

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**“EMPREGO DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL NO
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS
CROMATOGRÁFICOS NA INDÚSTRIA
FARMACÊUTICA”**

Bruna Miglioranza

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE PROFISSIONAL EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA TECNOLÓGICA.

Orientador: Renato Lajarim Carneiro

**São Carlos - SP
2012**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

M634ep

Miglioranza, Bruna.

Emprego de planejamento experimental no desenvolvimento de métodos cromatográficos na indústria farmacêutica / Bruna Miglioranza. -- São Carlos : UFSCar, 2012.
70 f.

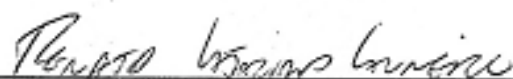
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Cromatografia líquida. 2. Cromatografia líquida de alta eficiência. 3. Planejamento experimental. 4. Análise multivariada. 5. Mistura (Química). I. Título.

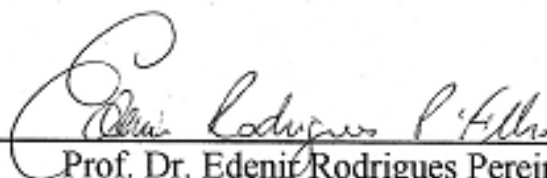
CDD: 543.0894 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Mestrado Profissional

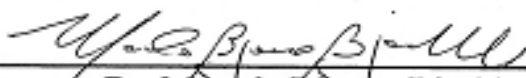
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de dissertação de Mestrado Profissional da candidata Bruna Miglioranza, realizada em 01 de novembro de 2012:



Prof. Dr. Renato Lajarin Carneiro



Prof. Dr. Edeníl Rodrigues Pereira Filho



Dr. Marcelo Bizarro Bjorklund

DEDICATÓRIA

À Deus,

Por todas as bênçãos que recebo diariamente de Vossas mãos. Obrigada por tudo, Pai.

Aos meus pais,

Que me educaram não por palavras, mas exemplos de fé, amor, perseverança e honestidade. Obrigada por toda a ajuda de sempre e pelo amor incondicional. Tenho por vocês a mais profunda admiração.

Ao meu marido Wagner,

Que fez inúmeros sacrifícios pessoais e trilhou cada passo dessa jornada ao meu lado, me amparando e me incentivando a seguir adiante. Wagner, essa conquista também é sua. Vamos colher juntos os frutos desse nosso esforço.

Aos meus irmãos Roberta e Leonardo,

Com todo o meu carinho.

Aos meus familiares e amigos,

Pela amizade incondicional, suporte, paciência e compreensão, principalmente na tolerância de minha ausência durante esse período.

AGRADECIMENTOS

O programa de mestrado profissional exige a participação e colaboração de muitas pessoas para sua aprovação, desenvolvimento e conclusão. Desta forma, agradeço de forma geral todos os meus colegas que participaram diretamente ou indiretamente dessas etapas do processo. Sei que sem o apoio dessas pessoas jamais conseguiria concluir esse trabalho. "Os grandes resultados e as grandes conquistas jamais serão conseguidos através de grandes esforços de poucas pessoas. Os grandes resultados e as grandes conquistas, só serão conseguidos através de pequenos esforços de muitas pessoas." (Autor desconhecido).

Agradeço às pessoas que batalharam pelo aceite do programa em suas respectivas instituições: José Martins e Flávia Tinti, da Farmacêutica EMS e Débora Stoll e Eduardo Lopes da Farmacêutica Sanofi. Agradeço também à Marcelo Bjorklund pelo grande suporte técnico durante o desenvolvimento do trabalho.

Agradeço à instituição EMS, pelo aceite inicial do programa.

Agradeço à Sanofi por ter aceitado o programa, por ter oferecido a infraestrutura para o desenvolvimento total da parte experimental do trabalho, bem como por ter flexibilizado meus horários de trabalho para possibilitar o cumprimento de todas as etapas do programa de Pós Graduação. Espero poder retribuir com os conhecimentos adquiridos e difundi-los para os demais colegas da empresa. Vejo a Sanofi como um modelo de ética e qualidade no ramo farmacêutico e tenho muito orgulho de pertencer a esse grupo.

Agradeço em especial meu orientador, Renato Lajarim Carneiro por todo o suporte, todos os finais de semana dedicados para nossas reuniões e toda a paciência perante minhas limitações.

LISTA DE TABELAS

TABELA 4.1.1 - Exemplo de aplicação de um planejamento fatorial de misturas.	10
TABELA 4.1.2 - Exemplo de planejamento para uma mistura binária.....	11
TABELA 4.2.1- Exemplo de planejamento fatorial de dois níveis.....	12
TABELA 4.4.1- Exemplo de modelo para cada resposta em cada planejamento de mistura de composição da fase móvel, considerando vazão de 0,8 mL/minuto e temperatura 25°C.....	14
TABELA 4.6.3.2.1 - Critérios de aceitação para repetibilidade/precisão intermediária	17
TABELA 5.1.1 - Principais lactonas sesquiterpênicas.....	20
TABELA 5.2.1 - Condições cromatográficas do método de referência.	22
TABELA 5.3.1 - Informações sobre os solventes eleitos para a extração líquido-líquido das lactonas sesquiterpênicas em amostra complexa contendo tintura de arnica [32].....	23
TABELA 5.3.2 - Planejamento experimental para escolha do solvente de extração.....	23
TABELA 5.3.3 - Resultados de porcentagem de lactonas sesquiterpênicas encontradas em relação ao valor esperado.....	24
TABELA 5.3.4 - Resultados de distribuição do planejamento de misturas.....	24
TABELA 5.3.5. - Resultados de coeficientes de regressão para o planejamento de mistura para a extração de lactonas sesquiterpênicas de amostra complexa contendo tintura de arnica.....	25
TABELA 5.3.6. - Resultados de coeficientes de regressão significativos para o planejamento de mistura para a extração de lactonas sesquiterpênicas de amostra complexa contendo tintura de arnica.....	25
TABELA 5.3.7 - Tabela de ANOVA para a equação $y = 57,48986 * X1 + 312,8755 * X1X2$	26
TABELA 6.2.1 - Condições cromatográficas do método de referência.	30
TABELA 6.3.1 - Concentração das vitaminas do complexo B no Polivitamínico – Xarope.....	31
TABELA 6.4.1 - Resolução entre as bandas de interesse com diferentes concentrações de KH_2PO_4 na fase móvel.	32
TABELA 6.4.2 - Fórmula estrutural das Vitaminas do Complexo B e ordem de eluição.....	34
TABELA 6.5.1 - Condições Cromatográficas iniciais do estudo de robustez do método.	35
TABELA 6.5.2 - Condições a serem testadas no planejamento fracionado:.....	36
TABELA 6.5.3 - Possibilidades de alteração da proporção de fase móvel durante um gradiente no cromatógrafo Waters.....	36
TABELA 6.5.4 - Planejamento fatorial fracionado 2^{6-2}	37
TABELA 6.5.5 - Resultados do planejamento fatorial fracionado 2^{6-2} para o teste de robustez.....	38
TABELA 6.5.6 - Resultados de separação cromatográfica seguindo método univariado de teste de robustez.	39
TABELA 6.5.7 - Planejamento fatorial fracionado 2^{6-2}	40
TABELA 6.5.8 - Contrastes calculados para as resoluções.....	41
TABELA 7.1.1 - Resumo dos métodos utilizados para a análise do Latanoprost e Maleato de Timolol solução oftálmica.	49

<i>TABELA 7.1.2 - Tempos de análises cromatográficas dos métodos utilizados para a análise do Latanoprost e Maleato de Timolol solução oftálmica.</i>	<i>50</i>
<i>TABELA 7.1.3 - Concentração das substâncias de interesse na solução oftálmica.</i>	<i>50</i>
<i>TABELA 7.1.4 - Fórmula estrutural das substâncias de interesse da solução oftálmica.</i>	<i>51</i>
<i>TABELA 7.1.5. Condições cromatográficas iniciais do método proposto por Mehta et al.</i>	<i>52</i>
<i>TABELA 7.2.1 - Planejamento experimental fracionado proposto para triagem inicial e posterior ajuste.</i>	<i>53</i>
<i>TABELA 7.2.2 - Condições a serem testadas no planejamento fracionado.</i>	<i>53</i>
<i>TABELA 7.2.3 - Resultados de resolução para as bandas em questão.</i>	<i>54</i>
<i>TABELA 7.2.4 - Resultados de tempo de análise e gasto de solvente para os experimentos testados.</i>	<i>55</i>
<i>TABELA 7.2.5 - Efeitos confundidos para cada uma das 7 respostas dependentes.</i>	<i>55</i>

LISTA DE FIGURAS

<i>FIGURA 3.1.1- Exemplo de planejamento para uma mistura binária.....</i>	<i>11</i>
<i>FIGURA 3.1.2 - Exemplo de planejamento fatorial de dois níveis.....</i>	<i>12</i>
<i>FIGURA 4.6.7.1. Valores de resolução e separação entre dois picos adjacentes</i>	<i>18</i>
<i>FIGURA 5.3.1. Gráfico de mistura ternária para a extração de Lactonas Sesquiterpênicas de mostra complexa contendo tintura de arnica.....</i>	<i>26</i>
<i>FIGURA 3.1.1 - Influência da concentração de KH_2PO_4 na fase móvel na separação das vitaminas do complexo B</i>	<i>33</i>
<i>FIGURA 3.1.2 - Gráfico de distribuição normal Y1 com demonstração dos efeitos.....</i>	<i>42</i>
<i>FIGURA 3.1.3 - Gráfico de distribuição normal Y2 com demonstração dos efeitos.....</i>	<i>43</i>
<i>FIGURA 3.1.4 - Gráfico de distribuição normal Y3 com demonstração dos efeitos.....</i>	<i>44</i>
<i>FIGURA 3.1.5 - Gráfico de distribuição normal Y4 com demonstração dos efeitos.....</i>	<i>45</i>
<i>FIGURA 7.2.6 - Gráfico de distribuição normal para a separação entre o ácido maleico e o maleato de timolol com demonstração dos efeitos.....</i>	<i>56</i>
<i>FIGURA 3.1.7 – Gráfico de distribuição normal para a separação entre o maleato de timolol e o latanoprostá ácido com demonstração dos efeitos... </i>	<i>57</i>
<i>FIGURA 3.1.8 - Gráfico de distribuição normal para a separação entre o latanoprostá ácido e o latanoprostá com demonstração dos efeitos.....</i>	<i>58</i>
<i>FIGURA 3.1.9 - Gráfico de distribuição normal para a separação entre o latanoprostá e o cloreto de benzalcônio (CBK-12) com demonstração dos efeitos.....</i>	<i>59</i>
<i>FIGURA 3.1.10 - Gráfico de distribuição normal para a separação entre o cloreto de benzalcônio (CBK-12) e o cloreto de benzalcônio (CBK-14) com demonstração dos efeitos.....</i>	<i>60</i>
<i>FIGURA 7.2.11 - Gráfico de distribuição normal para o tempo de análise com demonstração dos efeitos.....</i>	<i>61</i>
<i>FIGURA 3.1.12 - Gráfico de distribuição normal para a geração de resíduos com demonstração dos efeitos.....</i>	<i>62</i>
<i>FIGURA 3.1.8 – Cromatograma referente ao experimento 7.....</i>	<i>63</i>
<i>FIGURA 3.1.9– Cromatograma referente ao método original [34].....</i>	<i>63</i>

RESUMO

EMPREGO DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL NO DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA. O objetivo deste trabalho foi utilizar técnicas de planejamento experimental durante o desenvolvimento e validação de métodos de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para análise de medicamentos na indústria farmacêutica, a fim de demonstrar sua aplicabilidade e as vantagens de sua utilização. Uma avaliação multivariada da robustez do método de doseamento de vitaminas do complexo B permitiu a visualização de interações entre as variáveis, o que não seria possível através do estudo da forma univariada. Foi realizado também um planejamento de mistura para a determinação de solventes de extração de lactonas sesquiterpênicas de formulação farmacêutica à base de tintura de arnica. A mistura de solventes selecionada através do estudo permitiu extração desejável dos compostos de interesse da amostra, que foi comprovada através da validação da metodologia. Finalmente, foi realizado um planejamento exploratório de uma metodologia analítica de doseamento de latanoprost, maleato de timolol, conservantes e produto de degradação em colírio. O planejamento permitiu a o redução do tempo de corrida e da geração de resíduos em cerca de 44%.

Palavras-chaves: CLAE, Planejamento experimental, Planejamento de mistura, Avaliação multivariada da robustez.

ABSTRACT

USE OF EXPERIMENTAL DESIGN FOR THE DEVELOPMENT OF CHROMATOGRAPHIC METHODS IN THE PHARMACEUTICAL INDUSTRY. The aim of this study was to use experimental design techniques during the development and validation of high performance liquid chromatography (HPLC) methods for analysis of drugs in the pharmaceutical industry in order to demonstrate its applicability and benefits of its use. A multivariate assessment of the robustness of an assay method for vitamins of the B complex enabled the visualization of interactions between variables, which would not be possible through the univariate approach. A mixture design was performed for determining the extraction solvents of sesquiterpene lactones in pharmaceutical formulation containing arnica tincture. The mixture of solvents selected through the study allowed desirable extraction of compounds of interest from the sample, which was confirmed through the validation of the methodology. Finally, we conducted an exploratory planning on an analytical methodology for the determination of latanoprost, timolol maleate, preservatives and degradation product in eye drops. The design allowed the reduction of chromatographic run time and waste generation by about 44%.

Keywords: HPLC, experimental planning, mixture design, multivariate robustness test.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL.....	2
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.	OBJETIVOS	8
3.1.	OBJETIVO GERAL	8
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
4.	METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	10
4.1.	PLANEJAMENTO MISTURA PARA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL OU SOLVENTE DE EXTRAÇÃO.....	10
4.2.	PLANEJAMENTO FATORIAL PARA AS DEMAIS VARIÁVEIS	12
4.3.	PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO	13
4.4.	RESPOSTAS A SEREM AVALIADAS	13
4.5.	OBTENÇÃO DOS MODELOS.....	14
4.6.	ANÁLISE DE RESULTADOS	15
4.6.1.	<i>Seletividade</i>	15
4.6.2.	<i>Linearidade</i>	15
4.6.3.	<i>Precisão</i>	16
4.6.4.	<i>Exatidão</i>	17
4.6.5.	<i>Robustez</i>	17
4.6.6.	<i>Estabilidade da solução</i>	17
5.	OTIMIZAÇÃO DO SOLVENTE DE EXTRAÇÃO NA ANÁLISE DA ARNICA EM FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA (GEL).....	20
5.1.	INTRODUÇÃO	20
5.2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	21
5.3.	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA A DETERMINAÇÃO DO SOLVENTE (OU MISTURA DELES) PARA A EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DA AMOSTRA.....	22
5.4.	CONCLUSÃO PARCIAL	27
6.	AVALIAÇÃO MULTIVARIADA DA ROBUSTEZ NA ANÁLISE SIMULTÂNEA DE VITAMINAS 29	
6.1.	INTRODUÇÃO	29
6.2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
6.3.	DETERMINAÇÃO DO VOLUME DE INJEÇÃO, DILUENTE E CONCENTRAÇÃO DE TRABALHO.....	31
6.4.	REDUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO KH_2PO_4 (DIHIDROGENOFOSFATO DE POTÁSSIO) NA FASE MÓVEL. 31	
6.5.	ESTUDO DA ROBUSTEZ DO MÉTODO ATRAVÉS DE PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO.....	35
6.6.	CONCLUSÃO PARCIAL	45
7.	DELINEAMENTO DE EXPERIMENTO PARA REDUÇÃO DE RESÍDUOS E TEMPO DE ANÁLISE DE MÉTODO PARA COLÍRIO DE LATANOPRÓSTA	48
7.1.	INTRODUÇÃO	48
7.2.	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL EXPLORATÓRIO PARA AJUSTE DO MÉTODO	52
7.3.	CONCLUSÃO PARCIAL	63
8.	CONCLUSÕES GERAIS.....	65
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

1. INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO GERAL

A indústria farmacêutica vem crescendo a taxas superiores às apresentadas pelo setor de produção industrial e pela economia do Brasil. Enquanto a economia brasileira cresceu 2,7% e a produção industrial registrou queda de 1,3% na comparação de abril de 2010 com abril de 2011, a indústria farmacêutica cresceu 17,6% no mesmo período [1-2]. Este cenário de crescimento está intimamente ligado à elevação do poder aquisitivo das classes C e D e ao aumento da preocupação com a saúde [3].

Apesar da importância econômica da indústria farmacêutica ao Brasil, seu papel principal está relacionado à prevenção e tratamento de doenças. Dessa forma, é indiscutível a necessidade de se produzir medicamentos com qualidade. A confirmação da qualidade dos medicamentos é realizada pelo setor de Controle de Qualidade, baseada em métodos desenvolvidos pelo setor de Desenvolvimento Analítico em uma indústria farmacêutica.

Quantificações inadequadas comprometem não só a atividade terapêutica do medicamento, mas também a segurança do uso do produto. Por esse motivo, métodos analíticos de teor e liberação (dissolução) de substância ativa, substâncias relacionadas, produtos de degradação e impurezas precisam ser validados cautelosamente após seu desenvolvimento [4].

A técnica da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) permite a realização de análises qualitativas e quantitativas da maioria dos produtos farmacêuticos e é a mais utilizada para a quantificação de ingredientes ativos e seus subprodutos na indústria farmacêutica. A cromatografia líquida é um processo físico-químico de separação, em que uma amostra é separada em seus componentes (ou analitos) pela distribuição entre a fase móvel (líquida) e a fase estacionária (partículas sorventes que compõem a fase estacionária cromatográfica). A CLAE apresenta vantagens em relação às demais técnicas de separação por ser uma ferramenta versátil, precisa, automatizada, altamente sensível e aplicável a diversas amostras, através da variação dos parâmetros cromatográficos [5].

Para obter a quantificação adequada dos compostos presentes na amostra, é necessário ajustar uma série de variáveis dependendo do tipo de componente ou analito que se pretende determinar. Dentre os parâmetros que podem ser ajustados buscando a separação ideal entre as bandas cromatográficas

de uma amostra (conceito denominado resolução), os principais são: tipo de fase estacionária, comprimento da coluna, diâmetro e tamanho de partícula da fase estacionária, temperatura da fase estacionária, composição e vazão de fase móvel. A variação de qualquer um desses parâmetros influencia diretamente a separação dos compostos a serem analisados.

Como a cromatografia líquida lança mão de muitos fatores para realizar uma separação cromatográfica, a tarefa de encontrar um ponto ótimo de trabalho pode ser um processo complicado e demorado se avaliado um fator de cada vez, ou seja, univariadamente. Além disso, muitas vezes deve-se abrir mão de uma característica em detrimento de outra, por exemplo, para se reduzir o tempo de análise, geralmente o resultado é a perda de resolução cromatográfica. Portanto, para contornar tal situação, tornando sistemático o desenvolvimento de métodos e para se encontrar um ponto ideal de trabalho realizando um número razoável de experimentos, as técnicas de planejamento experimental, as quais englobam efeitos de interação entre as variáveis que afetam a separação cromatográfica, podem ser bastante úteis [6-7].

Desta forma, o presente trabalho vai apresentar a aplicação de algumas técnicas de planejamento a fim de demonstrar a aplicabilidade de tais ferramentas para o setor de Desenvolvimento e Validação Analítica da indústria farmacêutica. Dentre as técnicas de planejamento utilizadas, está a avaliação multivariada de método de doseamento de vitaminas do complexo B; planejamento de mistura para determinação de solventes de extração de lactonas sesquiterpênicas de formulação farmacêutica à base de tintura de arnica e diminuição de tempo de análise e geração de resíduos de método de doseamento de latanoprostá em colírio.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os planejamentos experimentais têm por base estudar a influência de cada variável na resposta estudada, englobando no domínio experimental os efeitos de interação entre as variáveis do sistema. Por exemplo, o aumento da temperatura em uma separação cromatográfica pode favorecer uma separação utilizando determinado solvente, porém pode prejudicar a separação se o solvente for alterado. Tal exemplo ilustra que o efeito da temperatura pode ser positivo ou negativo na separação. Isso ocorre devido à interação entre a variável temperatura e a variável solvente. Assim, essas variáveis independentes serão modificadas de acordo com planejamentos previamente selecionados, baseando-se no seu objetivo: estudo das variáveis significativas, dos efeitos das variáveis ou modelagem [8].

