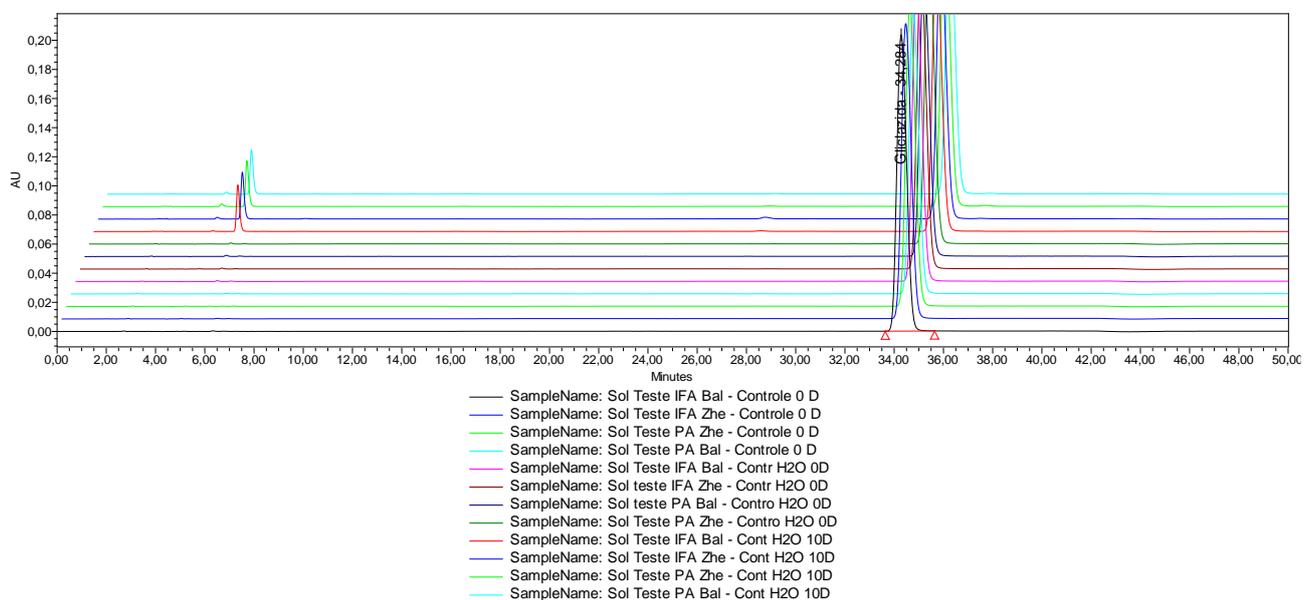


Figura 30: Cromatograma sobreposto da matéria-prima e produto acabado no controle e com a exposição em água purificada.

Durante o estudo da exposição da Gliclazida com Água Purificada, nenhuma substância na Solução Branco e Solução Placebo contribuiu de forma inadequada para seletividade do método analítico, uma vez que não foi observada a eluição de picos dos solventes próximos ao tempo de retenção da Gliclazida. O cromatograma sobreposto da solução branco água purificada em comparação com a solução branco controle é observada na Figura 31.

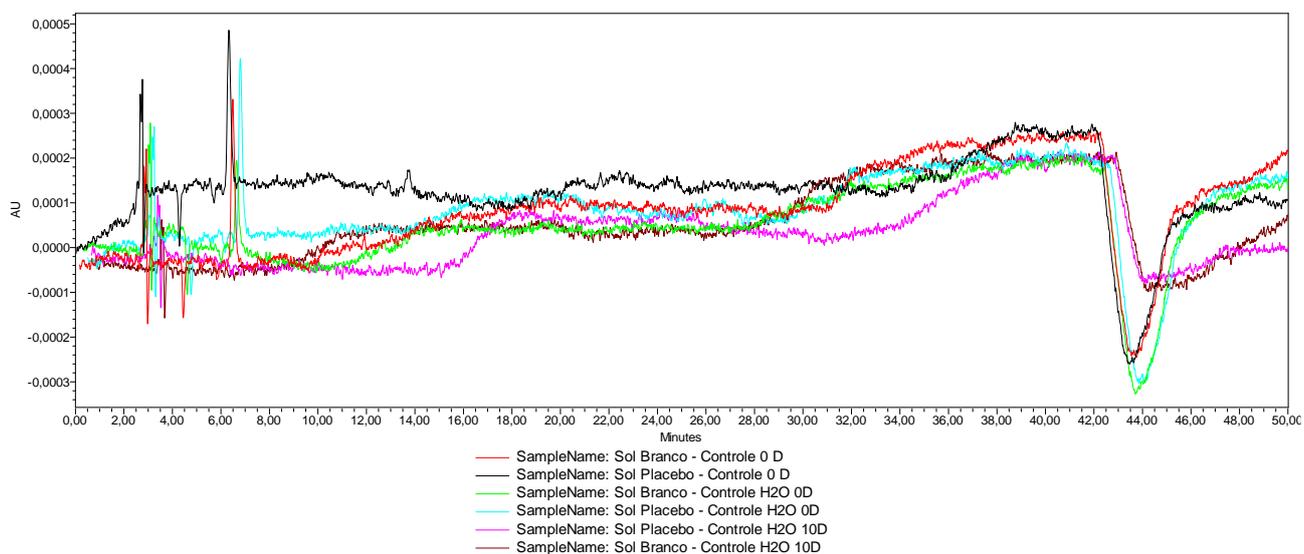


Figura 31: Sobreposição dos cromatogramas das Soluções Diluente, Diluente Água Purificada, Placebo Controle e Placebo Água Purificada.

5.3.2 Estresse Ácido – HCl 0,1M

Na Tabela 34, estão apresentados os resultados dos teores e impurezas/produtos de degradação obtidos para as amostras de Gliclazida, tanto para as Soluções Controle quanto para as Soluções Teste de produto acabado e matéria-prima submetidas a exposição. Foram realizadas quatro coletas durante o estudo, afim de avaliar o perfil de degradação do ativo. A primeira coleta ocorreu no tempo 0 (T0), a segunda coleta após 50 minutos de degradação, a terceira coletar após 90 minutos e a quarta coleta com 180 minutos ou 2 horas de degradação. O T0 apresentou o teor semelhante a controle, no entanto após 10 dias de exposição foi observado o decaimento do teor do ativo com resultados próximos a 10%, sendo que a matéria-prima apresentou uma queda de teor maior que no produto acabado e a recuperação das soluções frente a Solução Controle apresentou um balanço de massa dentro do esperado.

Tabela 34: Resultados das soluções em estresse ácido para as amostras de matéria-prima e produto acabado.

Amostra	Tipo de Amostra	Teor (%)	Impurezas				Decaimento (%)	Balanço de Massa
			Produtos de Degradação	Impureza A	Impureza G	Total de Impureza		
Matéria - Prima	Controle	98,96	-	-	-	-	-	-
	HCl T0	101,19	-	0,55	-	0,55	-	103
	HCl 50 min	97,67	-	2,37	-	2,37	1,29	101
	HCl 90 min	88,09	0,11	5,35	-	5,46	10,87	95
	HCl 2 hrs	83,43	0,21	7,30	-	7,51	15,53	92
Produto Acabado	Controle	93,81	-	-	-	-	-	-
	HCl T0	96,69	0,12	0,24	-	0,36	-	103
	HCl 50 min	92,59	0,11	2,53	-	2,64	1,22	102
	HCl 90 min	89,14	0,11	4,31	-	4,42	4,67	100
	HCl 2 hrs	84,99	-	6,05	-	6,05	8,82	97

A partir de 50 min de exposição do ativo a condição de estresse ácido, o decaimento do teor de ativo foi observado e ao mesmo tempo nota-se a formação da Impureza A de maneira majoritária em relação aos outros produtos de degradação, ocorrendo tanto para o produto acabado quanto para a matéria-prima para ambos os fabricantes testados.

Os resultados apresentados acima demonstraram que a matéria-prima obteve uma degradação mais acentuada que o produto acabado para ambos os fabricantes. Os tempos analisados demonstraram que a medida que o analito degrada, ocorre o aumento significativo da Impureza A na mesma proporção, sendo o produto de degradação majoritário na via de degradação e vai de acordo com o que a bibliografia demonstra a respeito.

A molécula de Gliclazida é altamente suscetível a hidrólise ácida, conforme descrito por Bansal et al., (2008), Gumieniczek et al., (2013) e Doomkaew et al., (2014). Essa degradação acontece no grupo funcional de sulfonilureias presente na estrutura da Gliclazida, que são hidrolisados em sulfonamida e amida, com a liberação de CO₂ após a clivagem da ligação carbono nitrogenio da amida (N-CO). A clivagem desta ligação é favorecida via catalize ácida, devido a protonação do oxigênio carbonílico (protonação O) ou do nitrogênio da amida (protonação N). Em uma segunda etapa, ocorre o ataque nucleofílico de uma molécula de água ao carbono carbonílico, conforme apresentado na Figura 32 [2].

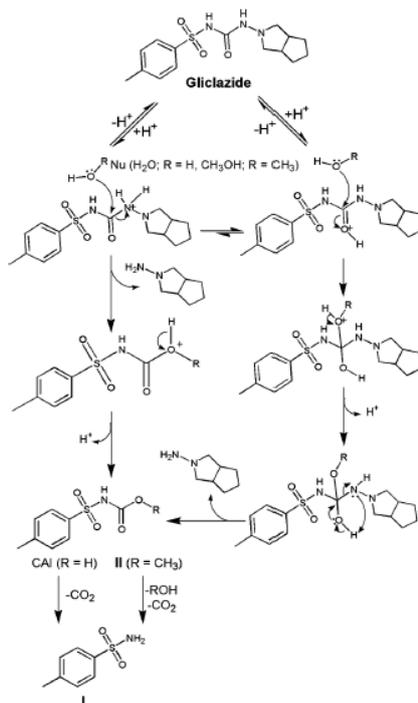


Figura 32: Rota de degradação da Gliclazida em meio ácido. (Bansal et al., 2008).

Vale destacar que, na hidrólise da Gliclazida ocorre a formação de produtos como CO_2 [2]. Os detectores fotométricos não apresentam habilidade para detecção de tais moléculas, uma vez que a diferença de energia entre os orbitais HOMO e LUMO presentes nestes compostos é demasiadamente alta, desta forma apresentando absorção de energia fora da faixa do UV-Vis. Entretanto, como a hidrólise, acontece na região central da molécula da Gliclazida, conforme Figura 33, a estrutura que representa a Impureza A (Left side) apresenta absorvidade no detector utilizado. Com base nisso, justifica-se as diferenças encontradas no cálculo de balanço de massas obtidos na Tabela 34, a qual correlaciona a queda de teor do ativo e elevação do percentual dos produtos de degradação formados.

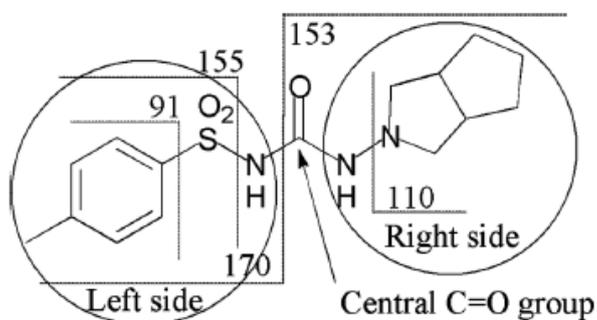


Figura 33: Fragmentação representativa da Gliclazida.

Na Figura 34 é apresentado o perfil cromatográfico sobreposto do produto acabado e da matéria-prima nos tempos amostrados de T0, T50 min, T90 min e T2 horas de degradação. A análise de pureza espectral do pico de Gliclazida se mostrou satisfatória.

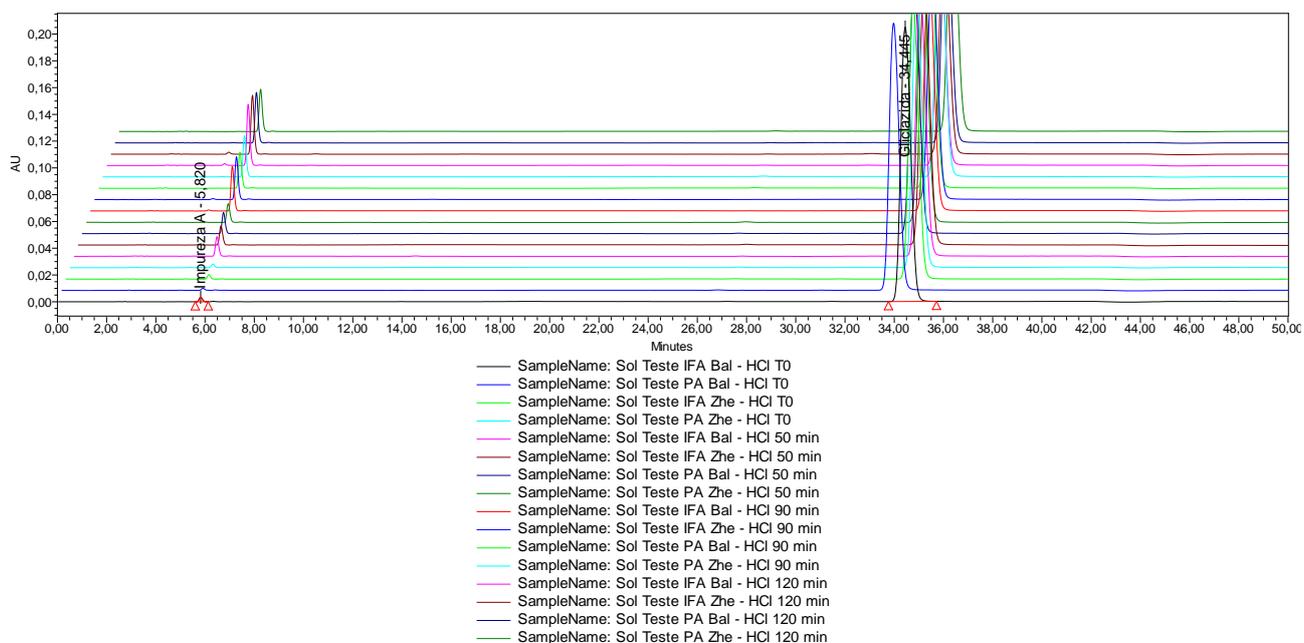


Figura 34: Cromatograma sobreposto da matéria-prima e produto acabado sob estresse ácido.

Durante o estudo de estresse ácido da Gliclazida, nenhuma substância na Solução Branco e Solução Placebo contribuiu de forma inadequada para seletividade do método analítico, uma vez que não foi observada a eluição de picos dos solventes próximos ao tempo de retenção da Gliclazida. O cromatograma sobreposto da Solução Diluente Ácido e da Solução Placebo Ácido é observado na Figura 35.

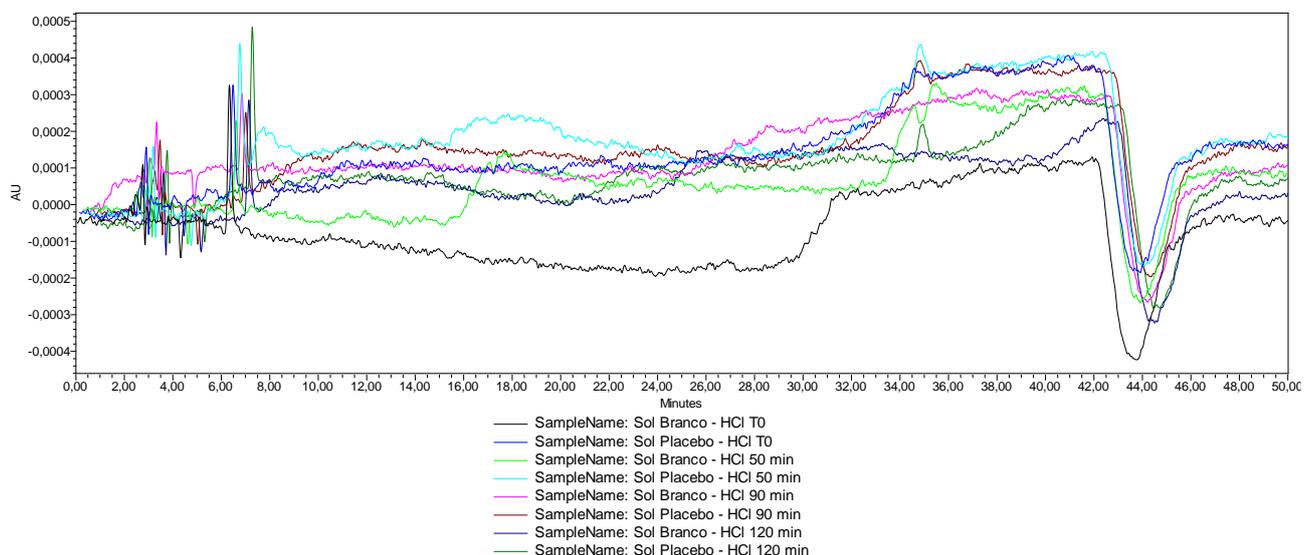


Figura 35: Sobreposição dos cromatogramas das Soluções Diluente ácido e Placebo ácido.

5.3.3 Estresse Alcalino – NaOH 1M

Na Tabela 35, estão apresentados os resultados dos teores e

impurezas/produtos de degradação obtidos para as amostras de Gliclazida, tanto para as Soluções Controle quanto para as Soluções Teste de produto acabado e matéria-prima submetidas a exposição ao estressante. Foi realizada apenas uma coleta após 10 dias de degradação. A matéria-prima se mostrou estável ao longo do estudo de degradação, no entanto o produto acabado apresentou um decaimento acentuado maior que 10% frente a Solução Controle. Porém, com a formação dos produtos de degradação, o estudo apresentou um balanço de massa dentro do esperado.

Tabela 35: Resultados das soluções em estresse alcalino para as amostras de matéria-prima e produto acabado.

Amostra	Tipo de Amostra	Teor (%)	Impurezas				Decaimento (%)	Balanço de Massa
			Produtos de Degradação	Impureza A	Impureza G	Total de Impureza		
Matéria - Prima	Controle	98,96	-	-	-	-	-	-
	NaOH 10 dias	102,27	0,59	-	-	0,59	-	104
Produto Acabado	Controle	93,81	-	-	-	-	-	-
	NaOH 10 dias	77,96	25,16	0,58	-	25,74	15,85	111

Neste estudo, as amostras foram estressadas utilizando uma concentração de NaOH 1M, por um período de 10 dias.

No período de estresse alcalino, notou-se que apenas no produto acabado foi observado uma degradação acentuada do ativo, diferente do que foi observado na matéria-prima, onde não ocorreu o decaimento do ativo. Diferente das degradações anteriores, a Impureza A não apresentou uma formação tão significativa e nesta condição não foi a formação majoritária, sendo que a impureza inespecífica RRT 0,914 apresentou uma formação de 19 %.

Segundo Bansal et al., (2008) e Guimieniczek et al., (2013), a molécula de Gliclazida também apresenta alta susceptibilidade a degradação em meio básico. Doomkaew et al., (2014), reporta que a molécula de Gliclazida apresenta maior resistência ao estresse alcalino quando comparado ao estresse ácido. Estes resultados são semelhantes aos encontrados neste estudo, onde a molécula de Gliclazida apresentou taxa de decaimento do ativo menor em condições básicas em relação a condição ácida, quando é analisado o tempo de exposição x decaimento de teor.

Diante do exposto, a hidrólise do grupamento sulfonilureia ocorre principalmente via catalise ácida, o qual favorece o ataque nucleofílico a carbonila e, concomitantemente, a clivagem e formação da Impureza A, Figura 32. No entanto, para a adição da solução de hidróxido de sódio, o cenário é diferente, pois em vez de ter a presença de íons H⁺, possui íons OH⁻, desencadeando uma rota de degradação diferente do que na hidrólise, apesar de que pelo tempo de exposição da molécula frente ao solvente, ocasiona uma baixa formação da Impureza A, pela baixa estabilidade do ativo durante o período do estresse.

Bansal et al., (2008), apresenta em seus estudos de LC/ESI-MS, a hidrólise básica além de apresentar mecanismo já citado no item de hidrólise ácida, ele pode ocasionar a formação de outras impurezas. Uma delas é reportada como a impureza VI visualizada em seu estudo, sendo que a mesma é formada apenas em meio básico. O caminho de formação da impureza IV é apresentado na Figura 36.

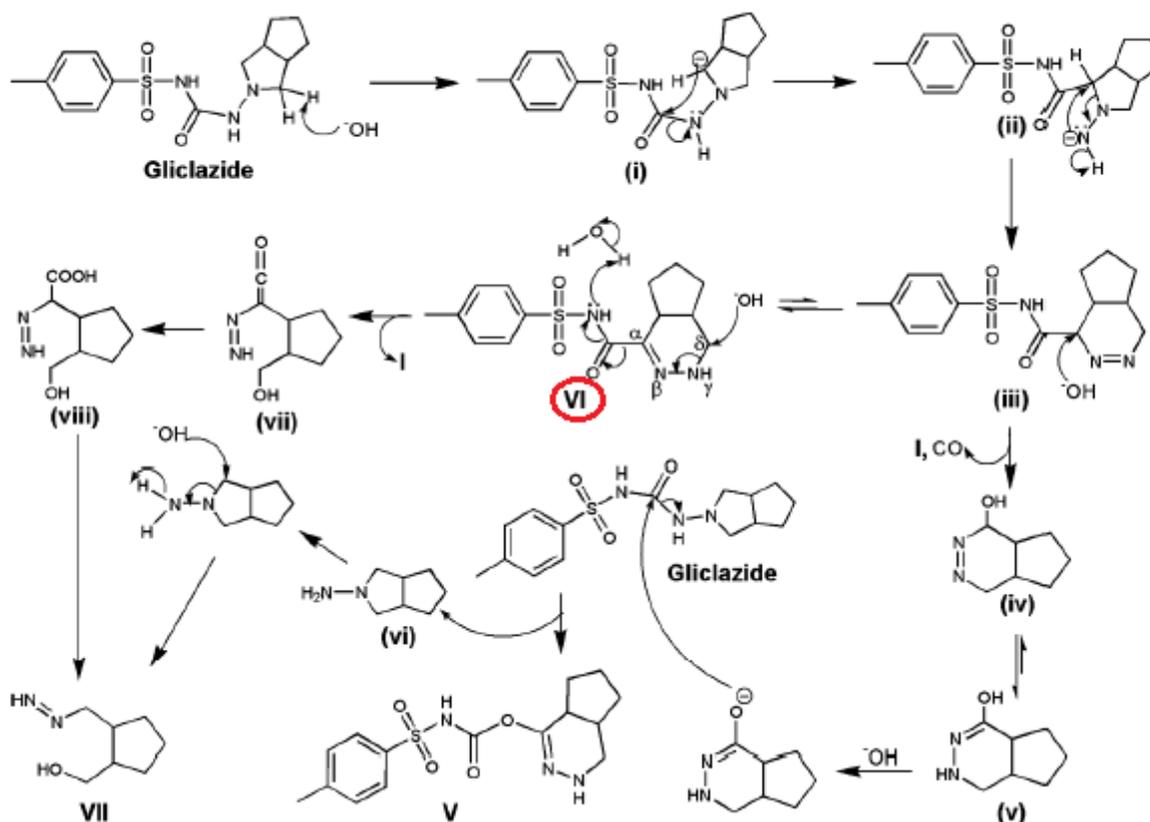


Figura 36: Caminho de formação da impureza VI.

A perda do α -hidrogênio do anel fundido da pirrolidina em meio alcalino gera um carbânion (i), este carbânion realiza um ataque no carbono eletrofílico da amida, $C=O$, que resulta na formação de um nitrânion (ii), este último sofre então uma expansão do anel para formação do produto (iii), que se transforma em isômero estável do produto VI [2]. Bansal et al. (2008), também reporta a formação de dois outros produtos em meio alcalino, compostos V e VII, gerados a partir do composto VI, conforme indicado na Figura 36.

Na Figura 37, é apresentado o perfil cromatográfico sobreposto do produto acabado e da matéria-prima para ambos os fabricantes após 10 dias de degradação. A análise de pureza espectral do pico de Gliclazida se mostrou satisfatória.

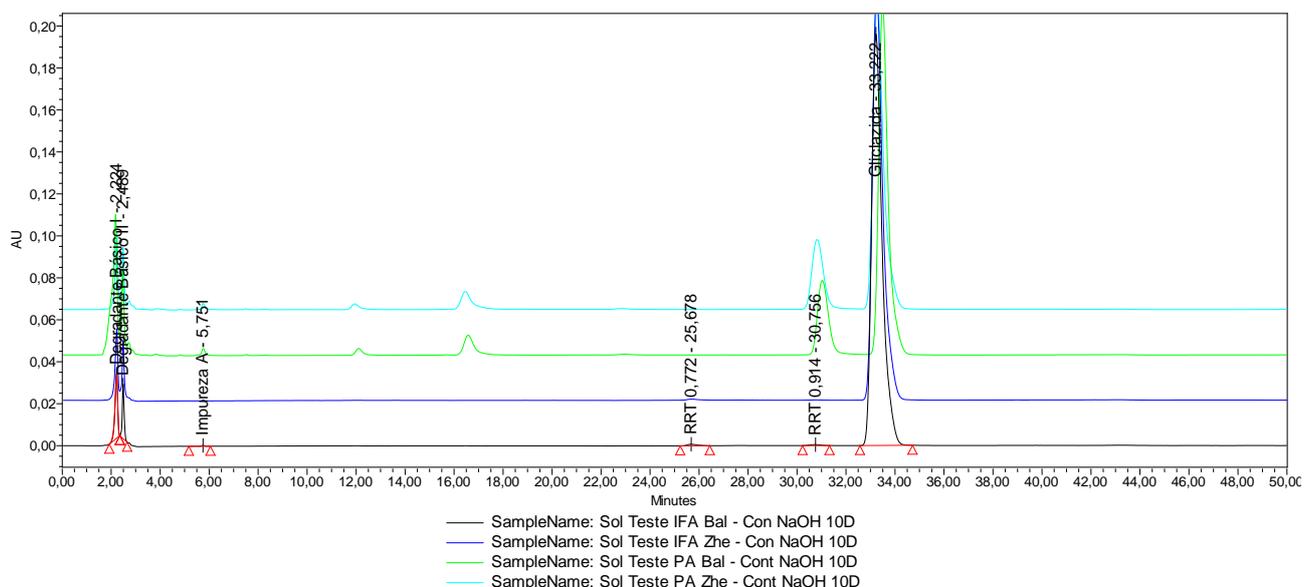


Figura 37: Cromatograma sobreposto da matéria-prima e produto acabado sob estresse alcalino.

Durante o estudo de estresse alcalino da Gliclazida, nenhuma substância na Solução Branco e Solução Placebo contribuiu de forma inadequada para seletividade do método analítico, uma vez que não foi observada a eluição de picos dos solventes próximos ao tempo de retenção da Gliclazida. O cromatograma sobreposto da Solução Diluente Alcalino e da Solução Placebo Alcalino é observado na Figura 38.

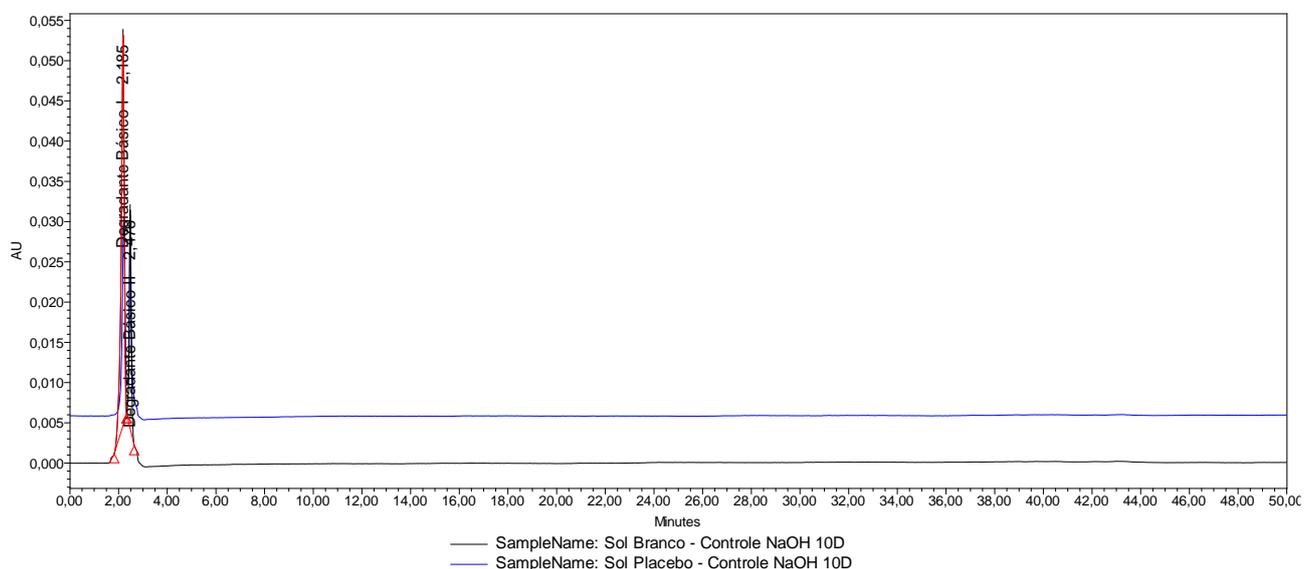


Figura 38: Sobreposição dos cromatogramas das Soluções Diluente alcalino e Placebo alcalino.

5.3.4 Estresse Oxidativo – H₂O₂ 1,5%

Na Tabela 36, estão apresentados os resultados dos teores e impurezas/produtos de degradação obtidos para as amostras de Gliclazida, tanto para as *Soluções Controle* quanto para as *Soluções Teste* de produto acabado e matéria-prima submetidas a exposição oxidativa. Foram realizadas três coletas durante o estudo, afim de avaliar o perfil de degradação do ativo. A primeira coleta ocorreu após 3 dias, a segunda coleta após 7 dias e a terceira coleta após 10 dias de degradação. Com 3 dias de degradação já começou a ser observado um decaimento do ativo. Após 7 dias de exposição já foi observado o decaimento superior a 15 % tanto para o produto acabado quanto para a matéria-prima. E com 10 dias o decaimento do teor passou dos 20 %.

Tabela 36: Resultados das soluções em estresse oxidativo para as amostras de matéria-prima e produto acabado.

Amostra	Tipo de Amostra	Teor (%)	Impurezas				Decaimento (%)	Balanço de Massa
			Produtos de Degradação	Impureza A	Impureza G	Total de Impureza		
Matéria - Prima	Controle	98,96	-	-	-	-	-	-
	H ₂ O ₂ 3 dias	95,69	1,61	2,51	-	4,12	3,27	101
	H ₂ O ₂ 7 dias	82,88	4,98	5,81	0,58	11,37	16,08	95
	H ₂ O ₂ 10 dias	75,80	6,88	8,00	0,96	15,84	23,16	93
Produto Acabado	Controle	93,81	-	-	-	-	-	-
	H ₂ O ₂ 3 dias	88,22	3,00	3,12	0,15	6,27	5,59	101
	H ₂ O ₂ 7 dias	76,60	8,73	7,49	0,90	17,12	17,21	100
	H ₂ O ₂ 10 dias	72,90	9,22	9,96	1,30	20,48	20,91	100

Neste estudo, as amostras foram estressadas utilizando uma concentração de H₂O₂ 1,5%, por um período de 10 dias.

Após 7 dias de degradação, as amostras já apresentaram um decaimento de teor superior a 10%. Nesta condição, já notamos o surgimento de vários produtos de degradação, incluindo a Impureza A e Impureza G. E com 10 dias de degradação, foi obtido uma degradação que superou os 20 % de degradação, onde foi obtido para todas as amostras uma formação de praticamente 10 % da Impureza A e 1,3% da Impureza G. Com os resultados expostos, a Impureza A foi o composto majoritário formado. No entanto, este fator de degradação está associado a soma de fatores que foram expostos a molécula de Gliclazida, como a água purificada, o diluente e o agente estressante. Essa relação desencadeou na molécula uma série de rotas de degradação que se assemelharam com o que já foi reportado nos estresses ácidos e alcalinos. A hidrólise do agrupamento funcional sulfonilureia, acarretou na formação da Impureza A, conforme já explicado no item 5.2.2.

Por outro lado, não foi apenas o mecanismo da hidrólise ácida que foi desencadeado, o peróxido de hidrogênio acelerou o processo de degradação e formação de impurezas na via alcalina, obtendo uma formação do mesmo composto formado na degradação básica. No entanto, em um meio alcalino o processo de degradação e formação de impurezas ocorre de maneira mais lenta e gradativa, mas com a presença do agente oxidativo o processo de degradação foi acelerado formando mais rapidamente o produto de degradação do processo, justificando o decaimento do teor superior ao que foi observado no controle com água purificada.

Para justificar tal argumento, em estudos reportados por Bansal et al. (2008), foi reportada uma grande estabilidade da molécula de Gliclazida frente a processos oxidativos, com decaimento insignificante (< 1%) quando exposto a peróxido 30% por aproximadamente 72 horas. Segundo Noda et al., (2000), Gliclazida possui ação antioxidante, que está relacionada com a estrutura molécula, a qual possui um único anel aminozabicyclo-octano enxertado na sulfoniluréia. A Gliclazida reduz a peroxidação lipídica, conforme apontado por vários estudos. Além disso, aliado a característica sequestradora de radicais da molécula, existe a indisposição de oxidação dos sítios, já que a maioria dos átomos já se encontram em elevados estados de oxidação, justificando a ausência de diferentes subprodutos ou elevados decaimentos [32,40]. Diante do exposto e conforme embasamento crítico-científico dos dados repostados na literatura, conclui-se que o decaimento do teor e a formação de impurezas deu-se pela falta de estabilidade do ativo em solução e não pelo agente estressante utilizado neste estudo. Com isso, a Gliclazida apresenta certa estabilidade em condições normais.

Na Figura 39, é apresentado o perfil cromatográfico sobreposto do produto acabado e da matéria-prima para ambos os fabricantes após 10 dias de degradação. A análise de pureza espectral do pico de Gliclazida se mostrou satisfatória.

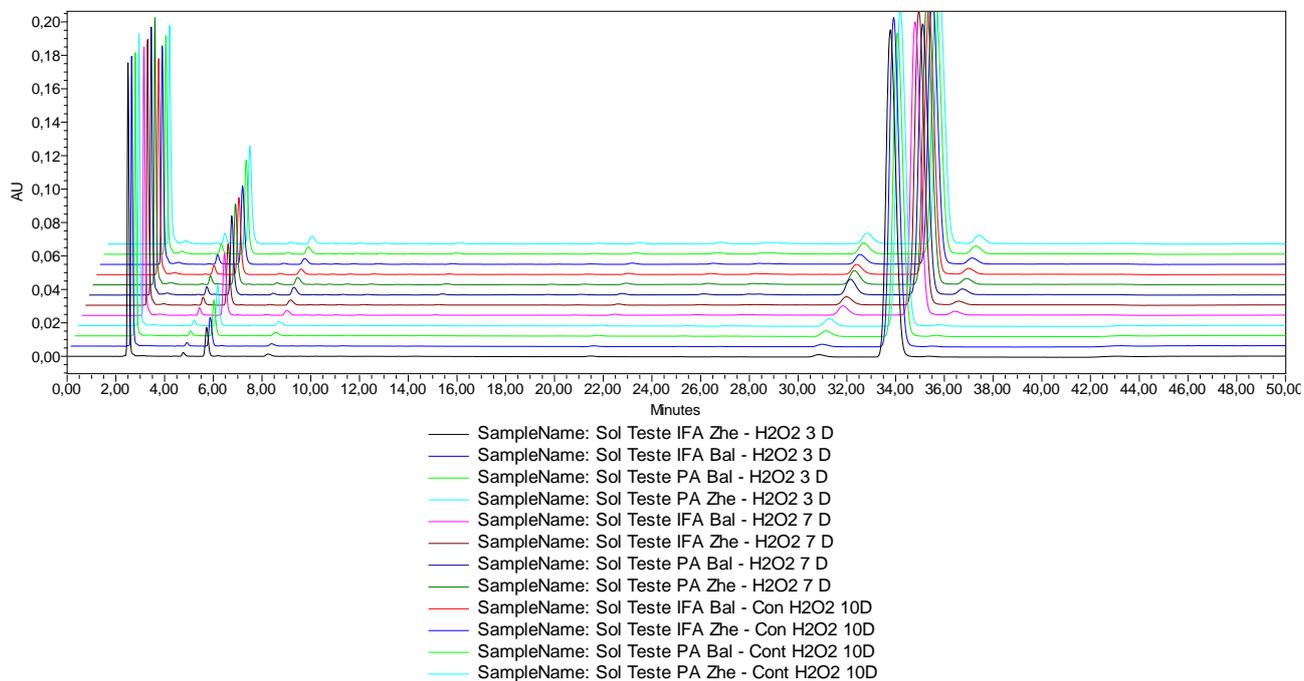


Figura 39: Cromatograma sobreposto matéria-prima e produto acabado da degradação oxidativa.

