

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para cloridrato de
raloxifeno**

FERNANDA RODRIGUES SALAZAR

PORTO ALEGRE, 2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para cloridrato de raloxifeno

Dissertação apresentada por **Fernanda Rodrigues Salazar** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof.^a Dr.^a Ana Maria Bergold

Porto Alegre, 2012

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 29.03.2012, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa Dra Clarice Madalena Bueno Rolim

Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

Profa Dra. Marlise Araújo dos Santos

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS

Profa. Dra. Simone Cristina Baggio Gnoatto

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

CIP - Catalogação na Publicação

Salazar, Fernanda Rodrigues
Desenvolvimento e validação de metodologia
analítica para cloridrato de raloxifeno / Fernanda
Rodrigues Salazar. -- 2012.
180 f.

Orientadora: Ana Maria Bergold.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto
Alegre, BR-RS, 2012.

1. cloridrato de raloxifeno. 2. métodos
analíticos. 3. controle de qualidade. I. Bergold, Ana
Maria, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFRGS na cidade de Porto Alegre, com financiamento do INCT-IF. A autora recebeu bolsa de estudos do CNPq

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Ana Maria Bergold agradeço todo o apoio, atenção, amizade, carinho e dedicação prestadas na orientação deste trabalho.

Ao Prof. Pedro Eduardo Fröhlich agradeço a atenção, colaboração e amizade com os esclarecimentos prestados.

À minha amiga e doutoranda Francini Yatsu agradeço a colaboração e auxílio na realização das análises de DSC e também pela amizade de todas as horas.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Química Farmacêutica Sirlei e Marquinho agradeço pela amizade, carinho e apoio durante este tempo de convivência.

Aos meus colegas e amigos Cristiane, Marcella, Andreia, Pamela, Andrea, Ana Paula, Tamara, Felipe, César, Carolina, Leonardo, Lisiane, Joyce, Haline, Raquel e Mariana pela ótima convivência e amizade.

À minha família, por todo amor, carinho, compreensão e apoio durante este tempo de mestrado e por estarem sempre ao meu lado

RESUMO**Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para cloridrato de raloxifeno**

O cloridrato de raloxifeno é um fármaco utilizado para o tratamento e prevenção da osteoporose em mulheres na pós-menopausa e foi aprovado pelo FDA para prevenção de câncer de mama invasivo. Pertence à classe de moduladores seletivos de receptor estrogênico. Foi desenvolvido pela *Ely Lilly Company* e é comercializado como Evista[®] na forma de comprimidos na dosagem de 60mg. Devido à importância do fármaco e interesse do Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia – Inovações Farmacêuticas no desenvolvimento métodos de síntese e de controle de qualidade, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de métodos analíticos para assegurar a qualidade tanto da matéria-prima quanto do produto acabado. A matéria-prima foi analisada quanto às suas características físico-químicas através da determinação da solubilidade, do ponto de fusão e da calorimetria exploratória diferencial. A caracterização e identificação da matéria-prima foram realizadas identificando grupos característicos como o cloreto e grupo fenol e também por espectrofotometria na região do infravermelho e do ultravioleta e por cromatografia líquida de alta eficiência. A forma farmacêutica comprimidos também foi caracterizada e identificada através dos mesmos métodos que a matéria-prima e adicionalmente através de cromatografia em camada delgada e eletroforese capilar. Os métodos desenvolvidos e validados para quantificação da matéria-prima foram volumetria em meio não-aquoso e cromatografia líquida. Para os comprimidos, foram desenvolvidos métodos por espectrofotometria na região do ultravioleta, cromatografia líquida e eletroforese capilar. Os resultados de todos os métodos foram analisados estatisticamente para verificar equivalência nas determinações.