O planejamento experimental pode ser didaticamente subdividido em oito etapas: seleção dos fatores que influenciam a resposta e seus níveis; seleção do tipo de delineamento experimental; seleção do tipo de respostas que se busca obter; planejamento e execução do experimento e medida das respostas; cálculo dos efeitos (ou coeficientes de regressão) dos fatores sobre as respostas; interpretação gráfica e estatística dos efeitos (ou coeficientes de regressão) estimados e finalmente, obtenção das conclusões, como estabelecimento de limites de *System Suitability* ou estabelecimento de limites de trabalho e validação da metodologia analítica [4].

Os delineamentos experimentais podem ser usados em diversas etapas do desenvolvimento, otimização e validação dos mais variados métodos analíticos. J.S. Space et al., por exemplo, usaram delineamento de experimentos para avaliar a precisão e a robustez de método cromatográfico e de dissolução de comprimidos de tartarato de lasofoxifeno [9]. Por outro lado, Y-B Ji et al. utilizaram planejamento fatorial fracionado e uniforme para o desenvolvimento, otimização e validação de método para *fingerprint* (ou perfil cromatográfico) de extrato de *ginkgo biloba* por CLAE [10]. F. Krier et al., otimizaram o método de quantificação de sunlidaco e suas substâncias relacionadas por CLAE, reduzindo o tempo de análise em cerca de três vezes, e o consumo de solventes pela metade [11].

G. Srinubabu et al. utilizaram Planejamento composto centrado para o estudo da robustez do método. Os autores também usaram planejamento fatorial completo para a determinação da precisão intermediária de metodologia de doseamento de voriconazol, em formulação farmacêutica por CLAE [12]. Bonfilio et

al. utilizaram planejamento fracionado e planejamento experimental Doehlert para otimizar método de doseamento de losartana potássica em cápsulas [13]. R. Ficarra et al. usaram modelo de superfície de resposta, utilizando planejamento composto central, visando otimização do método e planejamento fatorial completo para a análise da precisão intermediária [14]. K. Le Mapihan et al. por sua vez, usaram um delineamento D-ótimo, com quatro fatores, para o estudo de robustez de coluna [15].

Dentre os solventes orgânicos utilizados para viabilizar a separação cromatográfica por CLAE, a acetonitrila é o mais utilizado, devido a suas características bastante desejáveis, como a baixa viscosidade, baixa absorção de luz ultravioleta e alta miscibilidade com solventes apolares e água [16]. A indústria farmacêutica consome cerca de 70% da acetonitrila produzida no mundo [17]. Entretanto, desde o final de 2008, os usuários de acetonitrila vêm enfrentando uma escassez do produto no mercado e a elevação dos preços, que em curto espaço de tempo subiram mais de 900% [15,17]. Muitas vezes não é possível a substituição da acetonitrila por outro solvente, como o metanol, por exemplo. Portanto, técnicas que permitam a redução do tempo de análise e, conseqüentemente, o consumo desse solvente, são muito convenientes.

Além do aspecto financeiro, que obviamente é importante para a indústria, a economia de solventes é bastante vantajosa porque tanto a aquisição como o descarte desses solventes, representa um custo bastante elevado ao orçamento das empresas. Além disso, o respeito sócio-ambiental vem sendo cada vez mais cobrado pelo governo e sociedade. Normas de gerenciamento ambiental, como a ISO 14001 (2004) e RE CONAMA 358 (2005) são reflexos dessa tendência e destacam a importância da adequação dos processos visando redução de resíduos e desperdícios gerados [18, 19].

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Desenvolver e difundir a adoção de procedimentos baseados em planejamento experimental para desenvolvimento de métodos cromatográficos em setores de pesquisa e desenvolvimento de farmacêuticas visando redução de custos, geração de resíduos e melhor eficiência de separação através de modelos obtidos por regressão linear múltipla ou cálculo dos efeitos com os dados do planejamento experimental.

3.2. Objetivos específicos

- Aplicar as técnicas de planejamento experimental para o estudo multivariado da robustez de método analítico de doseamento de vitaminas do complexo B.
- Aplicar as técnicas de planejamento experimental para seleção de solventes e suas respectivas proporções para a extração de lactonas sesquiterpênicas em formulação à base de tintura de arnica.
- Aplicar as técnicas de planejamento experimental para diminuição do tempo de análise e geração de resíduos de método de doseamento de latanoprostá em colírio.

4.METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Na cromatografia, as variáveis independentes são aquelas variáveis iniciais, definidas pelo operador, para executar a análise, por exemplo: composição da fase móvel, vazão, temperatura da fase estacionária e tipo de fase estacionária. As variáveis dependentes são as respostas que dependem das variáveis independentes, por exemplo: tempo de eluição, geração de resíduos, custo de análise, resolução entre bandas cromatográficas, etc. A metodologia experimental foi baseada no estudo dos parâmetros de análise cromatográfica através de modelos de planejamento experimental.

4.1. Planejamento mistura para composição da fase móvel ou solvente de extração

Diferentemente das outras variáveis, a composição da fase móvel é uma mistura, ou seja, não é possível aumentar a porcentagem de um solvente, sem reduzir a porcentagem de ao menos algum outro solvente. Tal característica impede a utilização de modelos fatoriais convencionais, sendo que o mais adequado é o emprego de planejamento de misturas.

Supondo a aplicação de um planejamento fatorial 2^2 onde as variáveis são as porcentagens de acetonitrila e de metanol na fase móvel, o nível inferior é 40% e o superior é 60%, chegamos ao planejamento demonstrado na Tabela 4.1.1.

TABELA 4.1.1 - Exemplo de aplicação de um planejamento fatorial de misturas.

Experimento	% Acetonitrila	% Metanol	Total
1	40%	40%	80%
2	60%	40%	100%
3	40%	60%	100%
4	60%	60%	120%

É fácil visualizar na TABELA 4.1.1 que os experimentos 1 e 4 são impossíveis de serem executados, já que a porcentagem dos solventes presentes na fase móvel resulta em um valor diferente de 100%.

A restrição básica de um planejamento de misturas é justamente essa, a soma de todas variáveis deve ser 100%, ou 1, em termos de fração. Sendo i variáveis presentes numa mistura, a restrição será:

$$\sum_{n=1}^i x_n = 100\% = 1$$

Um exemplo de planejamento para uma mistura binária de acetonitrila e metanol numa fase móvel é apresentado na TABELA 4.1.2 e na FIGURA 4.1.1.

TABELA 4.1.2 - Exemplo de planejamento para uma mistura binária.

Experimento	% Acetonitrila	% Metanol
1	100%	0%
2	90%	10%
3	80%	20%
4	70%	30%
5	60%	40%
6	50%	50%
7	40%	60%
8	30%	70%
9	20%	80%
10	10%	90%
11	0%	100%

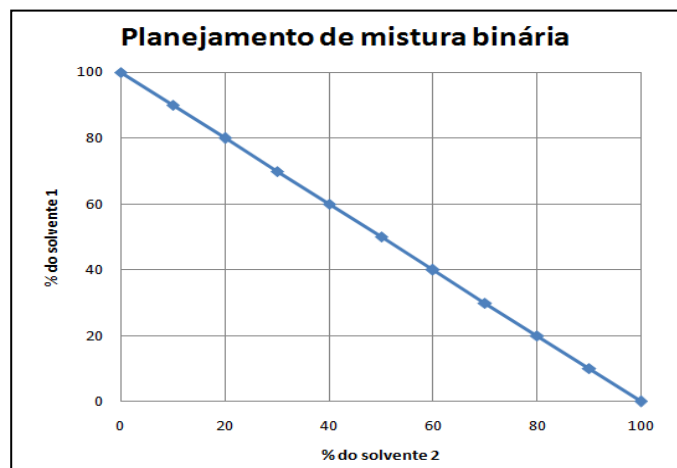


FIGURA 4.1.1- Exemplo de planejamento para uma mistura binária.

Pode-se verificar que todos os experimentos do exemplo resultam em 100% quando a composição é somada, seguindo a restrição de um planejamento de mistura.

Para as outras variáveis como vazão, temperatura e tipo de fase estacionária não existe tal restrição, pois elas são completamente independentes

entre si, devendo ser utilizado um planejamento fatorial convencional ou outro planejamento que não possua a restrição de misturas.

4.2. Planejamento fatorial para as demais variáveis

Para as demais variáveis, foi utilizado planejamento fatorial de dois níveis. Para variação da temperatura e da vazão de solventes, por exemplo, foi gerado um planejamento 2^2 , com quatro (4) experimentos, como exemplificado na TABELA 4.2.1 e FIGURA 4.2.1 .

TABELA 4.2.1- Exemplo de planejamento fatorial de dois níveis.

<i>Experimento</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Vazão (mL/min.)</i>
1	25	0,8
2	40	0,8
3	25	1,6
4	40	1,6

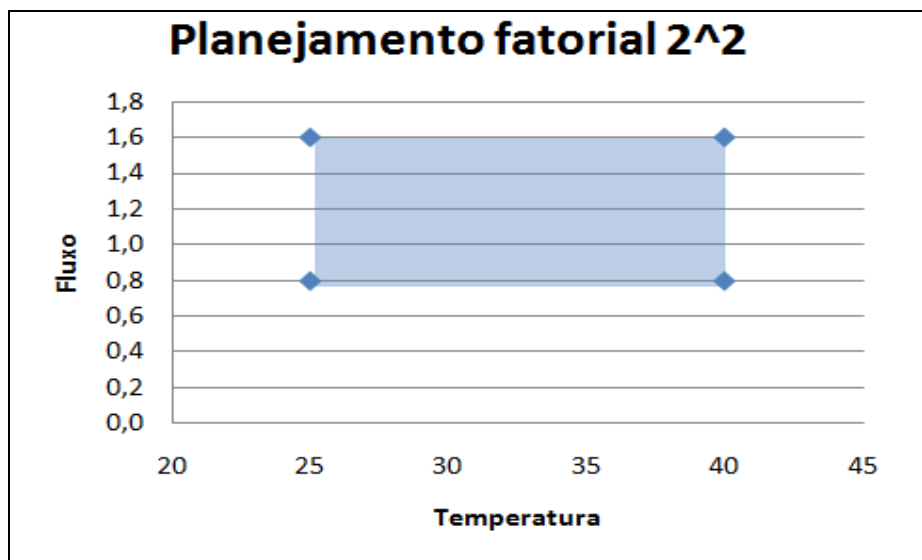


FIGURA 4.2.1 - Exemplo de planejamento fatorial de dois níveis.

Pode-se observar na FIGURA 4.2.1 do planejamento fatorial para duas variáveis que o domínio experimental é um plano, diferentemente do planejamento de misturas para duas variáveis onde o domínio experimental é uma reta. Essa redução na dimensão do domínio experimental é devido à restrição do planejamento de misturas.

4.3. Planejamento Fatorial Fracionado

O planejamento fatorial fracionário estuda f fatores selecionados em $N \geq f + 1$ experimentos. Em ocasiões em que a realização de 2^k experimentos é inviável, por exemplo, devido a custo elevado ou tempo para a realização do ensaio demasiado, o planejamento fatorial fracionado é uma boa opção pois permite o estudo de um número elevado de variáveis em menos experimentos. Para avaliar seis variáveis por um planejamento fatorial comum, por exemplo, seriam necessários 2^6 , ou seja, 64 experimentos ao passo que para avaliar esse mesmo número de variáveis por um fatorial fracionado seriam necessários 2^{6-2} , ou seja, 16 experimentos.

Essa diminuição do número de experimentos é possível por dois motivos; o primeiro é que o número de interações de ordem alta aumenta com o número de fatores e na maioria dos casos, essas interações não possuem importância prática. E o segundo é que com o aumento do número de fatores, é possível que um ou mais deles não afetem significativamente a resposta, seja por meio de efeitos principais ou por meio de efeitos de interação [8].

4.4. Respostas a serem avaliadas

Cada experimento realizado gerou um conjunto de respostas como custo e tempo de uma análise, resíduos gerados e resolução entre bandas cromatográficas. Foi criado um modelo para cada resposta em cada combinação das variáveis instrumentais, ou seja, um modelo para cada resposta em cada planejamento de mistura de composição da fase móvel.

Segue na TABELA 4.4.1 um exemplo para uma mistura binária de acetonitrila e metanol para uma condição experimental do planejamento fatorial (vazão e temperatura nos níveis inferiores).

TABELA 4.4.1- Exemplo de modelo para cada resposta em cada planejamento de mistura de composição da fase móvel, considerando vazão de 0,8 mL/minuto e temperatura 25°C.

% Acetonitrila (x_1)	% Metanol (x_2)	Custo (y_1)	Resolução (y_2)	Tempo (y_3)
100% (x_{11})	0% (x_{12})	y_{11}	y_{21}	y_{31}
70% (x_{21})	30% (x_{22})	y_{12}	y_{22}	y_{32}
50% (x_{31})	50% (x_{32})	y_{13}	y_{23}	y_{33}
30% (x_{41})	70% (x_{42})	y_{14}	y_{24}	y_{34}
0% (x_{51})	100% (x_{52})	y_{15}	y_{25}	y_{35}

Cada resposta originou um modelo matemático para descrever a variação empírica das respostas em função da composição da fase móvel, como o modelo de regressão linear para duas variáveis apresentado a seguir:

$$y_1 = b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2,$$

ou seja, o custo (y_1) é função da composição da fase móvel, onde b_n são os coeficientes de regressão do modelo. O mesmo procedimento é válido para y_2 e y_3 (resolução e tempo de análise) e qualquer outra resposta, sendo que diferentes respostas irão gerar diferentes coeficientes de regressão.

4.5. Obtenção dos modelos

Os modelos foram obtidos através de regressão linear múltipla utilizando os softwares Octave (GNU General Public License), Matlab (Mathworks, Inc. MA) ou Origin (Microcal Inc.) A regressão linear múltipla foi realizada vetorialmente da seguinte maneira:

$$\begin{array}{|c|} \hline y_{11} \\ \hline y_{12} \\ \hline y_{13} \\ \hline y_{14} \\ \hline y_{15} \\ \hline \end{array} = \begin{array}{|c|c|c|c|} \hline 1 & x_{11} & x_{12} & x_{11} * x_{12} \\ \hline 1 & x_{21} & x_{22} & x_{21} * x_{22} \\ \hline 1 & x_{31} & x_{32} & x_{31} * x_{32} \\ \hline 1 & x_{41} & x_{42} & x_{41} * x_{42} \\ \hline 1 & x_{51} & x_{52} & x_{51} * x_{52} \\ \hline \end{array} * \begin{array}{|c|} \hline b_1 \\ \hline b_2 \\ \hline b_{12} \\ \hline \end{array}$$

Escrevendo em forma vetor/matricial a regressão para os 5 experimentos da Tabela 4.4.1:

$$y = X*b$$

assim, os coeficientes de regressão são encontrados fazendo a pseudo-inversa de X , já que não é possível obter a inversa de uma matriz que não é quadrada:

$$(X^t X)^{-1} * X^t * y = (X^t X)^{-1} * X^t X * b = b$$

4.6. Análise de resultados

Os resultados foram avaliados durante a validação do método, quando aplicável. As validações foram realizadas de acordo com a Resolução da Anvisa - RE nº 899, de 29 de maio de 2003 [22] e foram testados: seletividade, linearidade, exatidão, intervalo, precisão, robustez, e estabilidade das soluções.

4.6.1. Seletividade

De acordo com a RE 899/03, a seletividade de um método é sua capacidade de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (placebo). [22]

O teste de seletividade foi avaliado através do preparo de soluções individuais contendo: fase móvel, diluente, placebo, padrão do ativo, padrão das impurezas e a amostra, as quais foram injetadas uma vez.

Foram adotados os seguintes critérios de aceitação: não haver interferências de outros componentes nos tempos de retenção dos princípios ativos e produtos de degradação e/ou impurezas que serão quantificadas. Foram utilizados testes de pureza de pico (com auxílio de detector de arranjo de fotodiodos) para demonstrar que cada banda cromatográfica é atribuída a um só componente.

4.6.2. Linearidade

Segundo a RE 899/03, a linearidade de um método é sua capacidade de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. [22] A faixa de concentração utilizada para o estudo de linearidade foi selecionada conforme requisitos da Resolução vigente da ANVISA (RE 899/03) para determinação quantitativa do analito (80 a 120%). O teste foi realizado pela preparação de diferentes concentrações do padrão partindo-se de 3 soluções estoque concentradas, cada uma gerando uma curva com no mínimo 5 concentrações.

Os resultados dos testes foram tratados por métodos estatísticos apropriados Excel (Microsoft®) para determinação do coeficiente de correlação, intersecção com o eixo Y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados

mínimos da regressão linear, resíduos, desvio padrão relativo e cálculo da curva após tratamento matemático.

Embora o único critério de aceitação na RE 899/03 para a linearidade seja o coeficiente de correlação obtido foi maior que 0,99, foi realizada também a análise crítica dos dados baseado nos resultados estatísticos.

4.6.3. Precisão

4.6.3.1. Repetibilidade (precisão intra-corrída)

Conforme a RE 899/03, a repetibilidade de um método (precisão intra-corrída) é a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. [22]

A precisão do método (repetibilidade) para o ensaio de teor foi avaliada através de análises de seis soluções amostras preparadas individualmente na concentração de trabalho e injetadas uma vez cada, conforme especificado na preparação de amostra do método.

4.6.3.2. Precisão Intermediária (precisão inter-corrída)

De acordo com a RE 899/03, a precisão intermediária (precisão inter-corrída) é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. [22]

A precisão intermediária dos métodos foi avaliada através de análises de seis soluções amostras preparadas individualmente por um segundo analista na concentração de trabalho e injetadas uma vez cada, conforme especificado na preparação de amostra do método.

Os resultados devem estar de acordo com a Tabela 4.6.3.2.1.

TABELA 4.6.3.2.1 - Critérios de aceitação para repetibilidade/precisão intermediária.

<i>Parâmetro</i>	<i>Critérios de aceitação</i>		
	TEOR	IMPUREZAS	FITOTERÁPICOS
<i>Precisão do método CV % (n=6)</i>	≤ 2,0%	≤ 5,0%	≤ 15,0%
<i>Precisão Intermediária CV % (n=12)</i>	≤ 2,0%	≤ 5,0%	≤ 15,0%
<i>ANOVA - Teste F</i>	≤ F Tabelado		

4.6.4. Exatidão

De acordo com a RE 899/03, a exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro.

Será realizada a preparação de placebo do produto fortificado com os ativos para diferentes concentrações. Foram testadas no mínimo, 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada. Para um teste de teor, por exemplo, foram testadas três determinações para 80%, três para 100% e três para 120% da concentração de trabalho.

4.6.5. Robustez

Segundo a RE 899/03, a robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. A resolução lista os fatores que devem ser considerados na determinação da robustez: variação do pH da fase móvel; variação na composição da fase móvel; diferentes lotes ou fabricantes de colunas; temperatura e fluxo da fase móvel. [22]

Constatando-se a susceptibilidade do método a variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento.

4.6.6. Estabilidade da solução

Será preparada uma solução padrão e uma solução de amostra com 100% da concentração de trabalho. Essas soluções serão mantidas à temperatura ambiente, e será avaliada a estabilidade ao longo de pelo menos 24 e 48 horas. Para que a solução seja considerada estável, a variação das médias das amostras

deve ser $\leq 2,0\%$ em relação às médias das amostras quando recentemente preparadas.