Durante o estudo de estresse oxidativo da Gliclazida, nenhuma substância na Solução Branco e Solução Placebo contribuiu de forma inadequada para seletividade do método analítico, uma vez que não foi observada a eluição de picos dos solventes próximos ao tempo de retenção da Gliclazida. O cromatograma sobreposto da Solução Diluente Oxidativo e da Solução Placebo Oxidativo é observado na Figura 40.

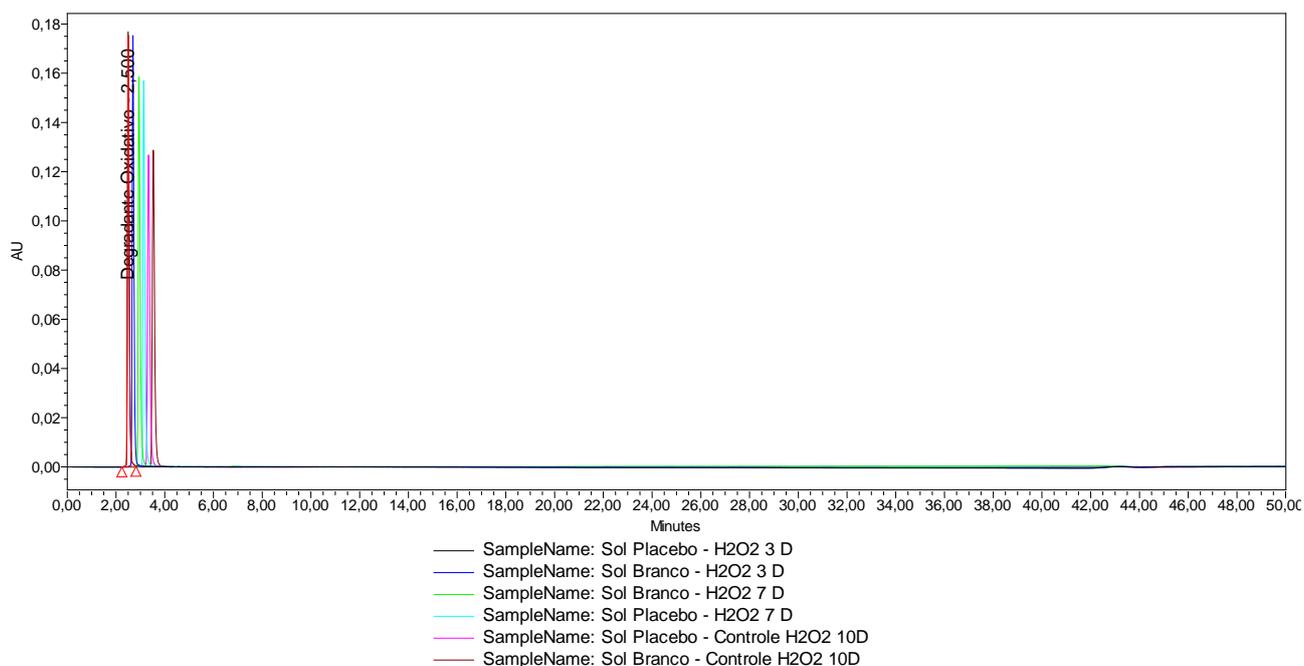


Figura 40: Sobreposição dos cromatogramas das Soluções Diluente oxidativo e Placebo oxidativo.

5.3.5 Estresse por Íons Metálicos – FeCl₃ 10 mM

Na Tabela 37, estão apresentados os resultados dos teores e impurezas/produtos de degradação obtidos para as amostras de Gliclazida, tanto para as *Soluções Controle* quanto para as *Soluções Teste* de produto acabado e matéria-prima submetidas a exposição por íons metálicos. Foram realizadas quatro coletas durante o estudo, afim de avaliar o perfil de degradação do ativo. A primeira coleta ocorreu no tempo 0 (T0), a segunda coleta após 1 hora de degradação, a terceira coletar após 3 horas e a quarta coleta com 4 horas de degradação. Já no T0 foi observado um decaimento considerável do teor do ativo, principalmente para os dois fabricantes na matéria-prima.

O produto acabado ocorreu o decaimento, no entanto de maneira mais moderada. Após 3 horas de exposição já foi observado o decaimento superior a 10 % tanto para o produto acabado quanto para a matéria-prima. A recuperação das soluções frente a Solução Controle apresentou um balanço de massa dentro do esperado.

Tabela 37: Resultados das soluções em estresse por íons metálicos para as amostras de matéria-prima e produto acabado.

Amostra	Tipo de Amostra	Teor (%)	Impurezas				Decaimento (%)	Balanço de Massa
			Produtos de Degradação	Impureza A	Impureza G	Total de Impureza		
Matéria - Prima	Controle	98,96	-	-	-	-	-	-
	FeCl ₃ T0	86,30	11,15	2,18	-	13,33	12,66	101
	FeCl ₃ 1 hora	80,11	15,22	4,19	-	19,39	18,85	101
	FeCl ₃ 3 horas	76,55	14,61	5,32	-	19,93	22,41	97
	FeCl ₃ 6 horas	72,83	15,27	7,24	-	22,51	26,13	96
Produto Acabado	Controle	93,81	-	-	-	-	-	-
	FeCl ₃ T0	90,62	3,05	1,47	-	4,52	3,19	101
	FeCl ₃ 1 hora	87,63	5,67	2,48	-	8,15	6,18	102
	FeCl ₃ 3 horas	82,15	7,49	3,34	-	10,83	11,66	99
	FeCl ₃ 6 horas	79,03	7,49	4,31	-	11,80	14,78	97

Neste estudo, as amostras foram estressadas utilizando uma concentração de FeCl_3 , por um período de 6 horas.

Na primeira coleta no tempo 0, foi observado principalmente na matéria-prima uma degradação acentuada do ativo, superando os 10% de degradação. Foi observado dois produtos de degradação desconhecidos e identificados como RRT 0,423 e RRT 0,914, juntamente com a Impureza A, formada em outros estresses já mencionados anteriormente. Por outro lado, o produto acabado apresentou uma degradação mais branda, próxima do 5% para os dois fabricantes, apresentando os mesmos produtos de degradação observados na matéria-prima.

A Gliclazida se mostrou tão suscetível a degradação por íons metálicos, que após 1 hora de degradação, a matéria-prima chegou a apresentar decaimento próximo dos 19% e o produto acabado próximo aos 10%, mantendo os mesmos produtos de degradação que surgiram no tempo 0, no entanto com uma recuperação maior de forma proporcional ao decaimento do ativo.

Com 3 e 6 horas a velocidade de reação diminuiu, as matérias-primas apresentaram decaimento superior a 20% e os produtos acabados próximo dos 15%. Juntamente com a degradação ácida, a molécula de Gliclazida apresentou uma considerável instabilidade, formando produtos de degradação.

Com a presença da água purificada e da acetonitrila em união aos íons metálicos, desencadeou na molécula uma série de rotas de degradação que se assemelharam com o que já foi reportado nos estresses ácidos e alcalinos. A hidrólise do agrupamento funcional sulfonilureia, acarretou na formação da Impureza A, conforme já explicado no item 5.3.2.

Por outro lado, não foi apenas o mecanismo da hidrólise ácida que foi desencadeado, o íon metálico reagindo juntamente com a acetonitrila acelerou o processo de degradação e formação de impurezas na via alcalina, obtendo uma formação do mesmo composto formado na degradação básica. No entanto, em um meio alcalino o processo de degradação e formação de impurezas ocorre de maneira mais lenta e gradativa, mas com a presença do íon metálico o processo de degradação foi acelerado formando mais rapidamente o produto de degradação do processo, justificando o curto período de tempo que o analito esteve em exposição ao estressante e o decaimento do teor tão rápido e acentuado observado através das análises dos resultados.

Na Figura 41, é apresentado o perfil cromatográfico sobreposto do produto acabado e da matéria-prima para ambos os fabricantes no T0, T1 hora, T3 horas e T6 horas de degradação. A análise de pureza espectral do pico de Gliclazida e o balanço de

massa se mostrou satisfatório.

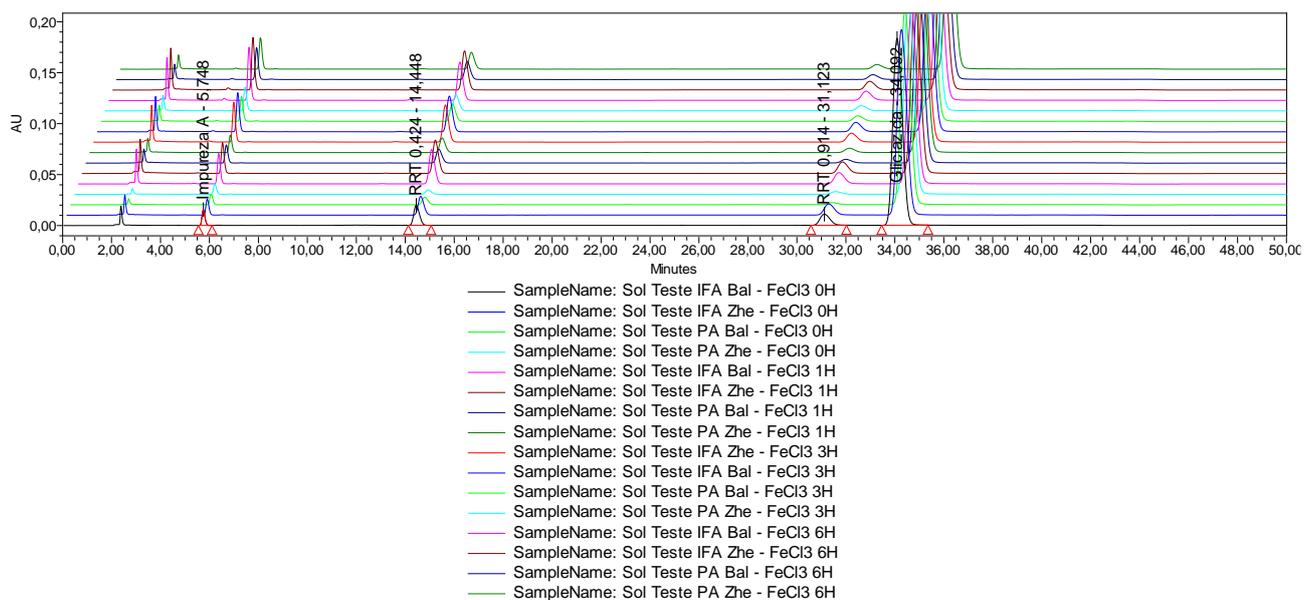


Figura 41: Cromatograma sobreposto da matéria-prima e produto acabado sob estresse por íons metálicos.

Durante o estudo de estresse por íons metálicos da Gliclazida, nenhuma substância na Solução Branco e Solução Placebo contribuiu de forma inadequada para seletividade do método analítico, uma vez que não foi observada a eluição de picos dos solventes próximos ao tempo de retenção da Gliclazida. O cromatograma sobreposto da Solução Diluente Íons Metálicos e da Solução Placebo Íons Metálicos é observado na Figura 42.

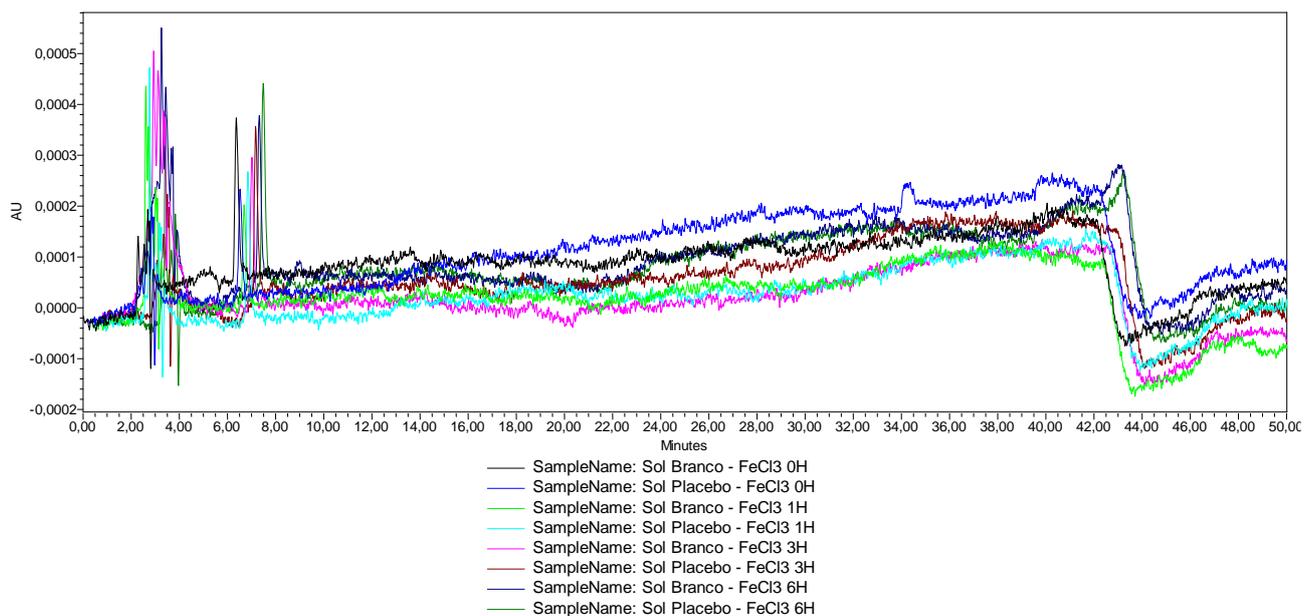


Figura 42: Sobreposição dos cromatogramas das Soluções Diluente íons metálicos e Placebo íons metálicos.

5.3.6 Estresse Fotolítico, Úmido e Térmico

Na Tabela 38, estão apresentados os resultados dos teores e impurezas/produtos de degradação obtidos para as amostras de Gliclazida, tanto para as Soluções Controle quanto para as Soluções Teste de produto acabado e matéria-prima submetidas a exposição ao estressante. Foi realizada apenas uma coleta após 2 ciclos de exposição sob luz UV, após 10 dias de exposição há 40 °C e 75% UR e após 10 dias de exposição há 60 °C. Tanto a matéria-prima quanto o produto acabado se mostraram estáveis após a exposição e não apresentaram decaimento do teor.

Tabela 38: Resultados das soluções em estresse físico (fotolítico, úmido e térmico) para as amostras de matéria-prima e produto acabado.

Amostra	Tipo de Amostra	Teor (%)	Impurezas				Decaimento (%)	Balanço de Massa
			Produtos de Degradação	Impureza A	Impureza G	Total de Impureza		
Matéria - Prima	Controle	98,96	-	-	-	-	-	-
	UV 2 ciclos	101,61	-	-	-	-	-	103
	Úmido 10 dias	99,64	-	-	-	-	-	101
	Térmico 10 dias	99,75	-	-	-	-	-	101
Produto Acabado	Controle	93,81	-	-	-	-	-	-
	UV 2 ciclos	95,14	-	-	-	-	-	101
	Úmido 10 dias	93,25	-	-	-	-	-	99
	Térmico 10 dias	94,31	-	-	-	-	-	101

A partir da análise das amostras submetidas as degradações físicas, foi possível observar que não ocorreram decaimentos significativos do teor de Gliclazida em nenhuma das condições avaliadas. Concomitantemente, os produtos de degradação formados foram obtidos em baixa proporção, sendo que, nenhum dos produtos formado apresentaram resolução inferior a 1,5 em relação ao pico de Gliclazida.

Os resultados apresentados condizem com os reportados por Bansal et al., (2008) e Rao e Nikalje (2011), onde os autores constataram alta estabilidade da molécula de Gliclazida aos estresses térmico e foto, com taxa de decaimento insignificantes.

Na Figura 43, é apresentado o perfil cromatográfico sobreposto do produto acabado e da matéria-prima após 10 dias de exposição para o estresse térmico e úmido, para o estresse fotolítico foram 2 ciclos de exposição em luz UV. A análise de pureza espectral do pico de Gliclazida se mostrou satisfatório para todas as condições.

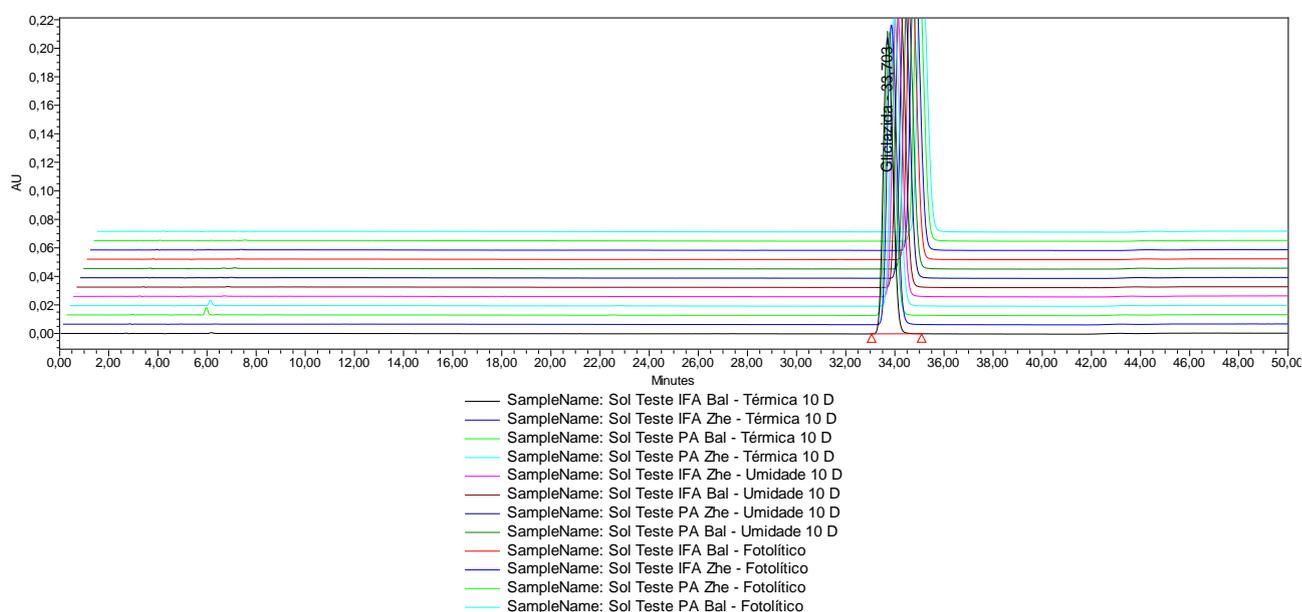


Figura 43: Cromatograma sobreposto da matéria-prima e produto acabado para degradação física (fotolítica, úmida e térmica).

Durante o estudo de estresse por degradações físicas (fotolítica, úmida e térmica) da Gliclazida, nenhuma substância na Solução Placebo contribuiu de forma inadequada para seletividade do método analítico, uma vez que não foi observada a eluição de picos dos solventes próximos ao tempo de retenção da Gliclazida. O cromatograma sobreposto da Solução Placebo Fotolítico, Úmido e Térmico é observado na Figura 44.

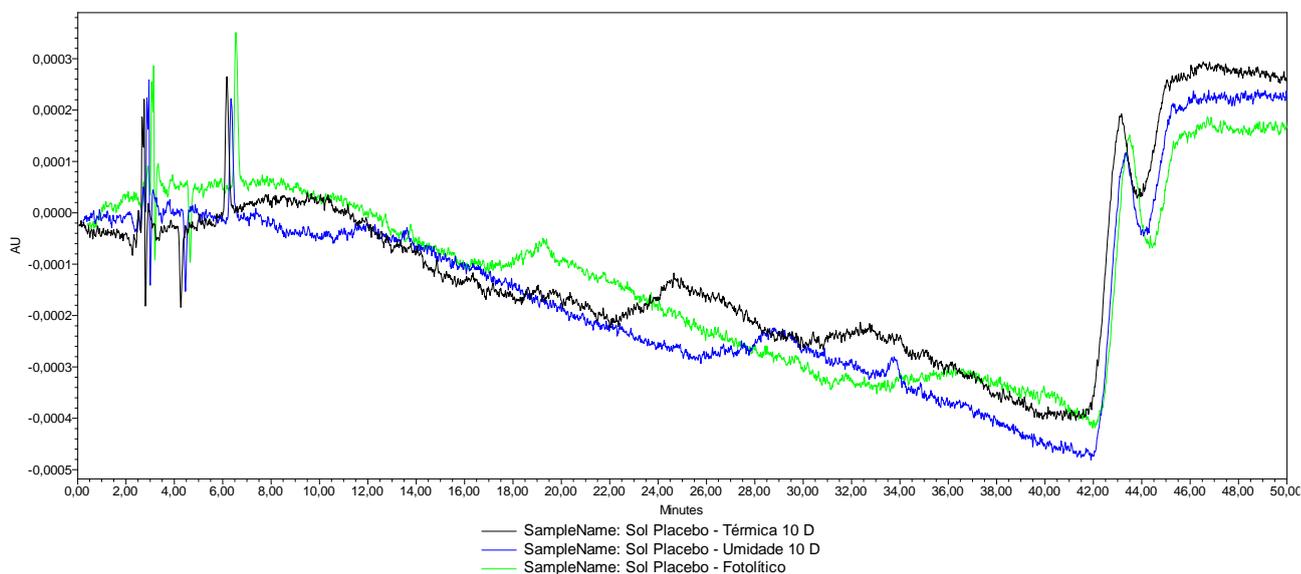


Figura 44: Sobreposição dos cromatogramas das Soluções Placebo de degradações físicas (fotolítico, úmido e térmico).

5.3.7 Conclusão da Estudo de degradação forçada

O diluente e placebo do método não possuem interferentes que comprometem a seletividade do método. As impurezas avaliadas como específicas e as impurezas inespecíficas apresentaram uma separação satisfatória em relação ao pico da Gliclazida, não ocorrendo nenhum prejuízo em sua quantificação.

Destaca-se que durante os estudos de degradação forçada, a molécula de Gliclazida apresentou uma elevada instabilidade nas condições de estresse forçado ácido e por íons metálicos, sendo que no meio básico e oxidativo apresentou uma leve degradação pelo elevado tempo de exposição e uma estabilidade para os estresses físicos de temperatura, fotólise e umidade.

Além disso, comprovou-se a homogeneidade do pico de Gliclazida em todas as condições de estresse avaliadas, não havendo nenhuma impureza eluindo no mesmo tempo de retenção, dados os valores de *Purity Angle* inferiores ao *Purity Threshold* e também pelo *Purity Plot* apresentados nos cromatogramas em anexo.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados expostos, pode-se observar na etapa de desenvolvimento, que os parâmetros cromatográficos foram definidos previamente, afim de garantir que o processo de validação reproduza o método submetendo a avaliação mais crítica.

Com isso, os parâmetros de validação foram capazes de certificar que o método apresenta confiança em sua utilização, tanto na avaliação do ativo Gliclazida quanto de suas impurezas, onde apresentou precisão, exatidão, linearidade, seletividade e robustez, dentro de especificações que estão harmonizadas com legislações internacionais.

Diante disso, o estudo de degradação forçada certificou ainda mais à qualidade do método desenvolvido e validado, onde foi observado possíveis produtos de degradação que poderão ser encontrados no estudo de estabilidade e, que o método apresenta seletividade adequada para que possa ser utilizado tanto na rotina de liberação em controle de qualidade, quanto na utilização para avaliar a estabilidade do produto quando armazenado em condições reais.

Portanto, o método analítico exposto apresenta à confiabilidade, segurança e qualidade esperada para que se possa avaliar criteriosamente o ativo Gliclazida e seus produtos de degradação, sendo um método analítico inovador e passível de utilização na indústria farmacêutica.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho servirá como base para que estudos relacionados com a molécula Gliclazida sejam realizados, a fim de elucidar cada vez mais seu perfil de degradação e conhecimentos dos produtos de degradação, garantindo um produto no mercado de qualidade e segurança, para que todas as pessoas possam tratar suas enfermidades sem que hajam riscos.

Na degradação forçada, observou-se que na hidrólise ácida o balanço de massa ficou próximo a 100%. Isso ocorreu, pois a impureza formada na hidrólise não apresenta grupo cromóforo e impossibilita sua visualização no detector. Diante disso, um método ortogonal por LC-MS seria o mais indicado para identificação do composto e quantificação de formação do mesmo, sendo um possível projeto para trabalhos futuros.

8. ELEMENTOS PÓS-TEXTUAIS

8.1 APÊNDICE I

- **Teste 01**

Preparo das Soluções

Fase Móvel

Transferir 1 mL de Trietilamina e 1 mL de Ácido Trifluoroacético em 1000 mL de uma mistura de água e acetonitrila (55:45). *Homogeneizar*.

Diluyente

Realizar uma mistura de água e acetonitrila na proporção de 55:45.

Preparo das Amostras

Solução Padrão Doseamento

Transferir 10 mg de Gliclazida Padrão para balão volumétrico de 10,0 mL, adicionar 4,5 mL de acetonitrila e levar ao ultrassom até completa solubilização. Após esse tempo, completar o volume do balão com água purificada. Homogeneizar. Transferir 1,2 mL desta solução para balão volumétrico de 20 mL. Completar o volume com diluyente. [Gliclazida] = 60 µg/mL.

Solução Teste Doseamento

Realizar a massa média do produto com não menos que 20 comprimidos. Transferir o equivalente a 30 mg de Gliclazida produto acabado para balão volumétrico de 50,0 mL, adicionar 22,5 mL de acetonitrila e levar ao ultrassom até completa solubilização. Após esse tempo, completar o volume do balão com água purificada. Homogeneizar. Transferir 2 mL desta solução para balão volumétrico de 20 mL. Completar o volume com diluyente. [Gliclazida] = 60 µg/mL.

- **Teste 02**

Preparo das Soluções

Fase Móvel

Realizar Transferir 1 mL de Trietilamina e 1 mL de Ácido Trifluoroacético em 1000 mL de uma mistura de água e acetonitrila (55:45). *Homogeneizar*.

Diluyente

Acetonitrila 100%.

Preparo das Amostras

Solução Padrão Estoque

Transferir 12 mg de Gliclazida Padrão para balão volumétrico de 10,0 mL, adicionar cerca de 5 mL de diluente e levar ao ultrassom até completa solubilização. Após esse tempo, completar o volume do balão com diluente. Homogeneizar. [Gliclazida] = 1200 µg/mL.

Solução Padrão Doseamento

Transferir 1,0 mL da *Solução Padrão Estoque* para balão volumétrico de 20 mL. Completar o volume com diluente. [Gliclazida] = 60 µg/mL.

Solução Padrão SR

Transferir 0,4 mL da *Solução Padrão Doseamento* para balão volumétrico de 20 mL. Completar o volume com diluente. [Gliclazida] = 1,2 µg/mL.

Solução Sensibilidade

Transferir 5 mL da *Solução Padrão SR* para balão volumétrico de 10 mL. Completar o volume com diluente. [Gliclazida] = 0,6 µg/mL.

Solução Teste Doseamento

Realizar a massa média do produto com não menos que 20 comprimidos. Transferir o equivalente a 30 mg de Gliclazida produto acabado para balão volumétrico de 50,0 mL, adicionar 22,5 mL de acetonitrila e levar ao ultrassom até completa solubilização. Após esse tempo, completar o volume do balão com água purificada. Homogeneizar. Transferir 2 mL desta solução para balão volumétrico de 20 mL. Completar o volume com diluente. [Gliclazida] = 60 µg/mL.

- **Teste 03**

Preparo das Soluções

Fase Móvel

Realizar Transferir 1 mL de Trietilamina e 1 mL de Ácido Trifluoroacético em 1000 mL de uma mistura de água e acetonitrila (55:45). Homogeneizar.

Diluente

Acetonitrila 100%.

Preparo das Amostras

Solução Padrão Estoque

Transferir 12 mg de Gliclazida Padrão para balão volumétrico de 10,0 mL, adicionar cerca de 5 mL de diluente e levar ao ultrassom até completa solubilização. Após esse tempo, completar o volume do balão com diluente. Homogeneizar. [Gliclazida] = 1200 µg/mL.

Solução Padrão Doseamento

Transferir 1,0 mL da Solução Padrão Estoque para balão volumétrico de 20 mL. Completar o volume com diluente. [Gliclazida] = 60 µg/mL.

Solução Padrão SR

Transferir 0,4 mL da Solução Padrão Doseamento para balão volumétrico de 20 mL. Completar o volume com diluente. [Gliclazida] = 1,2 µg/mL.

Solução Sensibilidade

Transferir 5 mL da Solução Padrão SR para balão volumétrico de 10 mL. Completar o volume com diluente. [Gliclazida] = 0,6 µg/mL.

Solução Estoque Gliclazida Impureza A

Transferir 1 mg do padrão de gliclazida impureza A para balão volumétrico de 10 mL, adicionar cerca de 10 mL de acetonitrila e levar ao ultrassom até completa solubilização do padrão, em temperatura ambiente. Completar o volume do balão volumétrico com acetonitrila e homogeneizar. [Impureza A] = 100 µg/mL.

Solução Estoque Gliclazida Impureza B

Transferir 1 mg do padrão de gliclazida impureza B para balão volumétrico de 10 mL, adicionar cerca de 10 mL de acetonitrila e levar ao ultrassom até completa solubilização do padrão, em temperatura ambiente. Completar o volume do balão volumétrico com acetonitrila e homogeneizar. [Impureza B] = 100 µg/mL.

Solução Estoque Gliclazida Impureza C

Transferir 1 mg do padrão de gliclazida impureza C para balão volumétrico de 10 mL, adicionar cerca de 10 mL de acetonitrila e levar ao ultrassom até completa solubilização do padrão, em temperatura ambiente. Completar o volume do balão volumétrico com acetonitrila e homogeneizar. [Impureza C] = 100 µg/mL.

Solução Estoque Gliclazida Impureza D

Transferir 1 mg do padrão de gliclazida impureza D para balão volumétrico de 10 mL, adicionar cerca de 10 mL de acetonitrila e levar ao ultrassom até completa solubilização do padrão, em temperatura ambiente. Completar o volume do balão volumétrico com acetonitrila e homogeneizar. [Impureza D] = 100 µg/mL.

Solução Estoque Gliclazida Impureza E

Transferir 1 mg do padrão de gliclazida impureza E para balão volumétrico de 10 mL, adicionar cerca de 10 mL de acetonitrila e levar ao ultrassom até completa solubilização do padrão,

em temperatura ambiente. Completar o volume do balão volumétrico com acetonitrila e homogeneizar. [Impureza E] = 100 µg/mL.

Solução Estoque Gliclazida Impureza F

Transferir 1,5 mg do padrão de gliclazida impureza F para balão volumétrico de 10 mL, adicionar cerca de 10 mL de acetonitrila e levar ao ultrassom até completa solubilização do padrão, em temperatura ambiente. Completar o volume do balão volumétrico com acetonitrila e homogeneizar. [Impureza F] = 150 µg/mL.

Solução Estoque Gliclazida Impureza G

Transferir 1 mg do padrão de gliclazida impureza G para balão volumétrico de 10 mL, adicionar cerca de 10 mL de acetonitrila e levar ao ultrassom até completa solubilização do padrão, em temperatura ambiente. Completar o volume do balão volumétrico com acetonitrila e homogeneizar. [Impureza G] = 100 µg/mL.

Solução Padrão Gliclazida Impureza A

Transferir 0,48 mL da Solução Estoque Gliclazida Impureza A para balão volumétrico de 20 mL. Completar o volume do balão volumétrico com diluente. Homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 µm com 4 mL de descarte. [Impureza A] = 2,4 µg/mL.

Solução Padrão Gliclazida Impureza B

Transferir 0,48 mL da Solução Estoque Gliclazida Impureza B para balão volumétrico de 20 mL. Completar o volume do balão volumétrico com diluente. Homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 µm com 4 mL de descarte. [Impureza B] = 2,4 µg/mL.

Solução Padrão Gliclazida Impureza C

Transferir 0,48 mL da Solução Estoque Gliclazida Impureza C para balão volumétrico de 20 mL. Completar o volume do balão volumétrico com diluente. Homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 µm com 4 mL de descarte. [Impureza C] = 2,4 µg/mL.

Solução Padrão Gliclazida Impureza D

Transferir 0,48 mL da Solução Estoque Gliclazida Impureza D para balão volumétrico de 20 mL. Completar o volume do balão volumétrico com diluente. Homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 µm com 4 mL de descarte. [Impureza D] = 2,4 µg/mL.

Solução Padrão Gliclazida Impureza E

Transferir 0,48 mL da Solução Estoque Gliclazida Impureza E para balão volumétrico de 20 mL. Completar o volume do balão volumétrico com diluente. Homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 µm com 4 mL de descarte. [Impureza E] = 2,4 µg/mL.

Solução Padrão Gliclazida Impureza F

Transferir 0,48 mL da Solução Estoque Gliclazida Impureza F para balão volumétrico de 20 mL. Completar o volume do balão volumétrico com diluente. Homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 µm com 4 mL de descarte. [Impureza F] = 3,6 µg/mL.

Solução Mix Impurezas

Transferir 0,6 mL da Solução Estoque Padrão Impureza A, B, C, D, E, F e G para balão volumétrico de 25 mL. Completar o volume do balão volumétrico com diluente. Homogeneizar e filtrar em membrana PVDF 0,45 µm com 4 mL de descarte. [impureza A] = [impureza B] = [impureza C] = [Impureza D] = [Impureza E] = [Impureza G] = 2,4 µg/mL; [Impureza F] = 3,6 µg/mL.

Solução Teste SR Contaminada

Transferir o equivalente a 30 mg de gliclazida para balão volumétrico de 25 mL. Transferir 0,6 mL da Solução Estoque Padrão Impureza A, B, C, D, E, F e G. Adicionar cerca de 15 mL de diluente e levar ao ultrassom por 10 minutos, em temperatura ambiente. Completar o volume do balão volumétrico com diluente. Homogeneizar e filtrar em membrana PVDF 0,45 µm com 4 mL de descarte. [Gliclazida] = 1000 µg/mL; [impureza A] = [impureza B] = [impureza C] = [Impureza D] = [Impureza E] = [Impureza G] = 2,4 µg/mL; [Impureza F] = 3,6 µg/mL.

8.2 APÊNDICE II

- **Linearidade Doseamento**

Preparo das Soluções

Solução A: Trietilamina 0,1% pH 3.8

Transferir 1 mL de Trietilamina em 1000 mL de água purificada. Homogeneizar. Ajustar o pH para aproximadamente 3,8 com ácido fosfórico (Não degaseificar e filtrar esta solução).

Diluyente

Acetonitrila 100%.

Preparo das Amostras

Solução Padrão Doseamento 1 e 2

Transferir 12,0 mg de *Gliclazida Padrão* para balão volumétrico de 20,0 mL, adicionar cerca de 10,0 mL de diluyente e levar ao ultrassom sem aquecimento por 10 minutos. Após esse tempo, aguardar a solução atingir temperatura ambiente e completar o volume do balão com diluyente. Homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 µm, com descarte prévio de 4,0 mL. $[Gliclazida] = 600,0 \mu\text{g/mL}$.

Solução Padrão Estoque SR 1 e 2

Transferir 1,0 mL da *Solução Padrão Doseamento* para balão volumétrico de 50,0 mL. Completar o volume com diluyente e homogeneizar. $[Gliclazida] = 12,0 \mu\text{g/mL}$.

Solução Padrão SR 1 e 2

Transferir 1,0 mL da *Solução Padrão Estoque SR* para balão volumétrico de 10,0 mL. Completar o volume com diluyente e homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 µm, com descarte prévio de 4,0 mL. $[Gliclazida] = 1,2 \mu\text{g/mL}$.

Solução Sensibilidade

Transferir 1,0 mL da *Solução Padrão Estoque SR* para balão volumétrico de 20,0 mL. Completar o volume com diluyente e homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 µm, com descarte prévio de 4,0 mL. $[Gliclazida] = 0,6 \mu\text{g/mL}$.

Solução Estoque Linearidade 1, 2 e 3

Transferir 40,0 mg de *Gliclazida* para balão volumétrico de 20,0 mL, adicionar cerca de 10,0 mL de diluyente e levar ao ultrassom até completa solubilização. Após esse tempo, completar o volume do balão com diluyente. Homogeneizar. $[Gliclazida] = 2000 \mu\text{g/mL}$.

