

## 4

# Avaliação de desempenho dos métodos voltamétricos e análise dos medicamentos e do alimento protéico

### 4.1.

#### Comparação do método voltamétrico com cromatografia líquida

Ao se comparar o desempenho de dois métodos analíticos, objetiva-se avaliar a exatidão de um método tido como referência com o método de análise proposto e em desenvolvimento. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi escolhida neste trabalho para realizar comparação com os métodos voltamétricos para determinação de sibutramina. CLAE é um método de análise bastante usado para análises quantitativas de fármacos (USP, 31) que se vale da separação física da espécie de interesse de outras na matriz em análise, aumentando a chance de sucesso das determinações analíticas. Embora nos compêndios oficiais não exista nenhum método para quantificação de sibutramina, esta técnica é usualmente usada nas determinações de sibutramina pelos órgãos de controle de qualidade.

Para a comparação entre as técnicas para determinação de sibutramina em medicamentos (voltametria de pulso diferencial e CLAE), foi usado o medicamento Biomag<sup>®</sup> 15 mg (lote 0205844) que possui a sibutramina como princípio ativo. Fez-se as determinações (Anexo 22) usando “pool” de 20 cápsulas e após ser feita a média destes valores, uma relação entre o valor médio obtido e a quantidade do princípio ativo declarado pelo fabricante foi obtida. Sete amostras independentes (caixas de medicamentos) foram usadas. Alíquotas de conteúdo das cápsulas foram pesadas, diluídas em metanol e deixadas em banho de ultra-som por 10 min. Em seguida, os volumes foram completados (20 mL) com água ultrapura. A massa média das cápsulas foi de 236,6 mg. Portanto, para cada 236,6 mg de sólido presente por cápsula, 15 mg era sibutramina (valor declarado pelo fabricante).

Para a comparação entre as duas técnicas de análise para alimentos protéicos para atletas foi usado o GF-1<sup>®</sup> Body Size da Integralmédica lotes 16174 e 17343. Soluções independentes de amostras GF-1<sup>®</sup> foram preparadas a partir de 1,0 mL do

conteúdo em 20,0 mL de metanol. As análises de GF-1<sup>®</sup> por DPV foram feitas por meio de procedimento de adição padrão, enquanto a análise por CLAE foi realizada por interpolação em curva analítica.

#### 4.1.1.

#### Análise do medicamento Biomag<sup>®</sup> por CLAE e por voltametria de pulso diferencial

##### 4.1.1.1.

##### CLAE

Para as análises das amostras do medicamento Biomag<sup>®</sup> por CLAE foi feita uma curva analítica com as concentrações do padrão 100; 200; 300; 400 e 500 mg L<sup>-1</sup> (Figura 17). As amostras do medicamento foram medidas em triplicata e interpoladas nesta curva para a obtenção da concentração de sibutramina na amostra (Anexo 16). A Figura 18 mostra um cromatograma típico do padrão de sibutramina.

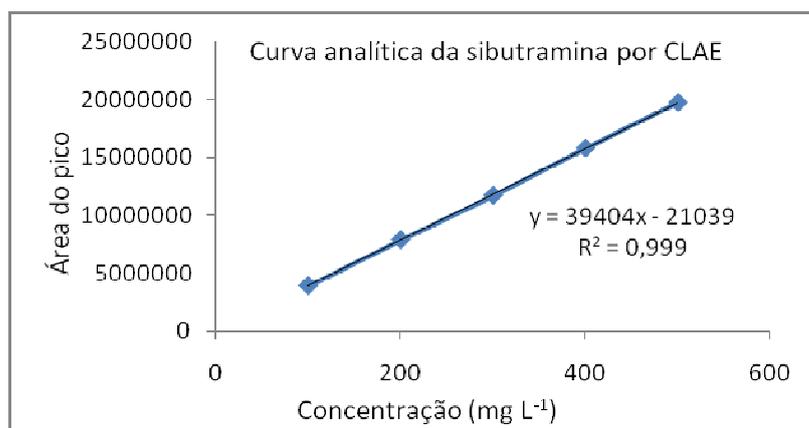


Figura 17 - Curva analítica da sibutramina por CLAE. Condições experimentais: coluna cromatográfica C8 de 250 x 4 mm (tamanho de partícula médio de 5  $\mu$ m), fase móvel: solução 0,05% v/v ácido trifluoracético e acetonitrila 70:30, volume injetado: 15  $\mu$ L de sibutramina da Biomag<sup>®</sup> e detetor UV (comprimento de onda 230 nm)