4.6.7. Resolução entre as bandas cromatográficas

A resolução cromatográfica corresponde à separação entre duas bandas adjacentes. Embora não seja um teste de validação, a resolução entre as bandas cromatográficas é um critério que foi amplamente avaliado durante o desenvolvimento deste trabalho. De acordo com a farmacopéia Americana (USP, 35), a separação de dois componentes de uma mistura é determinada através da

equação:
$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_2 + W_1}$$

Onde R é a resolução, t_1 e t_2 são os tempos de retenção dos dois componentes, W_1 e W_2 são as larguras dos picos dos dois componentes. Observe exemplos de resolução obtidos através do simulador Chromedia, na Figura 4.6.7.1.

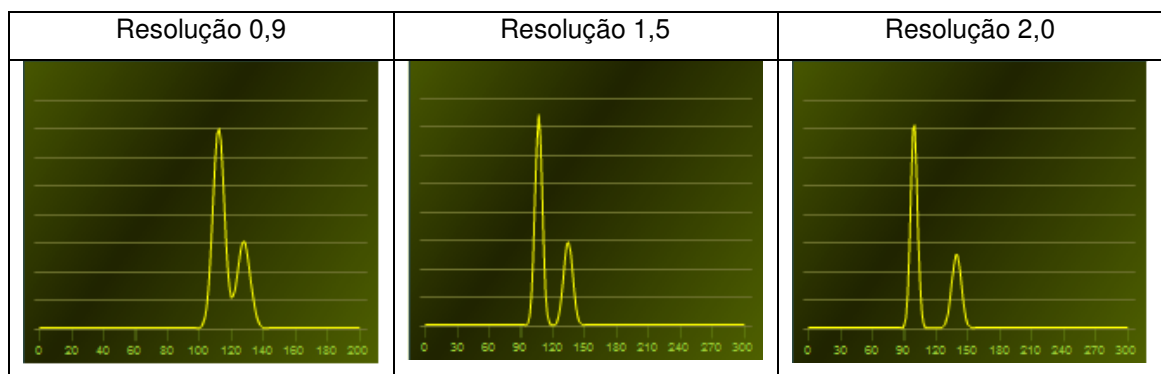


FIGURA 4.6.7.1. Valores de resolução e separação entre dois picos adjacentes.

Observe que para as resoluções abaixo de 1,5 (representado na figura por uma resolução de 0,9) não ocorre separação total das bandas, ocorrendo coeluição. A resolução de 1,5, conhecida por *baseline resolution* (separação na linha de base) corresponde ao menor valor em que ocorre separação total das bandas. Já a resolução de 2,0 é a menor resolução desejável durante o desenvolvimento de metodologias analíticas.

*5. OTIMIZAÇÃO DO SOLVENTE
DE EXTRAÇÃO NA ANÁLISE DA
ARNICA EM FORMULAÇÃO
FARMACÊUTICA (GEL)*

5. OTIMIZAÇÃO DO SOLVENTE DE EXTRAÇÃO NA ANÁLISE DA ARNICA EM FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA (GEL)

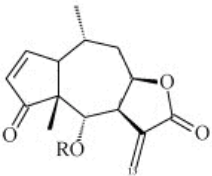
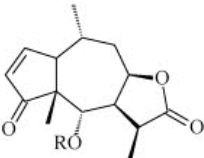
5.1. Introdução

A *Arnica montana* é uma planta medicinal nativa da Europa, tipicamente de regiões montanhosas. É popularmente conhecida por sua potente ação antiinflamatória e é usada principalmente para tratamento de entorses, contusões e hematomas. A arnica é usada tópicamente e geralmente na forma farmacêutica de tintura, sendo raramente usada por via oral, devido ao seu efeito irritante ao estômago. [24]

A atividade anti-inflamatória da arnica está relacionada à presença de lactonas sesquiterpênicas [25]. Estudos apontam ação anti-inflamatória comparável a diversos antiinflamatórios não esteroidais, como por exemplo, ibuprofeno [26] , cetoprofeno [27] e nimesulida [28] para determinados tipos de tratamentos.

Sabe-se que principais lactonas sesquiterpênicas presentes na *A. montana* são ésteres de helenalina e 11 α ,13-dihidro-helenalina. As estruturas gerais dessas lactonas estão representadas na Tabela 5.5.1.

TABELA 5.1.1 - Principais lactonas sesquiterpênicas.

Fórmula estrutural	Lactona Sesquiterpênica	R
	ésteres de helenalina	-CO(CH ₃)C=CHCH ₃ -CO(CH ₃)C=CH ₂ -COCH(CH ₃) ₂ -CO(CH ₃)CHCH ₂ CH ₃
	ésteres da 11 α ,13-dihidro-helenalina	-CO(CH ₃)C=CHCH ₃ -CO(CH ₃)C=CH ₂ -COCH(CH ₃) ₂ -CO(CH ₃)CHCH ₂ CH ₃

Fonte das estruturas: Referência [29].

A atividade farmacológica de medicamentos fitoterápicos está geralmente associada a um grande número de substâncias químicas, o que dificulta o uso de padrões, como os usados para a quantificação dos medicamentos convencionais. Geralmente são usados marcadores, que de acordo com a Anvisa, são componentes presentes na matéria-prima vegetal, preferencialmente o próprio

princípio ativo, utilizados como referência no controle de qualidade da matéria-prima vegetal e dos medicamentos fitoterápicos.

A Farmacopéia Européia (EP) apresenta um método analítico para a determinação de lactonas sesquiterpênicas totais expressas em helenalina para tintura de arnica [30]. Como a formulação em questão é à base de tintura de arnica, seria vantajoso utilizar o método de análise trazido pela EP para o estudo do produto.

Em testes iniciais com a matéria-prima ativa do produto, a tintura de arnica, verificou-se que o método da EP seria aplicável. Entretanto, durante realização de teste inicial com o produto formulado (tintura de arnica + excipientes), verificou-se que a etapa de extração precisaria ser alterada a fim de que pudesse ser analisado nas mesmas condições cromatográficas da tintura. A extração do produto foi impossibilitada de acordo com o método descrito na EP, pois a formulação do final possui cerca de oito excipientes além da tintura de arnica; e esses componentes apresentam características físico-químicas bastante distintas, o que torna a matriz do produto extremamente complexa. Desta forma, não foi possível evaporar a amostra à secura, conforme descrito no método.

Por conseguinte, foi estudada uma maneira de separar as lactonas sesquiterpênicas desta matriz complexa. O método de extração mais reprodutível que se obteve envolve uma etapa de extração líquido/líquido. Entretanto, foi observado que dependendo do solvente utilizado para essa extração, o resultado do doseamento de lactonas sesquiterpênicas era completamente diferente. Desta forma, optou-se por realizar um planejamento experimental para o estudo de mistura de solventes para a extração líquido-líquido da amostra.

5.2. Material e métodos

O método utilizado foi baseado na metodologia para análise da tintura de arnica e foi extraído da Farmacopéia Européia [30]. A Tabela 5.2.1 apresenta um resumo do método original.

TABELA 5.2.1 - Condições cromatográficas do método de referência.

Condições cromatográficas					
Coluna cromatográfica:	Coluna ODS end-capped (120 x 4,0 mm) (5 µm).				
Fase móvel:	A. Água				
	B. Metanol				
Vazão fase móvel:	1,2 mL/minuto				
Gradiente:	Tempo (minutos)	0-3	3-20	20-30	30-55
	% Fase móvel A	62	62 → 55	55	55 → 45
	% Fase móvel B	38	38 → 45	45	45 → 55
Temperatura:	20°C				
Volume de injeção:	20 µL				
Deteção:	UV, 225nm				

Foi utilizado clorofórmio do fabricante Merck (lote: K42113045), acetato de etila do fabricante Merck (lote: K41907523), metanol grau HPLC: Tedia (Lote: 1103083R), óxido de alumínio Merck (lote: TA1746977). A coluna cromatográfica usada foi a Lichrospher RP-18e, 125 x 4,0 mm, 5 µm (S/N: L59139333). Foi usado sistema cromatográfico da Waters, equipado com software versão 2.0, módulo de separação Waters 2695 (Alliance) e detector PDA, Waters 2996. Para a quantificação das lactonas sesquiterpênicas foi utilizado o padrão Santonin fornecido pela EP como padrão interno.

5.3. Planejamento experimental para a determinação do solvente (ou mistura deles) para a extração líquido-líquido da amostra.

O planejamento experimental foi realizado após escolha dos solventes e considerando que os modelos experimentais de mistura permitem a determinação de valores ótimos de proporções de componentes com um número reduzido de experimentos [31] condição esta que seria muito difícil atingir pelo método de tentativa e erro.

Misturas ternárias são misturas de três componentes e suas propriedades dependem das proporções desses componentes. Como a soma das proporções de uma mistura sempre é igual a 100%, uma mistura de três componentes obedecerá à restrição: $X_1 + X_2 + X_3 = 1$. A equação retira um grau de liberdade das proporções, definindo um triângulo de três lados iguais, ou equilátero. Todas as composições possíveis de uma mistura ternária são representadas pelos pontos pertencentes a esse triângulo. Os vértices dos triângulos correspondem aos

componentes puros e os lados às misturas binárias, e os pontos localizados no interior do triângulo representam misturas dos três componentes [8].

Foi elaborado um planejamento experimental considerando o uso do clorofórmio, acetato de etila e do diclorometano para a extração líquido-líquido da amostra, devido ao alto poder de extração que esses solventes apresentam e pelo ponto de ebulição relativamente baixo dos três componentes, conforme apresentado na Tabela 5.3.1.

TABELA 5.3.1 - Informações sobre os solventes eleitos para a extração líquido-líquido das lactonas sesquiterpênicas em amostra complexa contendo tintura de arnica [32].

Solvente	Risco	Solubilidade em água (20 °C)	Densidade em g/cm³ (20°C)	Ponto Ebulição
Acetato de Etila	Inflamável Irritante	85,3 g/l	0,90	77 °C
Clorofórmio	Irritante para a pele, potencialmente carcinogênico	8,0 g/l	1,48	61 °C
Diclorometano	Potencialmente Carcinogênico	20,0 g/l	1,33	40 °C

O planejamento experimental testado está apresentado na Tabela 5.3.2.

TABELA 5.3.2 - Planejamento experimental para escolha do solvente de extração.

Mistura	Clorofórmio	Acetato de Etila	Diclorometano
1	1	0	0
2	0	1	0
3	0	0	1
4	1/2	1/2	0
5	1/2	0	1/2
6	0	1/2	1/2
7	1/3	1/3	1/3
8	2/3	1/6	1/6
9	1/6	2/3	1/6
10	1/6	1/6	2/3

Os resultados obtidos estão apresentados na 5.3.3.

TABELA 5.3.3 - Resultados de porcentagem de lactonas sesquiterpênicas encontradas em relação ao valor esperado.

Experimento	Solventes	Proporção	(%) Lactonas Sesquiterpênicas Recuperada
Experimento 1	Clorofórmio	1	14,00
Experimento 2	Acetato de Etila	1	64,58
Experimento 3	Diclorometano	1	3,08
Experimento 4	Clorofórmio:Acetato de Etila	1/2:1/2	107,85
Experimento 5	Clorofórmio:Diclorometano	1/2:1/2	37,17
Experimento 6	Acetato de Etila:Diclorometano	1/2:1/2	23,78
Experimento 7	Clorofórmio:Acetato de Etila:Diclorometano	1/3:1/3:1/3	56,46
Experimento 8	Clorofórmio:Acetato de Etila:Diclorometano	2/3:1/6:1/6	50,10
Experimento 9	Clorofórmio:Acetato de Etila:Diclorometano	1/6:2/3:1/6	66,82
Experimento 10	Clorofórmio:Acetato de Etila:Diclorometano	1/6:1/6:2/3	2,23

TABELA 5.3.4 - Resultados de distribuição do planejamento de misturas.

Clorofórmio	Acetato de Etila	Diclorometano					
X1	X2	X3	X1X2	X1X3	X2X3	X1X2X3	Y
1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	14,00
0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	64,58
0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,08
0,50	0,50	0,00	0,25	0,00	0,00	0,00	107,85
0,50	0,00	0,50	0,00	0,25	0,00	0,00	37,17
0,00	0,50	0,50	0,00	0,00	0,25	0,00	23,78
0,33	0,33	0,33	0,11	0,11	0,11	0,04	56,46
0,67	0,17	0,17	0,11	0,11	0,03	0,02	50,10
0,17	0,67	0,17	0,11	0,03	0,11	0,02	66,82
0,17	0,17	0,67	0,03	0,11	0,11	0,02	2,23

Os coeficientes de regressão foram calculados através do software Origin (Microcal Inc.). E estão apresentados na Tabela 5.3.5. Os coeficientes significativos estão destacados na cor azul.

TABELA 5.3.5. - Resultados de coeficientes de regressão para o planejamento de mistura para a extração de lactonas sesquiterpênicas de amostra complexa contendo tintura de arnica.

Coeficiente	Valor	Erro padrão	LCL	UCL
X1	14,04	11,34	-22,06	50,14
X2	65,80	11,34	29,70	101,90
X3	-1,30	11,34	-37,40	34,80
X1X2	276,75	57,10	95,04	458,46
X1X3	105,83	57,10	-75,88	287,54
X2X3	-46,53	57,10	-228,24	135,18
X1X2X3	-443,70	376,43	-1641,65	754,25

O limite de controle superior (UCL) e limite inferior (LCL) demonstram quando os coeficientes são significativos. Para avaliar se esses coeficientes são significativos ou não, deve-se verificar se o valor zero está contido entre os limites inferior e superior. Se o zero estiver contido no intervalo, não podemos afirmar com confiança que o coeficiente é diferente de zero, desta forma, ele não é considerado significativo.

Na avaliação dos coeficientes de regressão foi observado que os coeficientes significativos foram X2 (Acetato de etila) e X1X2 (Clorofórmio:Acetato de Etila), dados pelo "Valor". Desta forma, os coeficientes não significativos foram eliminados e a regressão foi calculada novamente, conforme apresentado na Tabela 5.3.6.

TABELA 5.3.6. - Resultados de coeficientes de regressão significativos para o planejamento de mistura para a extração de lactonas sesquiterpênicas de amostra complexa contendo tintura de arnica.

	Valor	Erro padrão	LCL	UCL
X2	57,49	13,17	27,12	87,86
X1X2	312,88	60,41	173,57	452,18

Ou seja, somente o acetato de etila e a interação dele com o clorofórmio é significativa para a extração dos compostos de interesse. Assim, temos a equação: $y = 57,48986 * X1 + 312,8755 * X1X2$. A tabela de ANOVA para essa equação, já com os não-significativos eliminados, está apresentada na Tabela 5.3.7.

TABELA 5.3.7 - Tabela de ANOVA para a equação $y = 57,48986 * X1 + 312,8755 * X1X2$.

	<i>Graus de liberdade</i>	<i>Soma dos quadrados</i>	<i>Média Quadrática</i>	<i>Valor F</i>
Modelo	2	26123,39	13061,70	52,27
Resíduo	8	1999,02	249,88	
Total	10	28122,41		
R^2		0,93		

De acordo com os resultados apresentados, a regressão apresentou significância estatística com R^2 de 0,93 e 92,89% da variância explicada, somente em função da fração do acetato de etila e de sua interação com a fração de clorofórmio. Também o valor de F de 52,27 foi 11,7 vezes maior que o F tabelado, a 95% de confiança, mostrando a significância estatística da regressão ($F_{2,8,95\%} = 4,46$).

A equação, somente com os coeficientes significativos, gerou o gráfico de mistura ternária, conforme ilustrado na Figura 5.3.1.

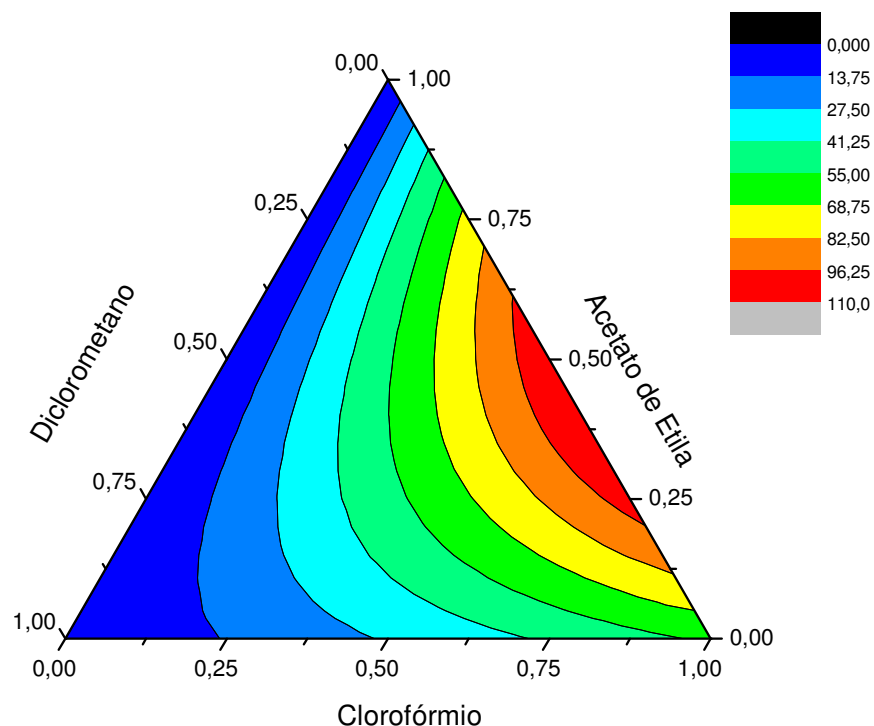


FIGURA 5.3.1. Gráfico de mistura ternária para a extração de Lactonas Sesquiterpênicas de amostra complexa contendo tintura de arnica.

Os resultados obtidos apontaram a mistura clorofórmio:acetato de etila próximo a da proporção (50:50) como ideal para a extração líquido-líquido por ser capaz de extrair eficientemente a lactona sesquiterpênica da amostra (102,87%).

Em análises posteriores para confirmação dos resultados experimentais, foi verificado que a extração conduzia a resultados de doseamento de lactonas sesquiterpênicas reprodutíveis, entretanto, acima do esperado (cerca de 20% acima do valor esperado). Desta forma, o placebo foi analisado individualmente e foi constatado que havia coeluição de algum de seus componentes (ou vários deles) com as lactonas sesquiterpênicas. Em avaliação individual dos componentes da formulação, foi observado que o componente utilizado como fragrância (uma mistura de cinco óleos essenciais) eram os componentes que estavam coeluinto com as lactonas sesquiterpênicas. Após minuciosa pesquisa sobre os constituintes da formulação da essência, foi confirmado que os cinco componentes da mistura possuíam compostos sesquiterpênicos que possivelmente eram a origem da coeluição. Como o produto ainda apresentava-se em desenvolvimento, optou-se por mudar a fragrância da formulação. Após mudança da formulação, a validação analítica do método teve início e foi concluída com sucesso.

5.4. Conclusão Parcial

O planejamento de misturas permitiu a seleção dos solventes de extração e suas proporções de maneira rápida e precisa, conduzindo a resultados bastante reprodutíveis. A metodologia foi validada com sucesso.

*6.AVALIAÇÃO MULTIVARIADA
DA ROBUSTEZ NA ANÁLISE
SIMULTÂNEA DE VITAMINAS*

6. AVALIAÇÃO MULTIVARIADA DA ROBUSTEZ NA ANÁLISE SIMULTÂNEA DE VITAMINAS

6.1. Introdução

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos [22]. A Resolução RE 899/2003 da Anvisa - Validação de métodos analíticos, indica que a avaliação da robustez deve ser realizada durante o desenvolvimento do método. Os fatores escolhidos para serem analisados em um teste de robustez geralmente são aqueles que possuem as maiores chances de afetar o resultado analítico quando houver mudanças de laboratórios, instrumentos ou analistas [4], a Anvisa recomenda que sejam testadas condições de variação do pH da fase móvel, variação na composição da fase móvel, diferentes lotes ou fabricantes de colunas cromatográficas, temperatura da coluna e vazão da fase móvel devem ser consideradas durante o estudo da robustez. Entretanto, a resolução não trás recomendações sobre a forma em que o estudo de robustez deve ser conduzido.