Soluções Linearidade 1, 2 e 3

Proceder as diluições das três soluções estoque linearidade conforme descrito na Tabela 39. Completar o volume do balão com diluente. Em seguida homogeneizar e filtrar em membrana PVDF 0,45 µm com 4,0 mL de descarte prévio.

Tabela 39: Diluições para o preparo da Linearidade doseamento.

Nível (%)	Vol. estoque padrão (mL)	Balão vol. (mL)	Concentração (µg/mL)
1	2,1	10	420,0
2	2,4		480,0
3	2,7		540,0
4	3,0		600,0
5	3,9		780,0

- **Linearidade Impurezas Específicas e Inespecíficas**

Preparo das Soluções

Solução A: Trietilamina 0,1% pH 3.8

Transferir 1 mL de Trietilamina em 1000 mL de água purificada. Homogeneizar. Ajustar o pH para aproximadamente 3,8 com ácido fosfórico (Não degaseificar e filtrar esta solução).

Diluyente

Acetonitrila 100%.

Preparo das Amostras

Solução Padrão Doseamento 1 e 2

Transferir 12,0 mg de *Gliclazida Padrão* para balão volumétrico de 20,0 mL, adicionar cerca de 10,0 mL de diluente e levar ao ultrassom sem aquecimento por 10 minutos. Após esse tempo, aguardar a solução atingir temperatura ambiente e completar o volume do balão com diluente. Homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 µm, com descarte prévio de 4,0 mL. $[Gliclazida] = 600,0 \mu\text{g/mL}$.

Solução Padrão Estoque SR 1 e 2

Transferir 1,0 mL da *Solução Padrão Doseamento* para balão volumétrico de 50,0 mL. Completar o volume com diluente e homogeneizar. $[Gliclazida] = 12,0 \mu\text{g/mL}$.

Solução Padrão SR 1 e 2

Transferir 1,0 mL da *Solução Padrão Estoque SR* para balão volumétrico de 10,0 mL. Completar o volume com diluente e homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 µm, com descarte prévio de 4,0 mL. $[Gliclazida] = 1,2 \mu\text{g/mL}$.

Solução Sensibilidade

Transferir 1,0 mL da *Solução Padrão Estoque SR* para balão volumétrico de 20,0 mL. Completar o volume com diluente e homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 µm, com descarte prévio de 4,0 mL. $[Gliclazida] = 0,6 \mu\text{g/mL}$.

Solução Padrão Gliclazida Estoque 1, 2 e 3

Transferir 12,0 mg de *Gliclazida* para balão volumétrico de 20,0 mL, adicionar cerca de 10,0 mL de diluente e levar ao ultrassom até completa solubilização. Após esse tempo, completar o volume do balão com diluente. Homogeneizar. $[Gliclazida] = 600,0 \mu\text{g/mL}$.

Solução Padrão Impureza A Estoque 1, 2 e 3

Transferir 5,0 mg de *Impureza A* para balão volumétrico de 10,0 mL, adicionar cerca de 5,0 mL de diluente e levar ao ultrassom até completa solubilização. Após esse tempo, completar o volume do balão com diluente. Homogeneizar. $[Impureza A] = 500,0 \mu\text{g/mL}$.

Solução Padrão Impureza G Estoque 1, 2 e 3

Transferir 2,5 mg de *Impureza G* para balão volumétrico de 5,0 mL, adicionar cerca de 2,5 mL de diluente e levar ao ultrassom até completa solubilização. Após esse tempo, completar o volume do balão com diluente. Homogeneizar. $[Impureza G] = 500,0 \mu\text{g/mL}$.

Solução Mix 1, 2 e 3

Transferir 1,67 mL da *Solução Padrão Gliclazida Estoque*, 2,0 mL da *Solução Padrão Impureza A e G Estoque* para balão volumétrico de 10,0 mL. Completar o volume com diluente e homogeneizar. $[Gliclazida]; [Impureza A]; [Impureza G] = 100,0 \mu\text{g/mL}$.

Soluções Linearidade 1, 2 e 3

Proceder as diluições das três *Soluções Mix* conforme descrito na Tabela 40. Completar o volume dos balões com solução diluente. Em seguida homogeneizar e filtrar em membrana PVDF 0,45 µm com descarte prévio de 4,0 mL.

Tabela 40: Diluições para o preparo da Linearidade das impurezas específicas e inespecíficas.

Nível (%)	Vol. Sol Estoque Mix Impurezas (mL)	Balão vol. (mL)	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
1	0,30	50	0,60
2	0,24		2,40
3	0,42	10	4,20
4	0,60		6,00
5	0,72		7,20

- **Precisão Doseamento**

- Preparo das Soluções**

- Solução A: Trietilamina 0,1% pH 3.8**

- Transferir 1 mL de Trietilamina em 1000 mL de água purificada. Homogeneizar. Ajustar o pH para aproximadamente 3,8 com ácido fosfórico (Não degaseificar e filtrar esta solução).

- Diluyente**

- Acetonitrila 100%.

- Preparo das Amostras**

- Solução Padrão Doseamento 1 e 2**

- Transferir 12,0 mg de *Gliclazida Padrão* para balão volumétrico de 20,0 mL, adicionar cerca de 10,0 mL de diluyente e levar ao ultrassom sem aquecimento por 10 minutos. Após esse tempo, aguardar a solução atingir temperatura ambiente e completar o volume do balão com diluyente. Homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 μm , com descarte prévio de 4,0 mL. $[\text{Gliclazida}] = 600,0 \mu\text{g/mL}$.

- Solução Padrão Estoque SR 1 e 2**

- Transferir 1,0 mL da *Solução Padrão Doseamento* para balão volumétrico de 50,0 mL. Completar o volume com diluyente e homogeneizar. $[\text{Gliclazida}] = 12,0 \mu\text{g/mL}$.

- Solução Padrão SR 1 e 2**

- Transferir 1,0 mL da *Solução Padrão Estoque SR* para balão volumétrico de 10,0 mL. Completar o volume com diluyente e homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 μm , com descarte prévio de 4,0 mL. $[\text{Gliclazida}] = 1,2 \mu\text{g/mL}$.

- Solução Sensibilidade**

- Transferir 1,0 mL da *Solução Padrão Estoque SR* para balão volumétrico de 20,0 mL. Completar o volume com diluyente e homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 μm , com descarte

prévio de 4,0 mL. $[Gliclazida] = 0,6 \mu\text{g/mL}$.

Solução Teste Doseamento/SR (Sextuplicata)

Realiza a massa média do produto com não menos que 20 comprimidos. Transferir o equivalente a 30,0 mg de *Gliclazida produto acabado* para balão volumétrico de 50,0 mL, adicionar cerca de 25,0 mL de diluente e levar ao ultrassom sem aquecimento por 10 minutos. Após esse tempo, aguardar retornar a temperatura ambiente e completar o volume do balão com diluente. Homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 μm , com descarte prévio de 4,0 mL. $[Gliclazida] = 600,0 \mu\text{g/mL}$.

- **Precisão Impurezas Inespecíficas**

Preparo das Soluções

Solução A: Trietilamina 0,1% pH 3.8

Transferir 1 mL de Trietilamina em 1000 mL de água purificada. Homogeneizar. Ajustar o pH para aproximadamente 3,8 com ácido fosfórico (Não degaseificar e filtrar esta solução).

Diluente

Acetonitrila 100%.

Preparo das Amostras

Solução Padrão Doseamento 1 e 2

Transferir 12,0 mg de *Gliclazida Padrão* para balão volumétrico de 20,0 mL, adicionar cerca de 10,0 mL de diluente e levar ao ultrassom sem aquecimento por 10 minutos. Após esse tempo, aguardar a solução atingir temperatura ambiente e completar o volume do balão com diluente. Homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 μm , com descarte prévio de 4,0 mL. $[Gliclazida] = 600,0 \mu\text{g/mL}$.

Solução Padrão Estoque SR 1 e 2

Transferir 1,0 mL da *Solução Padrão Doseamento* para balão volumétrico de 50,0 mL. Completar o volume com diluente e homogeneizar. $[Gliclazida] = 12,0 \mu\text{g/mL}$.

Solução Padrão SR 1 e 2

Transferir 1,0 mL da *Solução Padrão Estoque SR* para balão volumétrico de 10,0 mL. Completar o volume com diluente e homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 μm , com descarte prévio de 4,0 mL. $[Gliclazida] = 1,2 \mu\text{g/mL}$.

Solução Sensibilidade

Transferir 1,0 mL da *Solução Padrão Estoque SR* para balão volumétrico de 20,0 mL. Completar o volume com diluente e homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 μm , com descarte

prévio de 4,0 mL. $[Gliclazida] = 0,6 \mu\text{g/mL}$.

Solução Padrão Estoque Gliclazida 1, 2 e 3

Transferir 12,0 mg de *Gliclazida Padrão* para balão volumétrico de 20,0 mL, adicionar cerca de 10,0 mL de diluente e levar ao ultrassom sem aquecimento por 10 minutos. Aguardar a solução atingir temperatura ambiente e completar o volume do balão com diluente. Homogeneizar. Transferir 1,0 mL desta solução para balão volumétrico de 50,0 mL. Completar o volume com diluente e homogeneizar. $[Gliclazida] = 12,0 \mu\text{g/mL}$.

Solução Teste Inespecíficas Baixa (0,10%) 1, 2 e 3

Transferir 0,5 ml da *Solução Padrão Gliclazida Estoque e o equivalente a 6,0 mg de Placebo* para balão volumétrico de 10,0 mL. Adicionar cerca de 5,0 mL de diluente, levar ao ultrassom sem aquecimento por 10 minutos. Aguardar a solução atingir temperatura ambiente e completar o volume do balão volumétrico com diluente. Homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 μm , com 4,0 mL de descarte prévio. $[Gliclazida] = 0,60 \mu\text{g/mL}$.

Solução Teste Inespecíficas Média (0,17%) 1, 2 e 3

Transferir 0,85 ml da *Solução Padrão Gliclazida Estoque e o equivalente a 6,0 mg de Placebo* para balão volumétrico de 10,0 mL. Adicionar cerca de 5,0 mL de diluente, levar ao ultrassom sem aquecimento por 10 minutos. Aguardar a solução atingir temperatura ambiente e completar o volume do balão volumétrico com diluente. Homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 μm , com 4,0 mL de descarte prévio. $[Gliclazida] = 1,02 \mu\text{g/mL}$.

Solução Teste Inespecíficas Alta (0,24%) 1, 2 e 3

Transferir 1,2 ml da *Solução Padrão Gliclazida Estoque e o equivalente a 6,0 mg de Placebo* para balão volumétrico de 10,0 mL. Adicionar cerca de 5,0 mL de diluente, levar ao ultrassom sem aquecimento por 10 minutos. Aguardar a solução atingir temperatura ambiente e completar o volume do balão volumétrico com diluente. Homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 μm , com 4,0 mL de descarte prévio. $[Gliclazida] = 1,44 \mu\text{g/mL}$.

- **Precisão Impurezas Específicas**

Preparo das Soluções

Solução A: Trietilamina 0,1% pH 3.8

Transferir 1 mL de Trietilamina em 1000 mL de água purificada. Homogeneizar. Ajustar o pH para aproximadamente 3,8 com ácido fosfórico (Não degaseificar e filtrar esta solução).

Diluente

Acetonitrila 100%.

Preparo das Amostras

Solução Padrão Doseamento 1 e 2

Transferir 12,0 mg de *Gliclazida Padrão* para balão volumétrico de 20,0 mL, adicionar cerca de 10,0 mL de diluente e levar ao ultrassom sem aquecimento por 10 minutos. Após esse tempo, aguardar a solução atingir temperatura ambiente e completar o volume do balão com diluente. Homogeneizar. Filtrar em membra PVDF 0,45 µm, com descarte prévio de 4,0 mL. $[Gliclazida] = 600,0 \mu\text{g/mL}$.

Solução Padrão Estoque SR 1 e 2

Transferir 1,0 mL da *Solução Padrão Doseamento* para balão volumétrico de 50,0 mL. Completar o volume com diluente e homogeneizar. $[Gliclazida] = 12,0 \mu\text{g/mL}$.

Solução Padrão SR 1 e 2

Transferir 1,0 mL da *Solução Padrão Estoque SR* para balão volumétrico de 10,0 mL. Completar o volume com diluente e homogeneizar. Filtrar em membra PVDF 0,45 µm, com descarte prévio de 4,0 mL. $[Gliclazida] = 1,2 \mu\text{g/mL}$.

Solução Sensibilidade

Transferir 1,0 mL da *Solução Padrão Estoque SR* para balão volumétrico de 20,0 mL. Completar o volume com diluente e homogeneizar. Filtrar em membra PVDF 0,45 µm, com descarte prévio de 4,0 mL. $[Gliclazida] = 0,6 \mu\text{g/mL}$.

Solução Padrão Impureza G Estoque 1, 2 e 3

Transferir 2,5 mg de *Impureza G* para balão volumétrico de 5,0 mL, adicionar cerca de 2,5 mL de diluente e levar ao ultrassom até completa solubilização. Após esse tempo, completar o volume do balão com diluente. Homogeneizar. Transferir 0,6 mL para balão volumétrico de 25,0 mL. Completar o volume com diluente e homogeneizar. $[Impureza G] = 12,0 \mu\text{g/mL}$.

Solução Padrão Impureza A Estoque 1, 2 e 3

Transferir 5,0 mg de *Impureza A* para balão volumétrico de 10,0 mL, adicionar cerca de 5,0 mL de diluente e levar ao ultrassom até completa solubilização. Após esse tempo, completar o volume do balão com diluente. Homogeneizar. Transferir 1,0 mL para balão volumétrico de 25,0 mL. Completar o volume com diluente e homogeneizar. $[Impureza A] = 20,0 \mu\text{g/mL}$.

Solução Teste Controle

Realizar a massa média do produto com não menos que 20 comprimidos. Transferir o equivalente a 30,0 mg de *Gliclazida produto acabado* para balão volumétrico de 50,0 mL, adicionar cerca de 25,0 mL de diluente e levar ao ultrassom sem aquecimento por 10 minutos. Após esse tempo, aguardar retornar a temperatura ambiente e completar o volume do balão com diluente.

Homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 μm , com descarte prévio de 4,0 mL. $[\text{Gliclazida}] = 600,0 \mu\text{g/mL}$.

Solução Exatidão Impurezas Específicas A e G 0,10% - 1, 2 e 3

Transferir o equivalente a 6,0 mg de *Gliclazida* para balão volumétrico de 10,0 mL. Transferir 0,3 ml da *Solução Padrão Impureza A Estoque* e 0,5 mL *Solução Padrão Impureza G Estoque*, adicionar cerca de 5,0 mL de diluente e levar ao ultrassom sem aquecimento por 10 minutos. Após esse tempo, aguardar retornar a temperatura ambiente e completar o volume do balão volumétrico com diluente. Homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 μm , com 4,0 mL de descarte prévio. $[\text{Gliclazida}] = 600,0 \mu\text{g/mL}$; $[\text{Impureza A}]$ e $[\text{Impureza G}] = 0,6 \mu\text{g/mL}$.

Solução Exatidão Impureza A 0,65% e Impureza G 0,17% - 1, 2 e 3

Transferir o equivalente a 6,0 mg de *Gliclazida* para balão volumétrico de 10,0 mL. Transferir 1,95 ml da *Solução Padrão Impureza A Estoque* e 0,85 ml da *Solução Padrão Impureza G Estoque*, adicionar cerca de 2,0 mL de diluente e levar ao ultrassom sem aquecimento por 10 minutos. Após esse tempo, aguardar retornar a temperatura ambiente e completar o volume do balão volumétrico com diluente. Homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 μm , com 4,0 mL de descarte prévio. $[\text{Gliclazida}] = 600,00 \mu\text{g/mL}$; $[\text{Impureza A}] = 3,90 \mu\text{g/mL}$ $[\text{Impureza G}] = 1,02 \mu\text{g/mL}$.

Solução Exatidão Impureza A 1,20% e Impureza G 0,24% - 1, 2 e 3

Transferir o equivalente a 6,0 mg de *Gliclazida* para balão volumétrico de 10,0 mL. Transferir 3,6 ml da *Solução Padrão Impureza A Estoque* e 1,2 ml da *Solução Padrão Impureza G Estoque*, levar ao ultrassom sem aquecimento por 10 minutos. Após esse tempo, aguardar retornar a temperatura ambiente e completar o volume do balão volumétrico com diluente. Homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 μm , com 4,0 mL de descarte prévio. $[\text{Gliclazida}] = 600,00 \mu\text{g/mL}$; $[\text{Impureza A}] = 7,20 \mu\text{g/mL}$ $[\text{Impureza G}] = 1,44 \mu\text{g/mL}$.

- **Exatidão Doseamento**

Preparo das Soluções

Solução A: Trietilamina 0,1% pH 3.8

Transferir 1 mL de Trietilamina em 1000 mL de água purificada. Homogeneizar. Ajustar o pH para aproximadamente 3,8 com ácido fosfórico (Não degaseificar e filtrar esta solução).

Diluente

Acetonitrila 100%.

Preparo das Amostras

Solução Padrão Doseamento 1 e 2

Transferir 12,0 mg de *Gliclazida Padrão* para balão volumétrico de 20,0 mL, adicionar cerca de 10,0 mL de diluente e levar ao ultrassom sem aquecimento por 10 minutos. Após esse tempo, aguardar a solução atingir temperatura ambiente e completar o volume do balão com diluente. Homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 µm, com descarte prévio de 4,0 mL. $[Gliclazida] = 600,0 \mu\text{g/mL}$.

Solução Padrão Estoque SR 1 e 2

Transferir 1,0 mL da *Solução Padrão Doseamento* para balão volumétrico de 50,0 mL. Completar o volume com diluente e homogeneizar. $[Gliclazida] = 12,0 \mu\text{g/mL}$.

Solução Padrão SR 1 e 2

Transferir 1,0 mL da *Solução Padrão Estoque SR* para balão volumétrico de 10,0 mL. Completar o volume com diluente e homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 µm, com descarte prévio de 4,0 mL. $[Gliclazida] = 1,2 \mu\text{g/mL}$.

Solução Sensibilidade

Transferir 1,0 mL da *Solução Padrão Estoque SR* para balão volumétrico de 20,0 mL. Completar o volume com diluente e homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 µm, com descarte prévio de 4,0 mL. $[Gliclazida] = 0,6 \mu\text{g/mL}$.

Solução Teste Exatidão 70% 1, 2 e 3

Transferir 4,2 mg de *Gliclazida Padrão* e o equivalente a 6,0 mg de *Placebo* para balão volumétrico de 10,0 mL. Adicionar 5,0 mL de diluente, levar ao ultrassom sem aquecimento por 10 minutos. Após esse tempo, aguardar retornar a temperatura ambiente e completar o volume do balão volumétrico com diluente. Homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 µm, com 4,0 mL de descarte prévio. $[Gliclazida] = 420,0 \mu\text{g/mL}$.

Solução Teste Exatidão 100% 1, 2 e 3

Transferir 6,0 mg de *Gliclazida Padrão* e o equivalente a 6,0 mg de *Placebo* para balão volumétrico de 10,0 mL. Adicionar 5,0 mL de diluente, levar ao ultrassom sem aquecimento por 10 minutos. Após esse tempo, aguardar retornar a temperatura ambiente e completar o volume do balão volumétrico com diluente. Homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 µm, com 4,0 mL de descarte prévio. $[Gliclazida] = 600,0 \mu\text{g/mL}$.

Solução Teste Exatidão 130% 1, 2 e 3

Transferir 7,8 mg de *Gliclazida Padrão* e o equivalente a 6,0 mg de *Placebo* para balão volumétrico de 10,0 mL. Adicionar 5,0 mL de diluente, levar ao ultrassom sem aquecimento por 10 minutos. Após esse tempo, aguardar retornar a temperatura ambiente e completar o volume do balão volumétrico com diluente. Homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 µm, com 4,0 mL de

descarte prévio. $[Gliclazida] = 780 \mu\text{g/mL}$.

- **Robustez de Filtro**

Preparo das Soluções

Solução A: Trietilamina 0,1% pH 3.8

Transferir 1 mL de Trietilamina em 1000 mL de água purificada. Homogeneizar. Ajustar o pH para aproximadamente 3,8 com ácido fosfórico (Não degaseificar e filtrar esta solução).

Diluyente

Acetonitrila 100%.

Preparo das Amostras

Solução Padrão Doseamento 1 e 2

Transferir 12,0 mg de *Gliclazida Padrão* para balão volumétrico de 20,0 mL, adicionar cerca de 10,0 mL de diluyente e levar ao ultrassom sem aquecimento por 10 minutos. Após esse tempo, aguardar a solução atingir temperatura ambiente e completar o volume do balão com diluyente. Homogeneizar. . Filtrar de acordo com o que está descrito abaixo. $[Gliclazida] = 600,0 \mu\text{g/mL}$.

Solução Padrão Estoque SR 1 e 2

Transferir 1,0 mL da *Solução Padrão Doseamento* para balão volumétrico de 50,0 mL. Completar o volume com diluyente e homogeneizar. $[Gliclazida] = 12,0 \mu\text{g/mL}$.

Solução Padrão SR 1 e 2

Transferir 1,0 mL da *Solução Padrão Estoque SR* para balão volumétrico de 10,0 mL. Completar o volume com diluyente e homogeneizar. . Filtrar de acordo com o que está descrito abaixo. $[Gliclazida] = 1,2 \mu\text{g/mL}$.

Solução Sensibilidade

Transferir 1,0 mL da *Solução Padrão Estoque SR* para balão volumétrico de 20,0 mL. Completar o volume com diluyente e homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 μm , com descarte prévio de 4,0 mL. $[Gliclazida] = 0,6 \mu\text{g/mL}$.

Solução Teste Doseamento/SR

Realizar a massa média do produto com não menos que 20 comprimidos. Transferir o equivalente a 30,0 mg de *Gliclazida produto acabado* para balão volumétrico de 50,0 mL, adicionar cerca de 25,0 mL de diluyente e levar ao ultrassom sem aquecimento por 10 minutos. Após esse tempo, aguardar retornar a temperatura ambiente e completar o volume do balão com diluyente. Homogeneizar. Filtrar de acordo com a Tabela 41. $[Gliclazida] = 600,0 \mu\text{g/mL}$.

Tabela 41: Instrução de como proceder no processo de filtragem.

Alíquota	Procedimento	Volume de Descarte (mL)	Tamanho do Poro
1	Centrifugar a 5000 rpm por 5 minutos	-	-
2	PTFE hidrofílico	0	0,45 µm
3	PTFE hidrofílico	2	0,45 µm
4	PTFE hidrofílico	4	0,45 µm
5	PVDF	0	0,45 µm
6	PVDF	2	0,45 µm
7	PVDF	4	0,45 µm

8.3 APÊNDICE III

- **Estudo de Degradação Forçada e Seletividade**

Preparo das Soluções

Solução A: Trietilamina 0,1% pH 3.8

Transferir 1 mL de Trietilamina em 1000 mL de água purificada. Homogeneizar. Ajustar o pH para aproximadamente 3,8 com ácido fosfórico (Não degaseificar e filtrar esta solução).

Diluyente

Acetonitrila 100%.

Preparo das Soluções Estressantes

NaOH 1,0 M (Estresse Alcalino)

Pesar 8,0 g de hidróxido de sódio para balão volumétrico de 200 mL contendo aproximadamente 100 mL de água. Agitar até completa solubilização e resfriar a temperatura ambiente. Completar o volume do balão volumétrico com água e armazenar em recipiente plástico apropriado. [NaOH] = 1,0 M

NaOH 0,1 M (Estresse Alcalino)

Transferir 10,0 mL da *Solução NaOH 1,0 M (Estresse Alcalino)* para balão volumétrico de 100 mL, completar o volume do balão volumétrico com água e armazenar em recipiente plástico apropriado. [NaOH] = 0,1 M.

HCl 1,0 M (Estresse Ácido)

Transferir volumetricamente 8,5 mL de ácido clorídrico (36-38%) para balão volumétrico de 100 mL contendo aproximadamente 50 mL de água. Homogeneizar e resfriar a temperatura ambiente. Completar o volume do balão volumétrico com água e armazenar em recipiente apropriado. [HCl] = 1,0 M.

HCl 0,1 M (Estresse Ácido)

Transferir 10,0 mL da *Solução HCl 1,0 M (Estresse Ácido)* para balão volumétrico de 100 mL, contendo aproximadamente 50 mL de água. Completar o volume do balão volumétrico com água e armazenar em recipiente apropriado. [HCl] = 0,1 M.

H2O2 1,5 % (Estresse Oxidativo)

Transferir volumetricamente 5,00 mL de peróxido de hidrogênio 30% PA para balão volumétrico de 100 mL. Completar o volume do balão volumétrico com água, homogeneizar e resfriar a temperatura ambiente. Armazenar em recipiente apropriado. [H₂O₂] = 1,5% v/v.

FeCl₃ 10 mM (Estresse Íons Metálicos)

Transferir 0,27 g de cloreto de ferro III hexa-hidratado para balão volumétrico de 100 mL contendo aproximadamente 50 mL de água. Agitar até completa solubilização e resfriar a temperatura ambiente. Completar o volume do balão volumétrico com água e armazenar em recipiente apropriado. $[\text{FeCl}_3] = 10 \text{ mM}$.

Preparo das Amostras

Solução Padrão Doseamento 1 e 2

Transferir 12,0 mg de *Gliclazida Padrão* para balão volumétrico de 20,0 mL, adicionar cerca de 10,0 mL de diluente e levar ao ultrassom sem aquecimento por 10 minutos. Após esse tempo, aguardar a solução atingir temperatura ambiente e completar o volume do balão com diluente. Homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 μm , com descarte prévio de 4,0 mL. $[\text{Gliclazida}] = 600,0 \mu\text{g/mL}$.

Solução Padrão Estoque SR 1 e 2

Transferir 1,0 mL da *Solução Padrão Doseamento* para balão volumétrico de 50,0 mL. Completar o volume com diluente e homogeneizar. $[\text{Gliclazida}] = 12,0 \mu\text{g/mL}$.

Solução Padrão SR 1 e 2

Transferir 1,0 mL da *Solução Padrão Estoque SR* para balão volumétrico de 10,0 mL. Completar o volume com diluente e homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 μm , com descarte prévio de 4,0 mL. $[\text{Gliclazida}] = 1,2 \mu\text{g/mL}$.

Solução Sensibilidade

Transferir 1,0 mL da *Solução Padrão Estoque SR* para balão volumétrico de 20,0 mL. Completar o volume com diluente e homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 μm , com descarte prévio de 4,0 mL. $[\text{Gliclazida}] = 0,6 \mu\text{g/mL}$.

Solução Estoque Gliclazida Impureza A

Transferir 1,0 mg do padrão de *Gliclazida Impureza A* para balão volumétrico de 20,0 mL, adicionar cerca de 10,0 mL de acetonitrila e levar ao ultrassom sem aquecimento por 10 minutos. Aguardar a solução atingir temperatura ambiente e completar o volume do balão volumétrico com acetonitrila e homogeneizar. $[\text{Impureza A}] = 50,0 \mu\text{g/mL}$.

Solução Estoque Gliclazida Impureza B

Transferir 1,0 mg do padrão de *Gliclazida impureza B* para balão volumétrico de 20,0 mL, adicionar cerca de 10,0 mL de acetonitrila e levar ao ultrassom sem aquecimento por 10 minutos. Aguardar a solução atingir temperatura ambiente e completar o volume do balão volumétrico com acetonitrila e homogeneizar. $[\text{Impureza B}] = 50,0 \mu\text{g/mL}$.

Solução Estoque Gliclazida Impureza C

Transferir 1,0 mg do padrão de *Gliclazida Impureza C* para balão volumétrico de 20,0 mL, adicionar cerca de 10,0 mL de acetonitrila e levar ao ultrassom sem aquecimento por 10 minutos. Aguardar a solução atingir temperatura ambiente e completar o volume do balão volumétrico com acetonitrila e homogeneizar. [*Impureza C*] = 50,0 µg/mL.

Solução Estoque Gliclazida Impureza D

Transferir 1,0 mg do padrão de *Gliclazida Impureza D* para balão volumétrico de 20,0 mL, adicionar cerca de 10,0 mL de acetonitrila e levar ao ultrassom sem aquecimento por 10 minutos. Aguardar a solução atingir temperatura ambiente e completar o volume do balão volumétrico com acetonitrila e homogeneizar. [*Impureza D*] = 50,0 µg/mL.

Solução Estoque Gliclazida Impureza E

Transferir 1,0 mg do padrão de *Gliclazida Impureza E* para balão volumétrico de 20,0 mL, adicionar cerca de 10,0 mL de acetonitrila e levar ao ultrassom sem aquecimento por 10 minutos. Aguardar a solução atingir temperatura ambiente e completar o volume do balão volumétrico com acetonitrila e homogeneizar. [*Impureza E*] = 50,0 µg/mL.

Solução Estoque Gliclazida Impureza F

Transferir 1,0 mg do padrão de *Gliclazida Impureza F* para balão volumétrico de 20,0 mL, adicionar cerca de 10,0 mL de acetonitrila e levar ao ultrassom sem aquecimento por 10 minutos. Aguardar a solução atingir temperatura ambiente e completar o volume do balão volumétrico com acetonitrila e homogeneizar. [*Impureza F*] = 50,0 µg/mL.

Solução Estoque Gliclazida Impureza G

Transferir 1,0 mg do padrão de *Gliclazida Impureza G* para balão volumétrico de 20,0 mL, adicionar cerca de 10,0 mL de acetonitrila e levar ao ultrassom sem aquecimento por 10 minutos. Aguardar a solução atingir temperatura ambiente e completar o volume do balão volumétrico com acetonitrila e homogeneizar. [*Impureza G*] = 50,0 µg/mL.

Solução Padrão Gliclazida Impureza A

Transferir 0,24 mL da *Solução Estoque Gliclazida Impureza A* para balão volumétrico de 10,0 mL. Completar o volume do balão volumétrico com diluente. Homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 µm com 4,0 mL de descarte. [*Impureza A*] = 1,2 µg/mL.

Solução Padrão Gliclazida Impureza B

Transferir 0,24 mL da *Solução Estoque Gliclazida Impureza B* para balão volumétrico de 10,0 mL. Completar o volume do balão volumétrico com diluente. Homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 µm com 4,0 mL de descarte. [*Impureza B*] = 1,2 µg/mL.

Solução Padrão Gliclazida Impureza C

Transferir 0,24 mL da *Solução Estoque Gliclazida Impureza C* para balão volumétrico de 10,0 mL. Completar o volume do balão volumétrico com diluente. Homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 µm com 4,0 mL de descarte. $[Impureza C] = 1,2 \mu\text{g/mL}$.

Solução Padrão Gliclazida Impureza D

Transferir 0,24 mL da *Solução Estoque Gliclazida Impureza D* para balão volumétrico de 10,0 mL. Completar o volume do balão volumétrico com diluente. Homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 µm com 4,0 mL de descarte. $[Impureza D] = 1,2 \mu\text{g/mL}$.

Solução Padrão Gliclazida Impureza E

Transferir 0,24 mL da *Solução Estoque Gliclazida Impureza E* para balão volumétrico de 10,0 mL. Completar o volume do balão volumétrico com diluente. Homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 µm com 4,0 mL de descarte. $[Impureza E] = 1,2 \mu\text{g/mL}$.

Solução Padrão Gliclazida Impureza F

Transferir 0,24 mL da *Solução Estoque Gliclazida Impureza F* para balão volumétrico de 10,0 mL. Completar o volume do balão volumétrico com diluente. Homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 µm com 4,0 mL de descarte. $[Impureza F] = 1,2 \mu\text{g/mL}$.

Solução Padrão Gliclazida Impureza G

Transferir 0,24 mL da *Solução Estoque Gliclazida Impureza G* para balão volumétrico de 10,0 mL. Completar o volume do balão volumétrico com diluente. Homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 µm com 4,0 mL de descarte. $[Impureza G] = 1,2 \mu\text{g/mL}$.

Solução Teste Fortificada

Transferir o equivalente a 30,0 mg de *Gliclazida* para balão volumétrico de 50,0 mL. Transferir 1,2 mL da *Solução Estoque Padrão Impureza A, B, C, D, E, F e G*. Adicionar cerca de 15,0 mL de diluente e levar ao ultrassom sem aquecimento por 10 minutos. Aguardar a solução atingir temperatura ambiente e completar o volume do balão volumétrico com diluente. Homogeneizar e filtrar em membrana PVDF 0,45 µm com 4,0 mL de descarte. $[Gliclazida] = 600,0 \mu\text{g/mL}$; $[Impureza A] = [Impureza B] = [Impureza C] = [Impureza D] = [Impureza E] = [Impureza G] = 1,2 \mu\text{g/mL}$; $[Impureza F] = 1,2 \mu\text{g/mL}$.

Solução Estoque PA

Transferir o equivalente a 600,0 mg de *Gliclazida* para balão volumétrico de 100,0 mL. Adicionar cerca de 50,0 mL de diluente e levar ao ultrassom sem aquecimento por 10 minutos. Aguardar retornar a temperatura ambiente e completar o volume com diluente e homogeneizar. $[Gliclazida] = 6000,0 \mu\text{g/mL}$.

Solução Estoque Placebo

Transferir o equivalente 600,0 mg de *Placebo* para balão volumétrico de 100,0 mL. Adicionar cerca de 50,0 mL de diluente e levar ao ultrassom sem aquecimento por 10 minutos. Aguardar retornar a temperatura ambiente e completar o volume com diluente e homogeneizar. $[Gliclazida]_{eq} = 6000,0 \mu\text{g/mL}$.

Solução Branco – Controle

Filtrar para vial uma porção do diluente utilizando membrana PVDF 0,45 μm com 4,0 mL de descarte.

Solução Teste PA – Controle

Transferir 2,0 mL da *Solução Estoque PA* para balão volumétrico de 20,0 mL e completar o volume com diluente e homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 μm com 4,0 mL de descarte. $[Gliclazida] = 600,0 \mu\text{g/mL}$.

Solução Placebo – Controle

Transferir 2,0 mL da *Solução Estoque Placebo* para balão volumétrico de 20,0 mL e completar o volume com diluente e homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 μm com 4,0 mL de descarte. $[Gliclazida]_{eq} = 600,0 \mu\text{g/mL}$

Solução Branco – Controle Água Purificada

Transferir 9,0 mL da *Solução Diluente* para balão volumétrico de 20,0 mL, adicionar 2,0 mL de *água purificada*. Manter a solução em temperatura ambiente e protegida da luz durante o período de 10 dias. Após o período de degradação forçada, avolumar com diluente. Homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 μm com 4,0 mL de descarte prévio.

Solução Teste PA – Controle Água Purificada

Transferir 2,0 mL da *Solução Estoque PA* para balão volumétrico de 20,0 mL, adicionar 7,0 mL de diluente e 2,0 mL de *água purificada*. Manter a solução em temperatura ambiente e protegida da luz durante o período de 10 dias. Após o período de exposição, completar o volume com diluente e homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 μm com 4,0 mL de descarte. $[Gliclazida] = 600,0 \mu\text{g/mL}$.

Solução Placebo – Controle Água Purificada

Transferir 2,0 mL da *Solução Estoque Placebo* para balão volumétrico de 20,0 mL, adicionar 7,0 mL de diluente e 2,0 mL de *água purificada*. Manter a solução em temperatura ambiente e protegida da luz durante o período de 10 dias. Após o período de exposição, completar o volume com diluente e homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 μm com 4,0 mL de descarte. $[Gliclazida]_{eq} = 600,0 \mu\text{g/mL}$

Solução Branco – Degradação Ácida

Transferir 9,0 mL da *Solução Diluente* para balão volumétrico de 20,0 mL, adicionar 2,0 mL de *HCl 0,1 M*. Manter a solução em temperatura ambiente e protegida da luz durante o período de 2 horas. Após o período de degradação forçada, neutralizar a solução com 2,0 mL de *NaOH 0,1 M* e avolumar com diluente. Homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 µm com 4,0 mL de descarte prévio.

Solução Teste PA – Degradação Ácida

Transferir 2,0 mL da *Solução Estoque PA* para balão volumétrico de 20,0 mL, adicionar 7,0 mL de diluente e 2,0 mL de *HCl 0,1 M*. Manter a solução em temperatura ambiente e protegida da luz durante o período de 2 horas. Após o período de degradação forçada, neutralizar a solução com 2,0 mL de *NaOH 0,1 M* e avolumar com diluente. Homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 µm com 4,0 mL de descarte prévio. $[Gliclazida] = 600,0 \mu\text{g/mL}$.

