

DETERMINAÇÃO DE SIBUTRAMINA EM FORMAS FARMACÊUTICAS ATRAVÉS DE ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM REFLETÂNCIA DIFUSA E MÉTODOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

Daniela Florencio Maluf e Roberto Pontarolo

Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, Av. Prefeito Lothário Meissner, 632, 80210-170 Curitiba – PR, Brasil

Gilcélia A. Cordeiro, Noemi Nagata e Patricio Peralta-Zamora*

Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, CP 19081, 81531-990 Curitiba – PR, Brasil

Recebido em 11/5/09; aceito em 14/9/09; publicado na web em 24/2/10

DETERMINATION OF SIBUTRAMINE IN PHARMACEUTICAL FORMULATIONS BY DIFFUSE REFLECTANCE INFRARED SPECTROSCOPY AND MULTIVARIATE CALIBRATION METHODS. The goal of this work is the development and validation of an analytical method for fast quantification of sibutramine in pharmaceutical formulations, using diffuse reflectance infrared spectroscopy and partial least square regression. The multivariate model was elaborated from 22 mixtures containing sibutramine and excipients (lactose, microcrystalline cellulose, colloidal silicon dioxide and magnesium stearate) and using fragmented (750-1150/ 1350-1500/ 1850-1950/ 2600-2900 cm^{-1}) and smoothing spectral data. Using 10 latent variables, excellent predictive capacity were observed in the calibration ($n=20$, RMSEC=0.004, $R=0.999$) and external validation ($n=5$, RMSEC= 9.36, $R=0.999$) phases. In the analysis of synthetic mixtures the precision ($SD=3,47\%$) was compatible with the rules of the Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA-Brazil). In the analysis of commercial drugs good agreement was observed between spectroscopic and chromatographic methods.

Keywords: sibutramine; DRIFTS; multivariate calibration.

INTRODUÇÃO

O excesso de peso e a obesidade têm se tornado um grave problema de saúde pública, principalmente em razão de pacientes obesos apresentarem maiores riscos de doenças arteriais coronarianas, hipertensão, hiperlipidemia, *Diabetes mellitus*, acidente vascular cerebral, osteoartrite e doença pulmonar obstrutiva.¹ Dentre as várias medidas de tratamento disponíveis destacam-se intervenções farmacológicas, não-farmacológicas ou cirúrgicas, sendo que, em geral, medidas farmacológicas incluem medicamentos inibidores do apetite (ex. anfetaminas), inibidores da reabsorção intestinal de gorduras (ex. orlistat) e estimulantes da saciedade (ex. sibutramina).²

A sibutramina, identificada quimicamente como uma mistura racêmica dos enantiômeros do cloridrato de *N*-(1-(4-cloro-fenil-ciclobutil)-3-metilbutil)-*N,N* dimetilamina,³ é uma amina terciária pertencente à classe dos derivados de cicloalquilaminas (Figura 1), os quais foram inicialmente sintetizados como agentes antidepressivos. Atualmente, o uso deste fármaco corresponde à terapia de primeira escolha para o tratamento de obesidade,⁴ agindo como um inibidor da recaptação de aminas e causando o aumento da saciedade.⁵

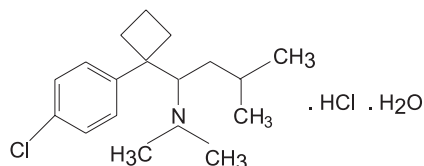


Figura 1. Estrutura química do cloridrato de sibutramina mono-hidratado

Apesar da sibutramina ser um fármaco aprovado pelas agências reguladoras, inclusive a ANVISA, não foi encontrada uma monografia farmacopeica (nacional ou internacional) que descreva procedimentos orientados ao controle de qualidade de matérias-primas ou suas formas farmacêuticas. Em geral, estudos orientados à identificação e

quantificação deste fármaco são fundamentados em métodos cromatográficos, usualmente cromatografia líquida de alta eficiência,⁶⁻⁸ os quais se caracterizam por serem onerosos e demorados. Deste ponto de vista, o desenvolvimento de metodologias rápidas e de baixo custo apresenta-se bastante relevante.