A avaliação da robustez é comumente realizada na indústria farmacêutica através da alteração das variáveis individualmente. Apesar de ser amplamente descrita na literatura e utilizada, a técnica univariada não é recomendada para o estudo da robustez, primeiramente porque requer um número bastante elevado de experimentos e depois porque as interações entre os fatores não pode ser avaliada [4]. O fato de as interações não serem avaliadas é problemática visto que na rotina de um laboratório dificilmente apenas um parâmetro varia isoladamente. Desta forma, o ideal é que os fatores sejam modificados de forma a permitir a observação de combinações de influências sobre o método analítico.

Em testes de robustez, geralmente são usados planejamentos de dois níveis, como fatorial fracionário ou de Plackett-Burman. Esses planejamentos estudam f fatores selecionados em $N \geq f + 1$ experimentos. Fatoriais completos também podem ser utilizados, desde que o número de fatores não seja maior que quatro, uma vez que o número de experimentos ficaria muito elevado, tornando o estudo impraticável. Em estudos de robustez, os fatores costumam ser avaliados em dois níveis extremos (superior e inferior), visto que os intervalos devem representar apenas a variabilidade que pode ocorrer quando houver alteração de laboratórios,

instrumentos ou analistas, ou seja, são relativamente pequenos e usualmente representam o nível de incerteza de cada fator. [4]

Durante o desenvolvimento de método para análise de complexo de vitamina B, foi encontrado em um catálogo das colunas ACE um método bastante promissor para a análise de cinco vitaminas do complexo B simultaneamente para o estudo deste polivitamínico [23]. Após pequenos ajustes no método, um planejamento fatorial fracionado 2^{6-2} foi realizado a fim de verificar a robustez do método analítico.

6.2. Material e métodos

O método utilizado foi baseado na metodologia para análise de vitaminas hidrossolúveis e foi extraído do catálogo do fabricante de colunas cromatográficas ACE. A Tabela 6.2.1. apresenta um resumo do método original.

TABELA 6.2.1 - Condições cromatográficas do método de referência.

Condições cromatográficas					
Coluna cromatográfica:	ACE 5 C8, 250 x 4,6mm (P/N: ACE-122-2546)				
Fase móvel:	A. 50 mMol/L KH_2PO_4 (pH 2,5)				
	B. Metanol				
Vazão fase móvel:	1,0 mL/minuto				
Gradiente:	Tempo (minutos)	0	3	16,5	19,5
	% Fase móvel A	100	100	55	20
	% Fase móvel B	0	0	45	80
Temperatura:	Ambiente				
Detecção:	UV, 205 nm				

Foi utilizado dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4) (Merck), Ácido Fosfórico (Merck) e metanol grau HPLC (Tedia). A coluna cromatográfica usada foi a ACE 5 C8, 250 x 4,6mm (P/N: ACE-122-2546). Foi usado sistema de cromatografia líquida de alta eficiência composto de bomba quaternária e autoamostrador do fabricante Waters (módulo de separação Waters 2695) e detector PDA, Waters 2996. A aquisição de dados foi realizada através do software Empower versão 2.0, Toda fase móvel utilizada foi filtrada através de membrana HV 0,45 μm (Millipore). Para a identificação das bandas cromatográficas nas amostras, foram usados padrões primários USP.

6.3. Determinação do volume de injeção, diluente e concentração de trabalho.

O produto usado como referência para o desenvolvimento do método um complexo polivitamínico, por conter as vitaminas de interesse em uma matriz relativamente simples. As concentrações das vitaminas no xarope testado estão apresentadas na Tabela 6.3.1.

TABELA 6.3.1 - Concentração das vitaminas do complexo B no Polivitamínico – Xarope.

<i>Vitamina</i>	<i>Concentração na formulação</i>
<i>Cloridrato de Tiamina – B1</i>	3 mg/mL
<i>Riboflavina – B2</i>	1 mg/mL
<i>Nicotinamida – B3</i>	2,5 mg/mL
<i>Pantetonato de Cálcio – B5</i>	1,5 mg/mL
<i>Cloridrato de Piridoxina – B6</i>	1,0 mg/mL

Foi determinado que a amostra seria diluída previamente na proporção de 1:20 em água e filtrada em millex LCR com membrana PTFE 0,45 µm da Millipore para injeção em cromatógrafo. O volume de injeção escolhido foi de 5 µL por permitir detecção satisfatória.

6.4. Redução da concentração do KH_2PO_4 (Dihidrogenofosfato de Potássio) na fase móvel.

Durante a realização de alguns testes preliminares com o método, foi observado que a *check-valve* do sistema cromatográfico comumente era obstruída durante as análises. A obstrução da *check-valve* geralmente ocorre devido a cristalizações do sal da fase móvel. Essas cristalizações costumam ocorrer quando a concentração de sal na fase móvel é elevada e principalmente quando há alterações bruscas na proporção do tampão e do solvente orgânico da fase móvel. Embora a concentração de sal na fase móvel não fosse demasiada, foi cogitada a possibilidade de reduzi-la ainda mais. Foram feitos testes preparando a fase aquosa com pH 2,5 com diferentes concentrações de dihidrogenofosfato de potássio: 50 mMol/L, 25 mMol/L, 12,5 mMol/L; também foi realizado um teste sem o sal, apenas

com o ajuste de pH da fase aquosa. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 6.4.1.

TABELA 6.4.1 - Resolução entre as bandas de interesse com diferentes concentrações de KH_2PO_4 na fase móvel.

Concentração do Sal	50 mMol/L	25 mMol/L	12,5 mMol/L	0 mMol/L
Resolução entre os picos Tiamina-Nicotinamida	10,4	8,6	9,7	5,2
Resolução entre os picos Nicotinamida-Piridoxina	5,5	7,4	6,2	1,2
Resolução entre os picos Piridoxina-Pantotenato	25,6	25,1	25,3	38,9
Resolução entre os picos Pantotenato-Riboflavina	22,4	20,9	20,6	23,4

Com base nos resultados obtidos, é possível dizer que o KH_2PO_4 possui influência significativa na separação entre os picos de Nicotinamida e Piridoxina e sua ausência na fase móvel compromete a separação entre esses picos. Foi observado também que a ausência do KH_2PO_4 na fase móvel não compromete a separação dos demais picos (resolução > 5), conforme FIGURA 6.4.1

Desta forma, se futuramente o método for empregado para formulação que não contenha simultaneamente nicotinamida e piridoxina, pode-se considerar a validação do método sem o uso do tampão para a separação dos picos. Para a utilização do método em questão, adotamos a concentração de 12,5 mMol/L para a concentração do tampão.

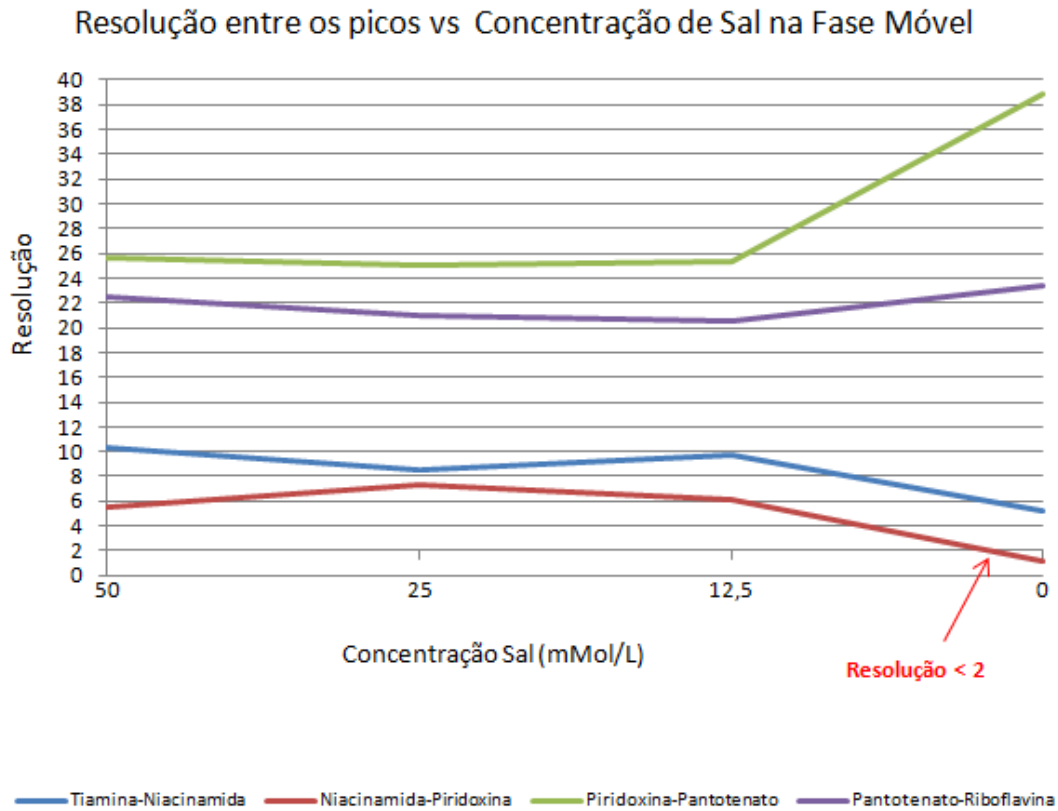
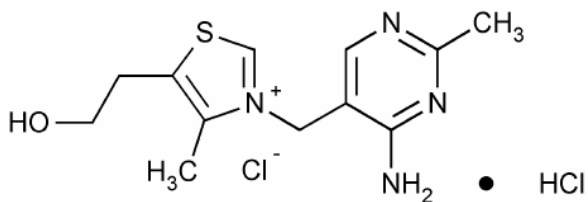
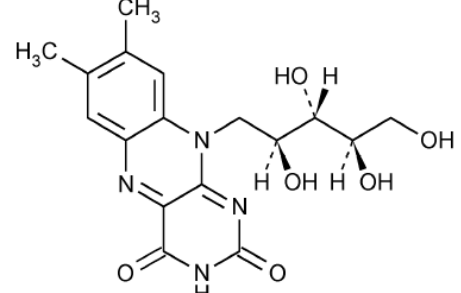
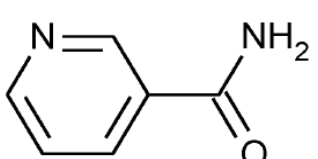
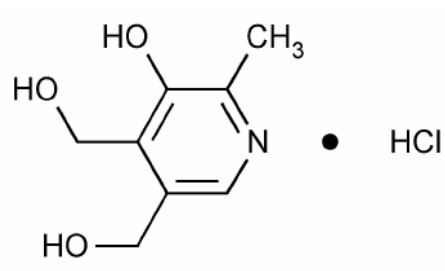
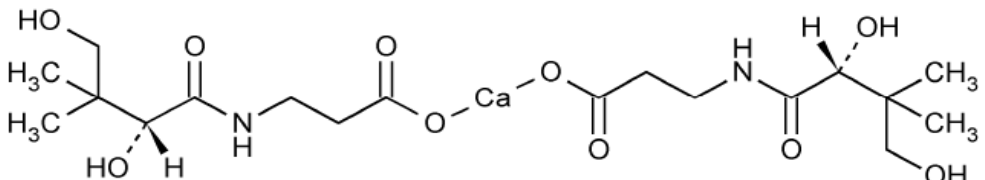


FIGURA 6.4.1 - Influência da concentração de KH_2PO_4 na fase móvel na separação das vitaminas do complexo B.

As fórmulas estruturais das vitaminas estão apresentadas na Tabela 6.4.2. assim como a ordem de eluição destas na metodologia testada.

TABELA 6.4.2 - Fórmula estrutural das Vitaminas do Complexo B e ordem de eluição.

Cloridrato de Tiamina – B1	Riboflavina – B2
<p>(Ordem eluição: 1)</p> 	<p>(Ordem eluição: 5)</p> 
Nicotinamida – B3	Cloridrato de Piridoxina – B6
<p>(Ordem eluição: 2)</p> 	<p>(Ordem eluição: 3)</p> 
Pantetonato de Cálcio – B5	
<p>(Ordem eluição: 4)</p> 	

Observação: A ordem de eluição foi confirmada mediante padrões primários (USP) injetados separadamente na concentração de trabalho.

Fonte estruturas: Certificados dos padrões da *United States Pharmacopeial Convention* (USP).

6.5. Estudo da Robustez do Método através de Planejamento Fatorial Fracionado

A robustez do método foi planejada de acordo com as observações realizadas em testes preliminares e baseada nas condições cromatográficas iniciais do método, conforme condições cromatográficas apresentadas na Tabela 6.5.1.

TABELA 6.5.1 - Condições Cromatográficas iniciais do estudo de robustez do método.

Condições cromatográficas					
Coluna cromatográfica:	ACE 5 C8, 250 x 4,6mm (P/N: ACE-122-2546)				
Fase móvel:	A. 12,5 mMol/L KH ₂ PO ₄ (pH 2,5)				
	B. Metanol				
Vazão da fase móvel:	1,0 mL/minuto				
Gradiente:	Tempo (minutos)	0	3	16,5	19,5
	% Fase móvel A	100	100	55	20
	% Fase móvel B	0	0	45	80
Temperatura:	Ambiente				
Volume de injeção:	5 µL				
Deteção:	UV, 205 nm				

De todos os fatores considerados importantes para a resolução entre as bandas cromatográficas, seis foram escolhidas para o estudo (temperatura da coluna, porcentagem de metanol nos primeiros entre 3 e 16,5 minutos de análise (denominado neste documento de Orgânico 1), pH da fase móvel, velocidade da alteração da proporção de fase móvel, porcentagem de metanol entre 16,5 e 19,5 minutos de análise (denominado neste documento de Orgânico 2), e vazão da fase móvel).

Para avaliar esse número de variáveis por um planejamento fatorial comum, seriam necessários 2^6 , ou seja, 64 experimentos. Todavia, o planejamento fracionário permite o estudo de um número grande de variáveis sem o aumento do número de experimentos. Devido ao alto número de experimentos que seriam necessários para estudar as variáveis em questão, optou-se por realizar um teste de robustez do método através de um planejamento fatorial fracionado 2^{6-2} .

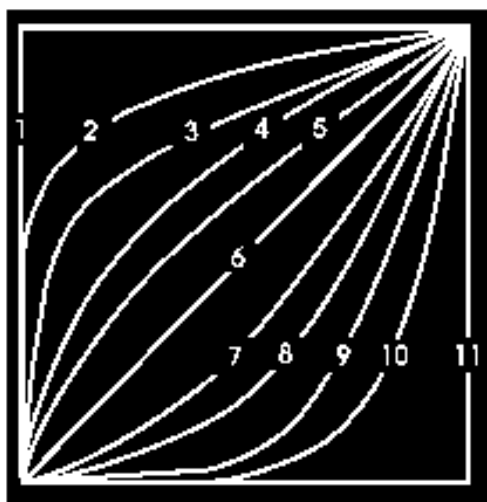
TABELA 6.5.2 - Condições a serem testadas no planejamento fracionado:

Níveis	Temperatura	Curva	% orgânico 1	pH	% orgânico 2	Vazão (mL/min.)
-1	20	5	43	2,3	78	0,8
1	30	7	47	2,7	82	1,2

A variável “curva” apresentada na Tabela 6.5.2 refere-se à alteração não linear das proporções de fase móvel no gradiente. Esta variável foi escolhida baseada em conhecimentos práticos de que dificilmente as misturas realizadas em diferentes marcas de equipamento são absolutamente iguais. Uma vez que o cromatógrafo Waters permite modificações não lineares de gradiente, foram escolhidas as formas convexas e côncavas mais brandas para a avaliação da robustez do método. Portanto, foram testadas no planejamento as curvas 5 e 7, conforme apresentado na Tabela 6.5.3.

TABELA 6.5.3 - Possibilidades de alteração da proporção de fase móvel durante um gradiente no cromatógrafo Waters.

Número da curva:	
1	Atinge as condições ajustadas imediatamente
2 a 5	Convexo (muda as condições mais rapidamente no início)
6	Linear (muda as condições de forma constante)
7 a 10	Côncavo (muda as condições mais rapidamente no final)
11	Mantém a condição inicial até a próxima etapa



Fonte imagem: Software Empower. Waters Corporation.

Desta forma, o planejamento fatorial fracionado testado está apresentado na Tabela 6.5.4. Observe que os sinais negativos correspondem aos níveis inferiores de cada condição e os sinais positivos correspondem aos níveis

superiores de cada condição. Por exemplo, temperatura -1 equivale a 20°C e temperatura +1 equivale a 30°C.

TABELA 6.5.4 - Planejamento fatorial fracionado 2⁶⁻².

Planejamento						
Experimento	Temperatura	Curva	% orgânico 1	pH	% orgânico 2	Vazão
1	-1	-1	-1	-1	1	-1
2	1	-1	-1	-1	-1	1
3	-1	1	-1	-1	-1	1
4	1	1	-1	-1	1	-1
5	-1	-1	1	-1	-1	1
6	1	-1	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1	1	-1
8	1	1	1	-1	-1	1
9	-1	-1	-1	1	-1	-1
10	1	-1	-1	1	1	1
11	-1	1	-1	1	1	1
12	1	1	-1	1	-1	-1
13	-1	-1	1	1	1	1
14	1	-1	1	1	-1	-1
15	-1	1	1	1	-1	-1
16	1	1	1	1	1	1

Após a realização dos experimentos, os resultados foram processados e os dados de tempo de retenção (RT) e resolução registrados, conforme demonstrado na Tabela 6.5.5.

TABELA 6.5.5 - Resultados do planejamento fatorial fracionado 2^{6-2} para o teste de robustez.

EXPERIMENTO	Tiamina		Nicotinamida		Piridoxina		Pantetonato de Cálcio		Riboflavina	
	Tempo de Retenção	Resolução	Tempo de Retenção	Resolução	Tempo de Retenção	Resolução	Tempo de Retenção	Resolução	Tempo de Retenção	Resolução
1	4,79		5,74	4,01	9,28	16,38	12,43	19,49	14,82	13,4
2	3,13		3,77	4,06	5,64	9,9	9,73	23,05	11,92	15,06
3	3,28		3,9	3,76	6,63	12,58	14,49	36,29	17,92	20,91
4	4,84		5,77	4,32	9,64	13,23	17,18	28,52	20,08	16,49
5	3,34		3,95	3,58	6,99	13,66	9,96	14,45	12,13	13,71
6	4,7		5,64	4,44	8,93	12,24	12,15	13,47	14,24	11,85
7	4,95		5,88	4,02	10,39	14,66	17,11	24,6	19,8	14,93
8	3,26		3,87	3,77	6,48	12,29	14,12	36,53	17,34	20,25
9	4,55		6,55	8,98	7,64	3,75	12,2	18,79	14,55	13,49
10	3,12		4,13	7,13	5,42	7,19	9,64	26,72	11,9	17,77
11	3,37		5,02	9,07	6,55	6,64	14,32	36,74	17,73	21,32
12	4,67		6,21	7,6	8,2	7,89	16,52	37,54	19,59	20,7
13	3,36		5,01	8,96	6,54	6,56	9,82	16,65	11,92	13,95
14	4,66		6,2	7,78	8,17	7,87	11,84	17,57	13,82	14,05
15	4,98		7,47	9,97	9,74	7,06	16,87	27,21	19,59	16,02
16	0,51		4,16	6,85	5,51	7,49	13,44	45,27	16,85	24,57

Observe que não há resultado de resolução para a tiamina. Isso acontece porque o valor de resolução refere-se à separação entre uma banda e a banda imediatamente anterior a ela. Como a tiamina é a primeira banda do cromatograma, não há valor de resolução. Para fins comparativos, foi realizado também o teste de robustez convencional (alterando uma variável por vez). Neste caso, foram realizados nove experimentos para testar as seis variáveis estudadas. É importante ressaltar que embora o número de experimentos seja maior nesse caso para o estudo multivariado, se comparado ao univariado, o primeiro permite o estudo das interações entre os fatores. Por isso, o pequeno aumento no número de experimentos (sete análises a mais) é vantajoso. Os resultados obtidos para estudo univariado da robustez estão apresentados na Tabela 6.5.6.