Solução Placebo – Degradação Ácida

Transferir 2,0 mL da *Solução Estoque Placebo* para balão volumétrico de 20,0 mL, adicionar 7,0 mL de diluente e 2,0 mL de *HCl 0,1 M*. Manter a solução em temperatura ambiente e protegida da luz durante o período de 2 horas. Após o período de degradação forçada, neutralizar a solução com 2,0 mL de *NaOH 0,1 M* e avolumar com diluente. Homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 µm com 4,0 mL de descarte prévio. $[Gliclazida]_{eq} = 600,0 \mu\text{g/mL}$.

Solução Branco – Degradação Alcalina

Transferir 9,0 mL da *Solução Diluente* para balão volumétrico de 20,0 mL, adicionar 2,0 mL de *NaOH 1,0 M*. Manter a solução em temperatura ambiente e protegida da luz durante o período de 10 dias. Após o período de degradação forçada, neutralizar a solução com 2,0 mL de *HCl 1,0 M* e avolumar com diluente. Homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 µm com 4,0 mL de descarte prévio.

Solução Teste PA – Degradação Alcalina

Transferir 2,0 mL da *Solução Estoque PA* para balão volumétrico de 20,0 mL, adicionar 7,0 mL de diluente e 2,0 mL de *NaOH 1,0 M*. Manter a solução em temperatura ambiente e protegida da luz durante o período de 10 dias. Após o período de degradação forçada, neutralizar a solução com 2,0 mL de *HCl 1,0 M* e avolumar com diluente. Homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 µm com 4,0 mL de descarte prévio. $[Gliclazida] = 600,0 \mu\text{g/mL}$.

Solução Placebo – Degradação Alcalina

Transferir 2,0 mL da *Solução Estoque Placebo* para balão volumétrico de 20,0 mL, adicionar 7,0 mL de diluente e 2,0 mL de *NaOH 1,0 M*. Manter a solução em temperatura ambiente e protegida da luz durante o período de 10 dias. Após o período de degradação forçada, neutralizar a

solução com 2,0 mL de *HCl* 1,0 M e avolumar com diluente. Homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 µm com 4,0 mL de descarte prévio. $[Gliclazida]_{eq} = 600,0 \mu\text{g/mL}$.

Solução Branco – Degradação Oxidativa

Transferir 9,0 mL da *Solução Diluente* para balão volumétrico de 20,0 mL, adicionar 2,0 mL de H_2O_2 3,0%. Manter a solução em temperatura ambiente e protegida da luz durante o período de 10 dias. Após o período de degradação forçada, avolumar com diluente. Homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 µm com 4,0 mL de descarte prévio.

Solução Teste PA – Degradação Oxidativa

Transferir 2,0 mL da *Solução Estoque PA* para balão volumétrico de 20,0 mL, adicionar 7,0 mL de diluente e 2,0 mL de H_2O_2 3,0%. Manter a solução em temperatura ambiente e protegida da luz durante o período de 10 dias. Após o período de degradação forçada, avolumar com diluente. Homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 µm com 4,0 mL de descarte prévio. $[Gliclazida] = 600,0 \mu\text{g/mL}$.

Solução Placebo – Degradação Oxidativa

Transferir 2,0 mL da *Solução Estoque Placebo* para balão volumétrico de 20,0 mL, adicionar 7,0 mL de diluente e 2,0 mL de H_2O_2 3,0%. Manter a solução em temperatura ambiente e protegida da luz durante o período de 10 dias. Após o período de degradação forçada, avolumar com diluente. Homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 µm com 4,0 mL de descarte prévio. $[Gliclazida]_{eq} = 600,0 \mu\text{g/mL}$.

Solução Branco – Degradação Íon Metálico

Transferir 9,0 mL da *Solução Diluente* para balão volumétrico de 20,0 mL, adicionar 2,0 mL de *FeCl3* 10 mM. Manter a solução em temperatura ambiente e protegida da luz durante o período de 6 horas. Após o período de degradação forçada, avolumar com diluente. Homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 µm com 4,0 mL de descarte prévio.

Solução Teste PA – Degradação Íon Metálico

Transferir 2,0 mL da *Solução Estoque PA* para balão volumétrico de 20,0 mL, adicionar 7,0 mL de diluente e 2,0 mL de *FeCl3* 10 mM. Manter a solução em temperatura ambiente e protegida da luz durante o período de 6 horas. Após o período de degradação forçada, avolumar com diluente. Homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 µm com 4,0 mL de descarte prévio. $[Gliclazida] = 600,0 \mu\text{g/mL}$.

Solução Placebo – Degradação Íon Metálico

Transferir 2,0 mL da *Solução Estoque Placebo* para balão volumétrico de 20,0 mL, adicionar 7,0 mL de diluente e 2,0 mL de *FeCl3* 10 mM. Manter a solução em temperatura ambiente

e protegida da luz durante o período de 6 horas. Após o período de degradação forçada, avolumar com diluente. Homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 µm com 4,0 mL de descarte prévio. $[Gliclazida]_{eq} = 600,0 \mu\text{g/mL}$.

Produto Acabado Fotolítico

Transferir cerca de 1200 mg de *Gliclazida produto acabado* para frasco de headspace e levar à câmara de fotoestabilidade, na posição horizontal. As amostras serão expostas a 2,4 milhões de lux/hora (correspondente a 2 ciclos de fotoestabilidade).

Placebo Fotolítico

Transferir cerca de 1200 mg de *Placebo* para frasco de headspace transparente e levar à câmara de fotoestabilidade, na posição horizontal. As amostras serão expostas a 2,4 milhões de lux/hora (correspondente a 2 ciclos de fotoestabilidade).

Produto Acabado Térmico

Transferir 1200 mg de *Gliclazida produto acabado* em frasco de headspace e levar para estufa a uma temperatura de 60°C por um período máximo de 10 dias.

Placebo Térmico

Transferir 1200 mg de *Placebo* em frasco de headspace e levar para estufa a uma temperatura de 60°C por um período máximo de 10 dias.

Produto Acabado Umidade

Transferir 1200 mg de *Gliclazida produto acabado* para frasco de headspace com a tampa aberta e levar para câmara climática à 40 °C e 75% de umidade por um período máximo de 10 dias.

Placebo Umidade

Transferir 1200 mg de *Placebo* para frasco de headspace com a tampa aberta e levar para câmara climática à 40 °C e 75% de umidade por um período máximo de 10 dias.

Solução Teste PA SR – Degradação Fotolítica, Térmica e Úmida

Transferir o equivalente a 30,0 mg de *Gliclazida* para balão volumétrico de 50,0 mL. Adicionar 25,0 mL de diluente e levar ao ultrassom sem aquecimento por 10 minutos. Completar o volume do balão com o diluente. Filtrar em membrana PVDF 0,45µm, com 4,0 mL de descarte prévio. $[Gliclazida] = 600,0 \mu\text{g/mL}$.

Solução Placebo – Degradação Fotolítica, Térmica e Úmida

Transferir quantidade de placebo equivalente a 30,0 mg de *Gliclazida* para balão volumétrico de 50,0 mL. Adicionar 25,0 mL de diluente e levar ao ultrassom sem aquecimento por 10 minutos. Completar o volume do balão com o diluente. Filtrar em membrana PVDF 0,45µm, com 4,0 mL de descarte prévio. $[Gliclazida]_{eq} = 600,0 \mu\text{g/mL}$.

8.4 APÊNDICE IV

- **Linearidade Doseamento**

Abaixo está demonstrado na íntegra o relatório gerado a partir da análise estatística no software Action Stat™.

A linearidade de um procedimento analítico é a sua capacidade de obter resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra.

COLETA DE DADOS

A seguir, apresentamos os dados coletados.

<u>Teorica_µg_mL</u>	<u>Area_mAU</u>	<u>Replicas</u>
419,054055	4126398	A
419,263425	4056294	A
419,57748	4114754	A
478,91892	4658705	B
479,1582	4624785	B
479,51712	4713969	B
538,783785	5234171	C
539,052975	5233852	C
539,45676	5297056	C
598,64865	5791150	D
598,94775	5807047	D
599,3964	5836132	D
778,243245	7472562	E
778,632075	7574620	E
779,21532	7607829	E

Tabela 1: Conjunto de dados para Linearidade.

MÉTODO DOS MÍNIMOS QUADRADOS ORDINÁRIOS: ESTIMAÇÃO

O Método dos Mínimos Quadrados é uma eficiente estratégia de estimação dos parâmetros da regressão e sua aplicação não é limitada apenas às relações lineares. Nesta seção utilizamos o Método dos Mínimos Quadrados Ordinários.

TESTE DO COEFICIENTE ANGULAR

Para avaliar a significância do modelo utilizamos o teste F da ANOVA. Neste caso, testamos as hipóteses:

H0: coeficiente angular igual a zero;

H1: coeficiente angular diferente de zero.

	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
Teórica_µg_mL	1	21067114898843,9	21067114898843,9	14417,998766	0
Resíduos	13	18995180823,6855	1461167755,66812		

Tabela 2: Tabela da ANOVA

Como P-valor (0) do teste F da ANOVA é menor que 0,05 (conforme especificado) rejeitamos a hipótesenula (coeficiente angular zero) ao nível de significância de 5%.

Mínimo	1Q	Mediana	Média	3Q	Máximo
-71630	-27440	-9219	0	33410	54300

Tabela 3: Análise exploratória (resíduos)

As estimativas dos parâmetros (coeficientes de regressão) são respectivamente:

	Estimativa	Desvio Padrão	Estat.t	P-valor
Intercepto	66580,311502	46123,874784	1,443511	0,17254
Teórica_µg_mL	9608,324095	80,019374	120,074971	0

Tabela 4: Coeficientes

	Limite Inferior	Limite Superior
Intercepto	-33064,261896	166224,884899
Teórica_µg_mL	9435,452747	9781,195443

Tabela 5: Intervalo de confiança para os parâmetros

TESTE DO INTERCEPTO (COEFICIENTE LINEAR)

Para avaliarmos o intercepto (coeficiente linear) utilizamos a estatística t de Student. Neste caso, testamos as hipóteses:

H0: intercepto (coeficiente linear) igual a

zero; H1: intercepto diferente de zero.

Como P-valor (0,1725) do teste t é maior que 0,05, não rejeitamos a hipótese nula (intercepto igual a zero) ao nível de significância de 5%.

IMPACTO DO COEFICIENTE LINEAR (INTERCEPTO)

Teorica_µg_mL	Area_mAU	Replicas	Impacto do Coeficiente Linear (%)
419,054055	4126398	A	1,613521
419,263425	4056294	A	1,641407
419,57748	4114754	A	1,618087
478,91892	4658705	B	1,429159
479,1582	4624785	B	1,439641
479,51712	4713969	B	1,412405
538,783785	5234171	C	1,272032
539,052975	5233852	C	1,272109
539,45676	5297056	C	1,25693
598,64865	5791150	D	1,149691
598,94775	5807047	D	1,146543
599,3964	5836132	D	1,140829
778,243245	7472562	E	0,890997
778,632075	7574620	E	0,878992
779,21532	7607829	E	0,875155

Tabela 6: Tabela Impacto do Coeficiente Linear (Intercepto)

COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE PEARSON

O coeficiente de correlação de Pearson mede o grau de proporcionalidade entre a variável explicativa ea variável resposta.

Desvio Padrão dos Resíduos	Graus de Liberdade	R ²	Coeficiente de Correlação
38225,224076	13	0,9991	0,9995

Tabela 7: Medida Descritiva da Qualidade do Ajuste

Como o coeficiente de correlação (0.9995) é maior que 0.990 (conforme especificado), concluímos que existe uma relação linear adequada.

ANÁLISE GRÁFICA

DIAGRAMA DE DISPERSÃO

O diagrama de dispersão é um gráfico que permite a visualização de uma possível associação entre variáveis quantitativas.

Valores Ajustados

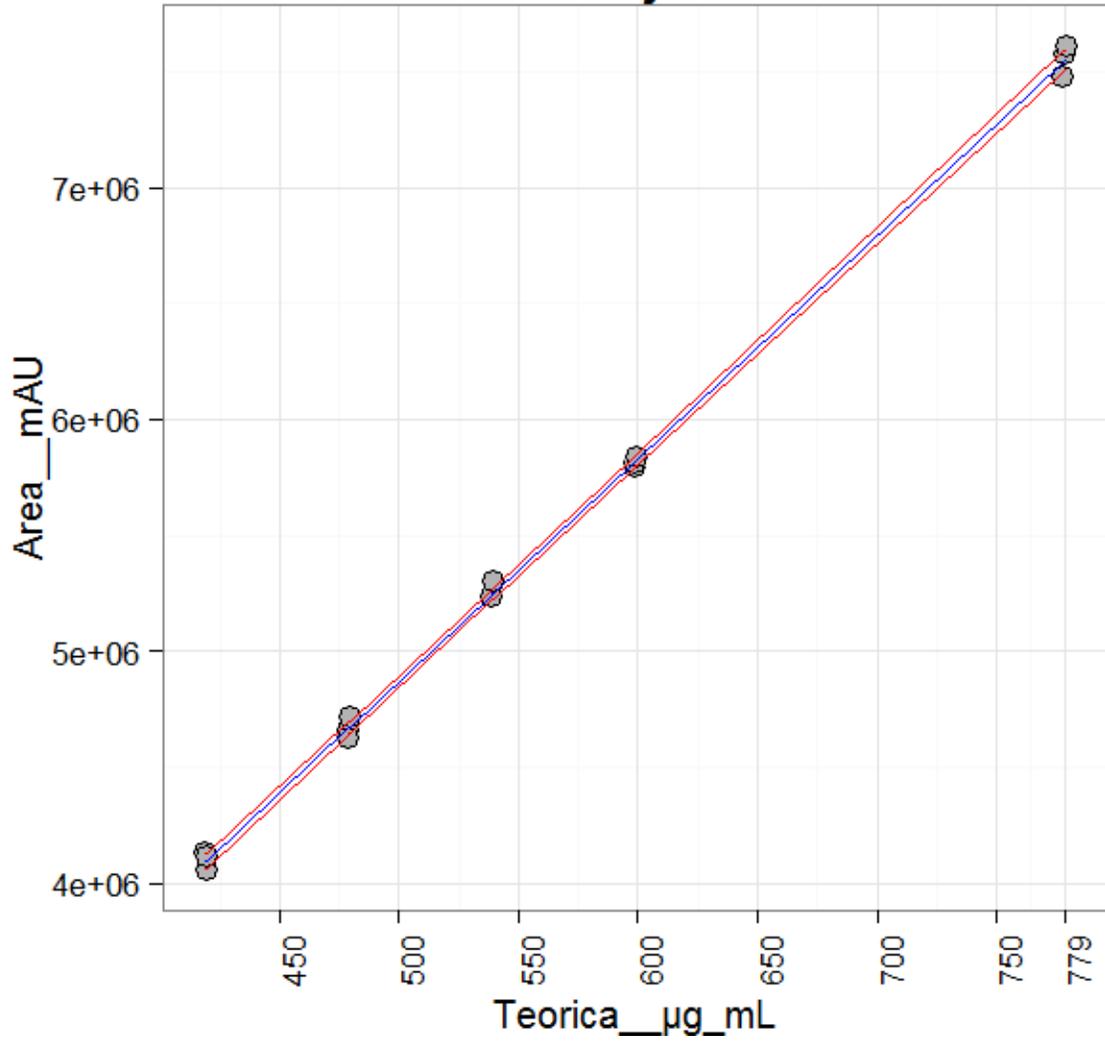


Figura 1: Diagrama de Dispersão

DIAGNÓSTICO DOS RESÍDUOS DO MODELO.

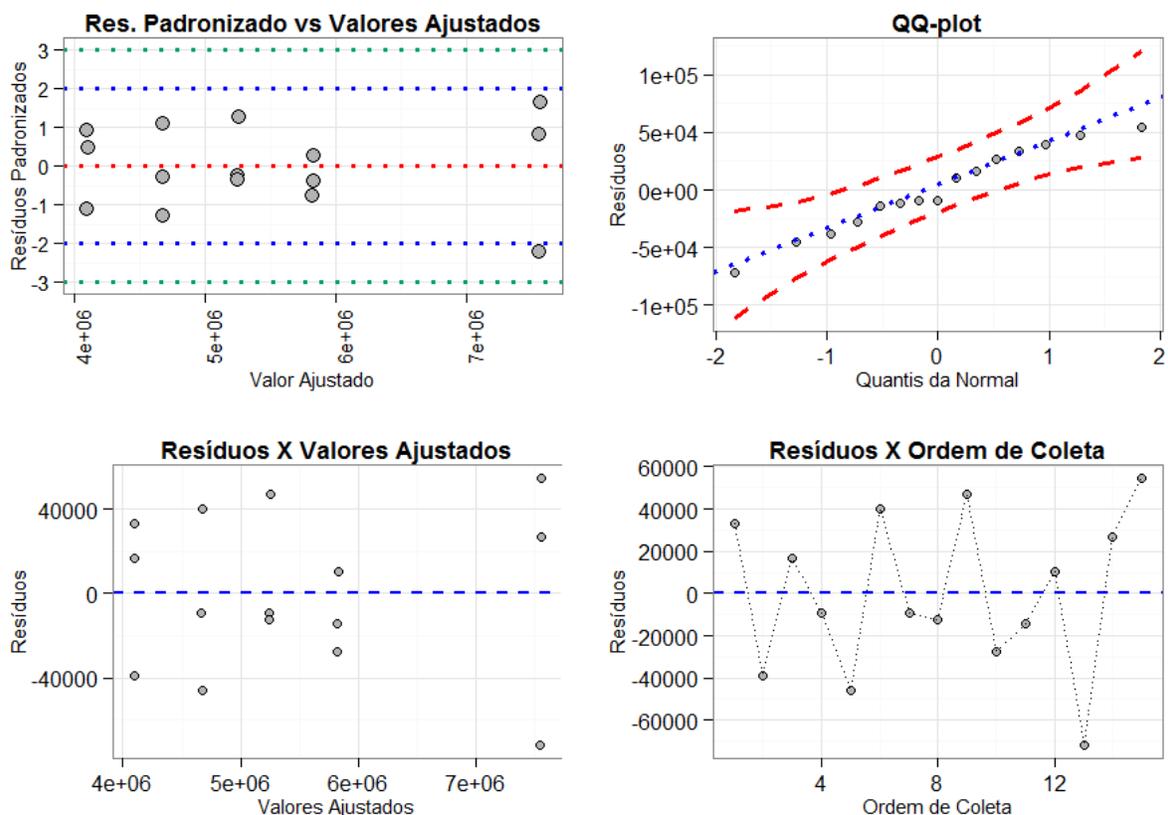


Figura 2: Gráfico da Análise dos Resíduos.

	Estatística	P-valor
Anderson-Darling	0,203485	0,846753

Tabela 8: Teste de Normalidade

H0: a distribuição dos resíduos é Normal;

H1: a distribuição dos resíduos não é Normal.

Como P-valor (0,8468) do teste de Anderson-Darling é maior que 0,05, não rejeitamos a hipótese denormalidade dos resíduos ao nível de significância de 5%.

AVALIAÇÃO DA HOMOCEASTICIDADE: TESTE DE BREUSCHPAGAN

Para avaliarmos a homocedasticidade da variância realizamos o seguinte teste de

hipóteses: H0: Variâncias dos níveis são iguais;

H1: Pelo menos uma variância diferente.

A seguir, apresentamos o teste de Teste de Breusch Pagan.

Estatística	GL	P-valor
3.106023	1	0.078003

Tabela 9: Teste de Homocedasticidade - Breusch Pagan

Como P-valor (0,078) do Teste de Breusch Pagan é maior que 0,05 (conforme proposto), não rejeitamos a hipótese de igualdade das variâncias ao nível de significância de 5%. Logo, temos um modelo homocedástico.

VALORES EXTREMOS NA RESPOSTA

Nesta seção, vamos avaliar os valores extremos na resposta. Para isto, avaliamos os resíduos padronizados e os resíduos studentizados.

RESÍDUOS

Como critério, será considerado valores extremos na resposta, as observações com resíduos padronizados e/ou studentizados maiores que 3.

N.Obs	Teórica μ_mL	Resíduos	Resíduos Studentizados	Resíduos Padronizados
1	419,054055	33410,514774	0,94859	0,952267
2	419,263425	-38705,180042	-1,113094	-1,103002
3	419,57748	16737,277735	0,462212	0,476859
4	478,91892	-9483,510044	-0,251595	-0,261181
5	479,1582	-45702,589833	-1,290337	-1,25855
6	479,51712	40032,790483	1,112262	1,102255
7	538,783785	-9218,534862	-0,240747	-0,249974
8	539,052975	-12123,999625	-0,317174	-0,32875
9	539,45676	47200,303231	1,315245	1,279809
10	598,64865	-27440,559679	-0,731848	-0,745281
11	598,94775	-14417,409416	-0,37847	-0,391594
12	599,3964	10356,815979	0,271115	0,281325
13	778,243245	-71631,634133	-2,653734	-2,19265
14	778,632075	26690,36121	0,806332	0,817405
15	779,21532	54295,354223	1,802225	1,664079

Tabela 10: Tabela de Resumo da Análise dos Resíduos.

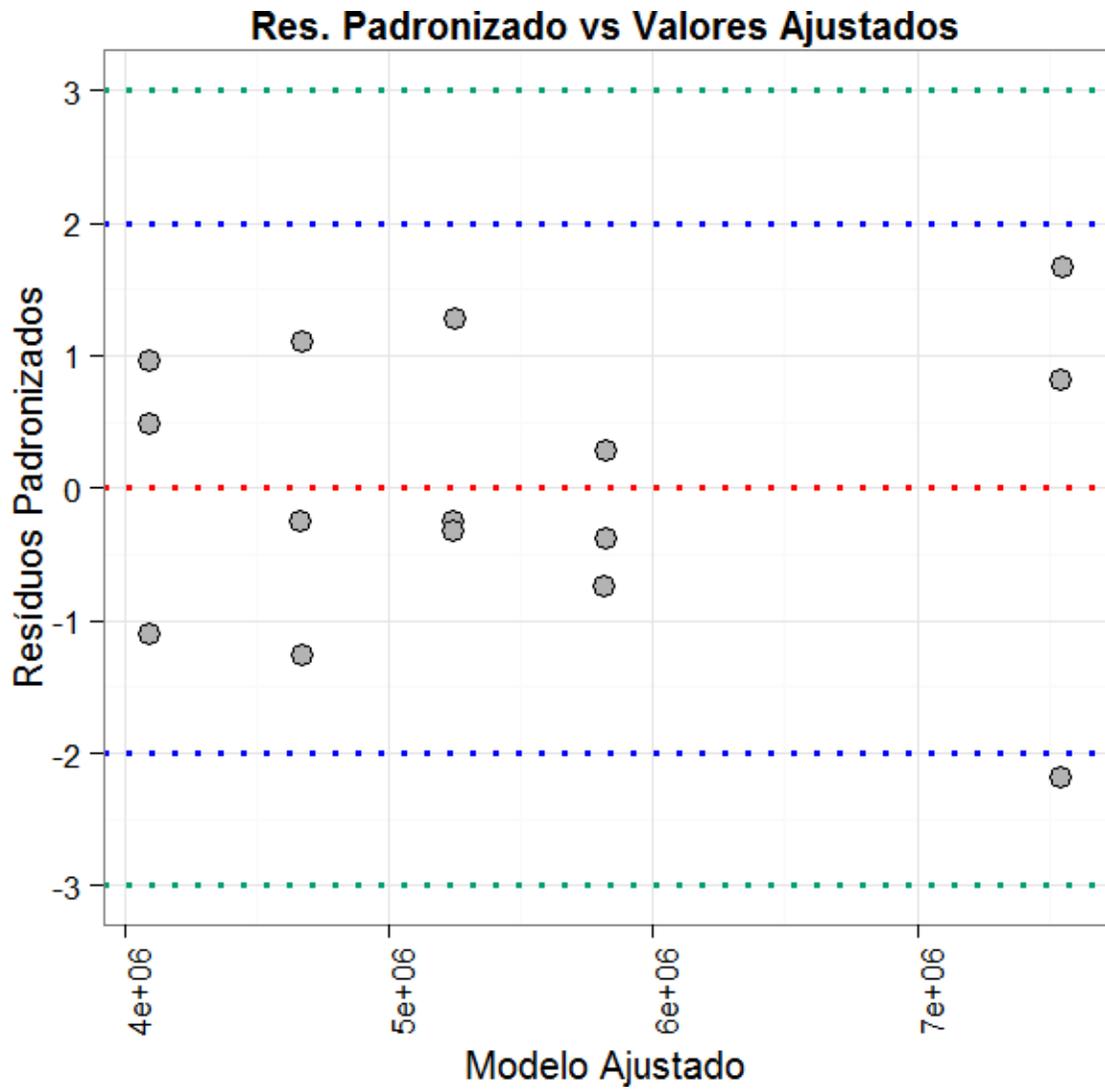


Figura 3: Análise dos Resíduos (Padronizados).

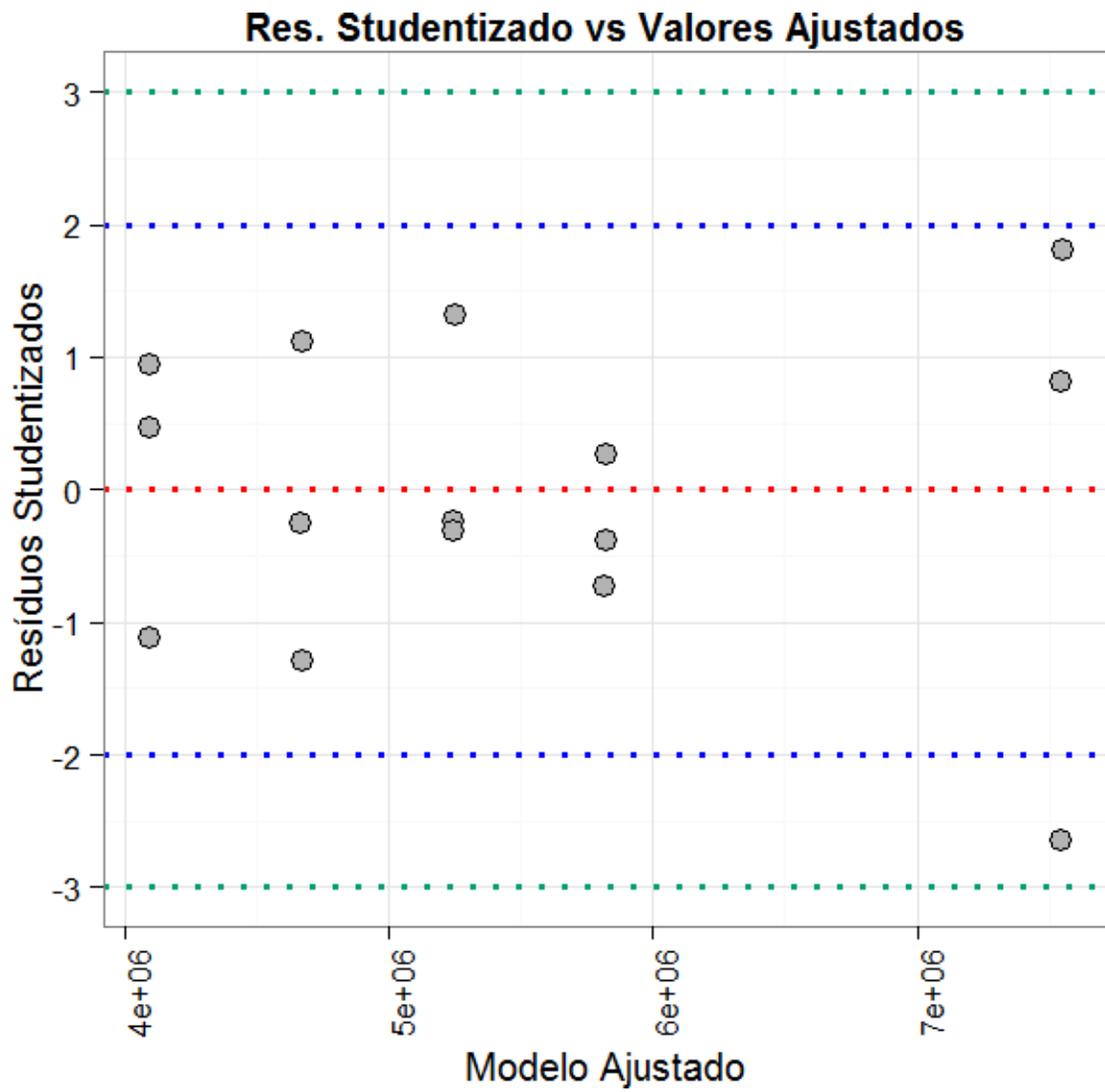
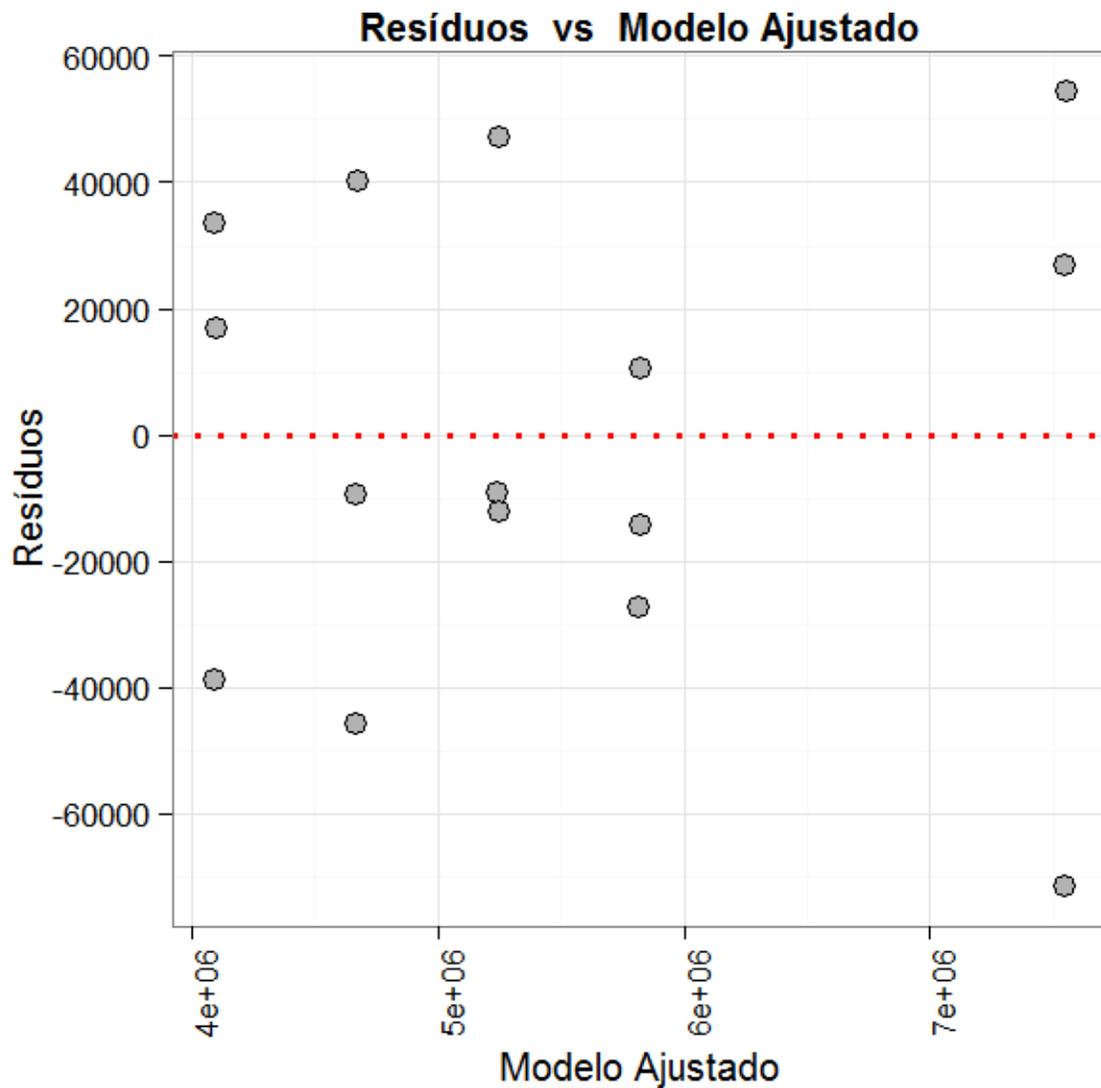


Figura 4: Análise dos Resíduos (Studentizados).



Neste item podemos observar dos gráficos Res. Padronizado vs Valores Ajustados Res. Studentizados vs Valores Ajustados que não foi detectado valores extremos.

PONTOS INFLUENTES

Um ponto é influente se sua exclusão do ajuste da regressão causa uma mudança substancial nos valores ajustados. A seguir, apresentamos três tipos de pontos influentes, são eles a distância de Cook, DFBETA e DFFITS. O DFBETA avalia a influência do ponto no coeficiente angular. O DFFITS avalia a influência do ponto no ajuste da curva. A distância de Cook avalia ponto de alavanca com resíduo padronizado alto. Os critérios para análise dos pontos influentes são dados por:

Diagnóstico	Fórmula	Valor
DFFITS	$2 \cdot \text{raíz}((p+1)/n)$	0,73
DCOOK	$4/n$	0,266667
DFBETA	$2/\text{raíz}(n)$	0,52

Tabela 11: Critério

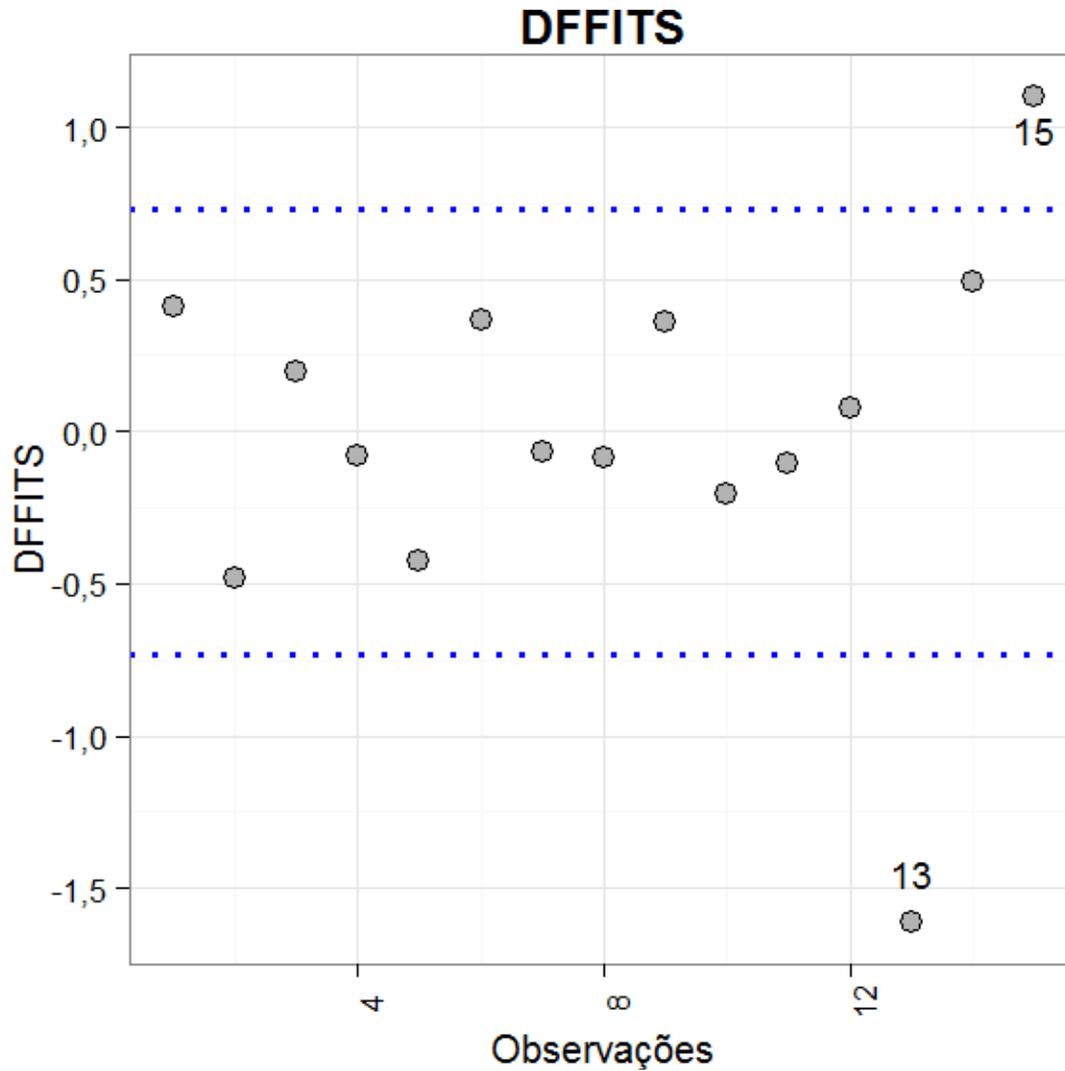


Figura 5: Gráfico da Análise dos Pontos Influentes (DFFIT).