A média da concentração de sibutramina encontrada no medicamento Biomag<sup>®</sup> por CLAE foi de 15,1 mg/cápsula, com um desvio padrão (s) de 0,361 e variância (s<sup>2</sup>) 0,13. O desvio padrão relativo foi de 2,6 e o intervalo de confiança ( $\pm t \cdot s/n^{1/2}$  para valor de  $t_6 = 2,45$ ) foi de 0,4. Portanto o valor de sibutramina encontrado (mg) por cápsula do medicamento foi de  $15,1 \pm 0,4$ .

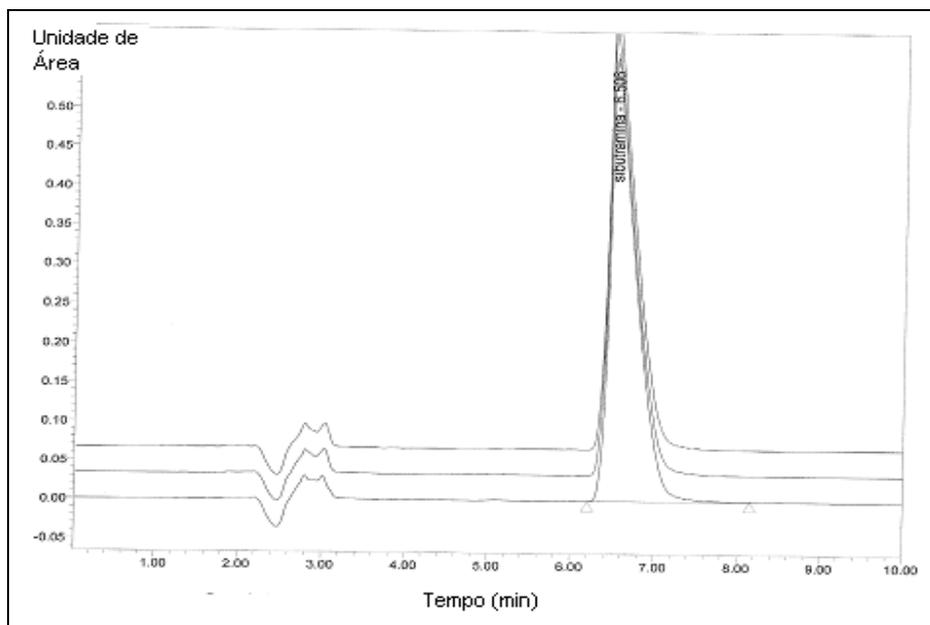


Figura 18 - Cromatograma do padrão de sibutramina  $300 \text{ mg L}^{-1}$ . Condições experimentais: coluna cromatográfica C8 de  $250 \times 4 \text{ mm}$  (tamanho de partícula médio de  $5 \mu\text{m}$ ), fase móvel: solução 0,05% v/v ácido trifluoracético e acetonitrila 70:30, volume injetado:  $15 \mu\text{L}$  de sibutramina do medicamento Biomag<sup>®</sup> e detetor UV (comprimento de onda  $230 \text{ nm}$ ).

#### 4.1.1.2. Voltametria de pulso diferencial

Para as análises das amostras de sibutramina do medicamento Biomag<sup>®</sup> por DPV foi feita uma curva analítica com as concentrações do padrão 7,3; 14,3; 20,9; 27,3 e 33,3  $\text{mg L}^{-1}$  (Figura 19). As amostras de sibutramina do medicamento Biomag<sup>®</sup> foram diluídas para se ajustarem na faixa de trabalho da curva e medidas em triplicata nesta curva analítica e a concentração de sibutramina na amostra foi então obtida (Anexo 17).