Palavras-chave: raloxifeno, cromatografia líquida de alta eficiência, controle de qualidade, eletroforese capilar, espectrofotometria na região do ultravioleta, volumetria em meio não-aquoso

ABSTRACT**Development and validation of analytical methodology for raloxifene hydrochloride**

Raloxifene hydrochloride is used for the treatment and prevention of osteoporosis in post-menopausal women. It was approved by FDA for the prevention of invasive breast cancer. It was developed by Ely Lilly Company and marketed as Evista® in form of tablets of 60mg. Due to the importance of this substance and the interest of INCT-IF in its synthesis and quality control, the present work developed analytical methods to assure the quality of the raw substance and the pharmaceutical form. Qualitative and quantitative methods were developed for the analysis of raloxifene hydrochloride as raw substance and tablets. The raw substance was characterized by its physical and chemical characteristics by solubility, melting point and differential scanning calorimetry. It was also identified by the analysis of characteristic groups such as chloride and phenol, and by infrared and ultraviolet spectrophotometry; also by high performance liquid chromatography. The tablets were also characterized and identified by the same methods as for the raw substance, but in addition by thin layer chromatography and capillary electrophoresis. The developed and validated methods for the assay of the raw substance were: non-aqueous titration and liquid chromatography. For the tablets, the assays were: ultraviolet spectrophotometry, liquid chromatography and capillary electrophoresis. The results of all methods were analyzed statistically to verify the equivalence of the determinations.

Key words: raloxifene, high performance liquid chromatography, spectrophotometry in region of ultraviolet, capillary electrophoresis, quality control, non-aqueous titration

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ações do raloxifeno nos seus locais alvos de acordo com atividade estrogênica ou antiestrogênica.....	13
Figura 2	Estrutura molecular do cloridrato de raloxifeno.....	15
Figura 3	Calorimetria exploratória diferencial do cloridrato de raloxifeno SQR.....	55
Figura 4	Calorimetria exploratória diferencial do cloridrato de raloxifeno matéria-prima.....	56
Figura 5	Espectro de absorção na região do IV para cloridrato de raloxifeno SQR.....	58
Figura 6	Espectro de absorção na região do IV para cloridrato de raloxifeno matéria-prima.....	59
Figura 7	Espectro de absorção na região do UV para cloridrato de raloxifeno SQR.....	60
Figura 8	Espectro de absorção na região do UV para cloridrato de raloxifeno matéria-prima.....	60
Figura 9	Cromatograma da solução de cloridrato de raloxifeno SQR (10,0µg/mL).....	61
Figura 10	Cromatograma da solução de cloridrato de raloxifeno matéria-prima (10,0µg/mL).....	62
Figura 11	Espectro de absorção na região do UV para cloridrato de raloxifeno na forma farmacêutica.....	63
Figura 12	CCD do cloridrato de raloxifeno SQR, forma farmacêutica e tamoxifeno SQR.....	64
Figura 13	Cromatograma da solução de cloridrato de raloxifeno forma farmacêutica.....	65
Figura 14	Eletroferograma da solução de cloridrato de raloxifeno SQR (80,0µg/mL).....	66
Figura 15	Eletroferograma da solução de cloridrato de raloxifeno em comprimidos (80,0µg/mL).....	66
Figura 16	Especificidade do método CLAE para cloridrato de raloxifeno submetido à hidrólise ácida por 24h.....	71
Figura 17	Especificidade do método CLAE para cloridrato de raloxifeno	71

	submetido à hidrólise alcalina por 24h.....	
Figura 18	Especificidade do método CLAE para cloridrato de raloxifeno submetido à oxidação com peróxido de hidrogênio 3% por 24h	72
Figura 19	Especificidade do método CLAE para cloridrato de raloxifeno SQR submetido à fotólise (A) e submetido à degradação térmica (B).....	72
Figura 20	Representação gráfica da curva padrão média do cloridrato de raloxifeno SQR obtido por CLAE.....	73
Figura 21	Espectro de absorção na região do UV para cloridrato de raloxifeno em metanol (A) SQR (B) comprimidos.....	79
Figura 22	Espectro de absorção na região do UV para cloridrato de raloxifeno em solução de metanol para amostra (1) e solução placebo (2).....	79
Figura 23	Representação gráfica da curva padrão média para cloridrato de raloxifeno por UV.....	81
Figura 24	Cromatograma para avaliar especificidade da solução de cloridrato de raloxifeno SQR (10,0µg/mL) e solução placebo contendo excipientes da formulação do comprimido.....	84
Figura 25	Cromatograma da solução de cloridrato de raloxifeno SQR submetido à degradação forçada para avaliação da especificidade do método CLAE.....	85
Figura 26	Representação gráfica da curva padrão média do cloridrato de raloxifeno obtido por CLAE.....	87
Figura 27	Eletroferograma para avaliação da especificidade do método EC para comprimido e solução placebo contendo excipientes da formulação.....	93
Figura 28	Eletroferograma da solução de cloridrato de raloxifeno submetido à hidrólise ácida (HCl 1M) para avaliação da especificidade.....	93
Figura 29	Eletroferograma da solução de cloridrato de raloxifeno submetido à hidrólise alcalina (NaOH 1M) para avaliação da especificidade.....	94
Figura 30	Eletroferograma da solução de cloridrato de raloxifeno submetido à oxidação (H ₂ O ₂ 3%) para avaliação da especificidade.....	94
Figura 31	Eletroferograma da solução de cloridrato de raloxifeno submetido à degradação forçada para avaliação da	95

especificidade.....