A espectroscopia no infravermelho, principalmente no modo de refletância difusa, representa uma ferramenta de inestimável valor para a implementação de rotinas de análise, em função de características como baixo custo (instrumental e operacional), rapidez e não necessidade de operações de abertura e solubilização de amostras.⁹ Por estes motivos, métodos fundamentados em espectroscopia no infravermelho tornam-se populares na indústria e na pesquisa, crescendo substancialmente como técnica de controle de qualidade na indústria farmacêutica.¹⁰

De maneira geral, a complexidade de sinal e a pouca seletividade observada na espectroscopia no infravermelho¹¹ impedem o desenvolvimento de modelos de calibração fundamentados em procedimentos univariados. Assim, ferramentas quimiométricas são cada vez mais utilizadas, de maneira a permitir a utilização de toda a informação espectral relevante.¹²

Neste trabalho, modelos espectroscópicos multivariados são propostos para a quantificação de sibutramina em medicamentos, utilizando-se espectroscopia no infravermelho com refletância difusa (DRIFT) e regressão de mínimos quadrados parciais (PLS). A análise envolveu o uso de medicamento de referência (medicamento original, patenteado, de eficácia e segurança comprovadas através de testes clínicos), similar (medicamento que apresenta o mesmo fármaco e a mesma dose que o medicamento de referência, mas não apresenta sua equivalência confirmada pelos estudos de biodisponibilidade), genérico (medicamento produzido após ter expirado a patente, possuindo eficácia equivalente à do medicamento de referência, comprovada através de estudos de biodisponibilidade) e magistral (medicamento produzido em farmácias de manipulação, que apresenta mesmo fármaco e mesma dose que o medicamento de referência, mas não apresenta sua equivalência confirmada pelos estudos de biodisponibilidade).

*e-mail: zamora@quimica.ufpr.br

Recentemente, a espectroscopia no infravermelho foi proposta para a realização de estudos orientados a avaliar adulterações em medicamentos fitoterápicos.¹³ Neste trabalho, a adição de drogas sintéticas, como a sibutramina, foi detectada pelo uso de métodos multivariados.

PARTE EXPERIMENTAL

Amostras e padrões

A matéria-prima, cloridrato de sibutramina mono-hidratado (teor 99,95%), e os excipientes, microcelulose cristalina, lactose, estearato de magnésio e dióxido de silício coloidal, foram de pureza grau farmacêutico.

O padrão de sibutramina utilizado como referência foi da marca Axxora®, sendo obtido da empresa Bioagency (99,99%).

As especialidades farmacêuticas analisadas foram: medicamento de referência (Reductil®, Medley, 15 mg, Lote: 440398F04), medicamento genérico (Cloridrato de sibutramina monohidratado®, Medley, 15 mg, Lote: 480128F02), medicamento similar (Vazy®, SEM, 15 mg, Lote: 109934-1) e medicamento magistral (Cloridrato de sibutramina mono-hidratado, 15 mg).

Desenvolvimento de modelos multivariados de calibração

Um conjunto de 27 amostras sintéticas foi preparado (5,0 a 150,0 mg g⁻¹) tomando-se 1 a 30 mg de sibutramina e diluindo-se até 200 mg com a mistura de excipientes (estearato de magnésio (0,5% m/m), dióxido de silício coloidal (1,0% m/m), microcelulose cristalina (40,0% m/m) e lactose (58,5% m/m)). Destas, 22 amostras foram utilizadas para o desenvolvimento dos modelos de calibração, enquanto que as 5 restantes, selecionadas de maneira a se distribuir uniformemente ao longo do intervalo de concentração modelado, foram reservadas para a fase de validação externa.