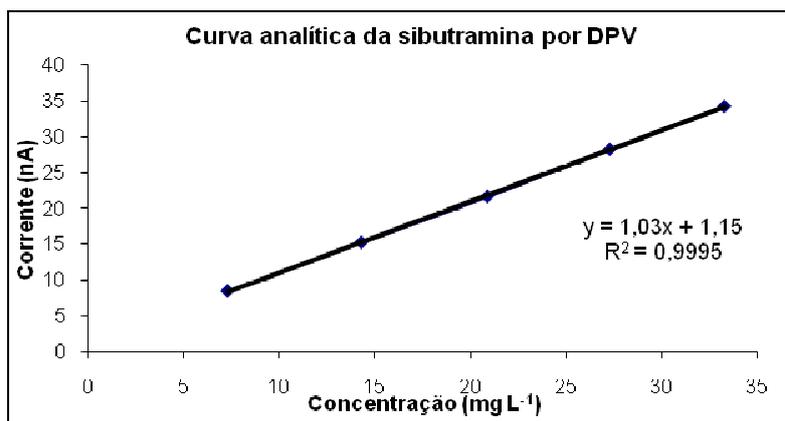


Figura 19 - Curva analítica da sibutramina por DPV para análises das amostras de sibutramina do medicamento Biomag<sup>®</sup>

A média da concentração de sibutramina encontrada no medicamento Biomag<sup>®</sup> por DPV foi de 14,9 mg/cápsula, com um desvio padrão ( $s$ ) de 0,3742 e variância ( $s^2$ ) 0,14. O desvio padrão relativo foi de 2,7 e o intervalo de confiança ( $\pm t.s/n^{1/2}$  para valor de  $t_6 = 2,45$ ) foi de 0,4. Portanto o valor de sibutramina encontrado (mg) por cápsula do medicamento foi de  $14,9 \pm 0,4$ .

#### 4.1.1.3.

#### Comparação entre os resultados das análises de sibutramina do medicamento Biomag<sup>®</sup>

O teste F (onde:  $F_{calculado} = s^2 \text{ maior} / s^2 \text{ menor}$ ) foi usado para verificar se os dois métodos de análise (CLAE e DPV) apresentavam diferenças significativas entre si com relação à precisão para a determinação de sibutramina em medicamentos. O valor encontrado para o  $F_{calculado}$  foi de 1,1, enquanto o valor de  $F_{tabelado}$  para  $F_{6,6}$  é 4,28 (95%). Portanto, como o valor de  $F_{calculado}$  foi menor que o valor de  $F_{tabelado}$ , concluiu-se que os dois métodos de análise não apresentavam diferenças estatisticamente significativas entre si em relação às suas precisões.

O teste t também foi aplicado a fim de avaliar a igualdade das médias dos dois conjuntos de amostras. O valor de  $t_{calculado}$  foi 1,0 ( $0,2/[0,137 (0,286)]^{1/2}$ ). O valor de  $t_{tabelado}$  é 2,18 (( $2n-2$ ) graus de liberdade e 95% de limite de confiança).

A partir destes resultados, a distribuição t de Student mostrou que a diferença entre as médias obtidas para o medicamento Biomag<sup>®</sup> por CLAE e DPV não é significativa.

#### 4.1.2.

#### Análise do alimento protéico GF-1<sup>®</sup> por CLAE e DPV

As duas amostras do alimento protéico GF-1<sup>®</sup> (lotes 16174 e 17343) foram analisadas por CLAE e por DPV. Três soluções independentes foram preparadas para cada amostra (conforme indicado na seção 2.5).

##### 4.1.2.1.

##### CLAE

Para as análises por CLAE, as soluções foram medidas usando a curva analítica da Figura 20. As concentrações de sibutramina nas soluções da amostra GF-1<sup>®</sup> lote 16174 são mostradas no Anexo 18, onde o valor médio da concentração de sibutramina encontrada na amostra GF-1<sup>®</sup> foi 3600,0 mg L<sup>-1</sup> e o desvio padrão (s) foi de 103,0. O DPR foi 2,9% e o intervalo de confiança ( $\pm t.s/n^{1/2}$  para valor de  $t_2 = 4,3$ ) foi de 255,7. Portanto o valor de sibutramina encontrado foi de 3600,0  $\pm$  255,7 mg L<sup>-1</sup>. A Figura 20 mostra o cromatograma para a amostra de GF-1<sup>®</sup>. Para o GF-1<sup>®</sup> lote 17343 nenhum sinal analítico foi encontrado por CLAE.