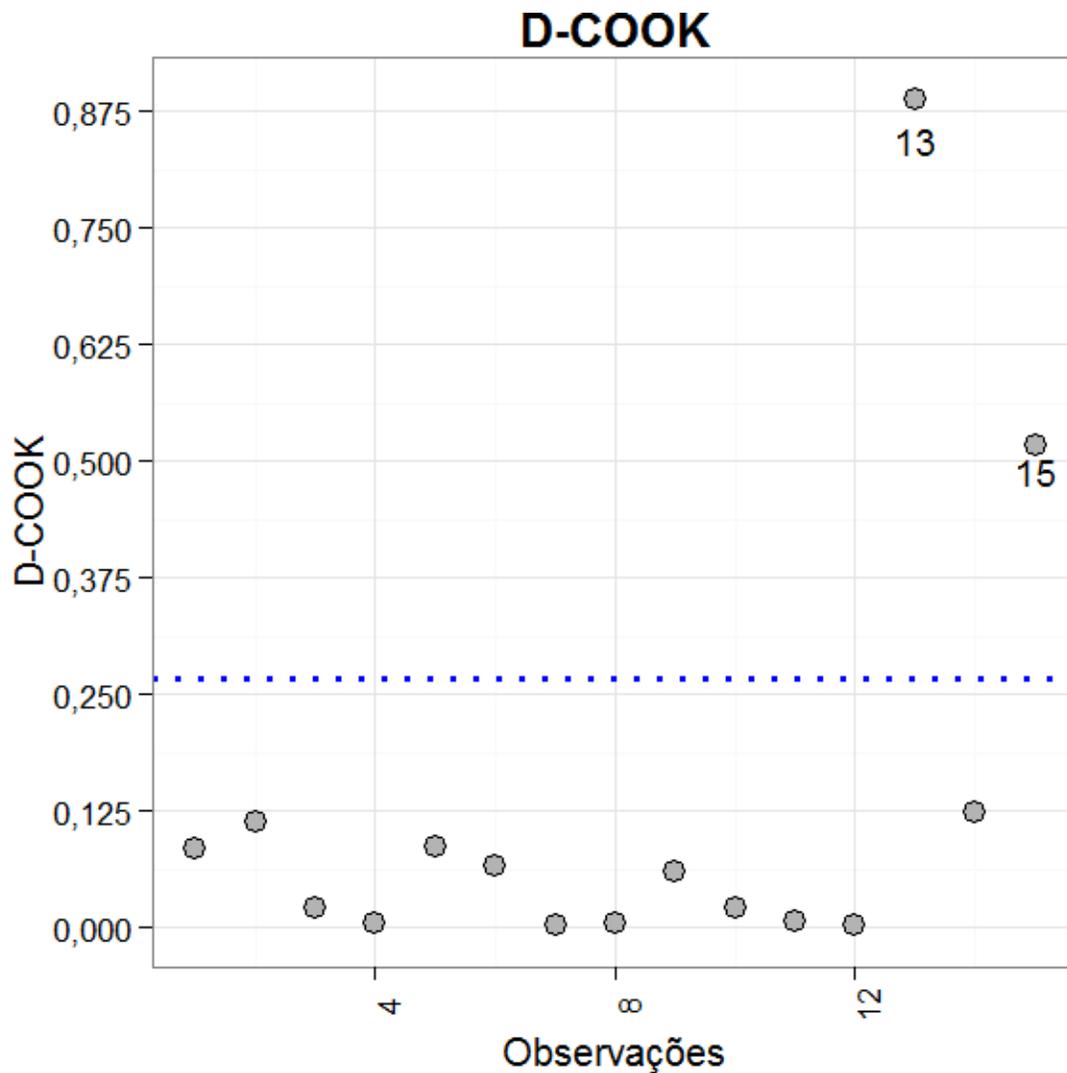


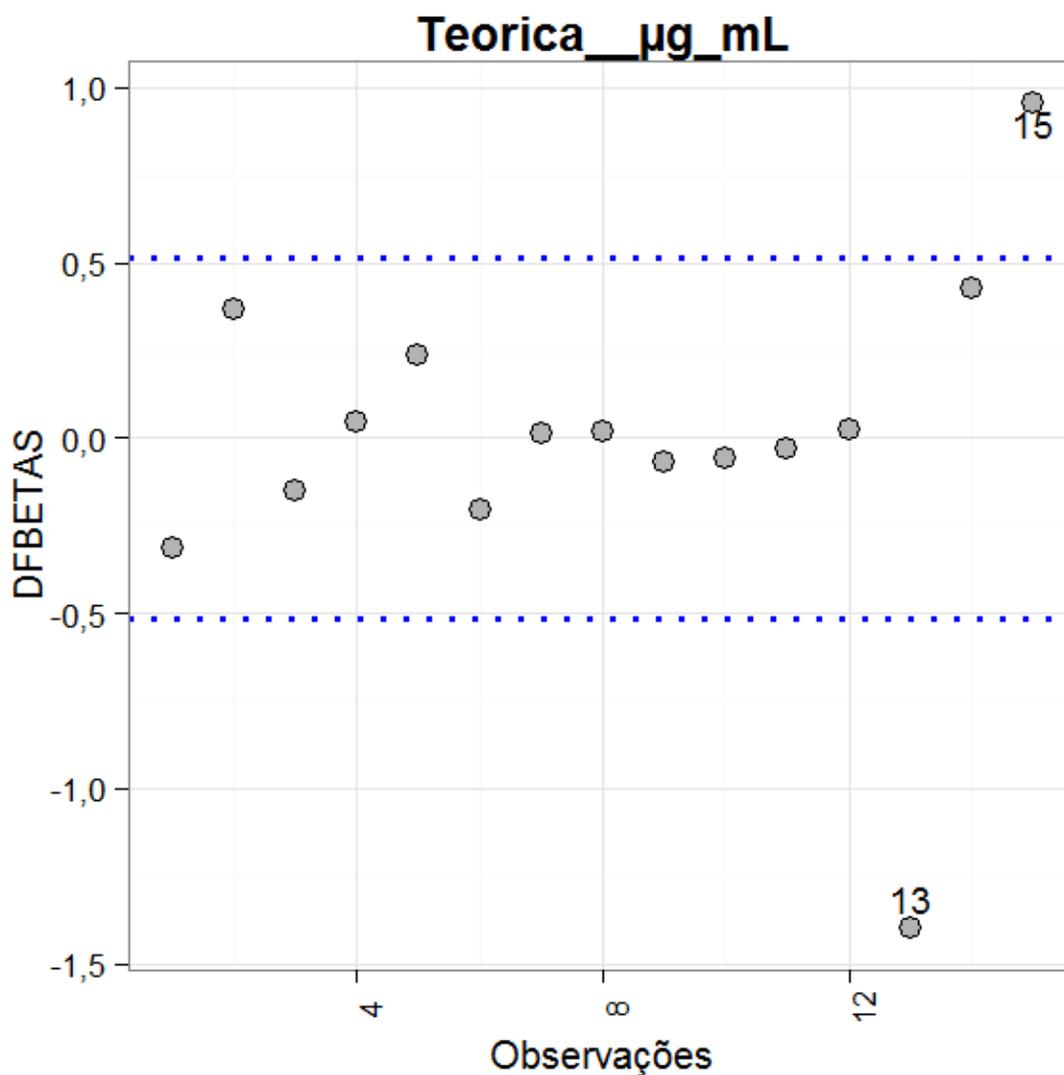
Figura 6: Gráfico da Análise dos Pontos Influentes (DCOOK).

<u>Observações</u>	<u>DFITs</u>	<u>Critério</u>
13	-1,61	± 0.73
15	1,1	± 0.73

Tabela 12: Análise dos Pontos Influentes (DFIT).

<u>Observações</u>	<u>DCOOK</u>	<u>Critério</u>
13	0,887216	0,266667
15	0,515802	0,266667

Tabela 13: Análise dos Pontos Influentes (DCOOK).



<u>Observações</u>	<u>DFBETA</u>	<u>Critério</u>
13	-1,398717	0,516398
15	0,955402	0,516398

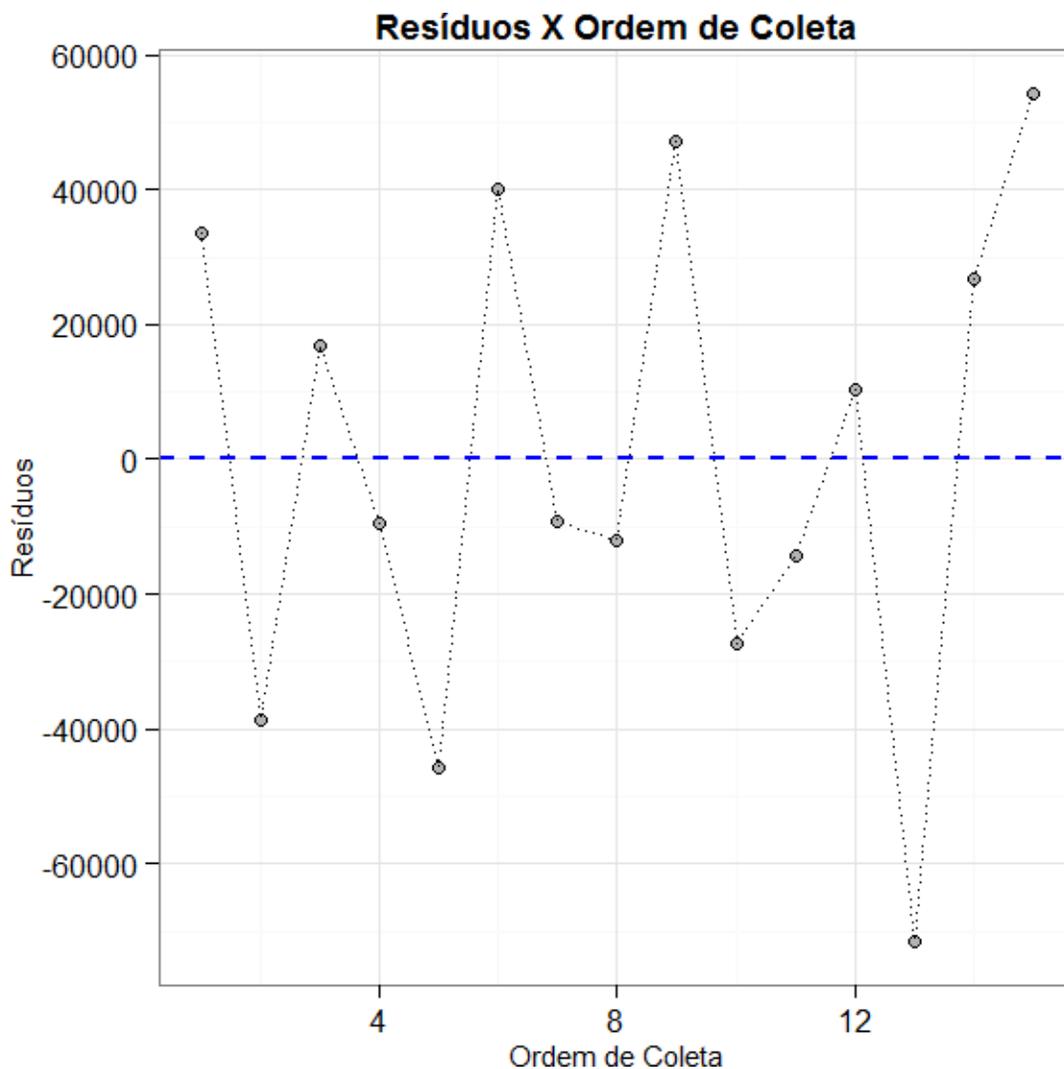
Tabela 14: Pontos Influentes (DFBETA).

TESTE DE INDEPENDÊNCIA

Neste item testamos a independência das observações através do seguinte teste de hipóteses: H0: Observações são independentes;
H1: Observações não são independentes.

<u>Estatística</u>	<u>P-valor</u>
2,47873	0,492572

Tabela 15: Teste de Independência - Durbin-Watson.



Como P-valor (0,4926) do teste de Durbin-Watson é maior que 0,05. Logo, não rejeitamos a hipótese de independência das observações ao nível de significância de 5%.

RESUMO DO ESTUDO DE LINEARIDADE

Para finalizarmos, apresentamos uma tabela com o resumo do estudo.

Teste	Conclusão
Teste F da ANOVA	Não rejeitamos a significância do modelo linear
Teste do Intercepto	Intercepto igual a zero
Coefficiente de Correlação de Pearson	$R = 0.9995$ que é maior que o proposto (0,99)
Teste de Normalidade dos Resíduos	Não rejeitamos a hipótese de normalidade dos resíduos
Teste de Homocedasticidade	Não rejeitamos a homocedasticidade da variância
Valores extremos na resposta	Não detectamos pontos extremos
Teste de independência das observações	Não detectado dependência das observações

Tabela 16: Resumo das Conclusões do estudo de Linearidade (Método dos Mínimos Quadrados Ordinários).

- **Linearidade Inespecíficas**

A linearidade de um procedimento analítico é a sua capacidade de obter resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra.

COLETA DE DADOS

A seguir, apresentamos os dados coletados.

μg_mL	Area_mAU	Ponto
0,600395	5618	1
0,601394	5295	1
0,601394	5411	1
2,401582	22910	2
2,405578	21243	2
2,405578	23517	2
4,202768	38935	3
4,209761	39167	3
4,209761	39588	3
6,003954	56997	4
6,013944	57018	4
6,013944	56044	4
7,204745	68428	5
7,216733	69162	5
7,216733	67234	5

Tabela 1: Conjunto de dados para Linearidade.

MÉTODO DOS MÍNIMOS QUADRADOS ORDINÁRIOS: ESTIMAÇÃO

O Método dos Mínimos Quadrados é uma eficiente estratégia de estimação dos parâmetros da regressão e sua aplicação não é limitada apenas às relações lineares. Nesta seção utilizamos o Método dos Mínimos Quadrados Ordinários.

TESTE DO COEFICIENTE ANGULAR

Para avaliar a significância do modelo utilizamos o teste F da ANOVA. Neste caso, testamos as hipóteses:

H0: coeficiente angular igual a zero;

H1: coeficiente angular diferente de zero.

	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
μg_mL	1	7693949433,45336	7693949433,45336	16221,028492	0
Resíduos	13	6166152,946637	474319,457434		

Tabela 2: Tabela da ANOVA

Como P-valor (0) do teste F da ANOVA é menor que 0,05 (conforme especificado) rejeitamos a hipótesenula (coeficiente angular zero) ao nível de significância de 5%.

Mínimo	1Q	Mediana	Média	3Q	Máximo
-1234	-599,5	58,64	0	400,4	1040

Tabela 3: Análise exploratória (resíduos).

As estimativas dos parâmetros (coeficientes de regressão) são respectivamente:

	Estimativa	Desvio Padrão	Estat.t	P-valor
Intercepto	-355,731448	352,701403	-1,008591	0,331576
µg_mL	9491,428314	74,523352	127,361802	0

Tabela 4: Coeficientes

	Limite Inferior	Limite Superior
Intercepto	-1117,696505	406,233609
µg_mL	9330,430401	9652,426227

Tabela 5: Intervalo de confiança para os parâmetros

TESTE DO INTERCEPTO (COEFICIENTE LINEAR)

Para avaliarmos o intercepto (coeficiente linear) utilizamos a estatística t de Student. Neste caso, testamos as hipóteses:

H0: intercepto (coeficiente linear) igual a zero;

H1: intercepto diferente de zero.

Como P-valor (0,3316) do teste t é maior que 0,05, não rejeitamos a hipótese nula (intercepto igual a zero) ao nível de significância de 5%.

IMPACTO DO COEFICIENTE LINEAR (INTERCEPTO)

µg_mL	Area_mAU	Ponto	Impacto do Coeficiente Linear (%)
0,600395	5618	1	6,331994
0,601394	5295	1	6,718252
0,601394	5411	1	6,574227
2,401582	22910	2	1,552734
2,405578	21243	2	1,674582
2,405578	23517	2	1,512657
4,202768	38935	3	0,913655
4,209761	39167	3	0,908243
4,209761	39588	3	0,898584
6,003954	56997	4	0,624123
6,013944	57018	4	0,623893
6,013944	56044	4	0,634736
7,204745	68428	5	0,519862
7,216733	69162	5	0,514345
7,216733	67234	5	0,529095

Tabela 6: Tabela Impacto do Coeficiente Linear (Intercepto)

COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE PEARSON

O coeficiente de correlação de Pearson mede o grau de proporcionalidade entre a variável explicativa ea variável resposta.

Desvio Padrão dos Resíduos	Graus de Liberdade	R ²	Coeficiente de Correlação
688,708543	13	0,9992	0,9996

Tabela 7: Medida Descritiva da Qualidade do Ajuste.

Como o coeficiente de correlação (0.9996) é maior que 0.990 (conforme especificado), concluímos que existe uma relação linear adequada.

ANÁLISE GRÁFICA

DIAGRAMA DE DISPERSÃO

O diagrama de dispersão é um gráfico que permite a visualização de uma possível associação entre variáveis quantitativas.

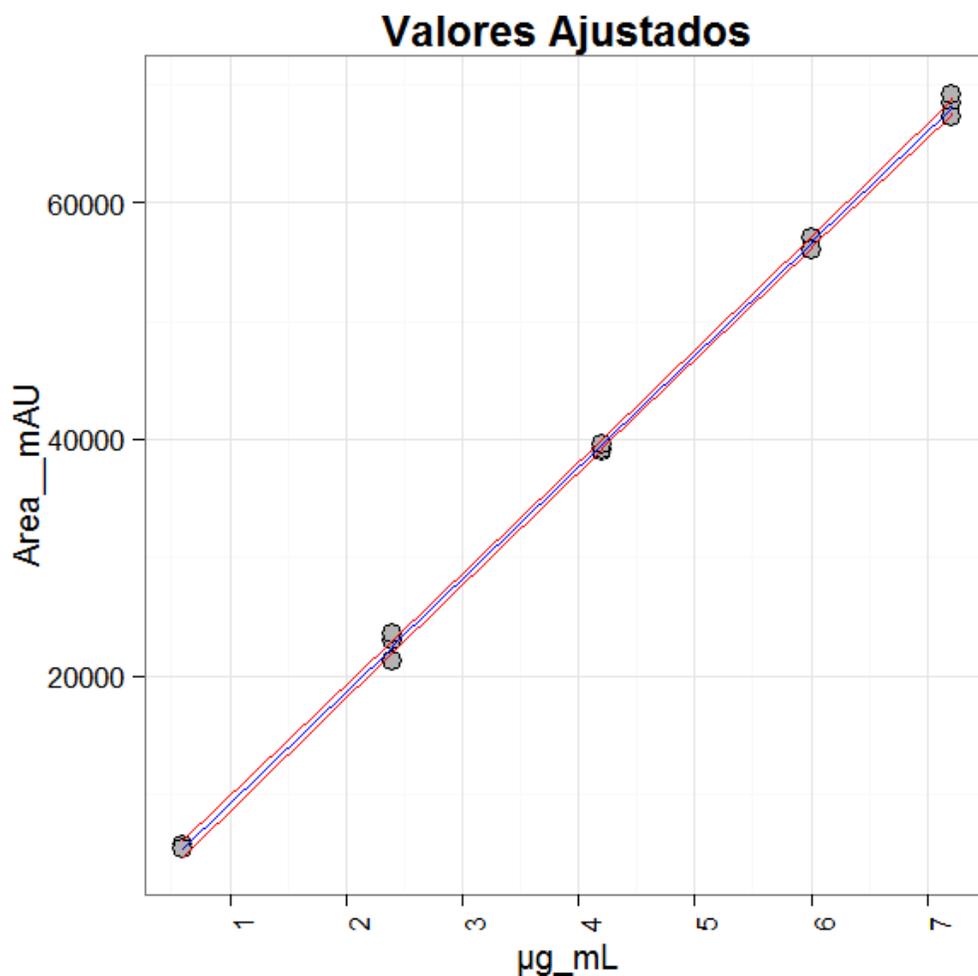


Figura 1: Diagrama de Dispersão

DIAGNÓSTICO DOS RESÍDUOS DO MODELO.

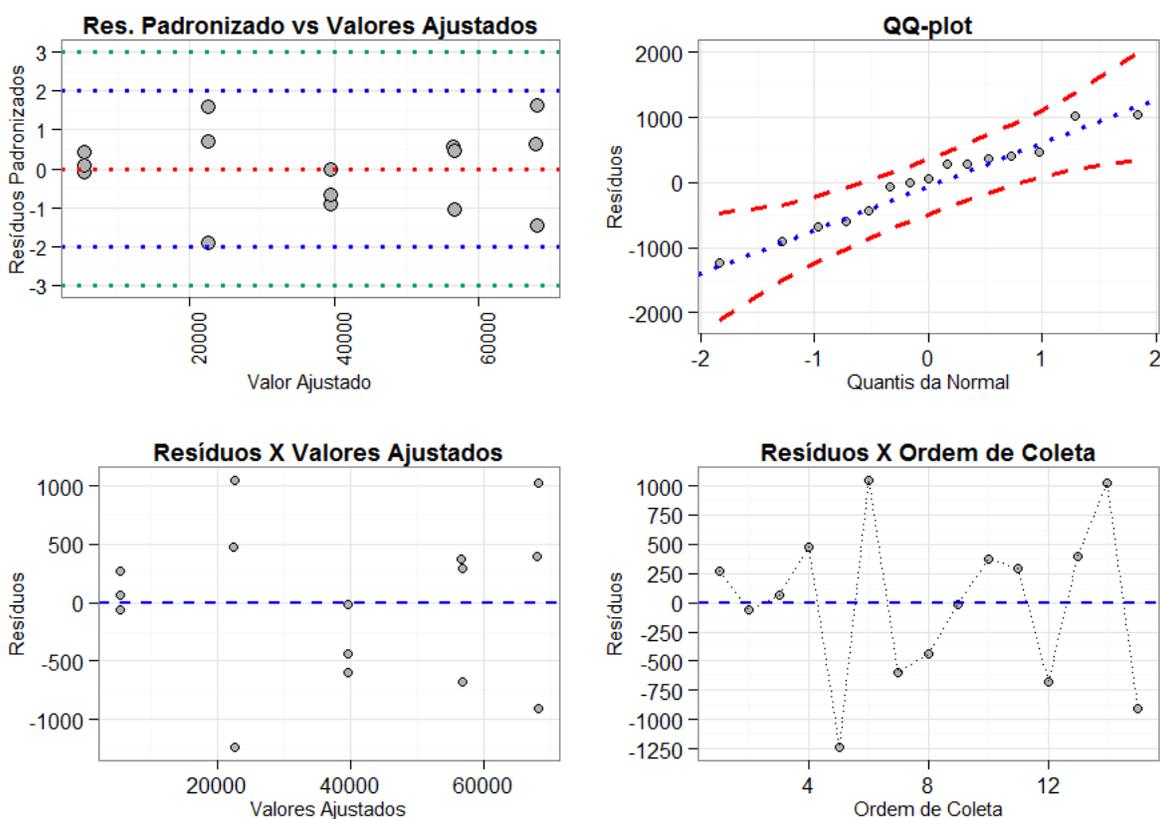


Figura 2: Gráfico da Análise dos Resíduos.

	Estatística	P-valor
Anderson-Darling	0,26236	0,650763

Tabela 8: Teste de Normalidade

H0: a distribuição dos resíduos é Normal;

H1: a distribuição dos resíduos não é Normal.

Como P-valor (0,6508) do teste de Anderson-Darling é maior que 0,05, não rejeitamos a hipótese denormalidade dos resíduos ao nível de significância de 5%.

AVALIAÇÃO DA HOMOCEDESTICIDADE: TESTE DE BREUSCH PAGAN

Para avaliarmos a homocedasticidade da variância realizamos o seguinte teste de

hipóteses: H0: Variâncias dos níveis são iguais;

H1: Pelo menos uma variância diferente.

A seguir, apresentamos o teste de Teste de Breusch Pagan.

Estatística	GL	P-valor
0,393019	1	0,530717

Tabela 9: Teste de Homocedasticidade - Breusch Pagan.

Como P-valor (0,5307) do Teste de Breusch Pagan é maior que 0,05 (conforme proposto), não rejeitamos a hipótese de igualdade das variâncias ao nível de significância de 5%. Logo, temos um modelo homocedástico.

VALORES EXTREMOS NA RESPOSTA

Nesta seção, vamos avaliar os valores extremos na resposta. Para isto, avaliamos os resíduos padronizados e os resíduos studentizados.

RESÍDUOS

Como critério, será considerado valores extremos na resposta, as observações com resíduos padronizados e/ou studentizados maiores que 3.

N.Obs	µg_mL	Resíduos	Resíduos Studentizados	Resíduos Padronizados
1	0,600395	275,121606	0,434933	0,449166
2	0,601394	-57,360274	-0,089999	-0,093642
3	0,601394	58,639726	0,092008	0,095731
4	2,401582	471,29208	0,707304	0,721303
5	2,405578	-1233,63544	-2,129003	-1,88789
6	2,405578	1040,36456	1,704877	1,592118
7	4,202768	-599,537446	-0,894179	-0,901154
8	4,209761	-433,910606	-0,637134	-0,65221
9	4,209761	-12,910606	-0,018645	-0,019406
10	6,003954	366,633028	0,548815	0,564188
11	6,013944	292,814229	0,436449	0,450707
12	6,013944	-681,185771	-1,052865	-1,048498
13	7,204745	400,413344	0,62706	0,642228
14	7,216733	1020,630785	1,766397	1,637879
15	7,216733	-907,369215	-1,529252	-1,45612

Tabela 10: Tabela de Resumo da Análise dos Resíduos

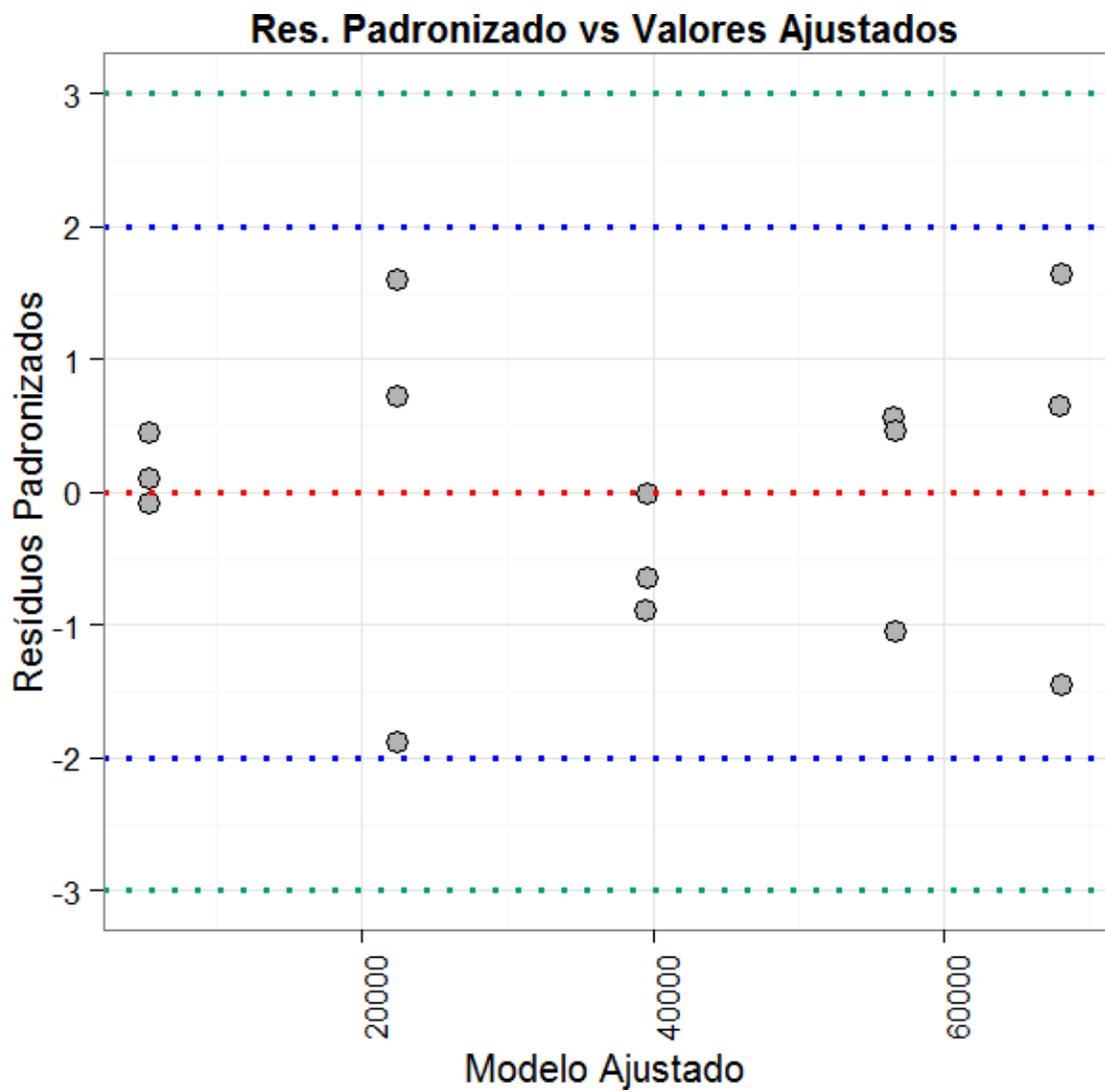


Figura 3: Análise dos Resíduos (Padronizados).

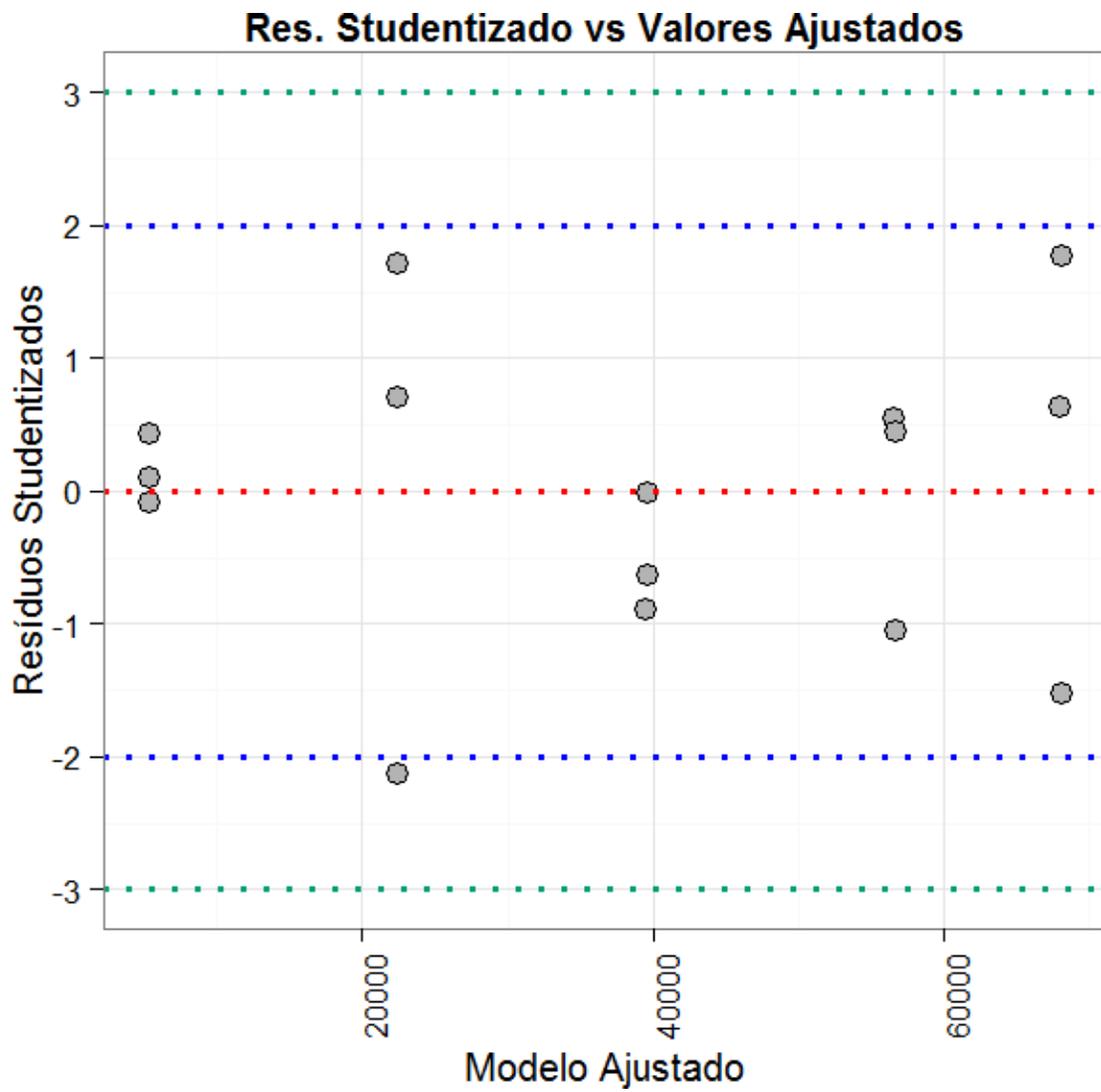
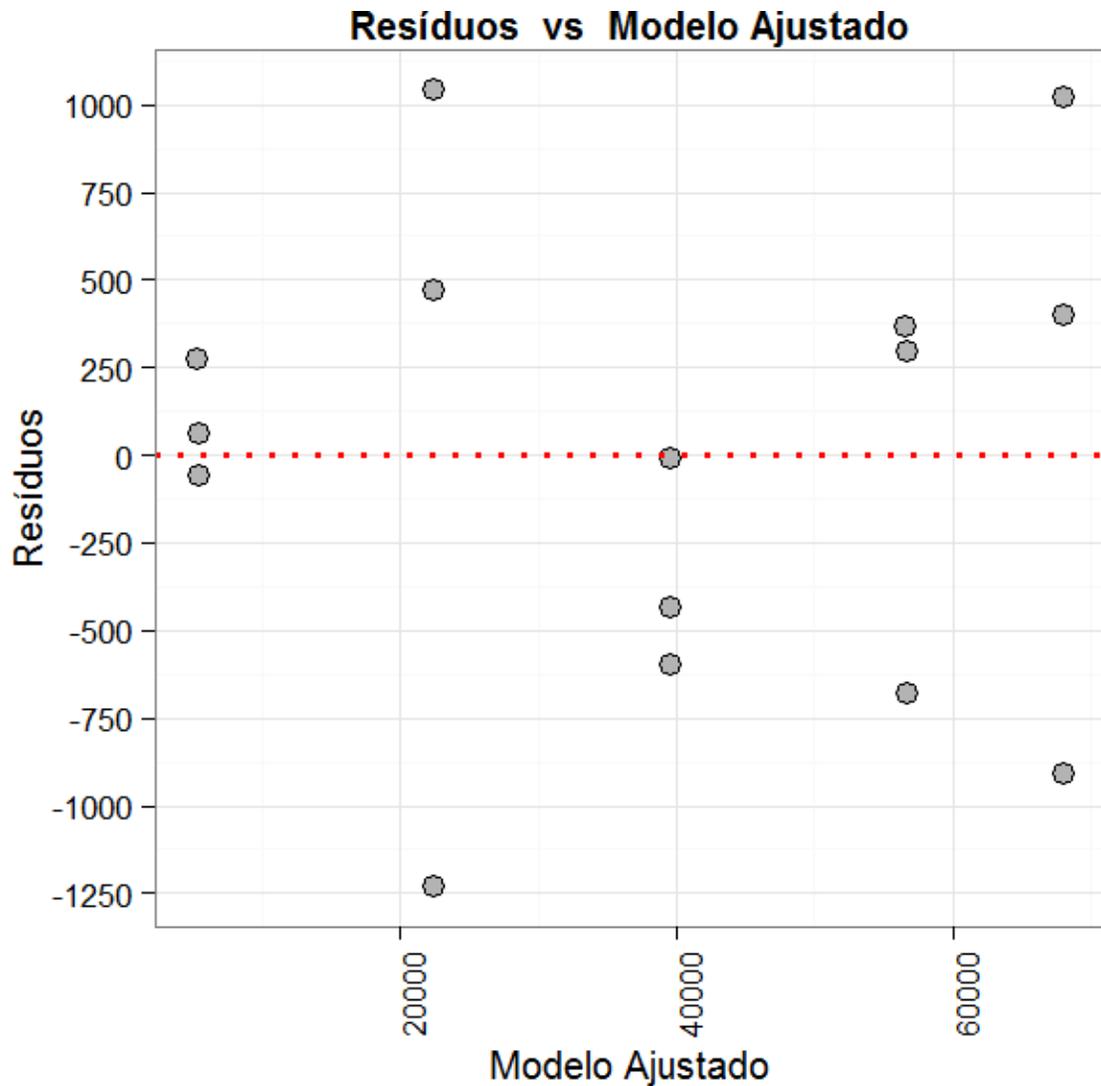


Figura 4: Análise dos Resíduos (Studentizados).