TABELA 6.5.6 - Resultados de separação cromatográfica seguindo método univariado de teste de robustez.

		Cond. Inicial	Vazão +	Vazão -	%Org. 1 +	%Org. 1 -	%Org. 2 +	%Org. 2 -	Temp. +	Temp. -
Tiamina	RT	3,894	3,226	4,776	4,772	4,770	3,851	3,849	3,776	3,811
	Resol.									
Nicotinamida	RT	5,182	4,272	6,344	6,333	6,331	5,103	5,103	5,003	5,057
	Resol.	6,66	6,40	7,29	7,45	7,39	6,94	6,95	6,90	6,84
Piridoxina	RT	7,394	6,023	8,920	8,894	8,891	7,186	7,182	6,662	6,985
	Resol.	9,11	8,34	8,99	9,02	8,92	8,73	8,76	7,41	8,21
Pantetonato de Cálcio	RT	12,402	11,128	13,812	13,671	13,955	12,250	12,240	12,006	12,244
	Resol.	22,31	25,76	19,32	19,14	19,86	23,02	23,18	25,63	24,12
Riboflavina	RT	15,757	14,494	17,043	16,752	17,347	15,567	15,555	15,248	15,654
	Resol.	19,21	20,28	17,39	17,09	18,27	19,34	19,43	19,42	19,58

Foi possível verificar que em todas as condições testadas a resolução entre as bandas foi satisfatória (acima de 2,0). Também foi observado que todas as bandas apresentaram pureza espectral, sugerindo não haver coeluições. Desta forma, todas as condições testadas seriam consideradas satisfatórias uma vez que não haveria comprometimento da separação cromatográfica dos componentes da formulação.

Após a obtenção das resoluções cromatográficas em cada condição experimental, os contrastes foram obtidos por regressão linear múltipla utilizando o software Matlab, conforme apresentado na Tabela 6.5.7 e na Tabela 6.5.8.

TABELA 6.5.8 - Contrastes calculados para as resoluções.

	Y1	Y2	Y3	Y4
bo	6,1438	9,9619	26,4306	16,7794
b1	-0,8	-0,39875	4,30625	1,62625
b2	0,0525	0,53625	15,31375	5,23875
b3	0,055	0,53375	-3,92375	-1,22625
b4 = b5b6	4,2975	-6,31125	3,76125	1,90875
b5= b4b6	-0,0875	1,17375	0,00375	0,01125
b6=b4b5	-0,4925	-0,84625	6,06375	3,32625
b1b2 = b3b6	-0,27	0,38875	1,44875	0,58125
b1b3 = b2b6	-0,1225	-0,11375	3,17625	1,40125
b1b4	-1,105	2,00625	2,62125	1,45125
b1b5	-0,03	-0,62375	-0,18125	0,14375
b1b6 = b2b3	-0,09	-0,24375	2,55375	0,31375
b2b4	0,1075	0,39125	1,44375	0,59875
b2b5	-0,1225	-0,62375	-0,61375	-0,15375
b3b4	0,14	0,34375	0,65125	0,05375
b3b5	-0,12	-1,15625	1,05375	0,30625

Os resultados de distribuição apresentados na coluna Y1 da Tabela 6.5.8 referem-se à separação entre as bandas cloridrato de tiamina e nicotinamida; Y2 corresponde à separação entre nicotinamida e cloridrato de piridoxina; Y3 a cloridrato de piridoxina e pantetonato de cálcio e finalmente, Y4 a pantetonato de cálcio e riboflavina.

Após a obtenção dos resultados de distribuição, os dados avaliados por meio de gráficos de distribuição normal (GDN). Através desses gráficos, pode ser feita a interpretação visual dos efeitos, sendo que os não significativos são encontrados em uma linha reta que passa próximo ao zero, enquanto os efeitos significativos se afastam dessa linha [4].

Os gráficos de distribuição normal obtidos para cada separação serão apresentados da Figura 6.5.1 até a Figura 6.5.4. Observe que o intercepto não está presente nos GDN, para facilitar a comparação entre os valores dos contrastes.

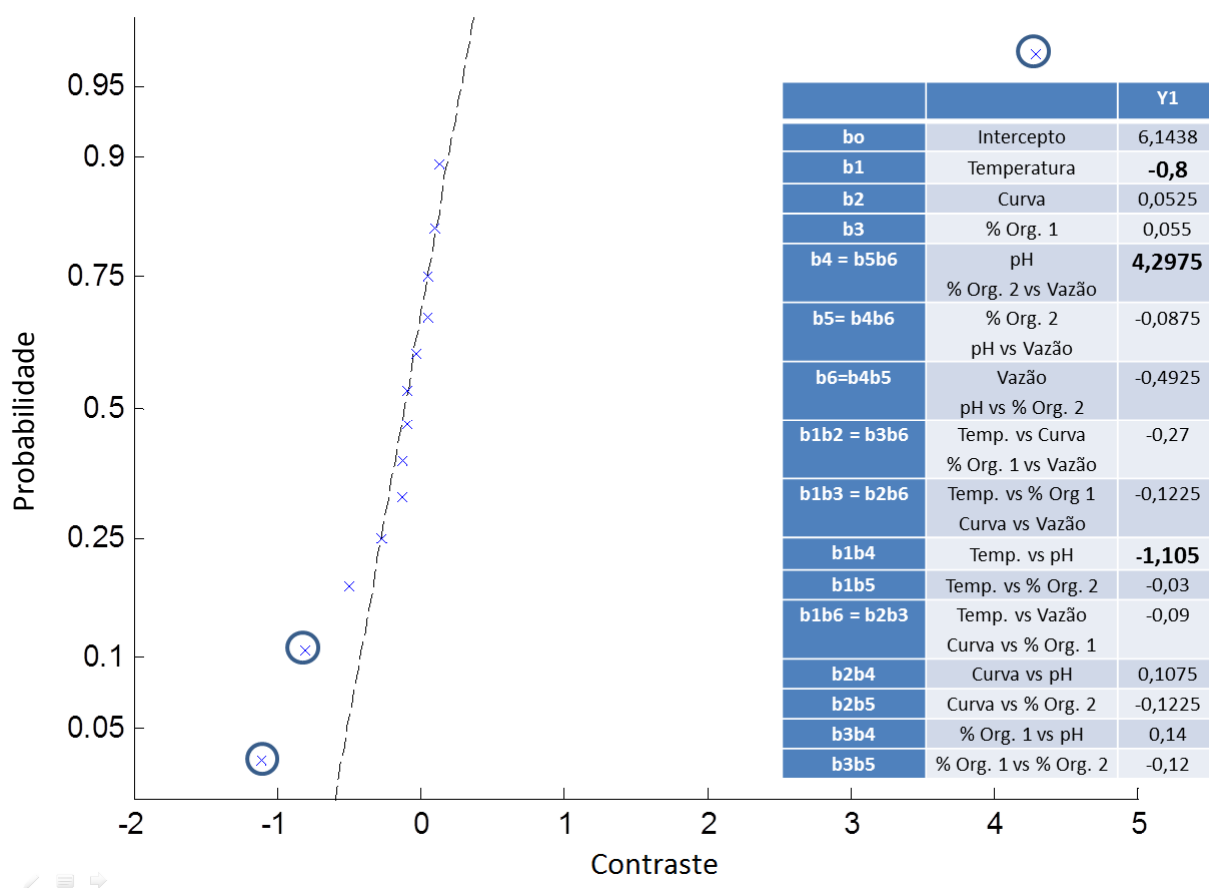


FIGURA 6.5.1 - Gráfico de distribuição normal Y1 com demonstração dos efeitos.

Com base na análise do GDN para Y1 (separação entre cloridrato de tiamina e nicotinamida), foi possível verificar que a temperatura e o pH possuem efeitos significativos sobre a separação cromatográfica. Foi verificado também que a união dessas duas variáveis também possui efeito significativo. Também foi possível verificar que a interação das variáveis de proporção de orgânico com a vazão possui grande efeito sobre a separação, isso é esperado, uma vez que o método é gradiente. Desta forma, o estudo da robustez de maneira multivariada permitiu verificar duas interações importantes para a separação cromatográfica; o que jamais seria possível observar em um teste univariado de robustez.

Os resultados referentes à separação cromatográfica entre as bandas nicotinamida e cloridrato de piridoxina estão apresentados na Figura 6.5.2.

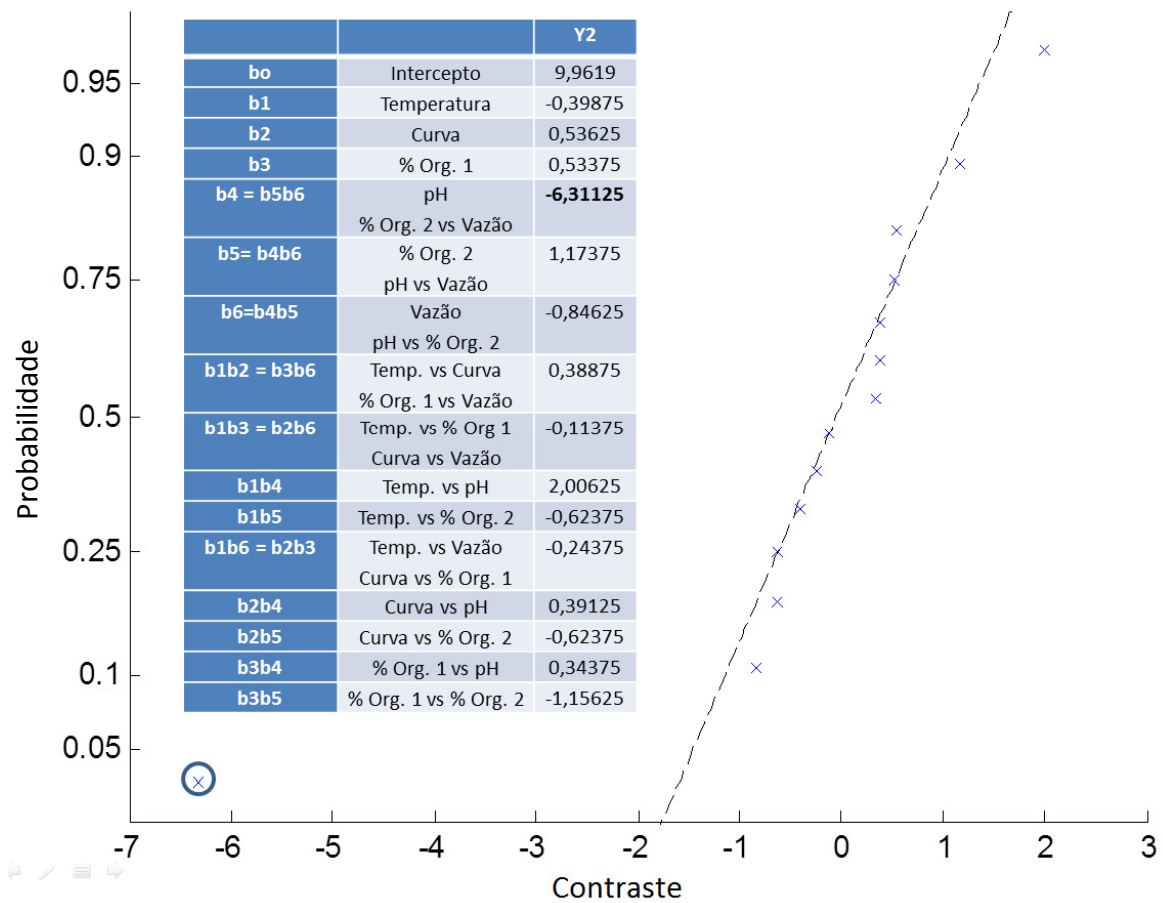


FIGURA 6.5.2 - Gráfico de distribuição normal Y2 com demonstração dos efeitos.

Analisando o GDN para Y2, é possível constatar que a única variável que influencia a separação isoladamente é pH. A união das variáveis porcentagem de orgânico nos últimos minutos de análise e a vazão possuem efeitos significativos sobre a separação. Mais uma vez foi possível verificar a influência da interação de uma variável na separação cromatográfica.

Os resultados referentes à separação cromatográfica entre as bandas cloridrato de piridoxina e pantetonato de cálcio estão apresentados na Figura 6.5.3.

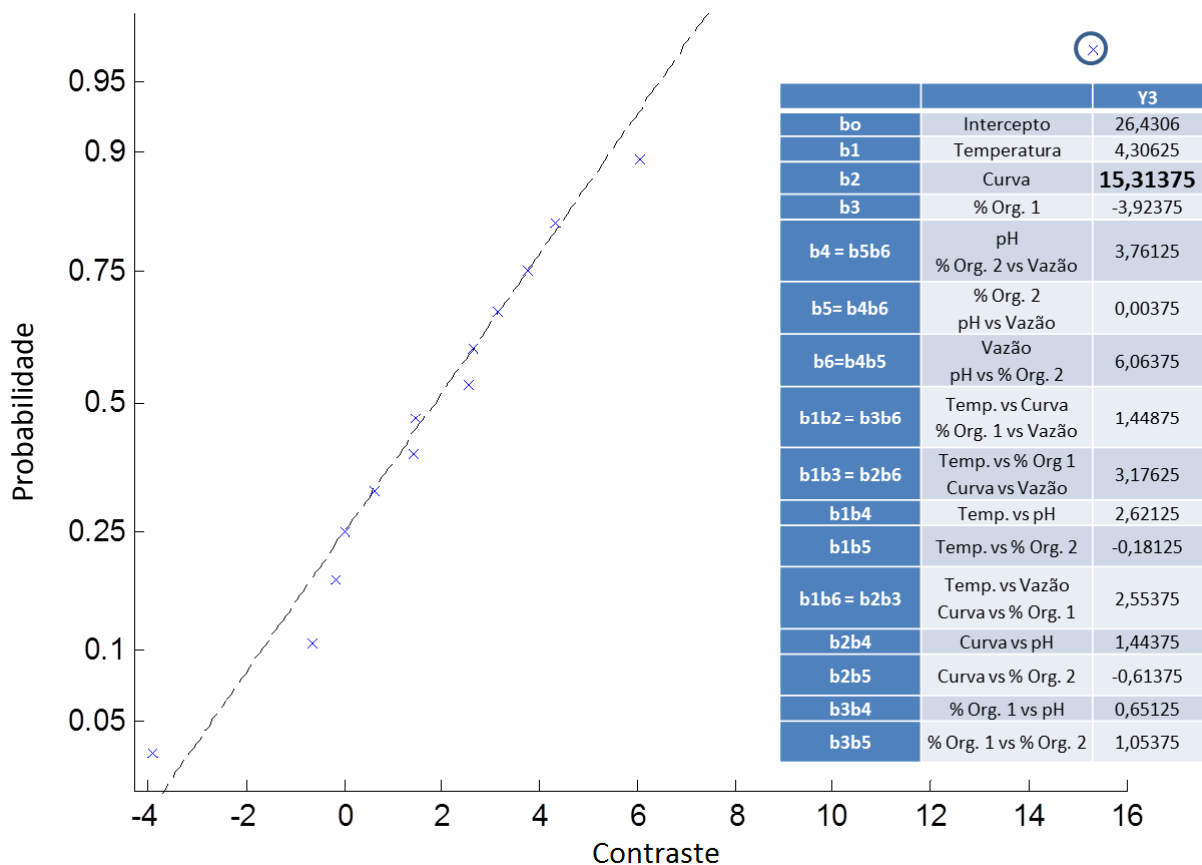


FIGURA 6.5.3 - Gráfico de distribuição normal Y3 com demonstração dos efeitos.

O GDN Y3 demonstra que as variáveis testadas não possuem influência umas sobre as outras em se tratando da separação cromatográfica entre cloridrato de piridoxina e pantetonato de cálcio. A velocidade de alteração da porcentagem de orgânico no gradiente, denominado “curva”, afeta significativamente a separação entre as bandas, mas de maneira isolada.

Os resultados referentes à separação cromatográfica entre as bandas pantetonato de cálcio e riboflavina estão apresentados na Figura 6.5.4.

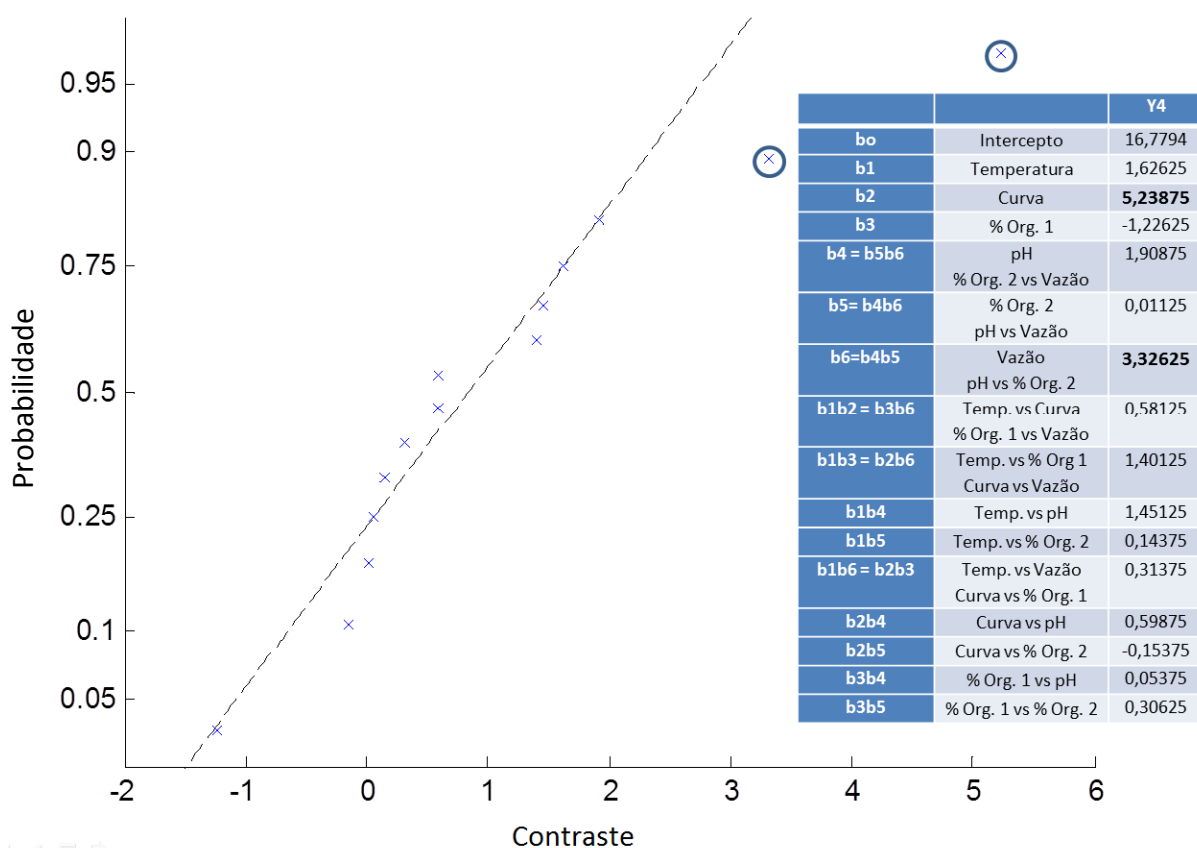


FIGURA 6.5.4 - Gráfico de distribuição normal Y4 com demonstração dos efeitos.

Verificando o Y4, é possível constatar que a velocidade da alteração da proporção de solventes possui efeito sobre a separação das bandas, bem como a vazão da fase móvel e a interação pH vs % de metanol na segunda etapa da análise. Desta forma, a separação cromatográfica entre as bandas pantetonato de cálcio e riboflavina também é influenciada pela interação de fatores.