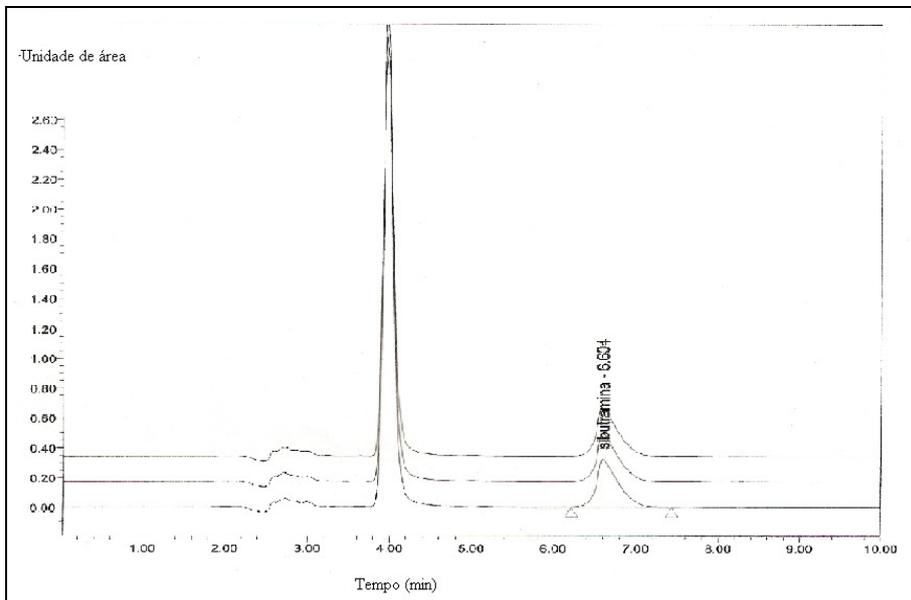


Figura 20 - Cromatograma da solução 2 da amostra do alimento protéico GF-1<sup>®</sup> lote 16174 por CLAE. Condições experimentais: coluna cromatográfica C8 de 250 x 4 mm (tamanho de partícula médio de 5  $\mu$ m), fase móvel: solução 0,05% v/v ácido trifluoracético e acetonitrila 70:30, volume injetado: 15  $\mu$ L de sibutramina do medicamento Biomag<sup>®</sup> e detetor UV (comprimento de onda 230 nm).

#### 4.1.2.2. DPV

Para as análises de GF-1<sup>®</sup> (lotes 16174 e 17343) por voltametria de pulso diferencial foram feitas três curvas de adição padrão (para cada amostra de GF-1<sup>®</sup>), adicionando 0,5 mL da solução GF-1<sup>®</sup> diluída 20 vezes à célula eletrolítica. Foram feitas cinco adições consecutivas de 250 µL do padrão de sibutramina 300 mg L<sup>-1</sup> à esta célula. Os resultados para as análises de GF-1<sup>®</sup> lote 16174 por DPV encontram-se no Anexo 19, onde o valor médio da concentração de sibutramina encontrada na amostra GF-1<sup>®</sup> lote 16174 por DPV foi 4181,5 mg L<sup>-1</sup> e o desvio padrão (s) foi de 63,1. O desvio padrão relativo foi de 1,5 e o intervalo de confiança ( $\pm t.s/n^{1/2}$  para valor de  $t_2 = 4,3$ ) foi de 155,0. Portanto o valor de sibutramina encontrado foi de  $4181,5 \pm 155,0$  mg L<sup>-1</sup>. Para o GF-1<sup>®</sup> lote 17343 nenhum sinal analítico foi encontrado.

#### 4.1.2.3. Comparação dos resultados das análises do GF-1<sup>®</sup>

O Teste F foi usado na avaliação da precisão entre os métodos de análise de sibutramina (voltametria de pulso diferencial e CLAE) para a determinação do alimento protéico GF-1<sup>®</sup> ( $F_{calculado} = s^2_{maior} / s^2_{menor}$ ). O  $F_{calculado}$  ( $F_{calculado} = 3988,0/3390,2$ ) foi 1,2 ( $F_{tabelado} = F_{2,2} = 19,0$  para 95% de limite de confiança). Como o valor de  $F_{calculado}$  foi menor que o valor de  $F_{tabelado}$ , concluiu-se que os dois métodos de análise não apresentavam diferenças estatisticamente significantes entre si em relação as suas precisões.

O teste t também foi aplicado a fim de avaliar a igualdade das médias dos dois conjuntos de amostras. O valor de  $t_{calculado}$  foi 5,92. O valor de  $t_{tabelado}$  é 2,78 ((2n-2) graus de liberdade e 95% de limite de confiança).