Neste item podemos observar dos gráficos Res. Padronizado vs Valores Ajustados Res. Studentizados vs Valores Ajustados que não foi detectado valores extremos.

PONTOS INFLUENTES

Um ponto é influente se sua exclusão do ajuste da regressão causa uma mudança substancial nos valores ajustados. A seguir, apresentamos três tipos de pontos influentes, são eles a distância de Cook, DFBETA e DFFITS. O DFBETA avalia a influência do ponto no coeficiente angular. O DFFITS avalia a influência do ponto no ajuste da curva. A distância de Cook avalia ponto de alavanca com resíduo padronizado alto. Os critérios para análise dos pontos influentes são dados por:

Diagnóstico	Fórmula	Valor
DFFITS	$2 \cdot \text{raiz}((p+1)/n)$	0,73
DCOOK	$4/n$	0,266667
DFBETA	$2/\text{raiz}(n)$	0,52

Tabela 11: Critério

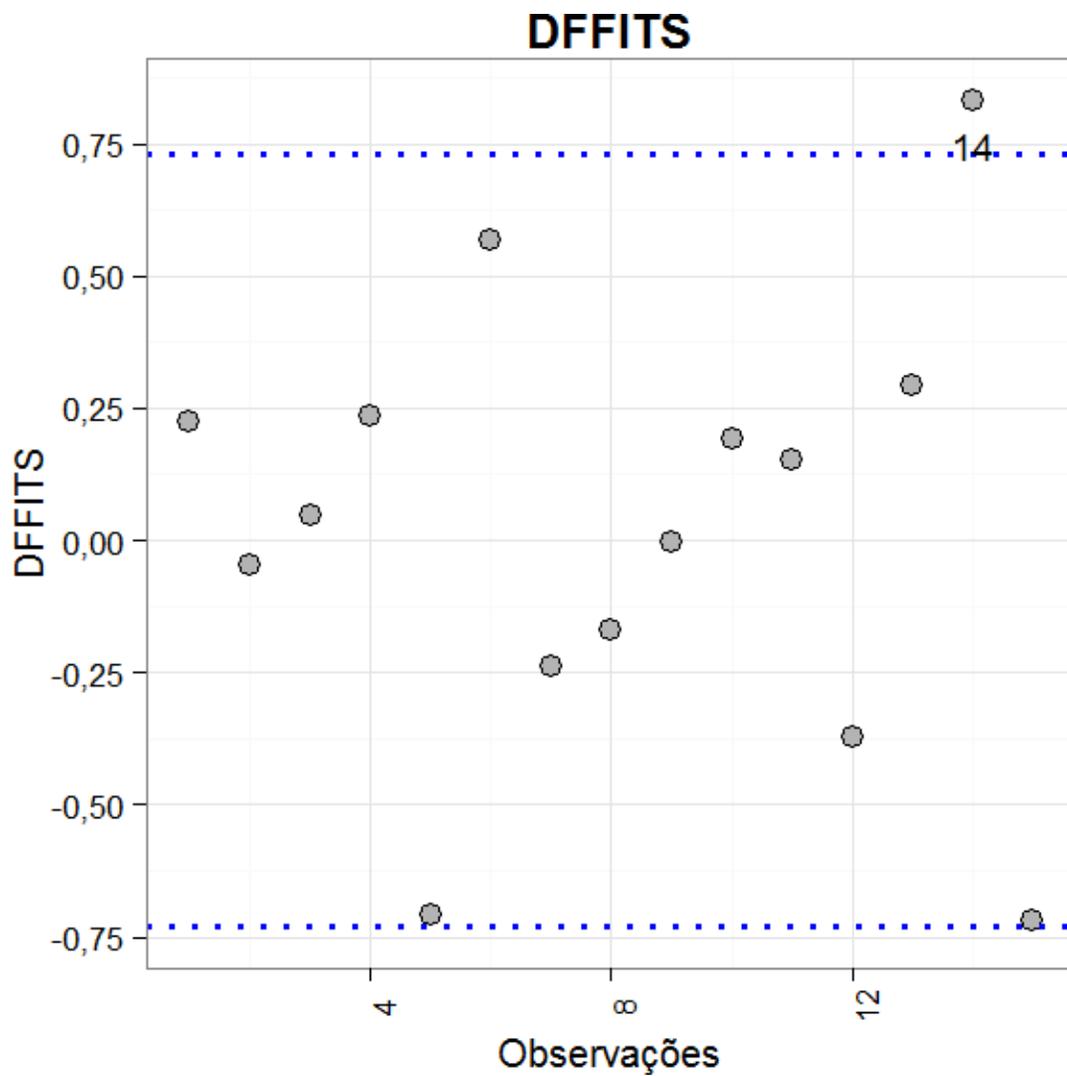


Figura 5: Gráfico da Análise dos Pontos Influentes (DFFIT).

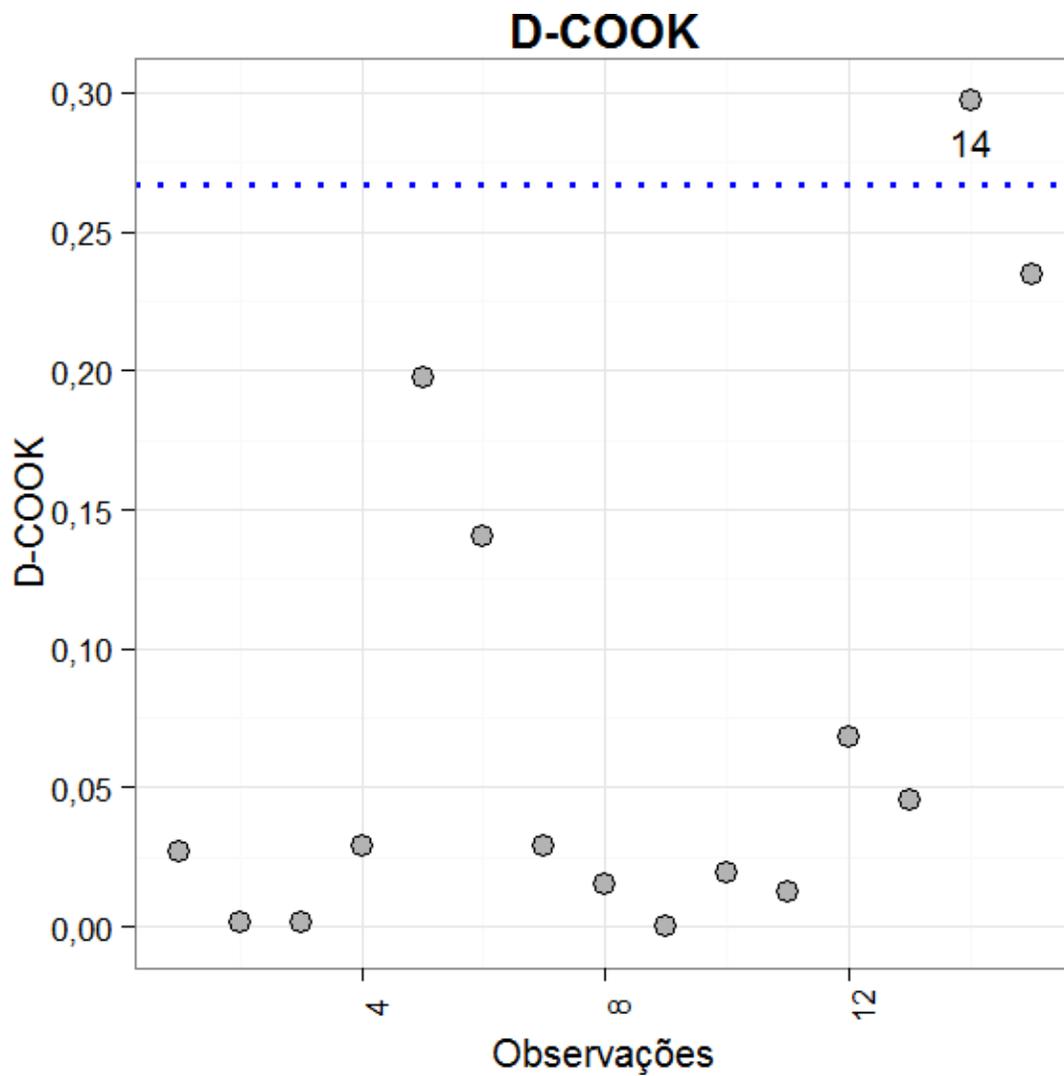


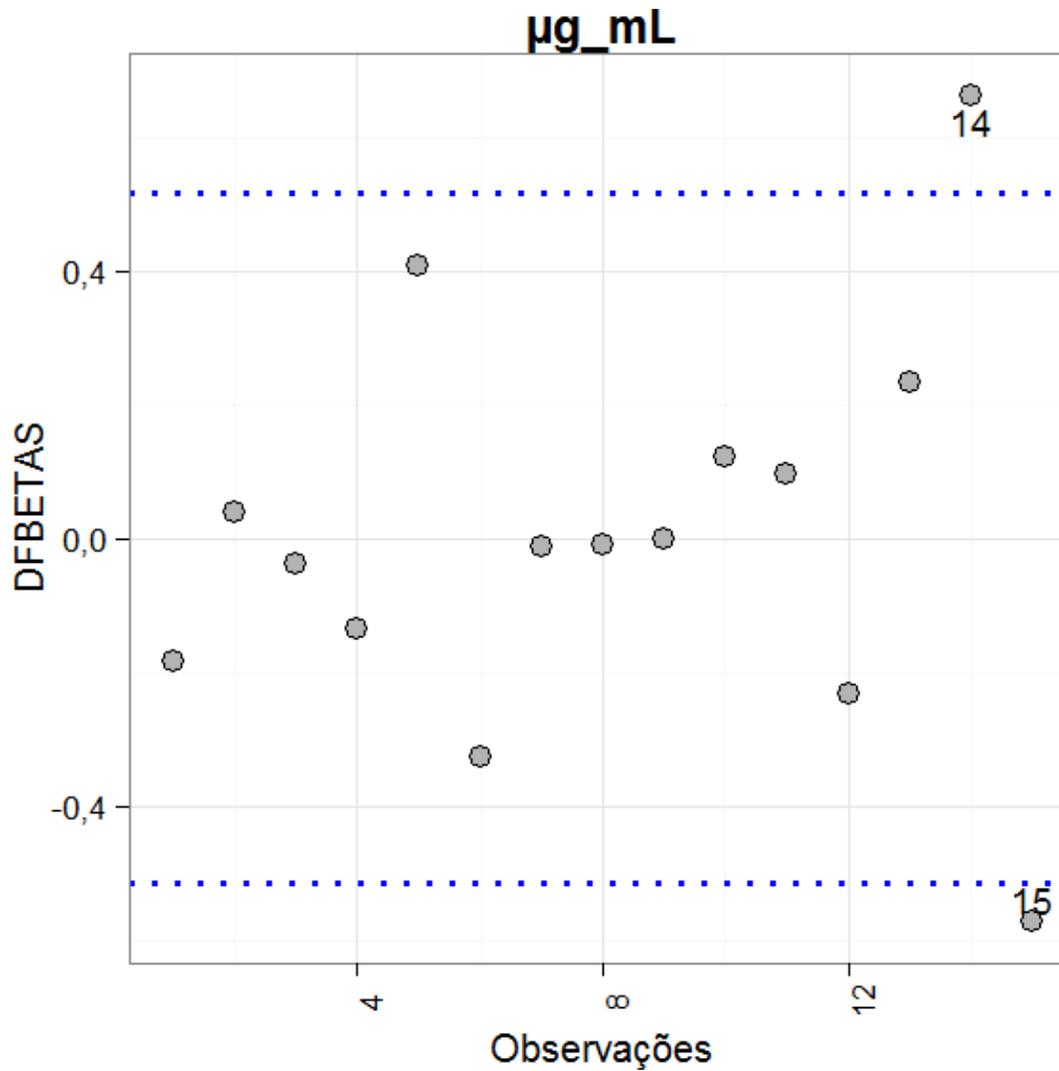
Figura 6: Gráfico da Análise dos Pontos Influentes (DCOOK).

<u>Observações</u>	<u>DFFITS</u>	<u>Critério</u>
14	0,83	$\pm 0,73$

Tabela 12: Análise dos Pontos Influentes (DFFIT).

<u>Observações</u>	<u>DCOOK</u>	<u>Critério</u>
14	0,297117	0,266667

Tabela 13: Análise dos Pontos Influentes (DCOOK).



Observações	DFBETA	Critério
14	0,661106	0,516398
15	-0,57235	0,516398

Tabela 14: Pontos Influentes (DFBETA).

TESTE DE INDEPENDÊNCIA

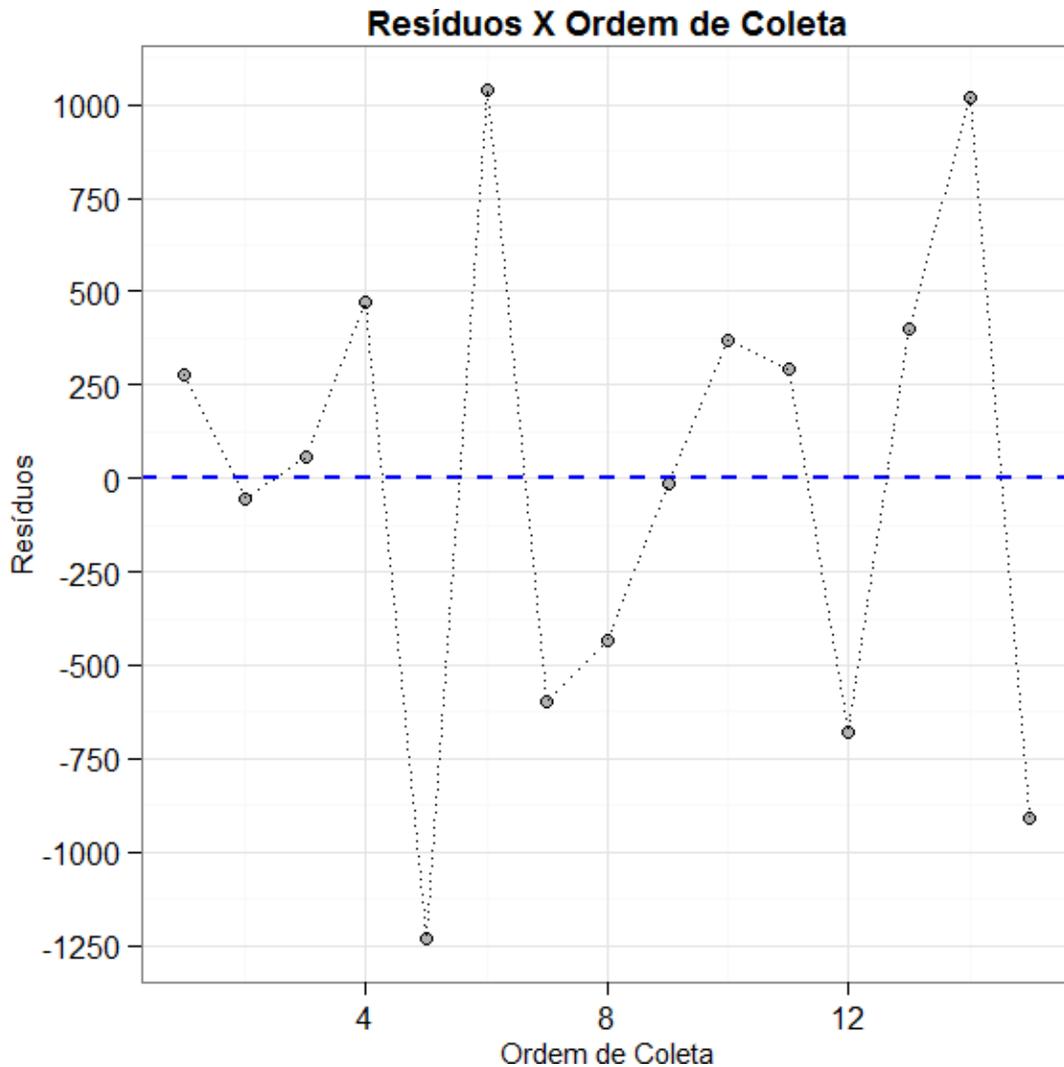
Neste item testamos a independência das observações através do seguinte teste de

hipóteses: H0: Observações são independentes;

H1: Observações não são independentes.

Estatística	P-valor
2,860126	0,129576

Tabela 15: Teste de Independência - Durbin-Watson



Como P-valor (0,1296) do teste de Durbin-Watson é maior que 0,05. Logo, não rejeitamos a hipótese de independência das observações ao nível de significância de 5%.

RESUMO DO ESTUDO DE LINEARIDADE

Para finalizarmos, apresentamos uma tabela com o resumo do estudo.

Teste	Conclusão
Teste F da ANOVA	Não rejeitamos a significância do modelo linear
Teste do Intercepto	Intercepto igual a zero
Coefficiente de Correlação de Pearson	$R = 0.9996$ que é maior que o proposto (0,99)
Teste de Normalidade dos Resíduos	Não rejeitamos a hipótese de normalidade dos resíduos
Teste de Homocedasticidade	Não rejeitamos a homocedasticidade da variância
Valores extremos na resposta	Não detectamos pontos extremos
Teste de independência das observações	Não detectado dependência das observações

Tabela 16: Resumo das Conclusões do estudo de Linearidade (Método dos Mínimos Quadrados Ordinários).

- **Linearidade Impureza G**

A linearidade de um procedimento analítico é a sua capacidade de obter resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra.

COLETA DE DADOS

A seguir, apresentamos os dados coletados.

μg_mL	Area_mAU	Ponto
0,59304	9308	1
0,598496	10244	1
0,594938	9791	1
2,37216	41755	2
2,393984	42298	2
2,379751	42242	2
4,15128	70698	3
4,189472	77416	3
4,164564	73539	3
5,9304	107457	4
5,98496	112162	4
5,949377	109193	4
7,11648	126352	5
7,181952	133083	5
7,139253	129046	5

Tabela 1: Conjunto de dados para Linearidade.

MÉTODO DOS MÍNIMOS QUADRADOS ORDINÁRIOS: ESTIMAÇÃO

O Método dos Mínimos Quadrados é uma eficiente estratégia de estimação dos parâmetros da regressão e sua aplicação não é limitada apenas às relações lineares. Nesta seção utilizamos o Método dos Mínimos Quadrados Ordinários.

TESTE DO COEFICIENTE ANGULAR

Para avaliar a significância do modelo utilizamos o teste F da ANOVA. Neste caso, testamos as hipóteses:

H0: coeficiente angular igual a zero;

H1: coeficiente angular diferente de zero.

	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
μg_mL	1	28454386167,3995	28454386167,3995	6798,28658	0
Resíduos	13	54411801,533857	4185523,194912		

Tabela 2: Tabela da ANOVA

Como P-valor (0) do teste F da ANOVA é menor que 0,05 (conforme especificado) rejeitamos a hipótesenula (coeficiente angular zero) ao nível de significância de 5%.

Mínimo	1Q	Mediana	Média	3Q	Máximo
-4152	-852,1	11,57	0	1216	3530

Tabela 3: Análise exploratória (resíduos).

As estimativas dos parâmetros (coeficientes de regressão) são respectivamente:

	Estimativa	Desvio Padrão	Estat.t	P-valor
Intercepto	-1629,217349	1047,702057	-1,555039	0,143937
µg_mL	18423,120079	223,4413	82,451723	0

Tabela 4: Coeficientes.

	Limite Inferior	Limite Superior
Intercepto	-3892,640034	634,205336
µg_mL	17940,404498	18905,835659

Tabela 5: Intervalo de confiança para os parâmetros

TESTE DO INTERCEPTO (COEFICIENTE LINEAR)

Para avaliarmos o intercepto (coeficiente linear) utilizamos a estatística t de Student. Neste caso, testamos as hipóteses:

H0: intercepto (coeficiente linear) igual a

zero; H1: intercepto diferente de zero.

Como P-valor (0,1439) do teste t é maior que 0,05, não rejeitamos a hipótese nula (intercepto igual a zero) ao nível de significância de 5%.

IMPACTO DO COEFICIENTE LINEAR (INTERCEPTO)

µg_mL	Area_mAU	Ponto	Impacto do Coeficiente Linear (%)
0,59304	9308	1	17,503409
0,598496	10244	1	15,904113
0,594938	9791	1	16,639948
2,37216	41755	2	3,90185
2,393984	42298	2	3,85176
2,379751	42242	2	3,856866
4,15128	70698	3	2,304474
4,189472	77416	3	2,104497
4,164564	73539	3	2,215447
5,9304	107457	4	1,516157
5,98496	112162	4	1,452557
5,949377	109193	4	1,492053
7,11648	126352	5	1,289427
7,181952	133083	5	1,224211
7,139253	129046	5	1,262509

Tabela 6: Tabela Impacto do Coeficiente Linear (Intercepto)

COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE PEARSON

O coeficiente de correlação de Pearson mede o grau de proporcionalidade entre a variável explicativa e a variável resposta.

Desvio Padrão dos Resíduos	Graus de Liberdade	R²	Coeficiente de Correlação
2045,855126	13	0,9981	0,999

Tabela 7: Medida Descritiva da Qualidade do Ajuste.

Como o coeficiente de correlação (0.999) é maior que 0.990 (conforme especificado), concluímos que existe uma relação linear adequada.

ANÁLISE GRÁFICA

DIAGRAMA DE DISPERSÃO

O diagrama de dispersão é um gráfico que permite a visualização de uma possível associação entre variáveis quantitativas.

Valores Ajustados

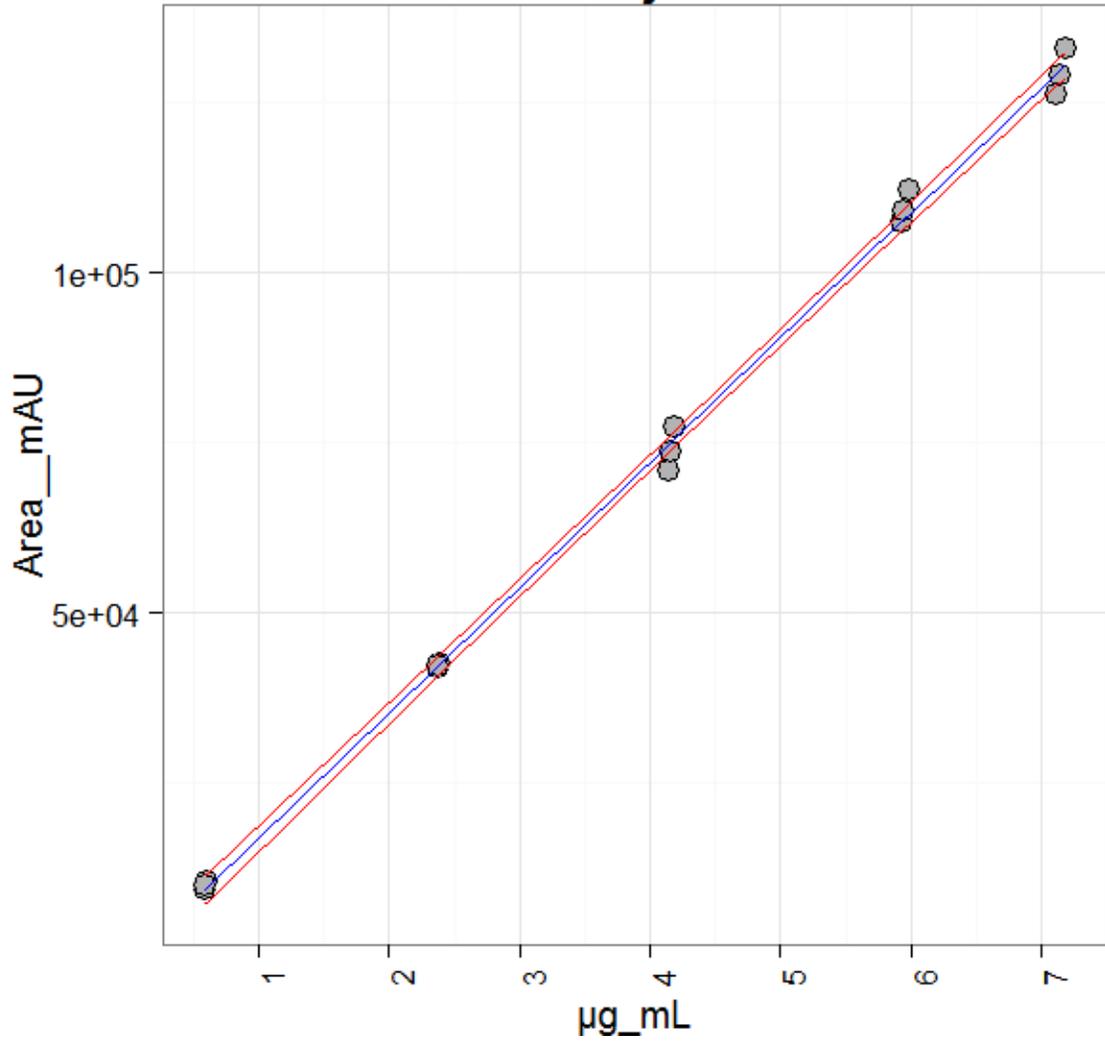


Figura 1: Diagrama de Dispersão

DIAGNÓSTICO DOS RESÍDUOS DO MODELO.

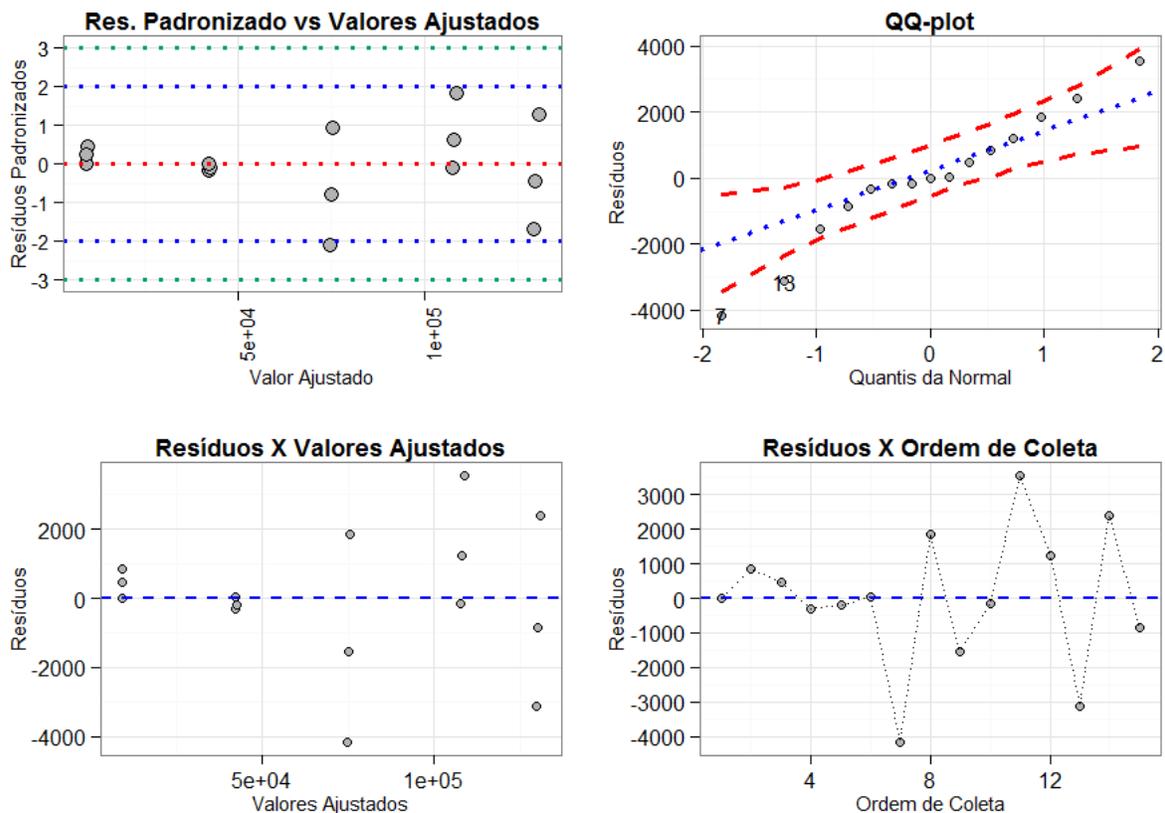


Figura 2: Gráfico da Análise dos Resíduos.

	Estatística	P-valor
Anderson-Darling	0,315153	0,508556

Tabela 8: Teste de Normalidade

H0: a distribuição dos resíduos é Normal;

H1: a distribuição dos resíduos não é Normal.

Como P-valor (0,5086) do teste de Anderson-Darling é maior que 0,05, não rejeitamos a hipótese denormalidade dos resíduos ao nível de significância de 5%.

AVALIAÇÃO DA HOMOCEASTICIDADE: TESTE DE BREUSCH PAGAN

Para avaliarmos a homocedasticidade da variância realizamos o seguinte teste de

hipóteses: H0: Variâncias dos níveis são iguais;

H1: Pelo menos uma variância diferente.

A seguir, apresentamos o teste de Teste de Breusch Pagan.

Estatística	GL	P-valor
2,573513	1	0,108666

Tabela 9: Teste de Homocedasticidade - Breusch Pagan

Como P-valor (0,1087) do Teste de Breusch Pagan é maior que 0,05 (conforme proposto), não rejeitamos a hipótese de igualdade das variâncias ao nível de significância de 5%. Logo, temos um modelo homocedástico.

VALORES EXTREMOS NA RESPOSTA

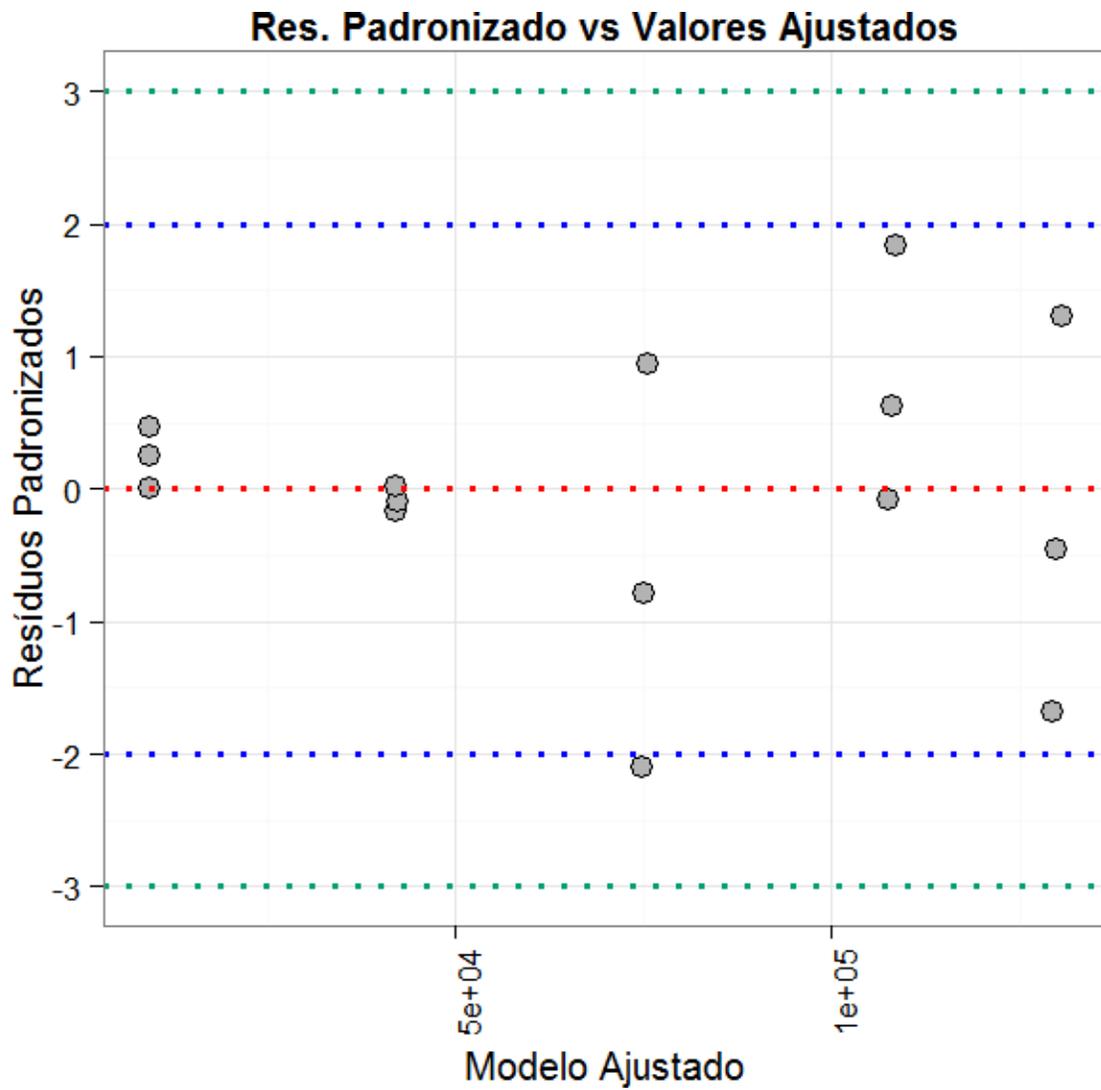
Nesta seção, vamos avaliar os valores extremos na resposta. Para isto, avaliamos os resíduos padronizados e os resíduos studentizados.

RESÍDUOS

Como critério, será considerado valores extremos na resposta, as observações com resíduos padronizados e/ou studentizados maiores que 3.