Espectros no infravermelho no modo de refletância difusa foram adquiridos em espectrofotômetro Excalibur (modelo FTS-4000 Bio-Rad), na faixa espectral compreendida entre 7000 a 400 cm⁻¹, utilizando-se resolução de 4 cm⁻¹ e acumulando-se 128 varreduras. Os espectros foram processados: de maneira integral (7000 a 400 cm⁻¹), separando-se regiões do infravermelho médio (4000 a 400 cm⁻¹) e do infravermelho próximo (7000-4000 cm⁻¹) e selecionando-se regiões espectrais de maior caracterização funcional no espectro da sibutramina (750-1150/ 1350-1500/ 1850-1950/ 2600-2900 cm⁻¹).

Para a montagem de matrizes de dados utilizou-se o software Origin Pro 6.1®, enquanto que para a elaboração dos modelos foi utilizado o programa PLS-toolbox 1.5, que opera em ambiente Matlab v.6.5.

Estudos de validação

Com o objetivo de conferir validade aos resultados obtidos pelo modelo multivariado, os ensaios de precisão e exatidão foram realizados de acordo com critérios estabelecidos pela ANVISA (RDC N°899 de 2003).¹⁴

Para o ensaio da repetitividade foram preparadas 3 amostras, contendo 10, 20 e 30 mg de sibutramina e levadas até massa final de 200 mg com a mistura de excipientes, sendo analisadas em triplicata, pelo mesmo analista. A avaliação da precisão intermediária envolveu a participação de dois analistas, os quais, em dias diferentes, analisaram as mesmas amostras utilizadas no ensaio anterior.

A exatidão do modelo multivariado foi avaliada por ensaio de recuperação, envolvendo as mesmas misturas utilizadas no ensaio de precisão.

Análise dos medicamentos por cromatografia líquida de alta eficiência

A análise dos medicamentos por cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada pelo método desenvolvido e validado por Radhakrishna *et al.*,³ utilizando-se cromatógrafo Varian 920 LC equipado com detector ultravioleta (225 nm) e coluna Hypersil C18 (5 µm, 4,6 x 250 mm). A fase móvel foi constituída de trietanolamina 10% (pH ajustado com ácido orto-fosfórico a 6,0) e acetonitrila na proporção 30/70 (v/v).

A curva analítica foi preparada entre 0,1 e 0,5 mg mL⁻¹ (n=5), utilizando-se padrão de sibutramina dissolvido na própria fase móvel.

Determinação do teor de fármaco nas amostras comerciais

Para análise de amostras comerciais foram tomadas 20 amostras de cada medicamento (cápsulas), cujo conteúdo foi misturado, triturado e homogeneizado. Na análise por DRIFT, os espectros foram adquiridos diretamente em fase sólida. Para análise cromatográfica, uma massa equivalente a uma cápsula (massa média determinada previamente) foi dissolvida em fase móvel e levada até volume final de 50 mL, alcançando uma concentração final nominal de 0,3 mg mL⁻¹ de sibutramina.

Todas as análises foram realizadas em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um espectro infravermelho típico de sibutramina é apresentado na Figura 2. Nesta figura é possível identificar sinais característicos do fármaco em estudo,¹⁵ destacando: a) estiramentos de grupos deformação de C-H aromático fora do plano (834 e 823 cm⁻¹) e b) no plano (1011 cm⁻¹), c) grupo isobutil (1395 e 1370 cm⁻¹), d) grupo NCH₃ (1428 e 1407 cm⁻¹), e) estiramento de CH₃ em grupo isobutil e vibração de CH₂ em tesoura (1483 e 1474 cm⁻¹), f) estiramento C=C aromático (1492 cm⁻¹), g) grupo aromático *p*-substituído (1902 cm⁻¹), h) estiramento de grupo N-H (2700 cm⁻¹) e i) estiramentos de grupos CH₃, CH₂ e CH (2963 e 2866 cm⁻¹).