A partir destes resultados, a distribuição t de Student mostrou que a diferença entre as médias obtidas por CLAE e DPV para o alimento protéico GF-1<sup>®</sup> é significativa, podendo estar associado a efeito de matriz na análise por DPV.

## 4.2.

### Análise dos medicamentos e do alimento protéico GF-1<sup>®</sup> por DPV

O alimento protéico não foi analisado por DPV nem por SWV, pois os resultados preliminares mostraram um efeito de matriz que superestimava o valor de sibutramina esperado na amostra. Este tipo de interferência não poderia ser minimizado pela técnica de adição do analito e somente a separação física do interferente poderia permitir a aplicação do método.

As análises dos medicamentos foram feitas de acordo com as condições operacionais otimizadas descritas na Tabela 3. A curva analítica, mostrada na Figura 21, foi usada para a quantificação dos medicamentos. Foram preparadas 10 amostras independentes (Anexos 20-24) para cada medicamento, sendo um volume de 750  $\mu\text{L}$  de solução da amostra de medicamento adicionado à célula eletroquímica. Foi feita a média das concentrações de sibutramina encontradas, o desvio padrão ( $s$ ), a variância ( $s^2$ ) e o desvio padrão relativo. Uma relação entre a concentração média encontrada e o valor de sibutramina declarado pelo fabricante foi obtido.

#### 4.2.1.

##### Análise dos medicamentos por DPV

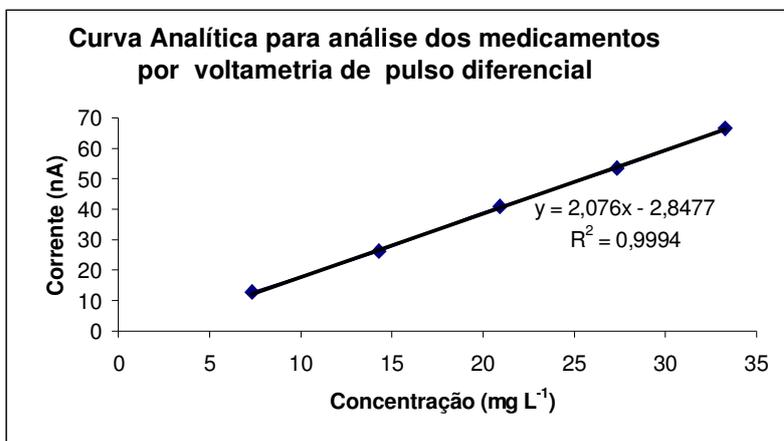


Figura 21 - Curva Analítica para análise dos medicamentos por voltametria de pulso diferencial

No Anexo 25 são mostrados os valores das concentrações ( $\text{mg L}^{-1}$ ) de sibutramina encontradas para cada uma das dez soluções analisadas pela curva analítica da Figura 21 para o medicamento Vazy<sup>®</sup> (lote 128734), onde a concentração média de sibutramina encontrada foi de  $(9,5 \pm 0,4)$   $\text{mg/cápsula}$  (intervalo de confiança encontrado usando  $t.s/n$

$\frac{1}{2}$ , onde  $t_{9 (1-\alpha = 0,95)} = 2,26$ ), variância ( $s^2$ ) 0,4, desvio padrão (s) 0,5925 e DPR de 6,2%. O medicamento Vazy<sup>®</sup> declarava conter 10,0 mg/cápsula de sibutramina, no entanto foi encontrado 9,5 mg/cápsula, ou seja, 95,0% do valor declarado pelo fabricante, mas de acordo com a USP 31, 2008 este medicamento estaria aprovado, pois a faixa de concentração aceitável é de 90 a 110% do valor declarado pelo fabricante.