N.Obs	µg_mL	Resíduos	Resíduos Studentizados	Resíduos Padronizados
1	0,59304	11,570217	0,00611	0,006359
2	0,598496	847,054264	0,450959	0,465446
3	0,594938	459,608147	0,243284	0,252596
4	2,37216	-318,371177	-0,157783	-0,164055
5	2,393984	-177,434991	-0,087831	-0,091388
6	2,379751	28,78054	0,014246	0,014828
7	4,15128	-4152,312571	-2,483852	-2,100998
8	4,189472	1862,075754	0,937859	0,942234
9	4,164564	-1556,047067	-0,775167	-0,787347
10	5,9304	-170,253965	-0,084723	-0,088156
11	5,98496	3529,586499	2,040796	1,830144
12	5,949377	1216,125327	0,614744	0,630003
13	7,11648	-3126,548228	-1,833253	-1,686502
14	7,181952	2398,260329	1,336092	1,297485
15	7,139253	-852,093078	-0,445693	-0,460099

Tabela 10: Tabela de Resumo da Análise dos Resíduos



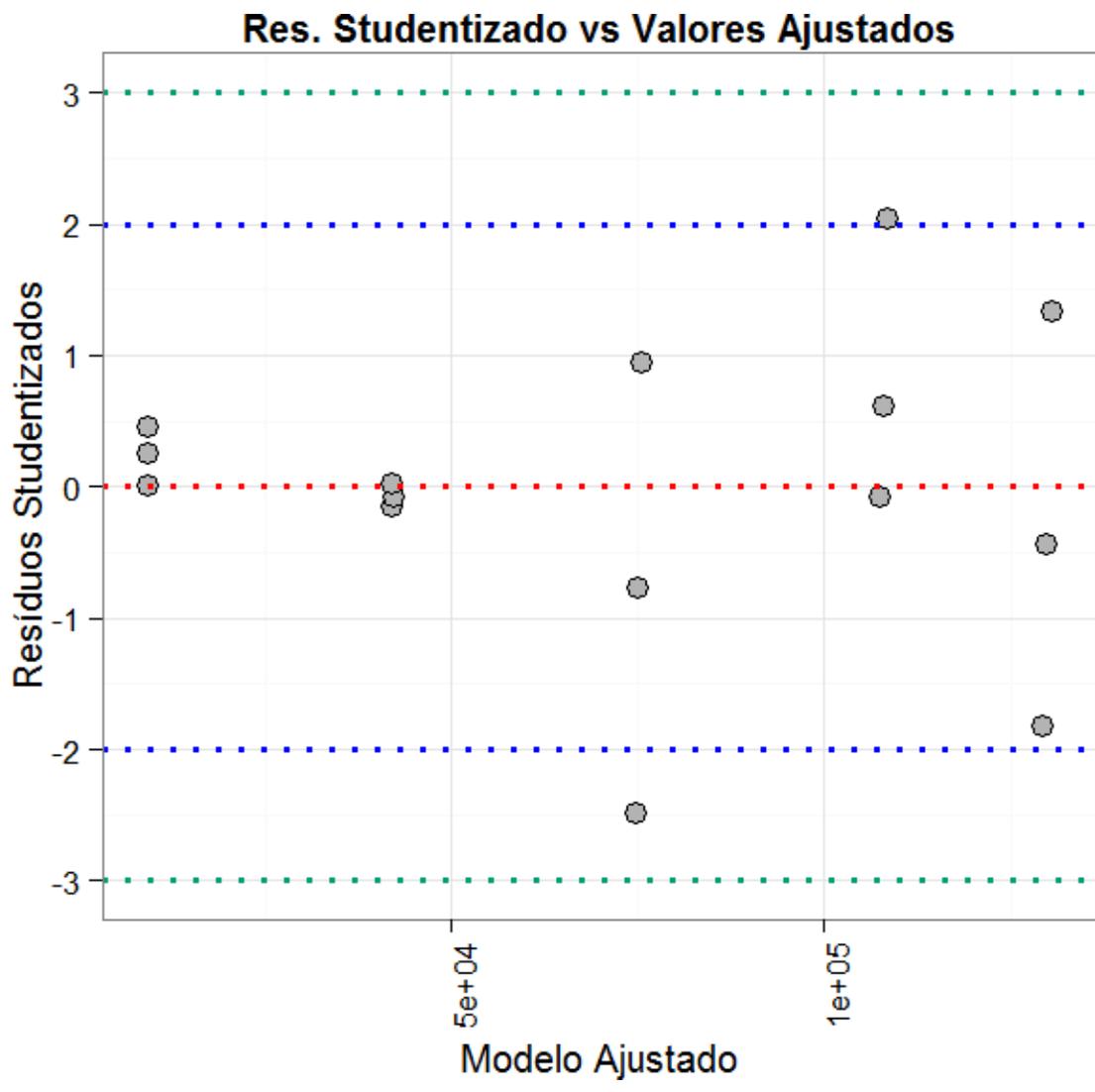
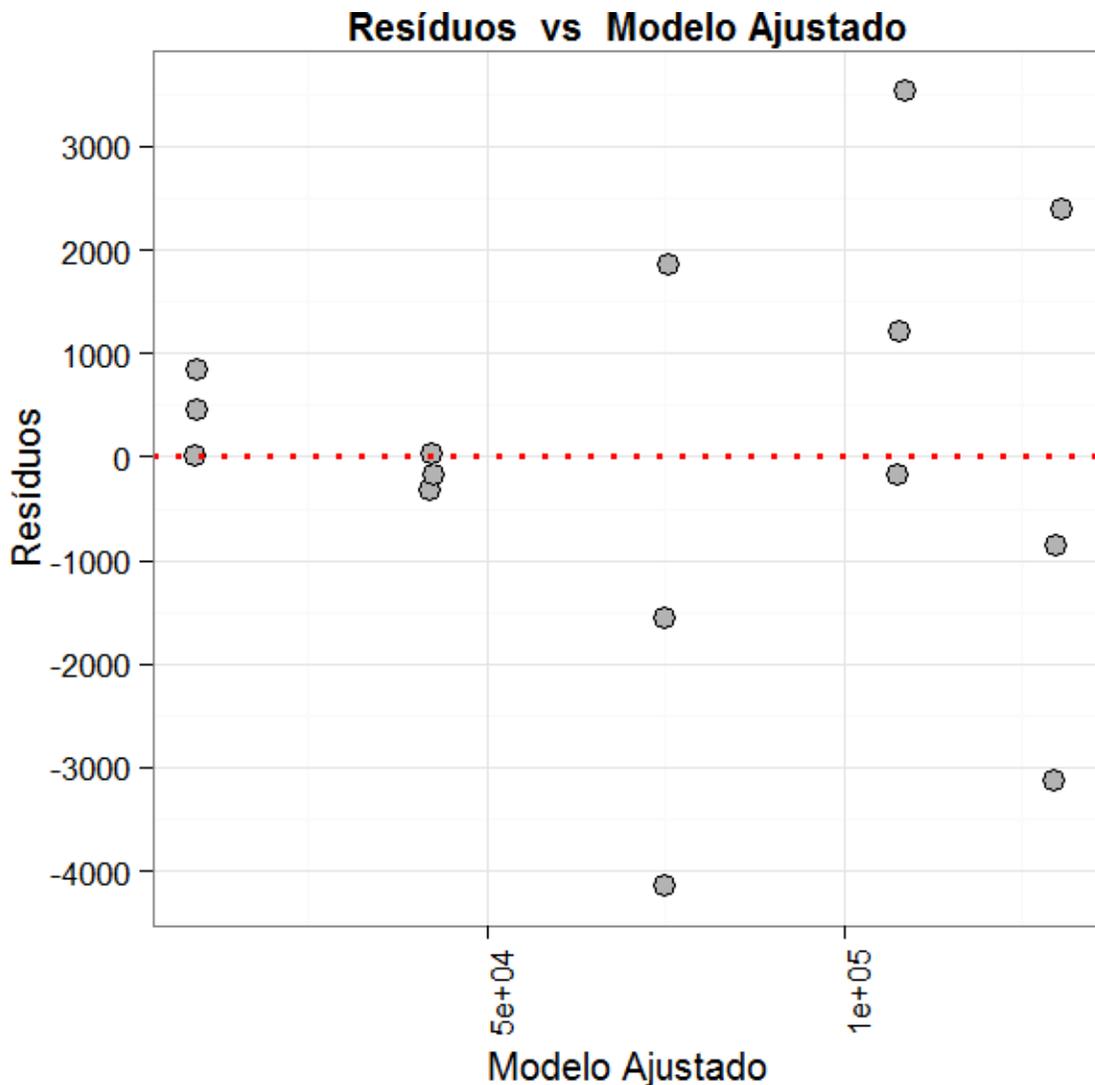


Figura 4: Análise dos Resíduos (Studentizados).



Neste item podemos observar dos gráficos Res. Padronizado vs Valores Ajustados Res. Studentizados vs Valores Ajustados que não foi detectado valores extremos.

PONTOS INFLUENTES

Um ponto é influente se sua exclusão do ajuste da regressão causa uma mudança substancial nos valores ajustados. A seguir, apresentamos três tipos de pontos influentes, são eles a distância de Cook, DFBETA e DFFITS. O DFBETA avalia a influência do ponto no coeficiente angular. O DFFITS avalia a influência do ponto no ajuste da curva. A distância de Cook avalia ponto de alavanca com resíduo padronizado alto. Os critérios para análise dos pontos influentes são dados por:

Diagnóstico	Fórmula	Valor
DFFITS	$2 \cdot \text{raiz}((p+1)/n)$	0,73
DCOOK	$4/n$	0,266667
DFBETA	$2/\text{raiz}(n)$	0,52

Tabela 11: Critério

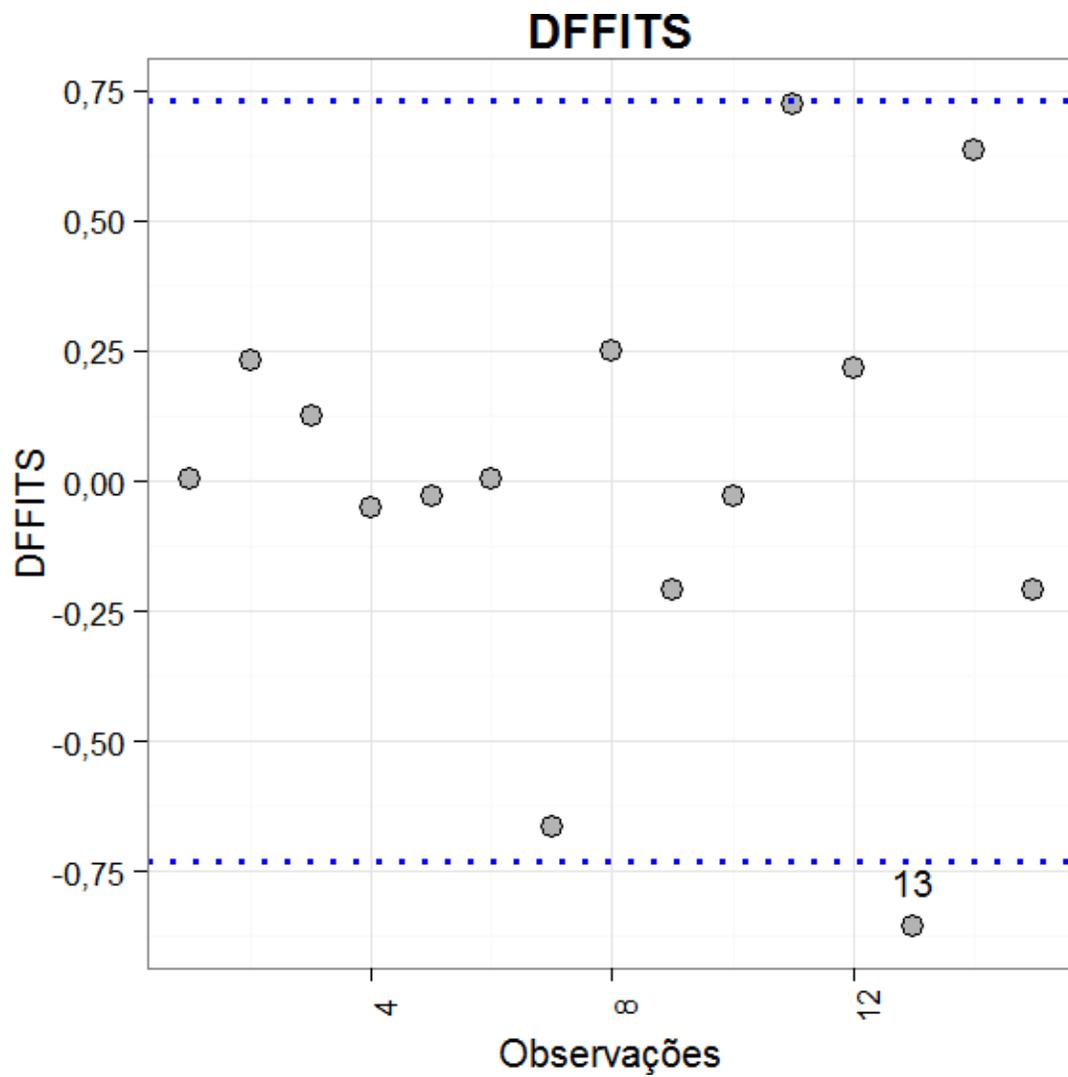


Figura 5: Gráfico da Análise dos Pontos Influentes (DFFIT).

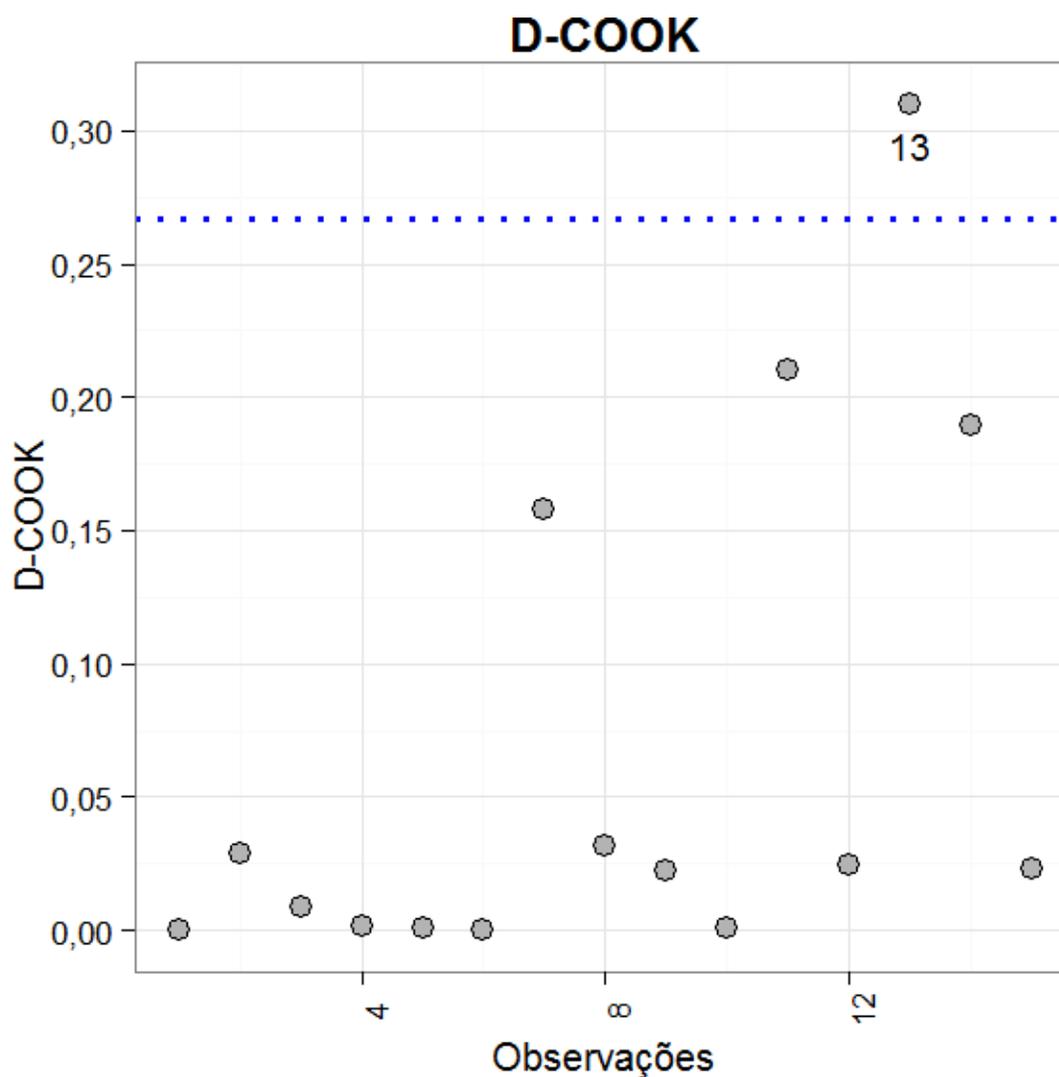


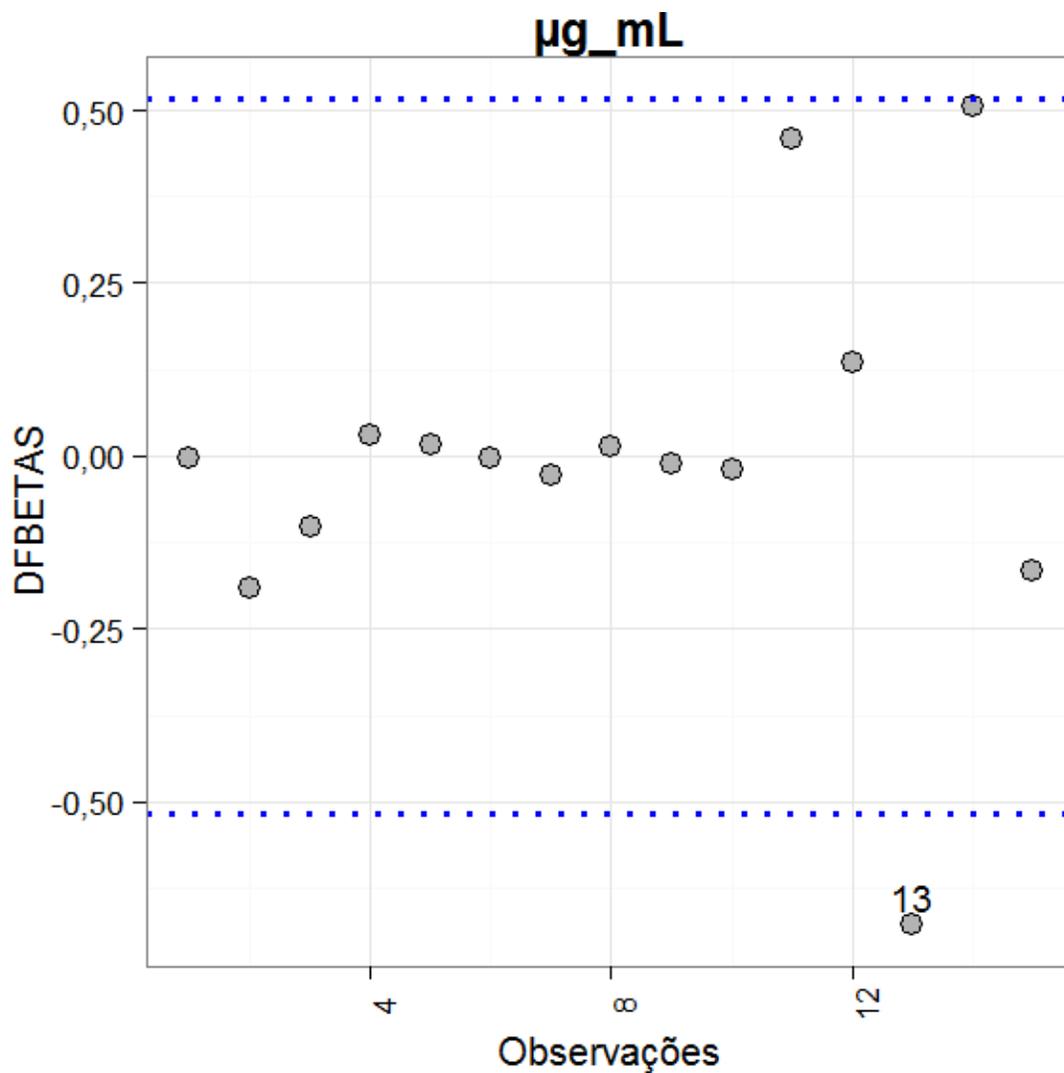
Figura 6: Gráfico da Análise dos Pontos Influentes (DCOOK).

<u>Observações</u>	<u>DFFITS</u>	<u>Crítério</u>
13	-0,86	$\pm 0,73$

Tabela 12: Análise dos Pontos Influentes (DFFIT).

<u>Observações</u>	<u>DCOOK</u>	<u>Crítério</u>
13	0,309812	0,266667

Tabela 13: Análise dos Pontos Influentes (DCOOK).



Observações	DFBETA	Critério
13	-0,677706	0,516398

Tabela 14: Pontos Influentes (DFBETA).

TESTE DE INDEPENDÊNCIA

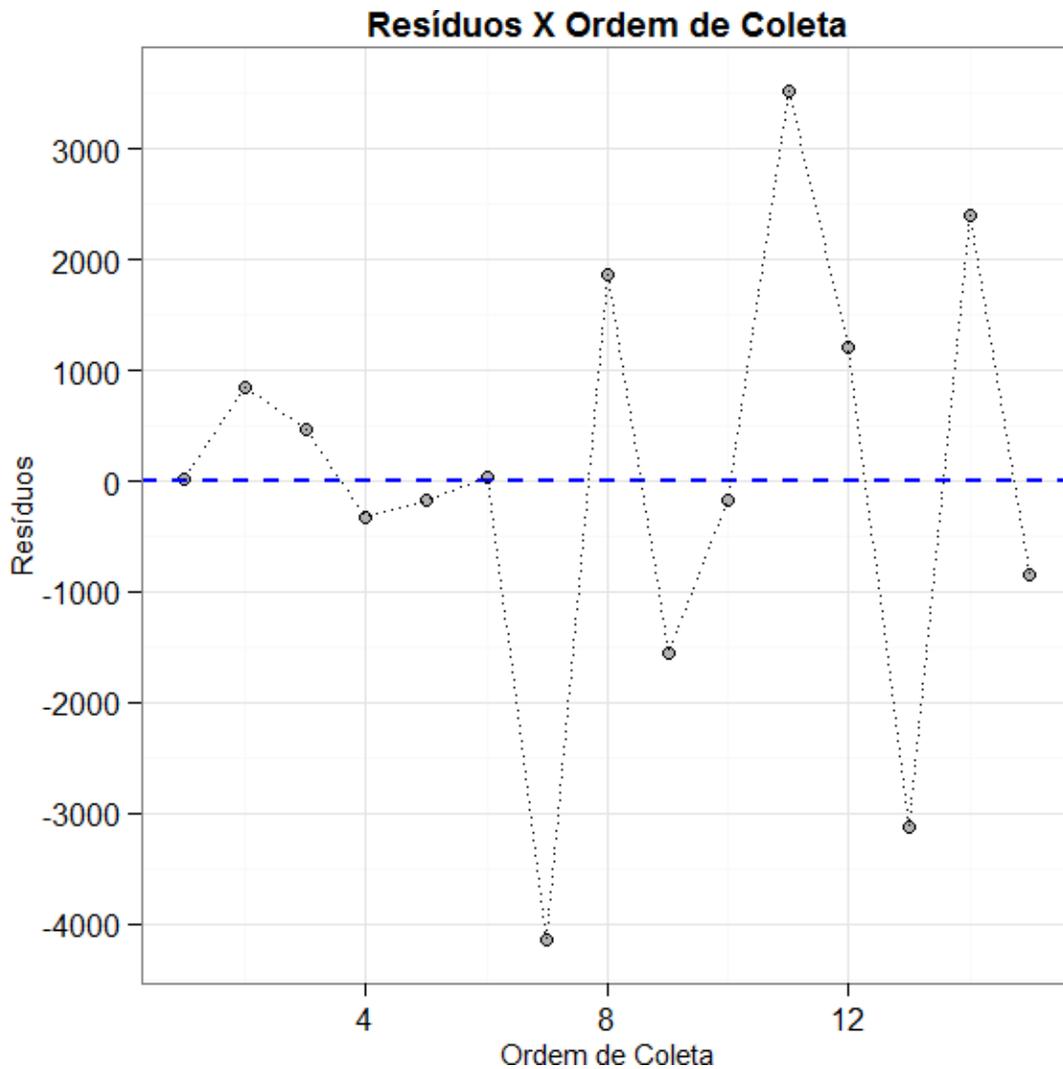
Neste item testamos a independência das observações através do seguinte teste de

hipóteses: H0: Observações são independentes;

H1: Observações não são independentes.

Estatística	P-valor
2,715628	0,23509

Tabela 15: Teste de Independência - Durbin-Watson



Como P-valor (0,2351) do teste de Durbin-Watson é maior que 0,05. Logo, não rejeitamos a hipótese de independência das observações ao nível de significância de 5%.

RESUMO DO ESTUDO DE LINEARIDADE

Para finalizarmos, apresentamos uma tabela com o resumo do estudo.

Teste	Conclusão
Teste F da ANOVA	Não rejeitamos a significância do modelo linear
Teste do Intercepto	Intercepto igual a zero
Coefficiente de Correlação de Pearson	$R = 0.999$ que é maior que o proposto (0,99)
Teste de Normalidade dos Resíduos	Não rejeitamos a hipótese de normalidade dos resíduos
Teste de Homocedasticidade	Não rejeitamos a homocedasticidade da variância
Valores extremos na resposta	Não detectamos pontos extremos
Teste de independência das observações	Não detectado dependência das observações

Tabela 16: Resumo das Conclusões do estudo de Linearidade (Método dos Mínimos Quadrados Ordinários).

- **Linearidade Impureza A**

A linearidade de um procedimento analítico é a sua capacidade de obter resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra.

COLETA DE DADOS

A seguir, apresentamos os dados coletados.

µg_mL	Area_mAU	Ponto
0,60732	6465	1
0,6234	6439	1
0,61296	6370	1
2,42928	24457	2
2,4936	25382	2
2,45184	24893	2
4,25124	43367	3
4,3638	44780	3
4,29072	43780	3
6,0732	62842	4
6,234	64422	4
6,1296	62853	4
7,28784	74600	5
7,4808	76824	5
7,35552	74631	5

Tabela 1: Conjunto de dados para Linearidade.

MÉTODO DOS MÍNIMOS QUADRADOS ORDINÁRIOS: ESTIMAÇÃO

O Método dos Mínimos Quadrados é uma eficiente estratégia de estimação dos parâmetros da regressão e sua aplicação não é limitada apenas às relações lineares. Nesta seção utilizamos o Método dos Mínimos Quadrados Ordinários.

TESTE DO COEFICIENTE ANGULAR

Para avaliar a significância do modelo utilizamos o teste F da ANOVA. Neste caso, testamos as hipóteses:

H0: coeficiente angular igual a zero;

H1: coeficiente angular diferente de zero.

	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
µg_mL	1	9386949823,32256	9386949823,32256	73300,627373	0
Resíduos	13	1664792,677441	128060,975188		

Tabela 2: Tabela da ANOVA

Como P-valor (0) do teste F da ANOVA é menor que 0,05 (conforme especificado) rejeitamos a hipótese nula (coeficiente angular zero) ao nível de significância de 5%.

Mínimo	1Q	Mediana	Média	3Q	Máximo
-739	-180,5	50,13	0	169,7	617,3

Tabela 3: Análise exploratória (resíduos)

As estimativas dos parâmetros (coeficientes de regressão) são respectivamente:

	Estimativa	Desvio Padrão	Estat.t	P-valor
Intercepto	-32,765053	183,233838	-0,178816	0,860839
µg_mL	10251,180436	37,863437	270,740886	0

Tabela 4: Coeficientes

	Limite Inferior	Limite Superior
Intercepto	-428,617693	363,087587
µg_mL	10169,381454	10332,979419

Tabela 5: Intervalo de confiança para os parâmetros

TESTE DO INTERCEPTO (COEFICIENTE LINEAR)

Para avaliarmos o intercepto (coeficiente linear) utilizamos a estatística t de Student. Neste caso, testamos as hipóteses:

H0: intercepto (coeficiente linear) igual a

zero; H1: intercepto diferente de zero.

Como P-valor (0,8608) do teste t é maior que 0,05, não rejeitamos a hipótese nula (intercepto igual a zero) ao nível de significância de 5%.

IMPACTO DO COEFICIENTE LINEAR (INTERCEPTO)

µg_mL	Area_mAU	Ponto	Impacto do Coeficiente Linear (%)
0,60732	6465	1	0,506807
0,6234	6439	1	0,508853
0,61296	6370	1	0,514365
2,42928	24457	2	0,13397
2,4936	25382	2	0,129088
2,45184	24893	2	0,131624
4,25124	43367	3	0,075553
4,3638	44780	3	0,073169
4,29072	43780	3	0,07484

6,0732	62842	4	0,052139
6,234	64422	4	0,05086
6,1296	62853	4	0,05213
7,28784	74600	5	0,043921
7,4808	76824	5	0,04265
7,35552	74631	5	0,043903

Tabela 6: Tabela Impacto do Coeficiente Linear (Intercepto)

COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE PEARSON

O coeficiente de correlação de Pearson mede o grau de proporcionalidade entre a variável explicativa ea variável resposta.

Desvio Padrão dos Resíduos	Graus de Liberdade	R ²	Coeficiente de Correlação
357,856082	13	0,9998	0,9999

Tabela 7: Medida Descritiva da Qualidade do Ajuste

Como o coeficiente de correlação (0.9999) é maior que 0.990 (conforme especificado), concluímos que existe uma relação linear adequada.

ANÁLISE GRÁFICA

DIAGRAMA DE DISPERSÃO

O diagrama de dispersão é um gráfico que permite a visualização de uma possível associação entre variáveis quantitativas.

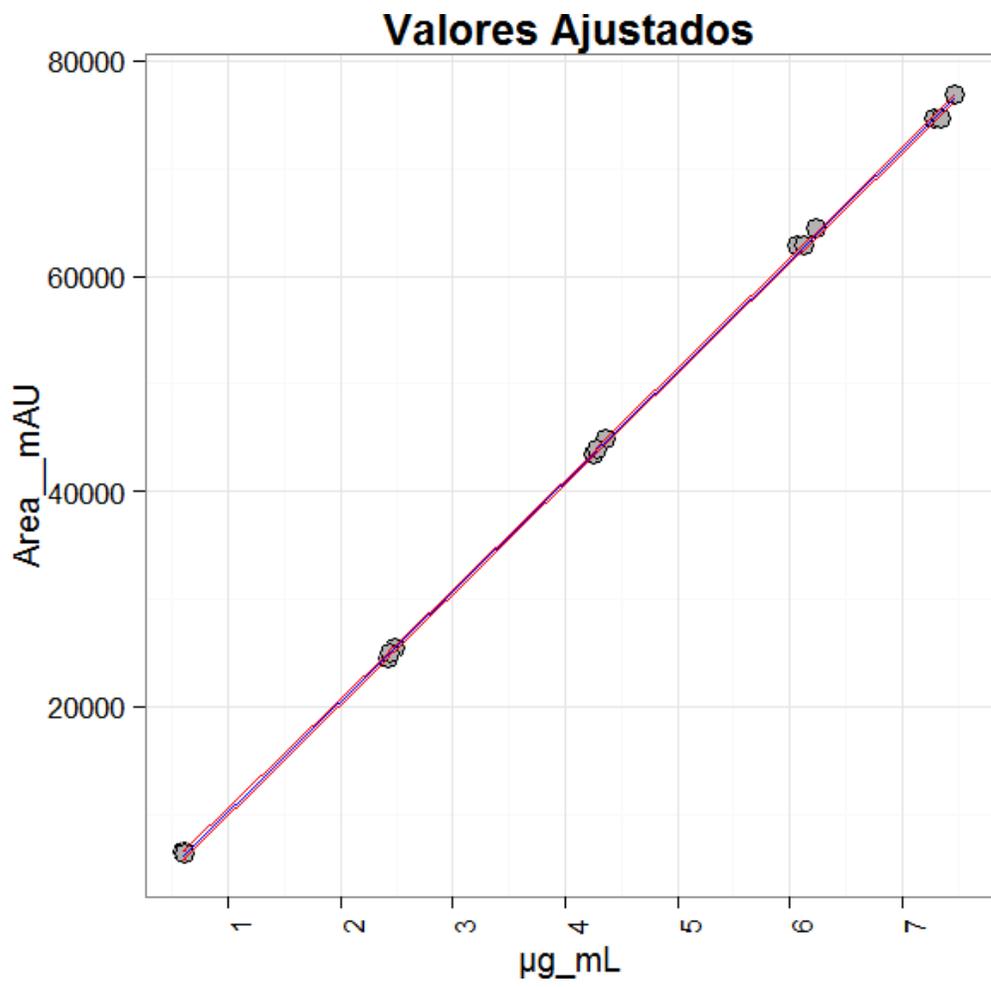


Figura 1: Diagrama de Dispersão

DIAGNÓSTICO DOS RESÍDUOS DO MODELO.

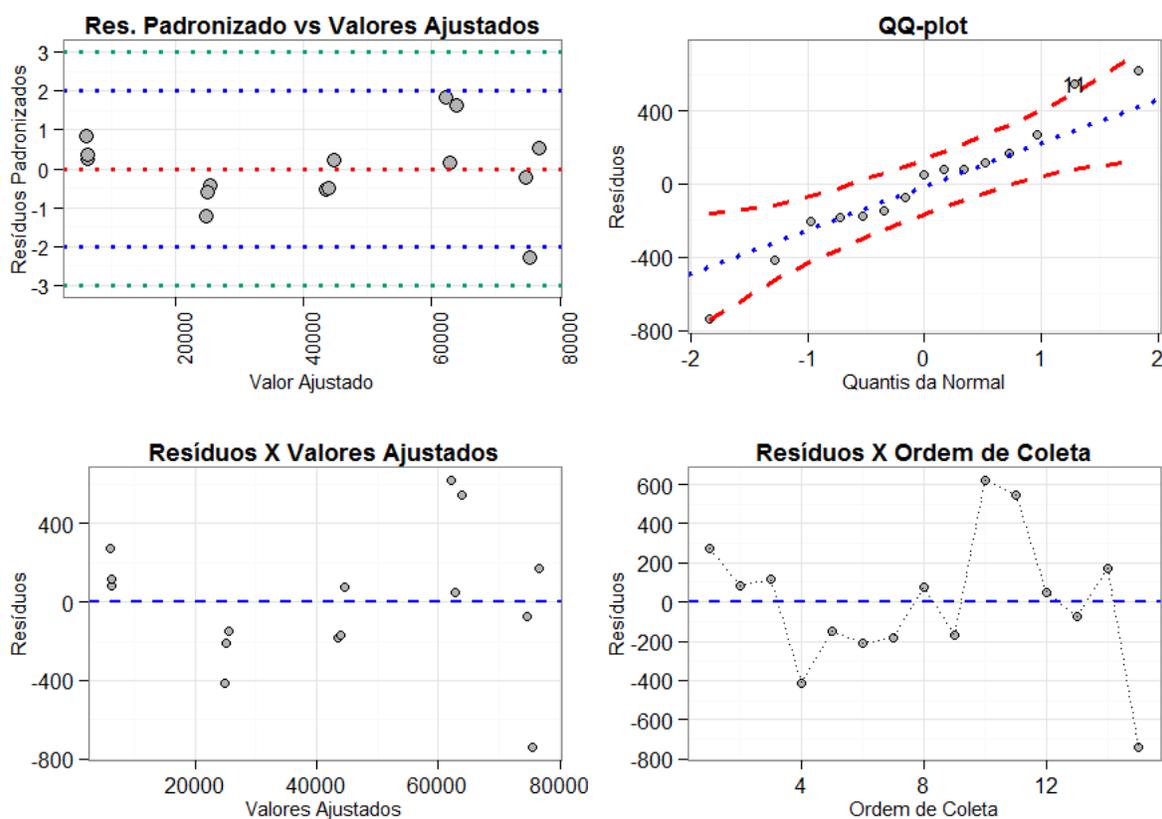


Figura 2: Gráfico da Análise dos Resíduos.

	Estatística	P-valor
Anderson-Darling	0,281059	0,588554

Tabela 8: Teste de Normalidade

H0: a distribuição dos resíduos é Normal;

H1: a distribuição dos resíduos não é Normal.

Como P-valor (0,5886) do teste de Anderson-Darling é maior que 0,05, não rejeitamos a hipótese denormalidade dos resíduos ao nível de significância de 5%.

AVALIAÇÃO DA HOMOCEDESTICIDADE: TESTE DE BREUSCH PAGAN

Para avaliarmos a homocedasticidade da variância realizamos o seguinte teste de

hipóteses: H0: Variâncias dos níveis são iguais;

H1: Pelo menos uma variância diferente.

A seguir, apresentamos o teste de Teste de Breusch Pagan.

Estatística	GL	P-valor
2,591023	1	0,107471

Tabela 9: Teste de Homocedasticidade - Breusch Pagan

Como P-valor (0,1075) do Teste de Breusch Pagan é maior que 0,05 (conforme proposto), não rejeitamos a hipótese de igualdade das variâncias ao nível de significância de 5%. Logo, temos um modelo homocedástico.

VALORES EXTREMOS NA RESPOSTA

Nesta seção, vamos avaliar os valores extremos na resposta. Para isto, avaliamos os resíduos padronizados e os resíduos studentizados.

RESÍDUOS

Como critério, será considerado valores extremos na resposta, as observações com resíduos padronizados e/ou studentizados maiores que 3.