6.6. Conclusão Parcial

As resoluções entre as bandas cloridrato de tiamina-nicotinamida, nicotinamida-cloridrato de piridoxina e pantetonato de cálcio-riboflavina sofrem efeitos significativos de interações entre as variáveis, que não seriam observados em análises univariadas da robustez do método. Já as resoluções entre cloridrato de piridoxina-pantetonato de cálcio são afetadas significativamente apenas por variáveis individuais. Apesar de todos os efeitos significativos observados, os

resultados das resoluções em todos os experimentos foram desejáveis (maior ou igual a 2,0), por isso, o método foi considerado robusto.

*7. DELINEAMENTO DE
EXPERIMENTO PARA
REDUÇÃO DE RESÍDUOS E
TEMPO DE ANÁLISE DE
MÉTODO PARA COLÍRIO DE
LATANOPROSTA*

7. DELINEAMENTO DE EXPERIMENTO PARA REDUÇÃO DE RESÍDUOS E TEMPO DE ANÁLISE DE MÉTODO PARA COLÍRIO DE LATANOPROSTA

7.1. Introdução

A eficácia da latanoprostina para o tratamento de glaucoma é estabelecida. Entretanto, muitos pacientes necessitam da combinação de mais de um medicamento para o controle da pressão intraocular [33]. Para alguns tipos de pacientes, é necessário que se faça uma associação de medicamentos para garantir eficácia do tratamento. O uso associado da latanoprostina e do maleato de timolol diminui consideravelmente a pressão intraocular, pois atuam por diferentes mecanismos de ação [34]. Contudo, medicamentos com combinações de ativos trazem um desafio para o setor de desenvolvimento de métodos analíticos na indústria farmacêutica, pois muitas vezes estão presentes em concentrações muito diferentes, como é o caso da latanoprostina e maleato de timolol, dificultando a análise concomitante de todas as substâncias de interesse.

Além do desafio de dosear adequadamente os princípios ativos das formulações, é necessário determinar a concentração das substâncias relacionadas (por exemplo, isômeros), de impurezas e produtos de degradação, que podem não só influenciar a atividade terapêutica do produto, mas também a segurança do uso dos produtos farmacêuticos.

No caso de formas farmacêuticas semi-sólidas e líquidas, em especial as acondicionadas em embalagens de doses múltiplas, ou seja, embalagens que possibilitem a retirada de porções sucessivas de seu conteúdo; muitas vezes é necessário adicionar conservantes às formulações para inibir a contaminação microbiana, como é o caso da formulação em questão.

No caso da formulação do colírio de latanoprostina e maleato de timolol, o conservante utilizado é o cloreto de benzalcônio. O produto de degradação é o latanoprostina ácido (advindo da degradação ácida do produto) e as substâncias relacionadas (advindas do processo de síntese do produto) são os isômeros 15 (S) - Latanoprostina e 5,6-trans- Latanoprostina.

O cloreto de benzalcônio (BAK ou CBK) é uma mistura de homólogos do cloreto de alquil dimetil benzil amônio com diversas cadeias alquila, sendo as mais frequentes $n\text{-C}_{12}\text{H}_{25}$, $n\text{-C}_{14}\text{H}_{29}$ e $n\text{-C}_{16}\text{H}_{33}$ [36]. O cloreto de benzalcônio é

considerado um dos mais seguros biocidas sintéticos e é amplamente usado como conservante em cosméticos e medicamentos, como colírios [37]. Entretanto, a presença desse conservante na formulação significa a separação e quantificação de mais três bandas cromatográficas. Além disso, o cloreto de benzalcônio é um composto relativamente difícil de analisar pois, comumente as bandas ficam com elevado grau de assimetria na maioria das colunas de fase reversa, isso ocorre devido a presença de grupamentos residuais de silanol na superfície da sílica e ao grau de hidrofobicidade do surfactante [37].

Devido a todas as dificuldades citadas, a solução oftálmica de latanoprostá e maleato de timolol era analisada por quatro métodos diferentes na empresa Sanofi, segundo a Tabela 7.1.1.

TABELA 7.1.1 - Resumo dos métodos utilizados para a análise do Latanoprostá e Maleato de Timolol solução oftálmica.

Método	Coluna	Fase móvel
Doseamento de Latanoprostá e Cloreto de Benzalcônio	CHIRALCEL® OD-R (250 x 4,6 mm) e 10 µm	Tampão Fosfato, pH 2,5 : Acetonitrila (50:50 v/v)
Doseamento de Maleato de Timolol	Inertisil ODS-3 (250 x 4,0 mm) e 5 µm	Gradiente de tampão fosfato pH 2,5 : acetonitrila (95:5 v/v) e tampão fosfato pH 2,5 : Acetonitrila (70:30 v/v)
Determinação de substâncias relacionadas	Luna Sílica (2) 100 A (250 x 4,6 mm) e 5 µm	n-Hexano:etanol absoluto (94:6 v/v)
Determinação de Latanoprostá ácido	Nucleosil RP-18 (150 x 2,0 mm) e 5 µm	Gradiente de tampão fosfato pH 2,5 e acetonitrila

Como pode ser observado na Tabela 7.1.1, cada método analítico faz uso de uma fase móvel e uma coluna cromatográfica diferente, o que tornava a análise do produto demorada. Além disso, cada análise possuía um tempo de análise relativamente alto, o que torna a análise do produto ainda mais dispendiosa. A Tabela 7.1.2 apresenta os tempos de análise de cada método.

TABELA 7.1.2 - Tempos de análises cromatográficas dos métodos utilizados para a análise do Latanoprostá e Maleato de Timolol solução oftálmica.

Método	Tempo de análise
Doseamento de Latanoprostá e Cloreto de Benzalcônio	35 minutos
Doseamento de Maleato de Timolol	20 minutos
Determinação de Latanoprostá ácido	20 minutos
Determinação de substâncias relacionadas (fase normal)	30 minutos

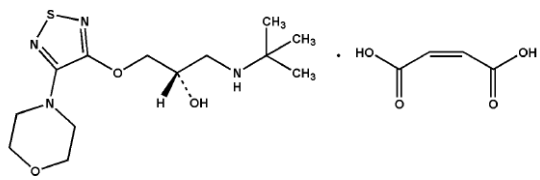
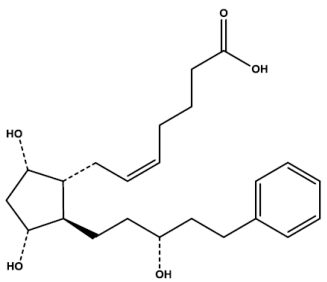
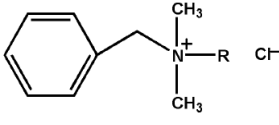
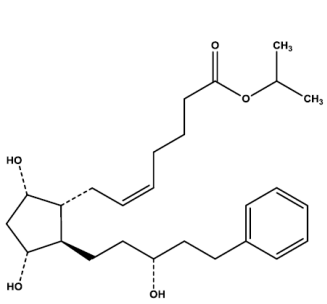
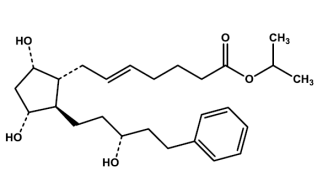
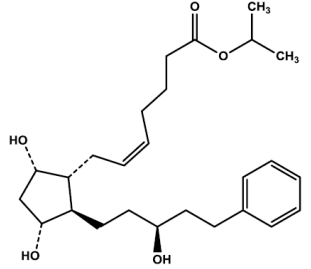
Durante a validação do método de doseamento de latanoprostá e cloreto de benzalcônio, foi observado que todas as substâncias de interesse eluem nas condições do método. Todavia, existem problemas na separação entre as bandas de maleato de timolol e latanoprostá ácido e entre as bandas do cloreto de benzalcônio (homólogo C14), latanoprostá, e 5,6-trans latanoprostá. Vislumbrou-se, portanto, a ajuste do método a fim melhorar a resolução entre os picos e desta maneira, substituir os quatro métodos em uso atualmente por um só método.

Evidentemente, a concentração das substâncias em questão é bastante diferente (vide TABELA 7.1.3) e certamente será necessário preparar amostras em diferentes concentrações. No entanto, entende-se que com o uso de um só método será necessário apenas um cromatógrafo, uma coluna cromatográfica, um preparo de fase móvel e uma curva de calibração. Além disso, eliminar o método por fase normal será bastante interessante, visto que a conversão do sistema cromatográfico de fase reversa para fase normal é demorada, trabalhosa, e utiliza o solvente n-Hexano, que possui efeito neurotóxico, narcótico, irritante de olhos, pele e mucosas, dentre outras severas conseqüências da exposição ocupacional. [38]

TABELA 7.1.3 - Concentração das substâncias de interesse na solução oftálmica.

Substância	Concentração na formulação
Latanoprostá (ativo)	50µg/mL
Maleato de Timolol (ativo)	5000µg /mL
Cloreto de Benzalcônio (conservante)	20µg /mL
Latanoprostá ácido (produto de degradação)	0,05 µg/mL (Limite máximo)
5,6-trans-latanoprostá (isômero)	1,75 µg/mL (Limite máximo)
15 (S)- latanoprostá (isômero)	0,25 µg /mL (Limite máximo)

TABELA 7.1.4 - Fórmula estrutural das substâncias de interesse da solução oftálmica.

Analito	Fórmula estrutural
Maleato de Timolol	
Latanoprostá Ácido (Composto Relacionado E)	
Cloreto de benzalcônio	 <p data-bbox="710 1019 1117 1064">Sendo R* = C₁₂H₂₅; C₁₄H₂₉ e C₁₆H₃₃</p>
Latanoprostá	
5,6-trans-Latanoprostá (Composto Relacionado A)	
15 (S)- Latanoprostá (Composto Relacionado B)	

Fonte estruturas: Certificados dos padrões da *United States Pharmacopeial Convention* (USP).

OBSERVAÇÃO: * Homólogos C12, C14 e C16, respectivamente.

Entretanto, por uma mudança de estratégia, foi decidido que o produto seria analisado da seguinte maneira: seria realizado o teste dos isômeros na matéria-prima, uma vez que é reportado na literatura que esses compostos não são produtos de degradação, mas de síntese. E o restante dos componentes, seria analisado por meio de um método analítico disponível na literatura após seu ajuste.

Mehta et al. [34] propuseram um método de quantificação simultânea de latanoprost, latanoprost ácido, maleato de timolol, cloreto de benzalcônio com 55 minutos de análise, conforme Tabela 7.1.5. Desta forma, foi vislumbrada a possibilidade de ajuste deste método a fim de reduzir o tempo e custo da análise e diminuir a geração de resíduo para o meio ambiente.

TABELA 7.1.5. Condições cromatográficas iniciais do método proposto por Mehta et al.

Condições cromatográficas						
Coluna cromatográfica:	Coluna Hypersil BDS CN (250 x 4,6 mm) (5 µm).					
Fase móvel:	A. Tampão Fosfato 0,05 M, pH 3,2					
	B. Metanol:Acetonitrila (50:50)					
Vazão fase móvel:	1,0 mL/minuto					
Gradiente:	Tempo (minutos)	0,00	25,0	43,0	43,1	55,0
	% Fase móvel A	64	64	15	64	64
	% Fase móvel B	36	36	85	36	36
Temperatura:	25°C					
Volume de injeção:	5 µL					
Detecção:	UV, 210 nm para Latanoprost e Cloreto de Benzalcônio e 295 nm para Timolol					

7.2. Planejamento Experimental Exploratório para Ajuste do Método

Para a triagem inicial do método, foi realizado um planejamento fatorial fracionado, de acordo com a Tabela 7.2.1 e níveis apresentados na Tabela 7.2.2.

TABELA 7.2.1 - Planejamento experimental fracionado proposto para triagem inicial e posterior ajuste. As variáveis X5 e X6 provêm da combinação $X5=X2X3X4$ e $X6=X1X3X4$, resultando numa resolução de 4.

Experimento	X1 % Org.1	X2 % Org.2	X3 Temp.	X4 [Tp.]	X5 pH	X6 Vazão
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
2	-1	-1	-1	1	1	1
3	-1	-1	1	-1	1	1
4	-1	-1	1	1	-1	-1
5	-1	1	-1	-1	1	-1
6	-1	1	-1	1	-1	1
7	-1	1	1	-1	-1	1
8	-1	1	1	1	1	-1
9	1	-1	-1	-1	-1	1
10	1	-1	-1	1	1	-1
11	1	-1	1	-1	1	-1
12	1	-1	1	1	-1	1
13	1	1	-1	-1	1	1
14	1	1	-1	1	-1	-1
15	1	1	1	-1	-1	-1
16	1	1	1	1	1	1

TABELA 7.2.2 - Condições a serem testadas no planejamento fracionado.

Níveis	Temp.	Molaridade Tampão	% orgânico 1	% orgânico 2	pH	Vazão (mL/min.)
-1	20	0,025	26	75	2,2	0,5
1	50	0,075	46	95	4,2	1,5

Os resultados de resolução obtidos para as bandas em questão estão apresentados na Tabela 7.2.3.

TABELA 7.2.3 - Resultados de resolução para as bandas em questão.

<i>Experimento</i>	<i>Ácido Maleico</i>	<i>Maleato de Timolol</i>	<i>Latanoprosta Ácido</i>	<i>Latanoprosta</i>	<i>CBK I</i>	<i>CBK II</i>
1		3,76	6,25	15,8	13,92	2,75
2		4,7	2,66	12,1	24,89	3,58
3		1,29	0	1,31	14,36	6,09
4		2,82	4,33	10,37	14,45	3,25
5		0,72	11,33	8,66	18,98	1,97
6		3,14	7,9	11,7	23,78	3,8
7		3,75	2,64	10,36	10,53	4,83
8		4,61	0	7,28	24,81	2,94
9		3,42	0,71	1,77	9,75	2,6
10		1,52	3,01	0	7,09	1,89
11		2,5	0,4	2,78	8,17	2,02
12		1,81	0	1,61	6,31	1,78
13		2,13	0,29	2,39	7,94	1,56
14		1,88	0,48	2,48	9,95	3,17
15		1,89	0	0	6,3	1,85
16		0,73	2,16	2,95	8,64	1,9

Os resultados de tempo de análise e gasto de solvente estão apresentados na Tabela 7.2.4.

TABELA 7.2.4 - Resultados de tempo de análise e gasto de solvente para os experimentos testados.

<i>Experimento</i>	<i>Tempo de Análise (minutos)</i>	<i>Gasto de Solvente (mL)</i>
1	46,290	18,87
2	34,627	44,40
3	29,411	37,74
4	38,557	15,91
5	45,335	18,50
6	32,924	42,18
7	23,044	31,08
8	38,000	15,91
9	7,433	9,72
10	26,335	8,37
11	22,32	7,29
12	3,753	7,29
13	13,667	15,39
14	17,794	6,21
15	13,464	5,13
16	5,040	8,10

TABELA 7.2.5 - Efeitos confundidos para cada uma das 7 respostas dependentes.

	<i>Y1</i>	<i>Y2</i>	<i>Y3</i>	<i>Y4</i>	<i>Y5</i>	<i>Y6</i>	<i>Y7</i>
<i>Efeitos</i>	Maleato de Timolol	Latanoprostá Ácido	Latanoprostá	CBK I	CBK II	Tempo Análise	Gasto Solvente
<i>b0</i>	2,542	2,635	5,723	13,12	2,874	24,87	18,26
<i>b1</i>	-1,11	-3,51	-7,95	-10,2	-1,56	-22,3	-19,6
<i>b2</i>	-0,37	0,93	0,01	1,499	-0,24	-2,43	-0,89
<i>b3</i>	-0,23	-2,89	-2,28	-2,84	0,418	-6,35	-4,4
<i>b4</i>	0,219	-0,14	0,678	3,746	-0,17	-0,49	0,581
<i>b5</i>	-0,53	-0,31	-2,08	2,486	-0,26	3,935	2,414
<i>b6</i>	0,159	-1,18	-0,4	0,316	0,788	-12,3	12,46
<i>b1b2 = b5b6</i>	-0,08	0,998	1,263	-0,03	-1,06	-0,23	-9,09
<i>b1b3 = b4b6</i>	0,249	-0,8	0,073	2,111	0,57	0,054	-0,01
<i>b1b4 = b3b6</i>	-1,22	1,198	-0,65	-3,79	0,348	-0,5	-2,47
<i>b1b5 = b2b6</i>	-1,2	2,09	-2,26	-0,4	0,09	-0,12	-0,1
<i>b1b6 = b2b5 = b3b4</i>	1,011	-0,91	1,12	0,249	-0,16	-1,19	-1,12
<i>b2b3 = b4b5</i>	-0,27	2,405	2,455	1,514	-0,84	1,189	1,429
<i>b2b4 = b3b5</i>	0,046	0,908	1,423	0,106	0,083	-1,21	-1,21

Note que efeitos diferentes geram resultados de distribuição idênticos. Isso acontece, pois o planejamento fracionado gera os chamados efeitos confundidos para que haja diminuição do número de experimentos.

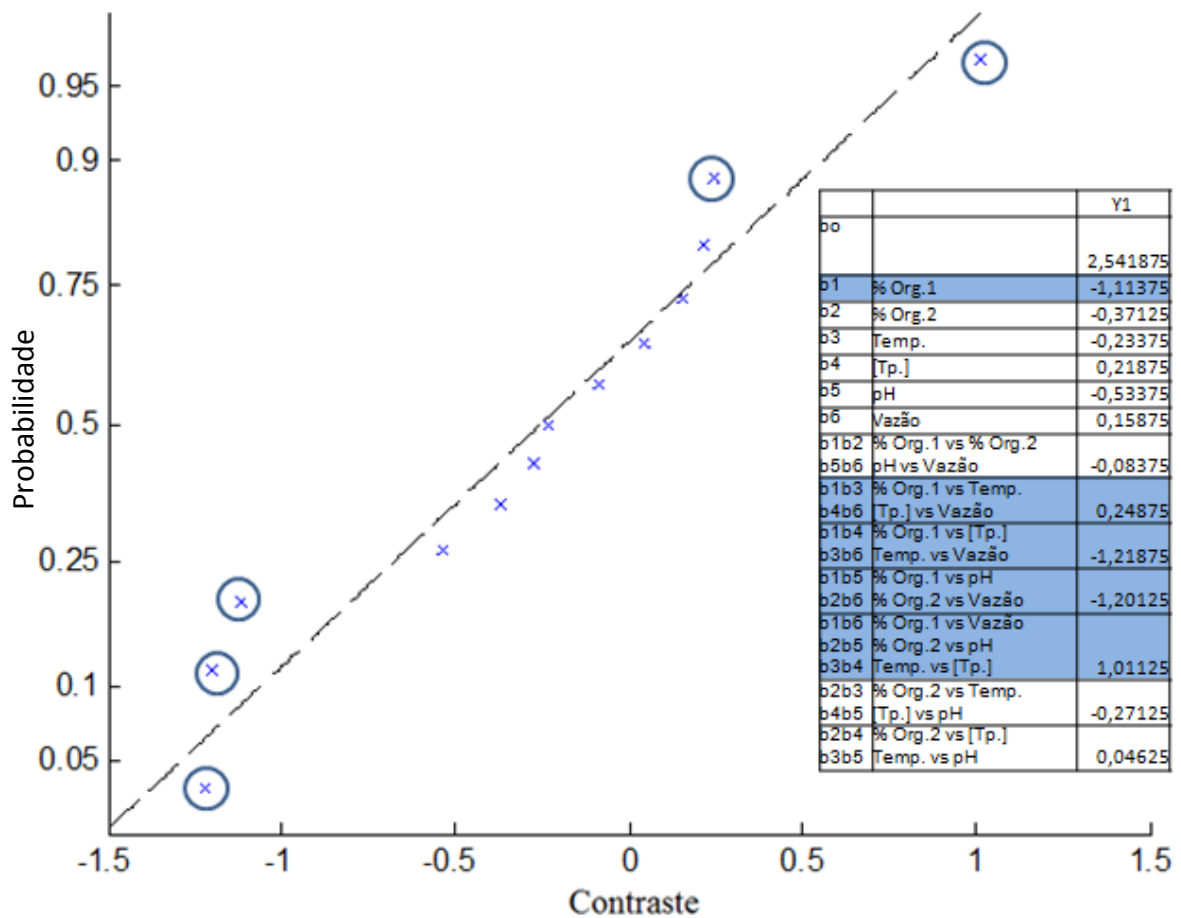


FIGURA 7.2.1 - Gráfico de distribuição normal para a separação entre o ácido maleico e o maleato de timolol com demonstração dos efeitos.