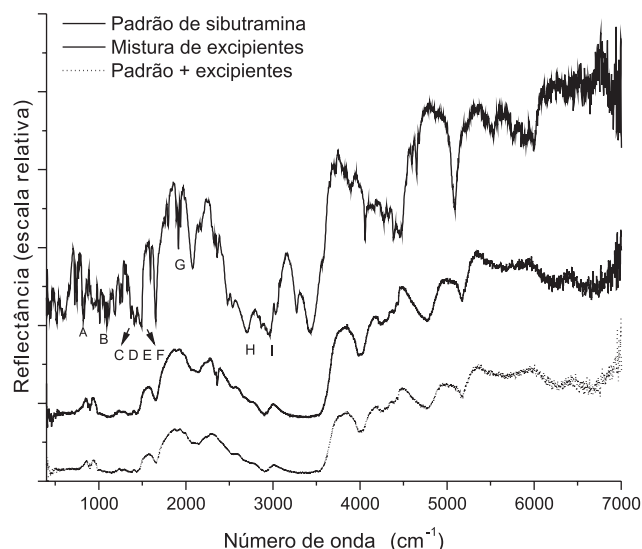


Figura 2. Espectros no infravermelho por refletância difusa de padrão de sibutramina, mistura de excipientes e mistura de sibutramina e excipientes

Quando se compara o espectro da sibutramina com o espectro da mistura de excipientes utilizada como diluente, observam-se perfis de absorção diferenciados, principalmente nas regiões em que se

manifestam os grupos químicos que caracterizam a sibutramina. Esta diferenciação sugere a possibilidade de se quantificar o fármaco na presença destes insumos. Entretanto, a baixa concentração relativa do fármaco, em relação aos excipientes utilizados na forma farmacêutica em estudo (15 mg/200 mg), faz com que o perfil espectral das amostras contendo sibutramina e excipientes seja praticamente idêntico ao espectro da mistura de excipientes. Trata-se de um fator desfavorável, que justifica a utilização de processos multivariados de calibração.

Inicialmente, inúmeros modelos foram desenvolvidos, utilizando-se as quatro regiões espectrais antes salientadas (1-4) e diversos números de variáveis latentes, os quais foram previamente selecionados em função da minimização do valor de RMSECV, que corresponde à raiz quadrada do somatório dos erros de previsão ao quadrado, obtidos no processo de validação cruzada (sistema *leave-one-out*).

Os resultados, expressos como erro percentual médio na fase de validação externa, são apresentados na Figura 3. Nesta representação gráfica, fica evidente que os modelos de melhor capacidade de previsão são obtidos pelo processamento da região espectral que melhor caracteriza os grupos funcionais da sibutramina (região espectral 4), região esta que inclui os intervalos 750-1150, 1350-1500, 1850-1950 e 2600-2900 cm^{-1} . Utilizando-se esta informação espectral, erros de previsão médios inferiores a 10% são observados com a utilização de 6 a 18 variáveis latentes.

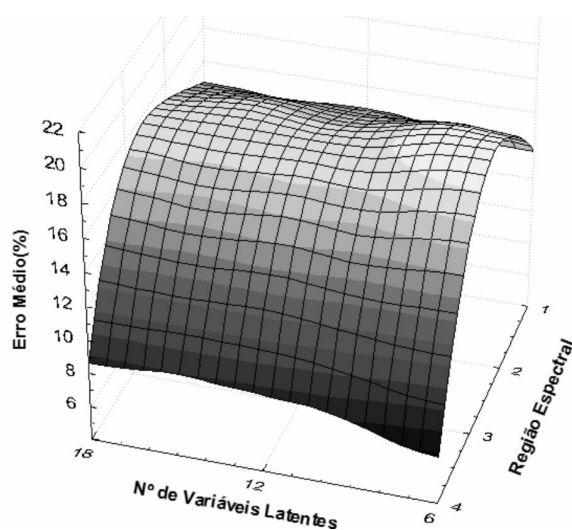


Figura 3. Evolução do erro médio de previsão na fase de validação externa, em função da região espectral processada e do número de variáveis latentes. 1: faixa espectral completa, 2: infravermelho médio, 3: infravermelho próximo, 4: dados espectrais selecionados