No Anexo 26 são mostrados os valores das concentrações ( $\text{mg L}^{-1}$ ) de sibutramina encontradas para cada uma das dez soluções analisadas do medicamento Sandoz<sup>®</sup> (lote 41748R), onde a concentração média de sibutramina encontrada foi de  $(14,0 \pm 0,1)$  mg/cápsula (intervalo de confiança encontrado usando  $t.s/n^{\frac{1}{2}}$ , onde  $t_{9 (1-\alpha = 0,95)} = 2,262$ ), variância ( $s^2$ ) 0,0344, desvio padrão (s) 0,1856 e DPR de 1,4%. O medicamento Sandoz<sup>®</sup> declarava conter 15,0 mg/cápsula de sibutramina, no entanto foi encontrado 14,0 mg/cápsula, ou seja, 93,3% do valor declarado pelo fabricante, mas de acordo com a USP 31, 2008 este medicamento também estaria aprovado, pois a faixa de concentração aceitável é de 90 a 110% do valor declarado pelo fabricante.

No Anexo 27 são mostrados os valores das concentrações ( $\text{mg L}^{-1}$ ) de sibutramina encontradas para cada uma das dez soluções analisadas do medicamento Sandoz<sup>®</sup> (lote 43140), onde a concentração média de sibutramina encontrada foi de  $(13,9 \pm 0,1)$  mg/cápsula, (intervalo de confiança encontrado usando  $t.s/n^{\frac{1}{2}}$ , onde  $t_{9 (1-\alpha = 0,95)} = 2,262$ ) variância ( $s^2$ ) 0,04333, desvio padrão (s) 0,2082 e DPR de 1,5%. O medicamento Sandoz<sup>®</sup> declarava conter 15,0 mg/cápsula de sibutramina, no entanto foi encontrado 13,9 mg/cápsula, ou seja, 92,7% do valor declarado pelo fabricante, mas de acordo com a USP 31, 2008 este medicamento estaria aprovado (faixa de concentração aceitável é de 90 a 110% do valor declarado pelo fabricante).

No Anexo 28 são mostrados os valores das concentrações ( $\text{mg L}^{-1}$ ) de sibutramina encontradas para cada uma das dez amostras analisadas do medicamento Biomag<sup>®</sup> (lote 0705169A), onde a concentração média de sibutramina encontrada foi de  $(9,8 \pm 0,1)$  mg/cápsula, (intervalo de confiança encontrado usando  $t.s/n^{\frac{1}{2}}$ , onde  $t_{9 (1-\alpha = 0,95)} = 2,262$ ) variância ( $s^2$ ) 0,02677, desvio padrão (s) 0,1633 e DPR de 1,7%. O medicamento Biomag<sup>®</sup> declarava conter 10,0 mg/cápsula de sibutramina, no entanto foi encontrado 9,8 mg/cápsula, ou seja, 98,0%, o que é aceitável de acordo com a USP 31, 2008.

No Anexo 29 são mostrados os valores das concentrações ( $\text{mg L}^{-1}$ ) de sibutramina encontradas para cada uma das dez soluções analisadas do medicamento Biomag<sup>®</sup> (lote 0205844), onde a concentração média de sibutramina encontrada foi de  $(15,1 \pm 0,2)$  mg/cápsula (intervalo de confiança encontrado usando  $t.s/n^{\frac{1}{2}}$ , onde  $t_{9 (1-\alpha = 0,95)} =$

2,262), variância ( $s^2$ ) 0,07333, desvio padrão ( $s$ ) 0,2708 e DPR de 2,0%. O medicamento Biomag<sup>®</sup> declarava conter 15,0 mg/cápsula de sibutramina, no entanto foi encontrado 15,1 mg/cápsula, ou seja, 100,7% do valor declarado pelo fabricante, mas de acordo com a USP 31, 2008 este medicamento estaria aprovado, pois a faixa de concentração aceitável é de 90 a 110% do valor declarado pelo fabricante.

### 4.3. Comparação entre as técnicas DPV e SWV

Escolheu-se duas amostras de medicamentos analisadas por DPV para comparação com a técnica SWV, a fim de se avaliar a precisão e a exatidão destas duas técnicas voltamétricas. Dez amostras independentes foram analisadas.