Com base na análise do GDN para a separação entre o ácido maléico e o maleato de timolol, pode ser observado que a única variável que possui efeito significativo individualmente sobre a separação é a porcentagem de orgânico nos primeiros minutos da análise. Podem ser observados nove efeitos de interações de variáveis, conforme demonstrado na Figura 7.2.1.

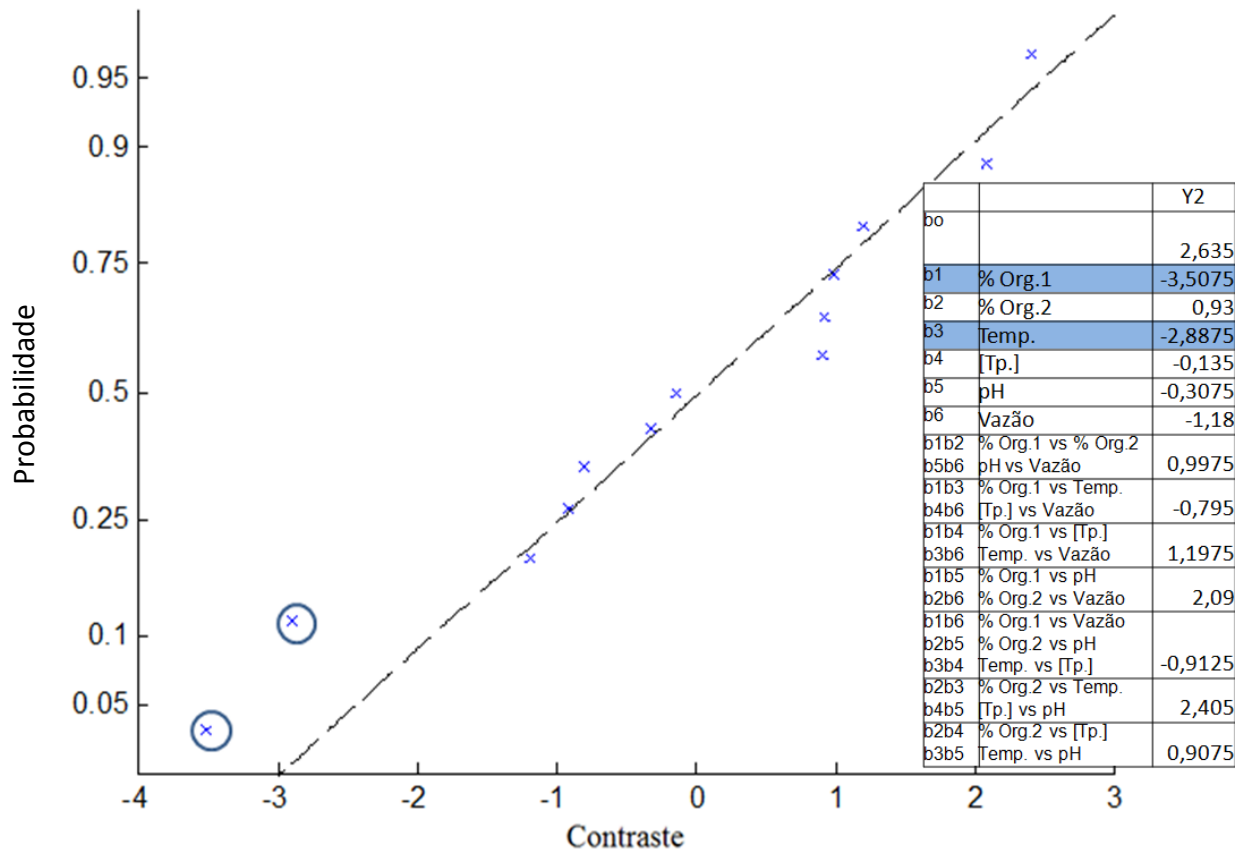


FIGURA 7.2.2 – Gráfico de distribuição normal para a separação entre o maleato de timolol e o latanoprostato ácido com demonstração dos efeitos.

Com base na análise do GDN para a separação entre o maleato de timolol e o latanoprostato ácido, pode ser observado que os únicos efeitos significativos sobre a separação são variáveis individuais. São elas: porcentagem de orgânico nos primeiros minutos de análise e temperatura da coluna, conforme Figura 7.2.2.

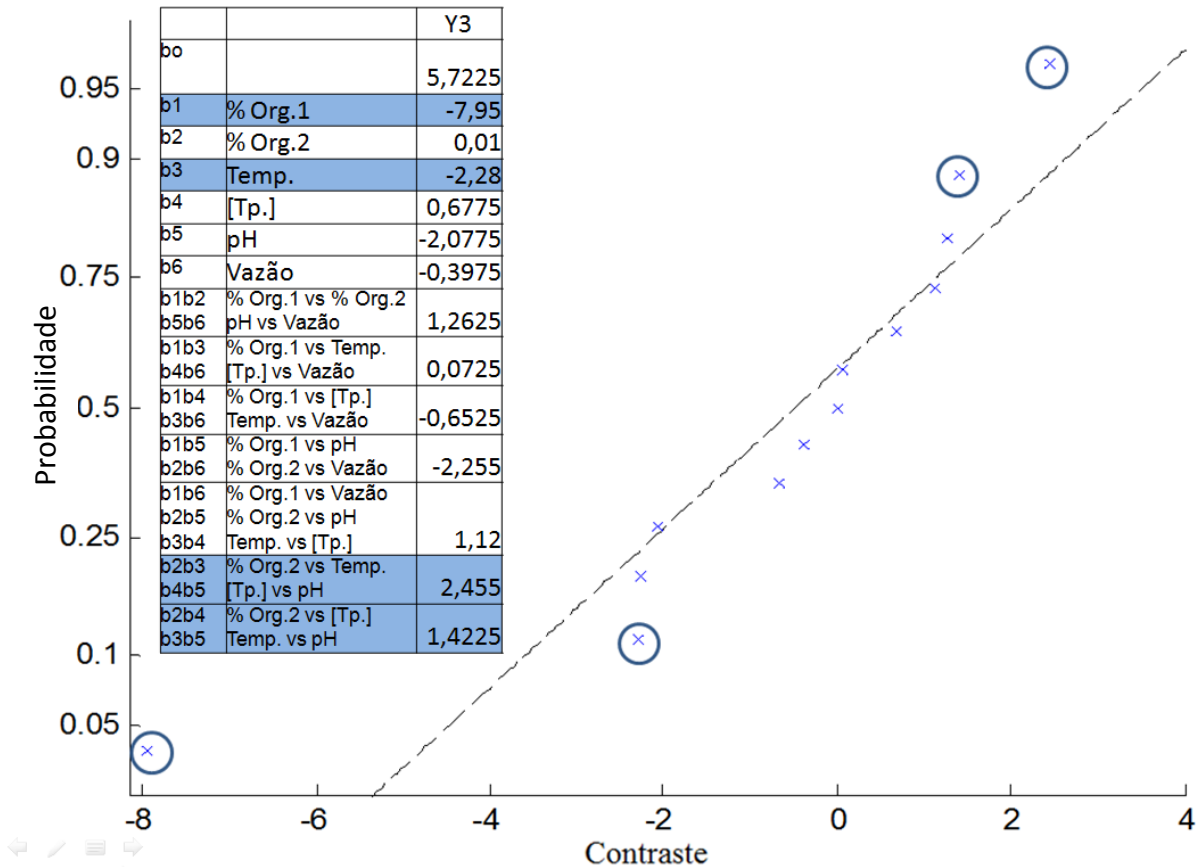


FIGURA 7.2.3 - Gráfico de distribuição normal para a separação entre o latanoprostato ácido e o latanoprostato com demonstração dos efeitos.

Com base na análise do GDN para a separação entre o latanoprostato ácido e a latanoprostato, pode ser observado que as variáveis que possuem efeito significativo individualmente sobre a separação são: a porcentagem de orgânico nos primeiros minutos de análise, a temperatura da coluna. Podem ser observados quatro efeitos de interação entre as variáveis. De todos os efeitos considerados significativos sobre a separação entre o latanoprostato ácido e o latanoprostato, a temperatura é o principal, conforme Figura 7.2.3.

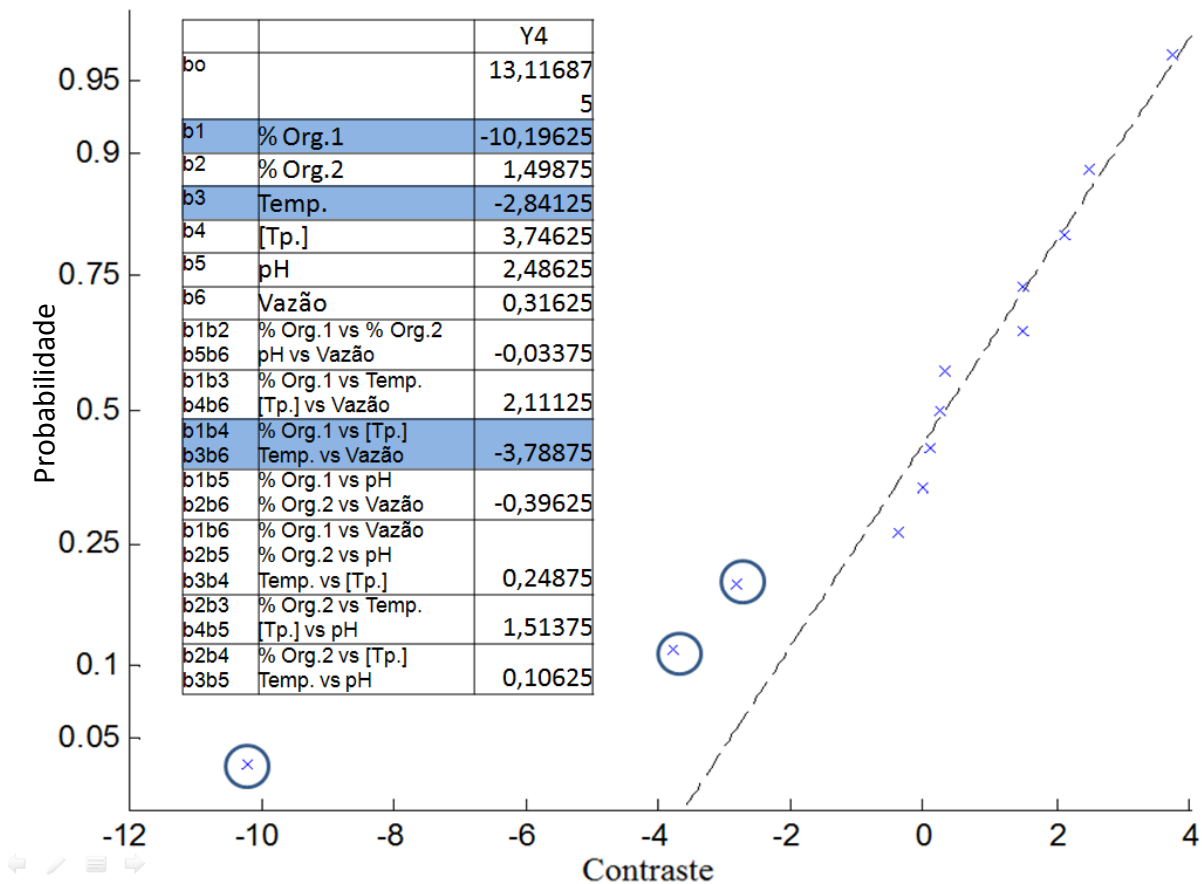


FIGURA 7.2.4 - Gráfico de distribuição normal para a separação entre o latanoprost e o cloreto de benzalcônio (CBK-12) com demonstração dos efeitos.

De acordo com o GDN para a separação entre o latanoprost e o cloreto de benzalcônio (CBK-12), pode ser observado que a porcentagem de orgânico nos primeiros minutos de análise e a temperatura da coluna possuem efeitos significativos sobre a separação individualmente. Podem ser observados dois efeitos de interações sobre a separação, conforme Figura 7.2.4.

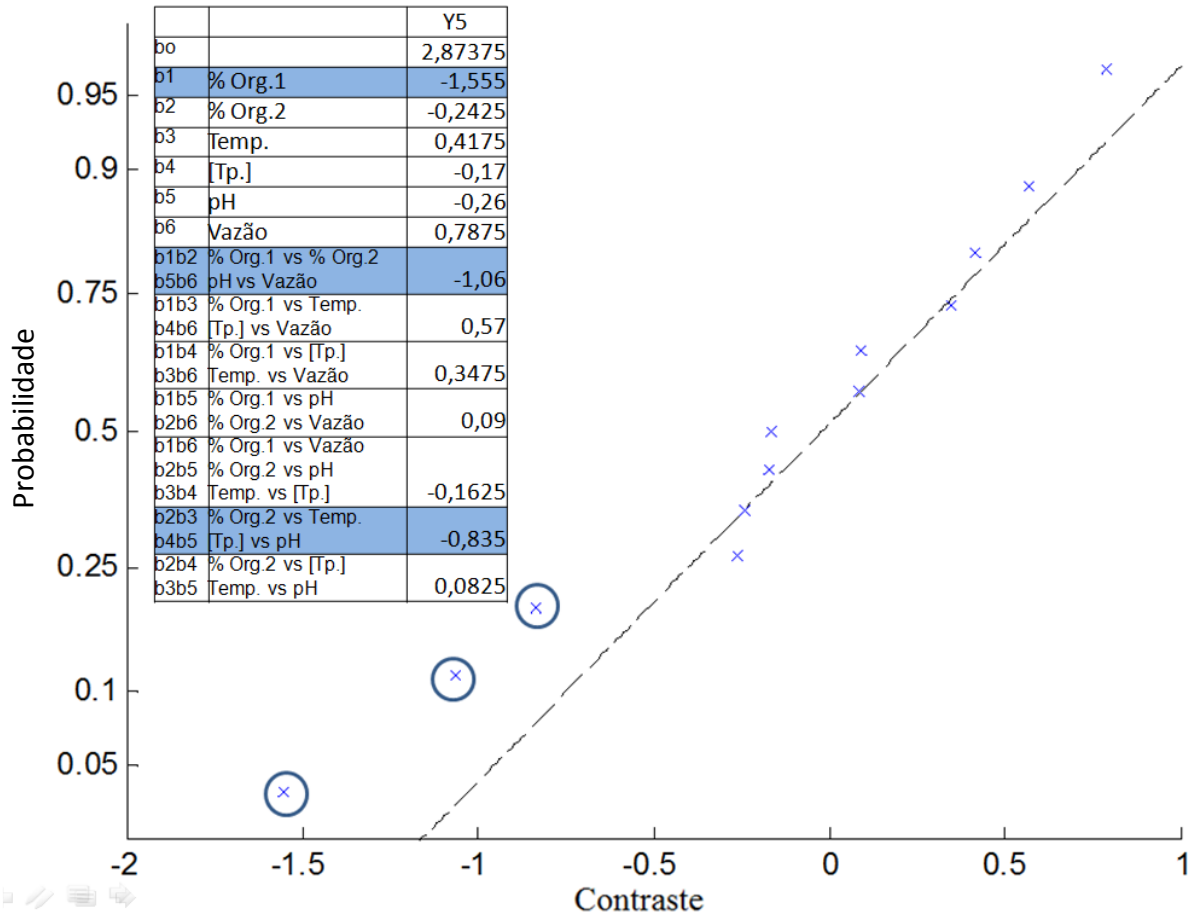


FIGURA 7.2.5 - Gráfico de distribuição normal para a separação entre o cloreto de benzalcônio (CBK-12) e o cloreto de benzalcônio (CBK-14) com demonstração dos efeitos.

O GDN para a separação entre o cloreto de benzalcônio (CBK-12) e o cloreto de benzalcônio (CBK-14), indica que a variável que possui efeito significativo individualmente sobre a separação é a temperatura da coluna. Podem ser observados outros quatro efeitos de interações, conforme Figura 7.2.5.

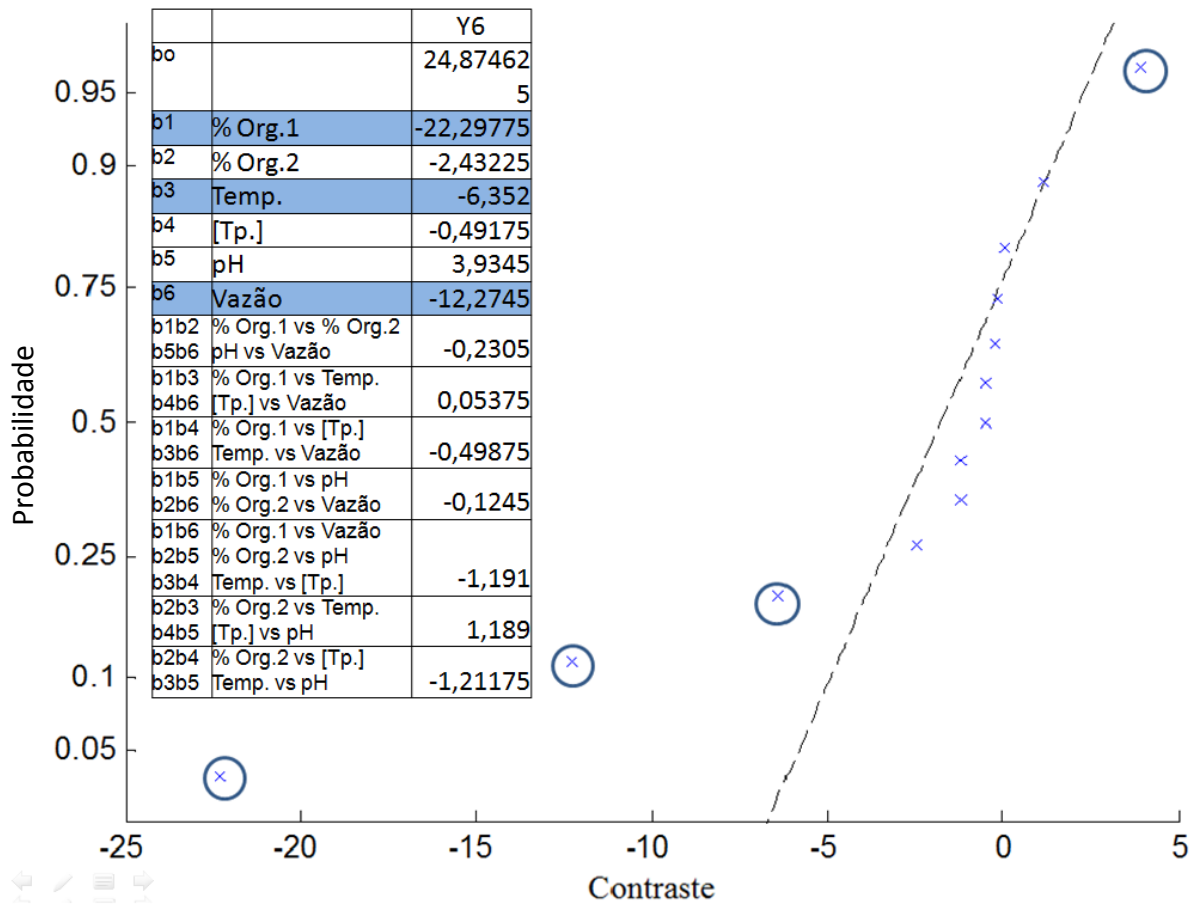


FIGURA 7.2.6 - Gráfico de distribuição normal para o tempo de análise com demonstração dos efeitos.