Figura 32 Representação gráfica da curva padrão média do cloridrato de raloxifeno SQR obtido por EC..... 96

Figura 33 Gráfico de pareto (Minitab®15) obtido através da análise dos resultados da robustez do método EC para comprimidos..... 99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Determinação de cloridrato de raloxifeno por métodos cromatográficos tanto em forma farmacêutica quanto para matrizes biológicas.....	16
Tabela 2	Determinação de raloxifeno por espectrofotometria em forma farmacêutica e em matéria prima.....	17
Tabela 3	Valores de ponto de fusão para cloridrato de raloxifeno matéria-prima.....	53
Tabela 4	Freqüências de absorção das principais bandas no infravermelho e suas respectivas atribuições para cloridrato de raloxifeno.....	57
Tabela 5	Resultados obtidos em três dias na quantificação das amostras de cloridrato de raloxifeno matéria-prima por VMNA utilizando indicador para determinar ponto final para avaliar precisão intra e interdias.....	68
Tabela 6	Resultados obtidos em três dias na quantificação das amostras de cloridrato de raloxifeno matéria-prima por VMNA utilizando potenciometria para determinar ponto final para avaliar precisão intra e interdias.....	68
Tabela 7	Valores das áreas obtidas para curva padrão de cloridrato de raloxifeno por CLAE.....	73
Tabela 8	Resultados obtidos em três dias de quantificação de amostras de cloridrato de raloxifeno matéria-prima para avaliação da precisão intra e interdias.....	74
Tabela 9	Avaliação da robustez do método CLAE para quantificação de cloridrato de raloxifeno matéria-prima...	75
Tabela 10	Resultados obtidos na determinação dos teores de cloridrato de raloxifeno matéria prima por CLAE, VMNA-POT e VMNA-IND.....	76
Tabela 11	Valores de absorvância obtidos para curva padrão de cloridrato de raloxifeno por UV.....	80
Tabela 12	Resultados obtidos em três dias diferentes na quantificação de três amostras com concentrações diferentes ($\mu\text{g/mL}$) e cloridrato de raloxifeno comprimidos por UV para avaliação da precisão intra e	82

	interdias.....	
Tabela 13	Resultados obtidos na determinação da exatidão do método por UV para cloridrato de raloxifeno comprimido	82
Tabela 14	Valores de áreas obtidos para curva padrão de cloridrato de raloxifeno por CLAE.....	86
Tabela 15	Resultados obtidos em três dias de quantificação de amostra de cloridrato de raloxifeno comprimidos (10,0µg/mL) para avaliação da precisão intra e interdias.....	88
Tabela 16	Resultados obtidos na determinação da exatidão do método por CLAE para cloridrato de raloxifeno comprimido.....	89
Tabela 17	Avaliação da robustez do método CLAE para quantificação de cloridrato de raloxifeno em comprimidos	89
Tabela 18	Valores de áreas obtidas para curva padrão de cloridrato de raloxifeno por CLAE.....	96
Tabela 19	Resultados obtidos em três dias de quantificação de amostra de cloridrato de raloxifeno comprimido (80,0µg/mL) para avaliação da precisão intra e interdias.....	97
Tabela 20	Resultados obtidos na determinação da exatidão do método por EC para cloridrato de raloxifeno comprimido	98
Tabela 21	Resultados obtidos na determinação dos teores de cloridrato de raloxifeno em comprimido por UV, CLAE e EC.....	100
Tabela 22	ANOVA (Microsoft Excel, 2007) das médias obtidas nos doseamentos de cloridrato de raloxifeno por VMNA utilizando indicador ou potenciometria para determinação do ponto final das titulações.....	Anexo
Tabela 23	Regressão e ANOVA das áreas absolutas determinadas para obtenção da curva padrão do cloridrato de raloxifeno matéria-prima por CLAE.....	Anexo
Tabela 24	Tabela 24 – Teste de tuckey (Minitab®15) das médias dos métodos CLAE, VMNA-POT e VMNA para verificar equivalência	Anexo
Tabela 25	Regressão e ANOVA das áreas absolutas determinadas para obtenção da curva padrão do cloridrato de raloxifeno comprimido por UV.....	Anexo