O Anexo 30 mostra os valores das concentrações ( $\text{mg L}^{-1}$ ) de sibutramina (no medicamento Vazy<sup>®</sup> lote 128734) encontradas usando a técnica SWV. Dez amostras foram analisadas e os resultados medidos interpolados na curva analítica da Figura 22. A concentração média de sibutramina encontrada foi de  $9,5 \pm 0,1$  mg/cápsula (Intervalo de confiança (valor de  $t_9$  ( $1-\alpha = 0,95$ ) = 2,262) = 0,4), variância ( $s^2$ ) 0,2, desvio padrão ( $s$ ) 0,5 e DPR de 5,3%. O medicamento Vazy<sup>®</sup> declarava conter 10,0 mg/cápsula de sibutramina, no entanto foi encontrado 9,5 mg/cápsula, ou seja, 95,0% do valor declarado pelo fabricante, mas de acordo com a USP 31, 2008 este medicamento estaria aprovado, pois a faixa de concentração aceitável é de 90 a 110% do valor declarado pelo fabricante. O valor encontrado por voltametria de onda quadrada também pode ser comparado com o valor obtido por voltametria de pulso diferencial, isto é 9,5 mg/cápsula do medicamento (Anexo 25). O teste F foi aplicado a fim de verificar se os resultados obtidos pelas duas técnicas de análise desenvolvidas são estatisticamente equivalentes, encontrando-se um  $F$  calculado de 2,0 (0,4 / 0,2) (valor de  $F$  tabelado  $_{9,9}$  3,18 com limite de confiança 95 %). Como o  $F$  calculado é menor que o  $F$  tabelado, pode-se concluir que o método não apresentou diferença significativa em relação à sua exatidão, sendo os resultados obtidos pelas duas técnicas estatisticamente equivalentes.

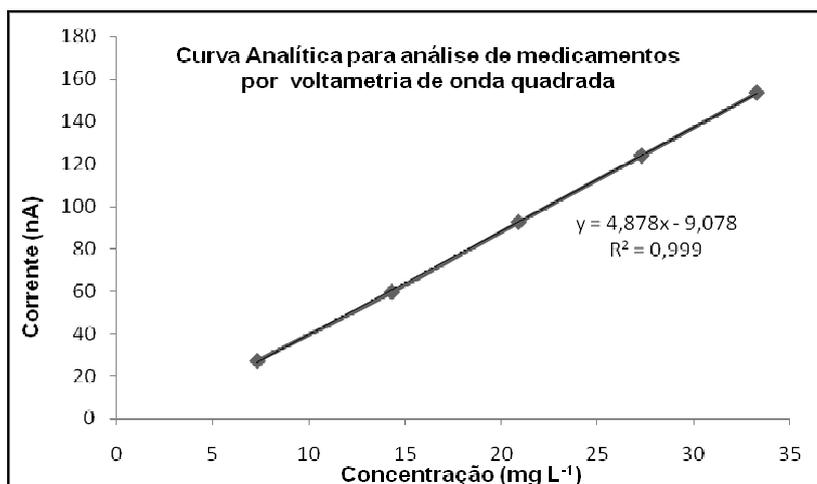


Figura 22 - Curva Analítica para análise dos medicamentos por voltametria de onda quadrada

O Anexo 31 mostra os valores das concentrações (mg L<sup>-1</sup>) de sibutramina encontradas para cada uma das dez amostras do medicamento Sandoz<sup>®</sup> (lote 41748R) analisadas por SWV (interpolação na curva analítica da Figura 25). A concentração média de sibutramina encontrada foi de (14,3 ± 0,1) mg/cápsula, variância (s<sup>2</sup>) 0,04, desvio padrão (s) 0,2 e DPR de 1,4%. O medicamento Sandoz<sup>®</sup> declarava conter 15,0 mg/cápsula de sibutramina, no entanto foi encontrado 14,3 mg/cápsula, ou seja, 95,6% do valor declarado pelo fabricante, mas de acordo com a USP 31, 2008 este medicamento estaria aprovado, pois a faixa de concentração aceitável é de 90 a 110% do valor declarado pelo fabricante.

Analisando este mesmo medicamento pela técnica de DPV foi encontrado 14,0 mg/cápsula do medicamento (Anexo 26). O teste F foi aplicado para comparar os resultados das análises por voltametria de pulso diferencial e voltametria de onda quadrada, a fim de verificar se os resultados obtidos pelas duas técnicas de análise desenvolvidas neste trabalho são estatisticamente equivalentes. O valor de *F calculado* foi 1,3 (0,04 / 0,03), e o valor de *F tabelado*<sub>9,9</sub> foi 3,18 (limite de confiança de 95 %). Como o *F calculado* é menor que o *F tabelado*, pode-se concluir que o método não apresenta diferença significativa em relação à sua exatidão, sendo as duas técnicas estatisticamente equivalentes.