O GDN confirma o que é esperado para a diminuição do tempo de análise cromatográfica: aumento da proporção de orgânico na fase móvel, aumento da vazão da fase móvel e aumento da temperatura da coluna. Conforme Figura 7.2.6.

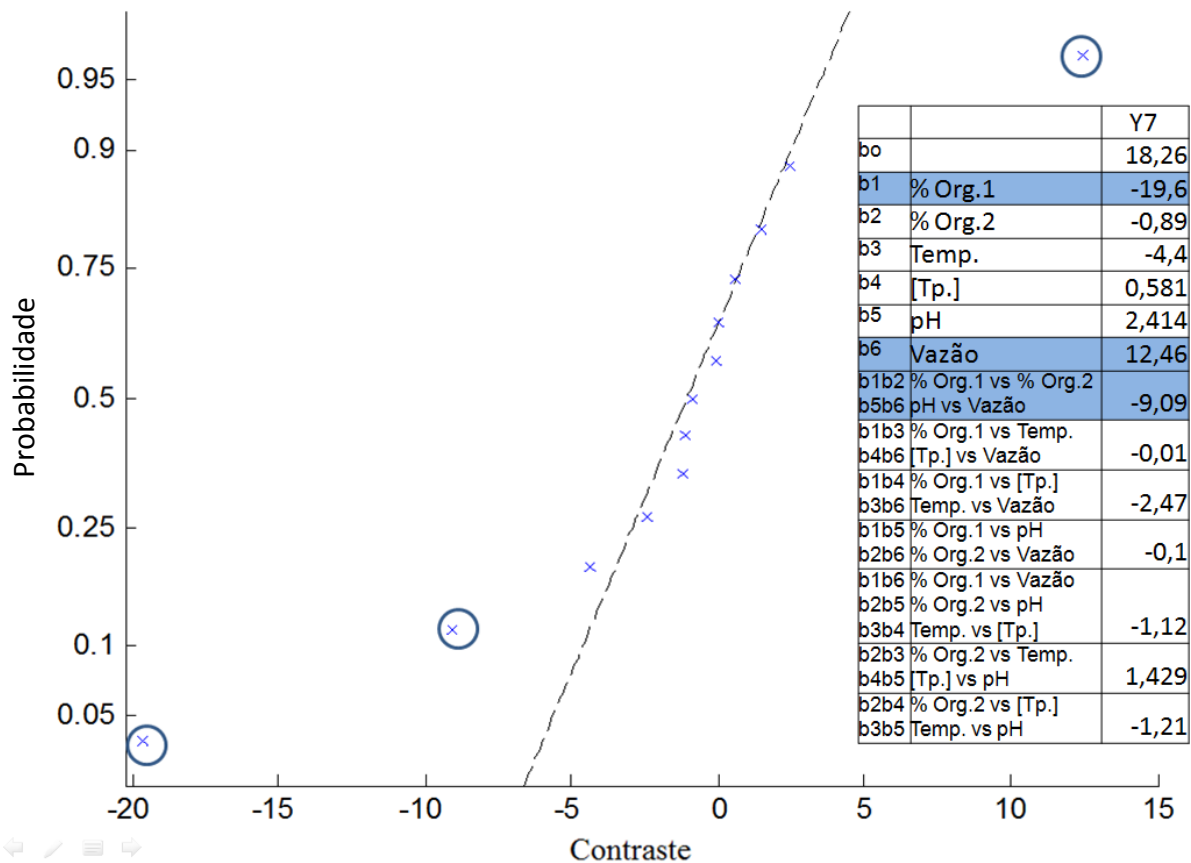


FIGURA 7.2.7 - Gráfico de distribuição normal para a geração de resíduos com demonstração dos efeitos.

O GDN indica que a variável mais significativa para a diminuição da geração de resíduos é a proporção de solvente orgânico nos primeiros minutos da análise, diminuindo conseqüentemente o tempo de análise. A vazão também é uma variável importante para a diminuição de resíduos. Podem ser observados outros dois efeitos de interações, conforme Figura 7.2.7.

O experimento conduziu a resultados satisfatórios de resolução (todas as resoluções maiores que 2,0) e diminuição do tempo de análise de 55 minutos para 30 minutos (-55%) e consumo de solvente de 55 mL para 30 mL por análise (-55%).

As Figuras 7.2.8 e 7.2.9 apresentam o cromatograma referente ao experimento 7 e ao referente ao método original, respectivamente.

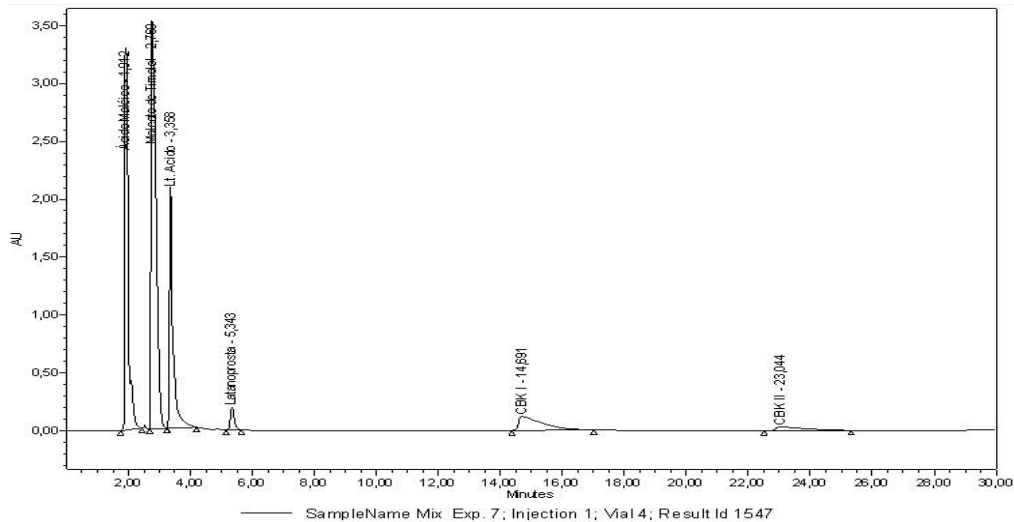


FIGURA 7.2.8 – Cromatograma referente ao experimento 7.

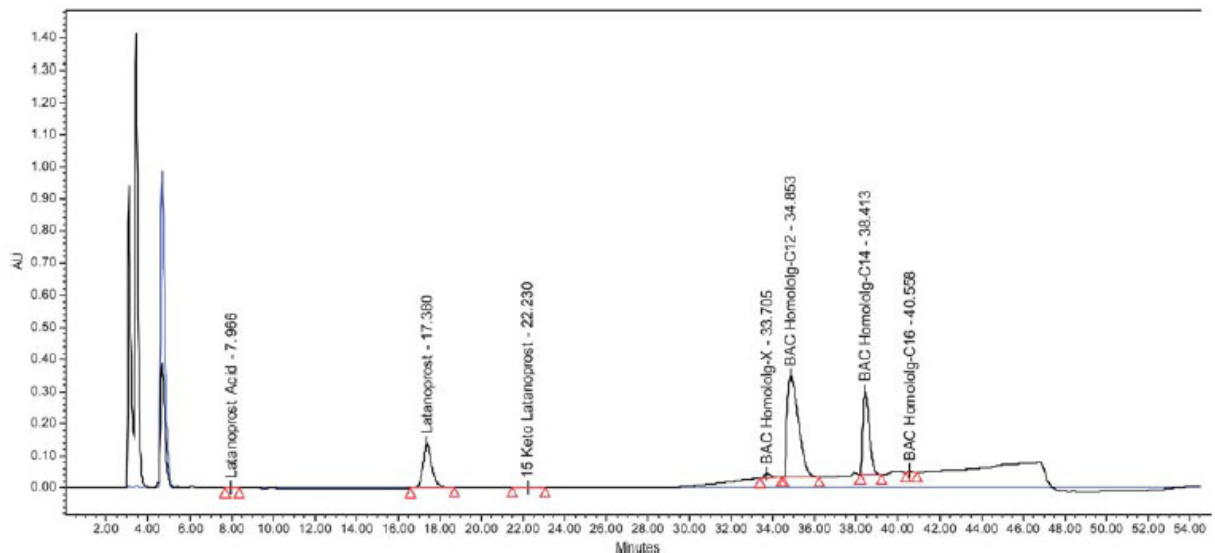


FIGURA 7.2.9– Cromatograma referente ao método original [34].

7.3. CONCLUSÃO PARCIAL

Com base nos resultados obtidos com o planejamento experimental exploratório foi possível verificar que a proporção de orgânico nos primeiros minutos de análise é a variável que possui a maior influência sobre a separação dos picos. Foi possível verificar interações entre fatores na maioria das separações. Foi possível verificar que o experimento 7 conduziu a resultados satisfatórios de resolução (todas as resoluções maiores que 2,0) e diminuição do tempo de análise de 55 minutos para 31 minutos (-56%) e consumo de solvente de 55 mL para 31 mL por análise (-56%).

8. CONCLUSÕES GERAIS

8. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos com o desenvolvimento do trabalho permitiram observar que as técnicas de são ferramentas poderosas e eficientes para extrair informações complexas sobre as metodologias em estudo. Foi verificado que as técnicas podem ser usadas com sucesso tanto no desenvolvimento como em validações de metodologias analíticas.

A avaliação multivariada da robustez método de doseamento de vitaminas do complexo B permitiu a visualização de interações entre as variáveis, o que não seria possível através do estudo da forma univariada. Mesmo com todas as interações foi possível comprovar a robustez do método. O estudo multivariado da robustez é visto como uma tendência por permitir o estudo das interações entre as variáveis uma vez que dificilmente elas são alteradas isoladamente.

O planejamento de mistura para a determinação de solventes de extração de lactonas sesquiterpênicas de formulação farmacêutica à base de tintura de arnica indicou uma mistura de dois solventes capaz de extrair eficientemente os compostos de interesse da amostra em questão.

O estudo multivariado do método de doseamento de latanoprostá em colírio permitiu a redução do tempo de análise de 55 minutos para 31 minutos (-58%) e consumo de solvente de 55 mL para 31 mL por análise (-58%).

Desta forma, é possível concluir que técnicas de planejamento podem ser usadas com sucesso para o desenvolvimento e validação analítica na indústria farmacêutica, conduzindo a resultados rápidos e robustos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. “Produção industrial cai 2,1% em abril”. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1886&id_pagina=1>. Acesso em 04 de Agosto de 2012.
- [2] INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. “Em 2011, PIB cresce 2,7% e totaliza R\$ 4,143 trilhões”. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=2093>. Acesso em 04 de Agosto de 2012.
- [3] VALÉCIO, M. “Os caminhos do setor farmacêutico”. Guia da Farmácia. Disponível em <<http://www.guiadafarmacia.com.br/anuario-2012/os-caminhos-do-setor-farmace%CC%82utico-dp1>>. Acesso em 04 de Agosto de 2012.
- [4] DEJAEGHER, B.; HEYDEN, Y.V.. “Ruggedness and robustness testing”. *Journal of Chromatography A*, **vol. 1158**, p. 138 – 157, 2007.
- [5] DONG, M. *Modern HPLC for Practicing Scientists*. EUA: Wiley, 2006.
- [6] SIVAKUMAR, T.; MANAVAN, R.; MURALIDHARAN, C.; VALLIAPPAN, K.. “Multi-criteria decision making approach and experimental design as chemometric tools to optimize HPLC separation of domperidone and pantoprazole”. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **vol. 43**, p. 1842 – 1848, 2007.
- [7] DEBRUS, B.; LEBRUN, P.; CECCATO, A.; CALIARO, G.; ROZET, E.; NISTOR, I.; OPREAN, R.; RUPÉREZ, F.J.; BARBAS, C.; BOULANGER, B.; HUBERT, P.. “Application of new methodologies based on design of experiments, independent component analysis and design space for robust optimization in liquid chromatography.” *Analytica Chimica Acta*, **vol. 691**, p. 33 – 42, 2011.
- [8] BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E.; “Como Fazer Experimentos – Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria”, Ed. da Unicamp: Campinas, 2001.
- [9] SPACE, J.S.; OPIO, A.M.; NICKERSON, B.; JIANG, H.; DUMONT, M.; BERRY, M.. “Validation of a dissolution method with HPLC analysis for lasofoxifene tartrate low dose tablets”. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **vol. 44**, p. 1064 – 1071, 2007.
- [10] YI-BING, J.; QING-SONG, X.; YU-ZHU, H.; HEYDEN, Y.V.. “Development, optimization and validation of a fingerprint of *Ginkgo biloba* extracts by high-performance liquid chromatography”. *Journal of Chromatography A*, **vol. 1066**, p. 97 – 104, 2005.
- [11] KRIER, F.; BRION, M.; DEBURS, B.; LEBRUN, P.; DRIESEN, A.; ZIEMONS, E.; EVRARD, B.; HUBERT, P.. “Optimization and validation of a fast HPLC method for the quantification of sunlidac and its related impurities”. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **vol. 54**, p. 694 – 700, 2011.

- [12] SRINUBABU, G.; RAJU, CH. A. I.; SARATH, N.; KUMAR, P. K., SESHAGIRI RAO, J.V.L.N.. "Development and validation of a HPLC method for the determination of voriconazole in pharmaceutical formulation using an experimental design". *Talanta*, **vol. 74**, p. 1424 – 1429, 2007.
- [13] BONFILIO, R.; TARLEY, C.R.T.; PEREIRA, G.R.; SALGADO, H.R.N.; ARAÚJO, M.B.; "Multivariate optimization and validation of an analytical methodology by RP-HPLC for the determination of losartan potassium in capsules". *Talanta*, **vol. 80**, p. 236 – 241, 2009.
- [14] FICARRA, R.; CALABRÒ, M.L.; CUTRONEO, P.; TOMMASINI, S.; MELARDI, S.; SEMREEN, M.; FURLANETTO, S. ; FICARRA, P. ; ALTAVILLA, G.. "Validation of a LC method for the analysis of oxaliplatin in a pharmaceutical formulation using an experimental design". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **vol. 29**, p. 1097 – 1103, 2002.
- [15] LE MAPIHAN, K.; VIAL, J.; JARDY, A.. "Reversed-phase liquid chromatography column testing: robustness study of the test". *Journal of Chromatography A*, **vol. 1061**, p. 149 – 158, 2004.
- [16] PACHECO, S.; GODOY, R.L.O.; OIANO-NETO, J.; ARAUJO, M.C.P.; ROSA, J. S.; MONTE, P.H.F. "Recuperação e reutilização de acetonitrila utilizada em análise de açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência." *Anais do XIV Encontro Nacional Sobre Metodologias e Gestão de Laboratórios da Embrapa; I Simpósio Sobre Metodologias de Laboratórios de Pesquisa Agropecuária*, Rio de Janeiro, 2009.
- [17] BONILLA, R. "Cost-Effective Solutions to the World-Wide Acetonitrile Shortage". Disponível em: <<http://www.pharmpro.com/articles/2010/04/Cost-Effective-Solutions-to-the-World-Wide-Acetonitrile-Shortage/>>. Acesso em: 04 de agosto de 2012.
- [18] OIANO-NETO, J.; SOUZA, A.M.; SANTIAGO, M.C.P.A.; SANTOS, M.C.S.; PACHECO, S.. "Metodologias rápidas e de baixo custo para tratamento e recuperação de alguns solventes orgânicos utilizados em separações cromatográficas." *Anais do Simpósio Internacional Sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais*, Foz do Iguaçu, 2011.
- [19] GIL, E.S.; GARROTE, C.F.D.; CONCEIÇÃO, E.C.; SANTIAGO, M.F.; SOUZA, A. R.. "Aspectos técnicos e legais do gerenciamento de resíduos químico-farmacêuticos". *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, **vol. 43** (1), p. 19 – 29, 2007.
- [20] DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of Quality Technology*, **vol. 12**, p. 214 – 219, 1980.
- [21] SILVA, R. A.; BORSATO, D.; SILVA, R. S. S. F. Método simplex supermodificado como estratégia de otimização para respostas combinadas em sistemas alimentares. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **vol. 20**, p. 329 – 336, 2000.

[22] Anvisa 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RE Nº 899, de 29 de Maio de 2003. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília DOU de 02/06/2003.

[23] Advanced Chromatography Technologies, 2003. Ace HPLC Applications. Disponível em: <http://www.teknolab.no/pdf/Hichrom_ACE_Sample_Applications.pdf>. Acesso em: 22 de setembro de 2012.

[24] Rural Industries Research and Development Corporation. Prospects for medicinal herbs. Australian Government. June 2006. Disponível em: <<https://rirdc.infoservices.com.au/downloads/06-084>>. Acesso em: 04 de agosto de 2012.

[25] GERTSCH, J.; STICHER, O.; SCHMIDT, T.; HEILMANN, J.. Influence of helenanolid-type sesquiterpene lactones on gene transcription profiles in Jurkat T cells and human peripheral blood cells: anti-inflammatory and cytotoxic effects. *Biochemical Pharmacology*. **Vol. 66** (11), p. 2141–2153, 2003.

[26] WIDRIG, R.; SUTER A.; SALLER, R.; MELZER, J.. Choosing between NSAID and arnica for topical treatment of hand osteoarthritis in a randomised, double-blind study. *Rheumatol International*. **Vol. 27** (6), p. 585–91, 2007.

[27] CASSU, R.; COLLARES, C; PORTO ALEGRE, B.; FERREIRA, R.; STEVANIN, H.; BERNARDI, C.. Analgesia e ação antiinflamatória da *Arnica montana* 12CH comparativamente ao cetoprofeno em cães. *Cienc. Rural*, **vol. 41** (10), 2011.

[28] MAZZOCCHI, A.; PASSI, L.; MORETTI, R. *Journal Oral Maxillofacial Surgery*, **vol. 65** (11), p. 2321–2323, 2007.

[29] STANEVA, J.; DENKOVA, P.; TODOROVA, M.; EVSTATIEVA, L.. Quantitative analysis of sesquiterpene lactones in extract of *Arnica montana* L. by ¹H NMR spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **vol. 54** (1), p. 94–99, 2011.

[30] European Pharmacopeia 6.0. Monografia Tintura de Arnica. P. 1216 e 1217.

[31] NASCIMENTO, I.; E. BRUNS, R.; F. SIQUEIRA, D.; P. NUNES, S.. “Application of statistical mixture models for ternary polymer blends”. *Journal of Brazilian Chemical Society*, **vol.8** (6): p. 587-595, 1997.

[32] Ficha de segurança e informações sobre produtos químicos. Merck Chemicals. Materials MSDS. Disponível em: <<http://www.merckmillipore.com>>. Acesso em: 22 de setembro de 2012.

[33] E.J Higginbotham. The Efficacy and Safety of Unfixed and Fixed Combinations of Latanoprost and Other Antiglaucoma Medications. *Survey of Ophthalmology*, **vol. 47** (S1), p. S133–S140, 2002.

[34] Mehta, J., Patel, V.. A versatile LC method for the simultaneous quantification of latanoprost, timolol and benzalkonium chloride and related substances in the presence of their degradation products in ophthalmic solution. The Royal Society of Chemistry, 2010. *Anal. Methods*, 2010, **vol. 2**, 1737-1744.

[35] ANVISA 2008. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Consulta Pública nº 50, de 4 de setembro de 2008. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília D.O.U de 05/09/2008.

[36] PHILIPPE LABRANCHE, L. "Rapid determination of total benzalkonium chloride content in ophthalmic formulation". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **v. 43** (3): p. 989–993, 2007.

[37] DIONEX. Analysis of Benzalkonium Chloride on the Acclaim Surfactant Column by High-Performance Liquid Chromatography. Dionex Application Note 237. Disponível em < www.dionex.com/.../82067-AN237-LC-BenzalkoniumChloride-15Oct2010-LPN2313-02.pdf > Acesso em 24 de julho de 2012.

[38] United States Department of Labor. Occupational Safety and Health Guideline for n-Hexane. Disponível em <<http://www.osha.gov/SLTC/healthguidelines/n-hexane/recognition.html> >. Acesso em 10 de janeiro de 2012.