Com a finalidade de remover ou reduzir variações espectrais ocasionadas por fatores instrumentais, três tipos de pré-processamento de sinais foram também avaliados: correção multiplicativa de sinal (MSC), que permite corrigir inconsistências associadas ao fenômeno de refletância; *detrend*, que permite a eliminação de tendências lineares e, alisamento pelo filtro de Savitzky-Golay, que permite eliminar flutuações devidas a ruído instrumental. Os resultados apresentados na Figura 4 indicam que a melhor capacidade de previsão do modelo multivariado, fundamentado na região espectral 4, é conseguida com o processamento de dados espectrais alisados, utilizando-se 9 a 11 variáveis latentes. Nestas condições, erros médios de previsão inferiores a 1% foram observados, na análise das amostras reservadas para validação.

De maneira geral, espera-se que a quantificação de apenas um analito implique na necessidade de um pequeno número de variáveis latentes, mesmo na presença de interferências associadas à comple-

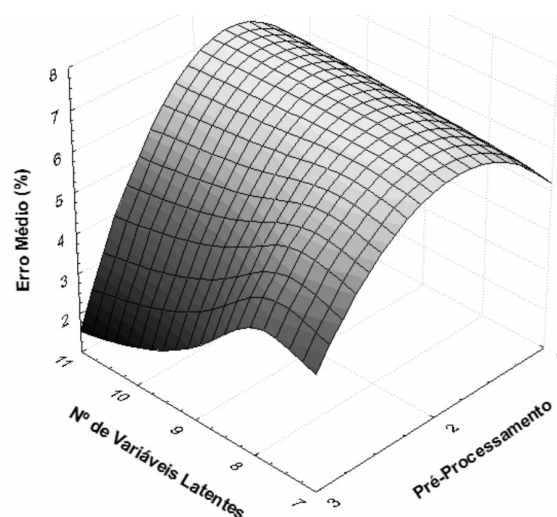


Figura 4. Evolução do erro médio de previsão na fase de validação externa, em função do tipo de pré-processamento dos dados espectrais e do número de variáveis latentes. 1: MSC, 2: *detrend*, 3: alisamento

xidade da matriz. Adicionalmente, o uso de um elevado número de VLs pode representar um sobre-ajuste (*overfitting*) do modelo, o que, de maneira geral, atenta contra a capacidade de previsão para novas amostras. Neste caso, a necessidade de um grande número de VLs pode ser justificado por desvios da linearidade dos dados, em função da presença de elevadas concentrações relativas de outros componentes (excipientes).¹⁶

Na Figura 5 se apresenta o gráfico que correlaciona os valores reais de concentração com os valores previstos pelo modelo desenvolvido com 10 variáveis latentes e envolvendo o uso de dados espectrais alisados (região espectral 4). Estes resultados demonstram um excelente ajuste do modelo, tanto para o conjunto de calibração como de validação.

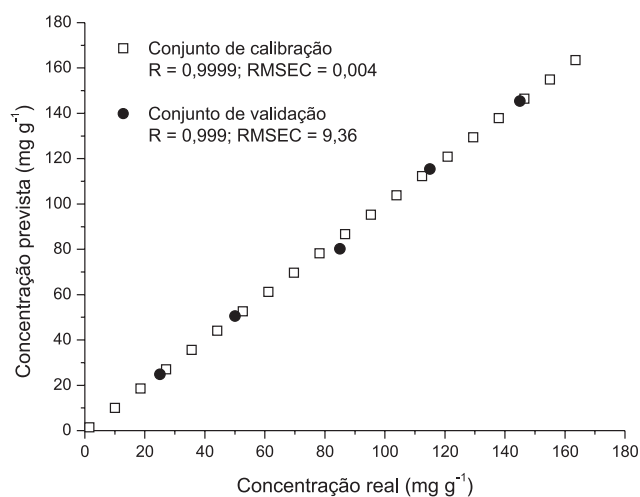


Figura 5. Gráfico de valores reais por previstos para os conjuntos de calibração e validação (faixa espectral 4, dados alisados, 10 variáveis latentes)