N.Obs	µg_mL	Resíduos	Resíduos Studentizados	Resíduos Padronizados
1	0,60732	272,01815	0,845508	0,854935
2	0,6234	81,179169	0,245547	0,254934
3	0,61296	119,201493	0,3618	0,374536
4	2,42928	-413,222557	-1,243093	-1,217815
5	2,4936	-147,578483	-0,420356	-0,434334
6	2,45184	-208,489188	-0,598799	-0,614142
7	4,25124	-180,463265	-0,506868	-0,522006
8	4,3638	78,663865	0,21909	0,227582
9	4,29072	-172,179869	-0,48316	-0,498067
10	6,0732	617,296027	2,033432	1,825236
11	6,234	548,906213	1,755057	1,629517
12	6,1296	50,12945	0,142724	0,148426
13	7,28784	-76,197778	-0,225689	-0,234407
14	7,4808	169,734445	0,511417	0,526592
15	7,35552	-738,99767	-2,827637	-2,279969

Tabela 10: Tabela de Resumo da Análise dos Resíduos

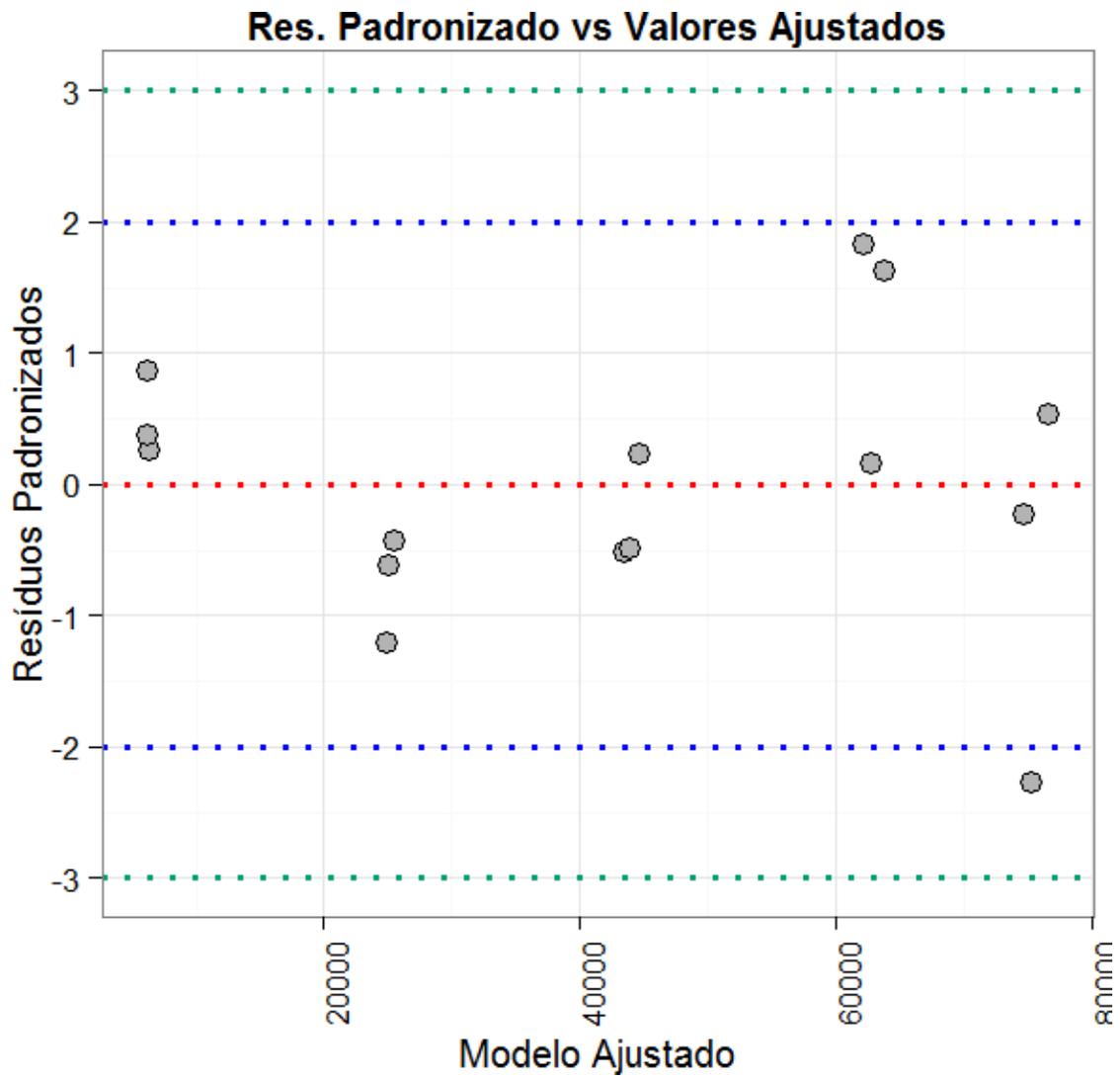


Figura 3: Análise dos Resíduos (Padronizados).

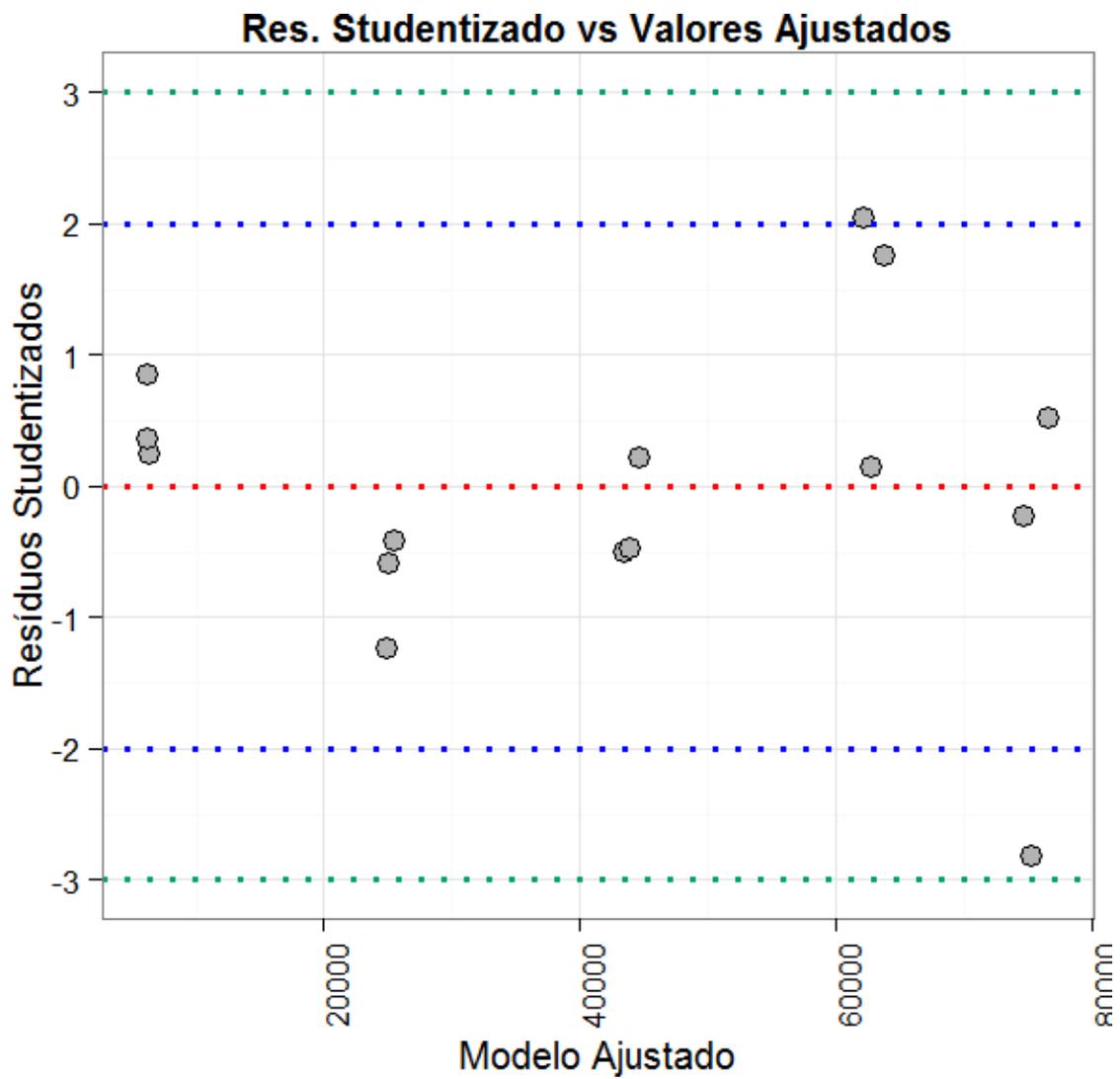
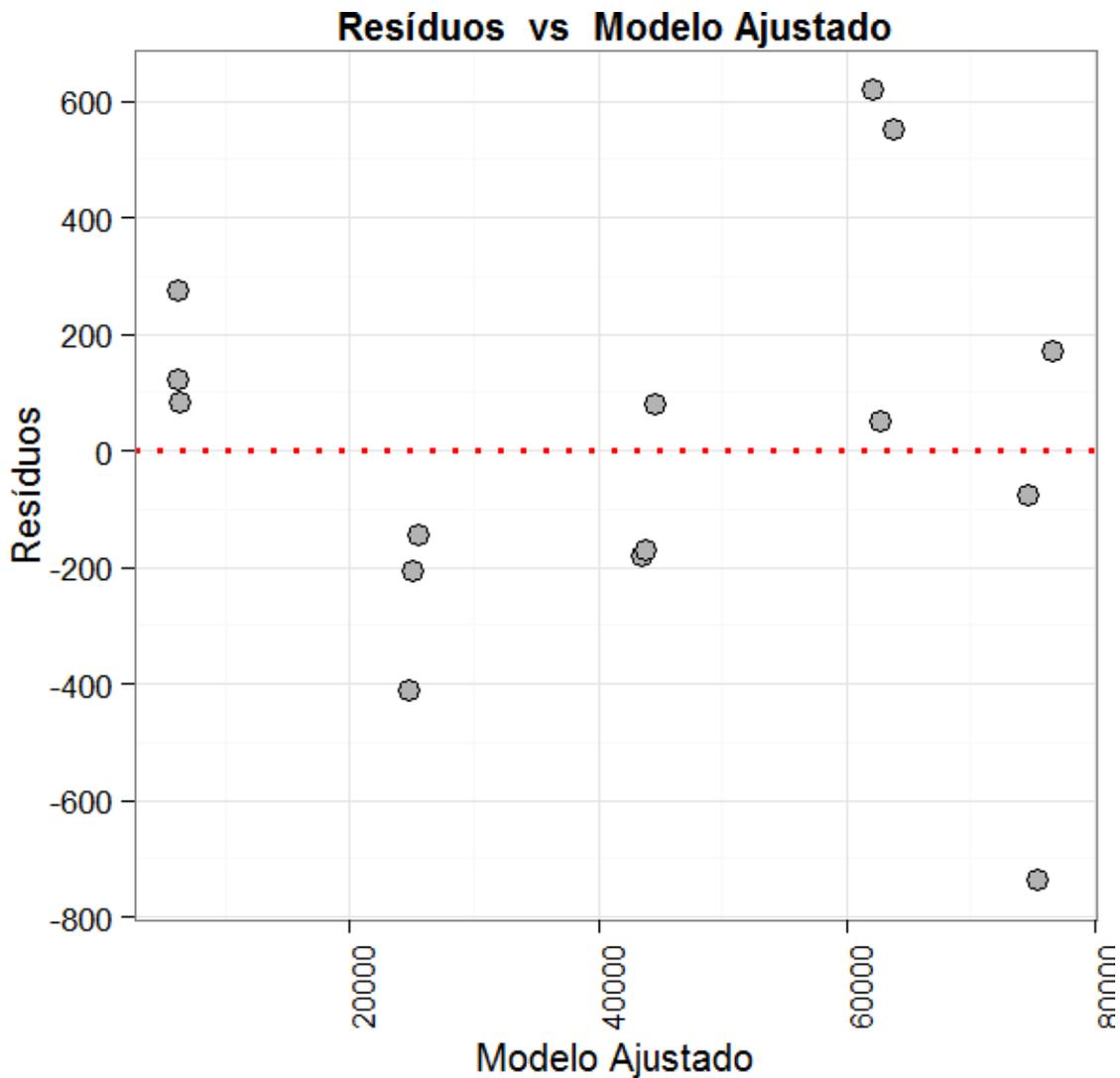


Figura 4: Análise dos Resíduos (Studentizados).



Neste item podemos observar dos gráficos Res. Padronizado vs Valores Ajustados Res. Studentizados vs Valores Ajustados que não foi detectado valores extremos.

PONTOS INFLUENTES

Um ponto é influente se sua exclusão do ajuste da regressão causa uma mudança substancial nos valores ajustados. A seguir, apresentamos três tipos de pontos influentes, são eles a distância de Cook, DFBETA e DFFITS. O DFBETA avalia a influência do ponto no coeficiente angular. O DFFITS avalia a influência do ponto no ajuste da curva. A distância de Cook avalia ponto de alavanca com resíduo padronizado alto. Os critérios para análise dos pontos influentes são dados por:

Diagnóstico	Fórmula	Valor
DFFITS	$2 \cdot \text{raiz} ((p+1)/n)$	0,73

DCOOK	$4/n$	0,266667
DFBETA	$2/\text{raíz}(n)$	0,52

Tabela 11: Critério

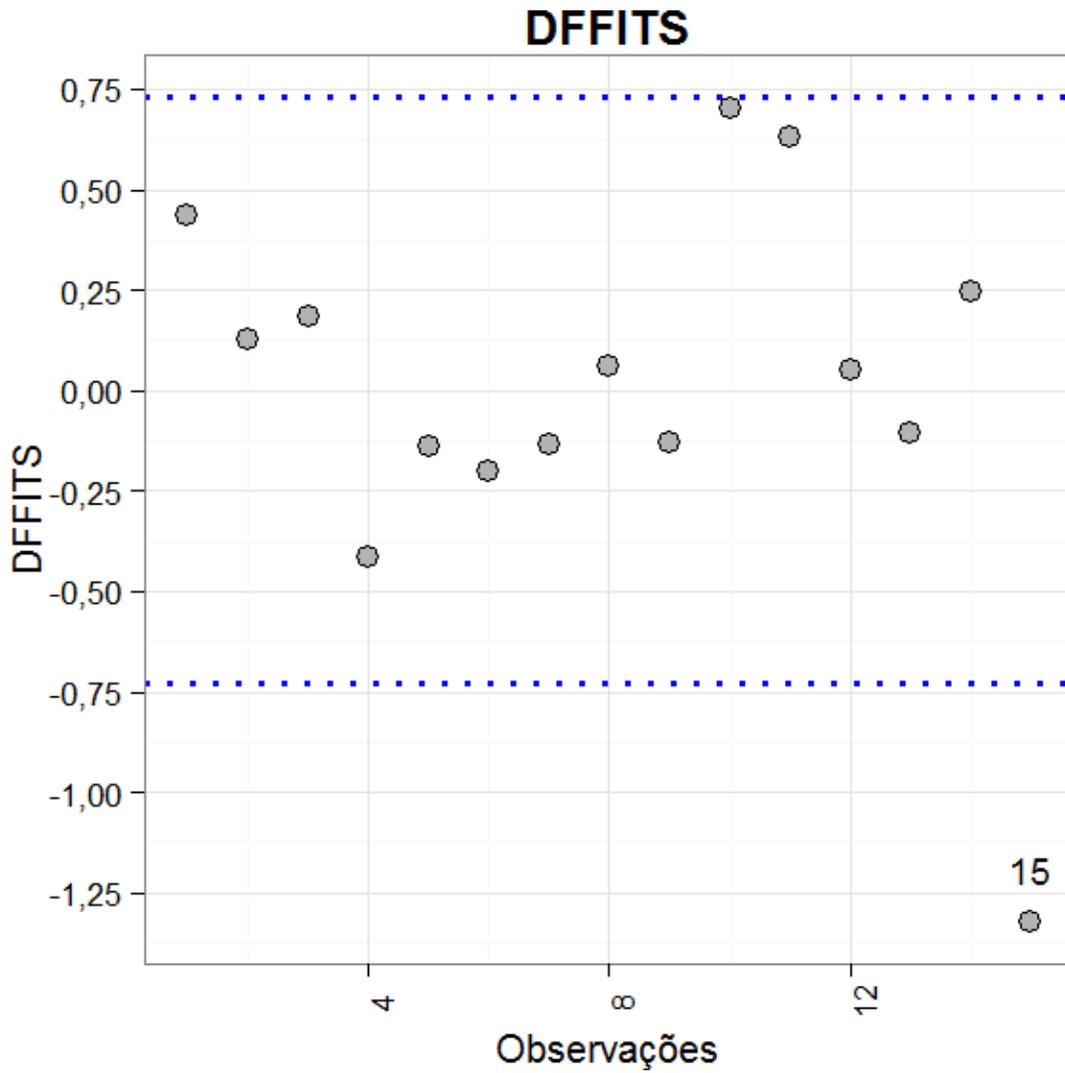


Figura 5: Gráfico da Análise dos Pontos Influentes (DFFIT).

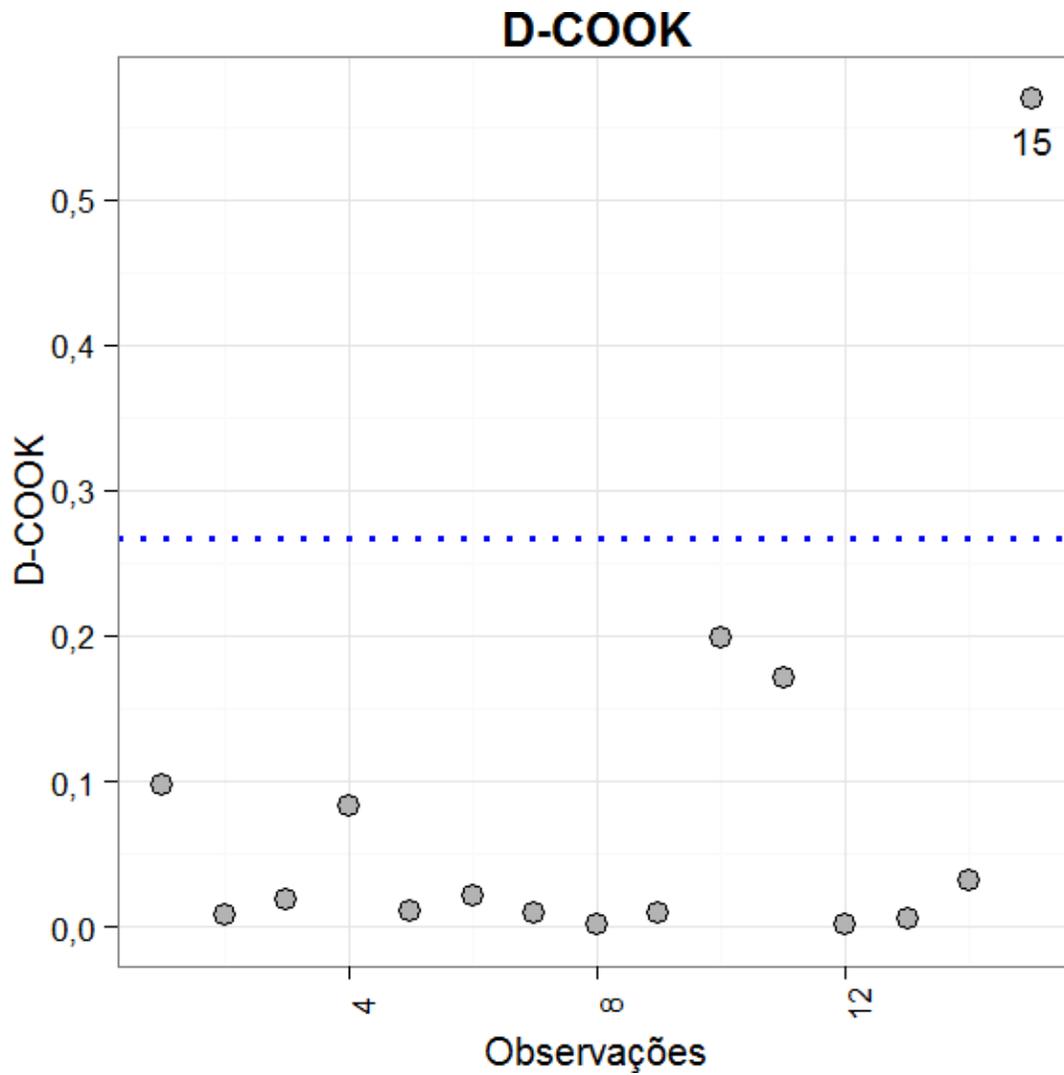


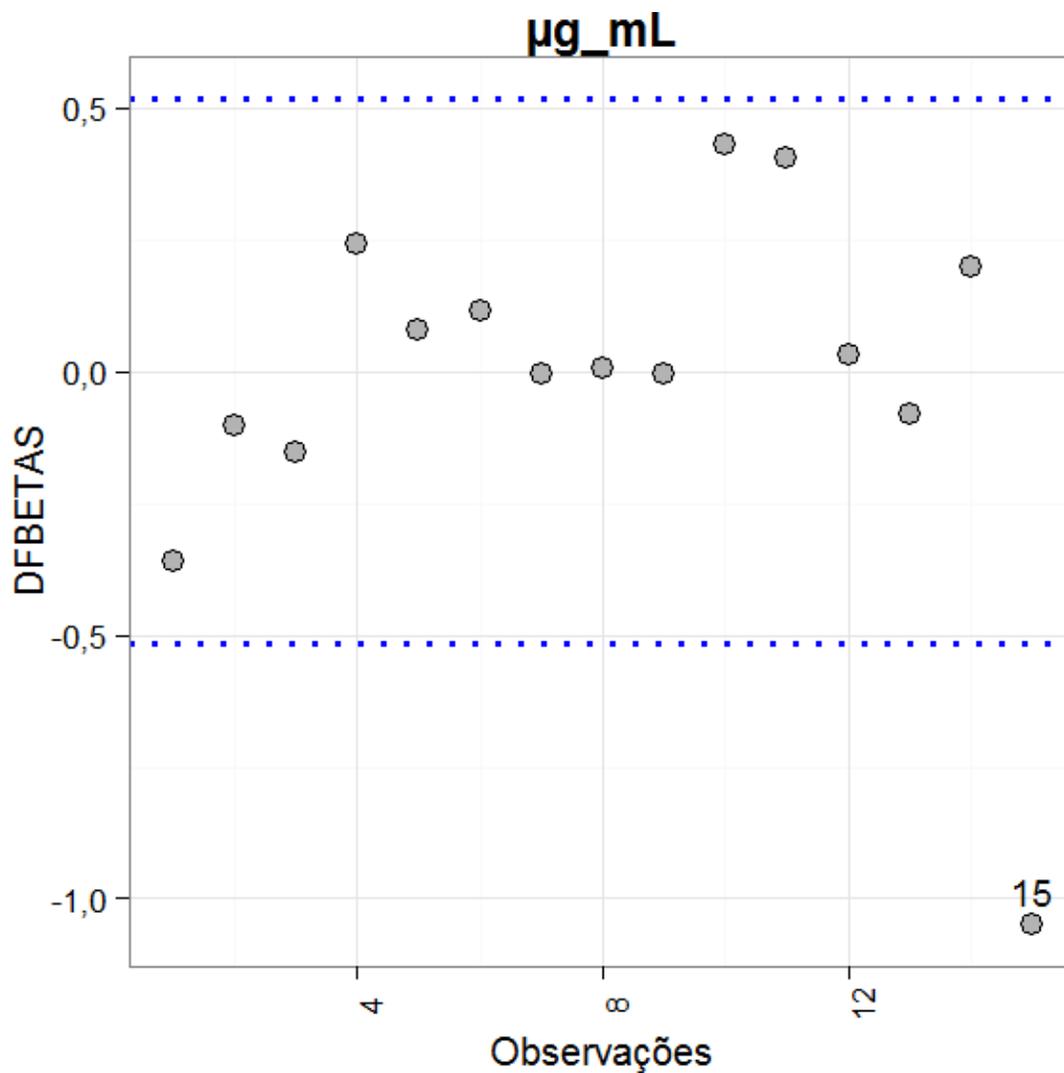
Figura 6: Gráfico da Análise dos Pontos Influentes (DCOOK).

<u>Observações</u>	<u>DFFITS</u>	<u>Critério</u>
15	-1,32	$\pm 0,73$

Tabela 12: Análise dos Pontos Influentes (DFFIT).

<u>Observações</u>	<u>DCOOK</u>	<u>Critério</u>
15	0,569098	0,266667

Tabela 13: Análise dos Pontos Influentes (DCOOK).



Observações	DFBETA	Critério
15	-1,049252	0,516398

Tabela 14: Pontos Influentes (DFBETA).

TESTE DE INDEPENDÊNCIA

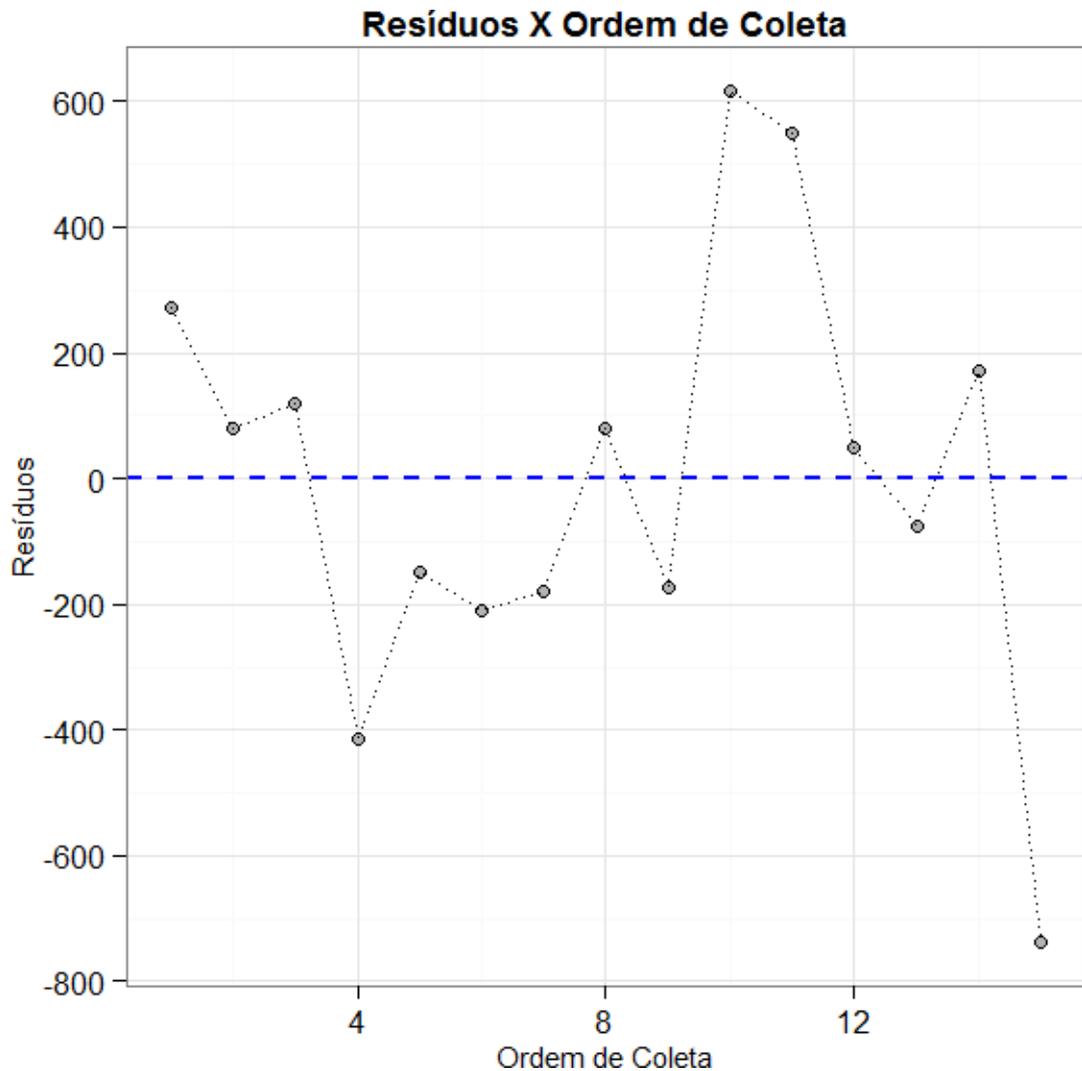
Neste item testamos a independência das observações através do seguinte teste de

hipóteses: H0: Observações são independentes;

H1: Observações não são independentes.

Estatística	P-valor
1,384818	0,113387

Tabela 15: Teste de Independência - Durbin-Watson



Como P-valor (0,1134) do teste de Durbin-Watson é maior que 0,05. Logo, não rejeitamos a hipótese de independência das observações ao nível de significância de 5%.

RESUMO DO ESTUDO DE LINEARIDADE

Para finalizarmos, apresentamos uma tabela com o resumo do estudo.

Teste	Conclusão
Teste F da ANOVA	Não rejeitamos a significância do modelo linear
Teste do Intercepto	Intercepto igual a zero
Coefficiente de Correlação de Pearson	$R = 0.9999$ que é maior que o proposto (0,99)
Teste de Normalidade dos Resíduos	Não rejeitamos a hipótese de normalidade dos resíduos
Teste de Homocedasticidade	Não rejeitamos a homocedasticidade da variância
Valores extremos na resposta	Não detectamos pontos extremos
Teste de independência das observações	Não detectado dependência das observações

Tabela 16: Resumo das Conclusões do estudo de Linearidade (Método dos Mínimos Quadrados Ordinários).

REFERÊNCIAS

- [1] Campbell DB., Lavielle R., Nathan C. The mode of action and clinical pharmacology of gliclazide: a review. *Diabetes research and Clinical Practice*, n 14, p 21-36, 1991.
- [2] Bansal G., Singh M., Jindal KC., Singh, S. LC and LC-MS Study on Establishment of Degradation Pathway of Glipizide Under Forced Decomposition Conditions. *Journal of Chromatographic Science*, vol. 46, 2008.
- [3] Batistela, CG.; Laporta, LV.; Santos, MC. Determinação quantitativa de Gliclazida em comprimidos por espectrofotometria no ultravioleta. *Disciplinarum Scientia*, v 14, n 1, p 47-59, 2013.
- [4] Lopes, JEB.; Desenvolvimento e validação de método para doseamento de gliclazida utilizando a técnica de RMNq1H. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, p 110, 2020.
- [5] Viane, C.; Ferreira, M.; Romero, C.S.; Bortoluzzi, M.R.; Lima, F.O.; Rolim, A capilare zone electrophoretic method for the determination of hypoglycemics as adulterants in herbal formulations used for the treatment of diabetes. *Analytical Methods*, 08 Feb 2013. DOI: 10.1039/c3ay26263d.
- [6] Dong, M.W.; Guillarme, D. Newer developments in HPLC impacting pharmaceutical analysis: a brief review. *American Pharmaceutical Review*, v 16, n 4, p 36-43, 2013.
- [7] Brasil. RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, [s. l.], v. 2017, p. 22, 2017. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401 .
- [8] Conference International et al. ICH Q3B(R2) Impurities in new drug products, 2006.
- [9] Skyller, J.S. Diabetes Mellitus: Pathogenesis and Treatment Strategies. *Journal of Medicinal Chemistry*, v 47, p 4113-4117, 2004.
- [10] Ferreira, VA., Campos SMB. Avanços farmacológicos no tratamento do diabetes tipo 2. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research*, v 8, p 72, 2014.
- [11] Wilding, J.P.H. The importance of weight management in type 2 diabetes mellitus. *The International Journal of Clinical Practice*, v 68, n 6, p 682-691, 2014.
- [12] Du X., Lizarzaburu M., Turcotte S., Lee T., Greenberg J., Shan B., Fan P., Ling Y., Medina JC., Houze, J. Optimization of triazoles as novel and potent nonphlorizin SGLT2 inhibitors. *Biorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v 21, p 3774, 2011.
- [13] Sanders, L.J. From Thebes to Toronto and the 21st Century: An Incredible Journey. *Diabetes Spectrum*, v 15, n 1, 2002.

- [14] IDF. IDF Diabetes Atlas. International Diabetes Federation, 10th edition, 2021.
- [15] Alves da Conceição R., Nogueira da Silva P., Barbosa MLC. Fármacos para o Tratamento do Diabetes Tipo II: Uma visita ao Passado e um Olhar para o Futuro. Revista Virtual de Química, v 9, p 514-534, 2017.
- [16] Oliveira EA, Labra ME, Bermudez J. A produção pública de medicamentos no Brasil: uma visão geral. Caderno de Saúde Pública, v 22, n 11, p 2379–2389, 2006.
- [17] Panorama Indústria Farmacêutica. Confederação Nacional do Ramo Químico. 2015. Disponível em <http://cnq.org.br/system/uploads/publication/9aee2f902857d5d6467b924555af8983/file/pa_norama-industria-farmaceutica-b.pdf>.
- [18] Akkari ACS, Munhoz IP, Tomioka J, Santos NMBF, Santos RF. Inovação tecnológica na indústria farmacêutica: diferenças entre a Europa, os EUA e os países farmaemergentes. Gest. Prod, v 23, p 365-380, 2016.
- [19] Sangi DP. Estratégias de síntese na descoberta de fármacos: o emprego da síntese orientada pela diversidade estrutural. Quim. Nova, v 39, p 995-1006, 2006.
- [20] Pandey, S., Pandey, P., Kumar, R, Singh., NP. Residual solvent determination by head space gas chromatography with flame ionization detector in omeprazole API. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. v 47, p 379-384, 2011.
- [21] Giordani CFA. Desenvolvimento de métodos analíticos e avaliação da toxicidade in vitro de impurezas orgânicas da sitagliptina e vildagliptina [tese]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2018.
- [22] Ahuja S. Assuring quality of drugs by monitoring impurities. Advanced drug delivery reviews, v 59, p 3-11, 2007.
- [23] FDA G. Guidance for Industry (Draft): Stability Testing of Drug Substances and Drug products. 1998.
- [24] BRASIL. RDC Nº 53, de 4 de dezembro de 2015. Estabelece parâmetros para notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semisintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil., [s.l.], v.2015, p.13, 2015. Disponível em :<http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/3295768/%281%29RDC_53_2015_COMP.pdf/d38f507d-745c-4f6b-a0a6-bd250f2e9892>.
- [25] Leite F. Validação em análise química. 5ª Edição. Campinas, SP. Editora Átomo; 2008.
- [26] Collins CH, Braga GL, Bonato PS. Fundamentos de cromatografia. 5ª. Campinas, Editora da Unicamp, 2006.
- [27] Danuello A, Martins MM, Souza RAC, Nascimento MNG, Martins CM, Petrucci JFS, Morais SAL, Pivatto M. Técnicas cromatográficas: princípios, classificação e aplicações. Fitoquímica: potencialidades biológicas dos biomas brasileiros. v 2, Editora Científica digital, 2022.

- [28] Lanças FM. Cromatografia em Fase Gasosa. 1ª edição. São Carlos, SP: Acta Eventos; 1993.
- [29] Gliclazide Substance Summary; disponível no site: < pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3475 > (Acessado em 07 de setembro de 2022).
- [30] British Pharmacopeia, BP 2021. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Strasbourg, 2021.
- [31] Proks, P., Reimann, F., Green, N. Gribble, F., Ashcroft, F. Sulfonylurea Stimulation of Insulin Secretion. Diabetes, v 51, 2002.
- [32] Scott, NA., Jennings, PE, Brown, J., Belch, JJF. Gliclazide: a general free radical scavenger. European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology, v 208, issue 2, p 175-177, 1991.
- [33] Porto, HSM. HPLC versus UPLC: avaliação de aspetos críticos à transferência e validação de métodos analíticos [dissertação]. Coimbra: Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra; 2014.
- [34] Loures, CCA., Alcântara, MAK., Filho, HJI., Teixeira, ACSC., Silva, FT., Paiva, TCB, Samanamud, GRL. Advanced Oxidative Degradation Processes: Fundamentals and Applications. International Review of Chemical Engineering, v 5, n 2, 2013.
- [35] AOAC I. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS, p 2, 2016.
- [36] The United States Pharmacopeia. <621> Chromatography. DocID: 6C3DF8B8-D12E-4253-A0E7-6855670CDB7B_1_en-US.
- [37] Gumieniczek, A., Maćzka, P., Inglot, T., Pietraś, R., Lewkut, E., Perczak, K. New HPLC method for in vitro dissolution study of antihypertensive mixture amlodipine and perindopril using an experimental design. Central European Journal of Chemistry, v 11, p 717-724, 2013.
- [38] Doomkaew, A., Prapatpong, P., Buranphalin, S., Heyden, YV., Suntornsuk, L. Fast and Simultaneous Analysis of Combined Anti-Diabetic Drygs by Capilar Zone Electrophoresis. Journal of Chromatographic Science, v 53, n 6, p 993-999, 2014.
- [39] Noda, Y., Mori, A., Cossins, E., Packer, L. Gliclazide scavenges hydroxyl and superoxide radicals: An electron spin resonance study. Metabolism, v 49, n 2, p 14-16, 2000.
- [40] Jennings, PE., Belch, JJF. Free radical scavenging activity of sulfonylureas: A clinical assessment of the effect of gliclazide. Metabolism, v 49, n 2, p 23-26, 2000.
- [41] Rao, BU., Nikalje, AP. Determination of Gliclazide in a tablet dosage form in the presence of metformin hydrochloride by ion pair – reversed phase liquid chromatographic technique. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, v 5, n 11, p 1331-1337, 2011.