Quando aplicado na análise de medicamentos comerciais, o modelo permite a obtenção dos resultados apresentados na Tabela 1. Em primeiro lugar, é importante salientar que existe uma clara diferença entre os valores nominais, descritos na bula dos medicamentos, e os valores encontrados por aplicação da metodologia cromatográfica de referência, especialmente nos medicamentos genérico, similar e magistral. Por sua vez, o modelo multivariado permite a obtenção

de resultados coerentes, em relação aos valores obtidos pela técnica cromatográfica de referência, com exceção das amostras de medicamento genérico, que apresentam um erro médio de previsão superior a 10%. Erros desta magnitude podem estar associados à presença de excipientes, os quais, de natureza ou concentração diferente daquela utilizada neste estudo, podem provocar alteração no sinal espectral monitorado. Trata-se de um problema de falta de robustez frente à presença destes insumos auxiliares, o qual deve ser considerado na etapa de elaboração dos modelos.

Tabela 1. Resultados da análise de amostras comerciais de medicamentos por procedimento cromatográfico e espectroscópico multivariado (n=3)

Medicamento	Nominal (bula: mg g ⁻¹)	Cromatografia (mg g ⁻¹)	DRIFTS (mg g ⁻¹)	Erro* (%)
Referência		15,02 ± 0,09	15,16 ± 1,82	0,93
Magistral	15,00	11,95 ± 0,67	12,18 ± 2,59	1,92
Genérico		13,54 ± 3,56	14,94 ± 8,89	10,34
Similar		14,51 ± 2,21	14,97 ± 3,82	3,17

*Erro calculado em função da concentração obtida por aplicação de metodologia cromatográfica de referência.

Estudos de validação

Os estudos de validação foram realizados de acordo com recomendações da ANVISA, levando-se em consideração ensaios de repetitividade, precisão intermediária e recuperação (exatidão).

Nos estudos de repetitividade (Tabela 2) observaram-se desvios relativos inferiores a 5%, na análise das três concentrações avaliadas. Desvios ainda inferiores foram observados no estudo de precisão intermediária (Tabela 3), o que atesta o cumprimento das especificações da agência reguladora (desvio máximo de 5%).

Tabela 2. Valores médios e desvios padrão relativos obtidos no estudo de repetitividade (n=3)

Concentração real (mg mL ⁻¹)	Concentração prevista (mg mL ⁻¹)			Média	DP	DP (%)
10,00	10,28	9,36	9,91	9,85	0,46	4,70
20,00	19,3	21,09	20,55	20,31	0,92	4,52
30,00	29,67	29,55	30,21	29,81	0,35	1,18
Média (%)						3,47

Tabela 3. Valores médios e desvios padrão relativos obtidos no estudo de precisão intermediária (n=3)

Concentração real (mg mL ⁻¹)	Analista 1 (média, n=3)	Analista 2 (média, n=3)	Média	DP	DP (%)
10	9,88	9,96	9,92	0,056	0,57
20	20,13	20,23	20,18	0,071	0,35
30	29,74	29,47	29,60	0,191	0,64
Média					0,52

Nos ensaios de recuperação (Tabela 4), valores de 100,26; 100,36 e 99,83% foram observados na determinação das três concentrações avaliadas, o que está de acordo com as exigências impostas pelas agências reguladoras, que consideram satisfatórios valores de recuperação entre 98 e 102%.

CONCLUSÕES

Os resultados permitem concluir que os processos de calibração multivariada utilizados no estudo viabilizam a determinação de si-

Tabela 4. Concentrações encontradas no ensaio de recuperação

Concentração real (mg mL ⁻¹)	Concentração prevista (mg mL ⁻¹)	Recuperação (%)	Média (%) ± DPR
10,00	9,87	98,70	100,27 ± 1,37
	10,08	100,80	
	10,13	101,30	
20,00	19,92	99,60	100,37 ± 0,69
	20,11	100,55	
	20,19	100,95	
30,00	29,57	98,56	99,83 ± 1,16
	30,03	100,10	
	30,25	100,83	

butramina em formas farmacêuticas, utilizando-se espectroscopia no infravermelho no modo de refletância difusa (DRIFT).

A metodologia proposta apresenta-se bastante rápida e simples, principalmente em função de prescindir de operações de abertura ou solubilização das amostras, assim como de processos de separação prévia.

O modelo de melhor desempenho de previsão foi fundamentado em regiões espectrais fragmentadas, as quais incluem as principais bandas associadas à molécula de sibutramina.

Parâmetros de precisão e exatidão foram avaliados de acordo com procedimentos padrão, obtendo-se resultados que estão em conformidade com as exigências impostas pelos órgãos de controle (ANVISA).

REFERÊNCIAS

- Marinho, S. P.; Martins, I. S.; Perestrelo, J. P. P.; Oliveira, D. C.; *Rev. Nutr.* **2003**, *16*, 195.
- Xavier, F.; Sunyer, P.; *Clin. Cornerstone* **2006**, *8*, 14.
- Radhakrishna, T.; Lakshminarayana, C.; Sreenivasrao, D.; Vyas, K.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2000**, *22*, 627.
- Halpern, A.; Leite, C. C.; Herszcowicz, N.; Barbato, A.; Costa, A. P. A.; *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo* **2002**, *57*, 98.
- Elfhag, K.; Rossner, S.; Barkeling, B.; Rooth, P.; *Pharmacol. Res.* **2005**, *51*, 159.
- Inoue, S.; Miyamoto, S.; Ogasawara, M.; Endo, O.; Suzuki, G.; *J. Health Sci.* **2009**, *55*, 183.
- Diefenbach, I. C. F.; Friedrich, M.; Dos Santos, M. R.; Figueiredo, C. B.; *J. AOAC Int.* **2009**, *92*, 148.
- Singh, A. K.; Garcia, P. L.; Gomes, F. P.; Yano, H. M.; Auricchio, M. T.; Kedor-Hackmann, E. R.; Santoro, M. I.; *J. AOAC Int.* **2008**, *91*, 572.
- Kipouros, K.; Kachrimanis, K.; Nikolakakis, I.; Malamataris, S.; *Anal. Chim. Acta* **2005**, *550*, 191.
- Pasquini, C.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2003**, *14*, 198.
- Sarraguça, M. C.; Lopes, J. A.; *Vib. Spectrosc.* **2009**, *49*, 204.
- Pöllänen, K.; Häkkinen, A.; Huhtanen, M.; Reinikainen, S. P.; Karjalainen, M.; Rantanen, J.; Louhi-Kultanen, M.; Nyström, L.; *Anal. Chim. Acta* **2005**, *544*, 108.
- Lu, F.; Li, S.; Le, J.; Chen, G.; Cao, Y.; Qi, Y.; Chai, Y.; Wu, Y.; *Anal. Chim. Acta* **2007**, *589*, 200.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária; *Resolução n.º. 899*, 29 de maio de 2003, Brasília, Brasil.
- Jeffery, J. E.; Kerrigan, F.; Miller, T. K.; Smith, G. J.; Tometzki, G.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1996**, *21*, 2583.
- Barthus, R. C.; Mazo, L. H.; Poppi, R. J.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 1638.