Tabela 26	Regressão e ANOVA das áreas absolutas determinadas para obtenção da curva padrão do cloridrato de raloxifeno comprimido por CLAE.....	Anexo
Tabela 27	Regressão e ANOVA das áreas absolutas determinadas para obtenção da curva padrão do cloridrato de raloxifeno comprimido por EC.....	Anexo
Tabela 28	ANOVA (Microsoft Excel, 2007) das médias obtidas nos doseamentos de cloridrato de raloxifeno em comprimidos por UV, CLAE e EC.....	Anexo

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – análise da variância

AP-1- proteína ativadora

CCD – cromatografia em camada delgada

CDTF – Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Farmacêutica

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

DAD – detector com arranjo de diodos

DPR – desvio padrão relativo

DSC – calorimetria exploratória diferencial

DI – diclofenaco de potássio

EC – eletroforese capilar

e.p.m. – erro padrão da média

gl – graus de liberdade

INCT-IF – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Inovações Farmacêuticas

IND - indicador

IV – espectrofotometria na região do infravermelho

MECC – eletroforese capilar micelar

MQ – média dos quadrados

MP – matéria-prima

MS – espectrometria de massas

LISTA DE ABREVIATURAS

MSRE – modulador seletivo de receptor de estrogênio

P/PI – relação área fármaco/área padrão interno

POT - potenciometria

RE-positivo – positivo para receptor de estrogênio

RF – fator de retenção

RLX – cloridrato de raloxifeno

SDS – dodecilsulfato de sódio

SQ – soma dos quadrados

SQR – substância química de referência

UV – espectrofotometria na região do ultravioleta

VIS – espectrofotometria na região do visível

VMNA – volumetria em meio não aquoso

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	5
2.1	<i>Objetivo Geral</i>	7
2.2	<i>Objetivos Específicos</i>	7
3	REVISAO	9
4	MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1	<i>Substância química de referência</i>	21
4.2	<i>Matéria-prima</i>	21
4.3	<i>Forma Farmacêutica</i>	21
4.4	<i>Análise quantitativa da matéria-prima e forma farmacêutica</i>	22
4.4.1	<i>Avaliação físico-química da matéria-prima</i>	22
4.4.1.1	<i>Solubilidade</i>	22
4.4.1.2	<i>Ponto de fusão</i>	22
4.4.1.3	<i>Calorimetria exploratória diferencial</i>	23
4.4.2	<i>Caracterização e identificação da matéria-prima</i>	23
4.4.2.1	<i>Identificação do cloreto</i>	23
4.4.2.2	<i>Identificação do grupo fenol</i>	23
4.4.2.3	<i>Espectrofotometria na região do infravermelho</i>	24
4.4.2.4	<i>Espectrofotometria na região do ultravioleta</i>	24
4.4.2.5	<i>Cromatografia líquida de alta eficiência</i>	24
4.4.3	<i>Ensaio de pureza da matéria-prima</i>	25
4.4.3.1	<i>Determinação da umidade</i>	25
4.4.3.2	<i>Perda por dessecação</i>	25
4.4.4	<i>Caracterização e identificação da forma farmacêutica</i>	26

4.4.4.1	Espectrofotometria na região do ultravioleta.....	26
4.4.4.2	Cromatografia em camada delgada.....	26
4.4.4.3	Cromatografia líquida de alta eficiência.....	27
4.4.4.4	Eletroforese capilar.....	27
4.5	<i>Análise quantitativa da matéria-prima.....</i>	27
4.5.1	Volumetria em meio não aquoso.....	27
4.5.1.1	Determinação da precisão do método VMNA	28
4.5.2	Cromatografia líquida de alta eficiência.....	29
4.5.2.1	Validação do método CLAE para quantificação da matéria-prima.....	30
4.5.2.1.1	Especificidade.....	30
4.5.2.1.2	Linearidade.....	32
4.5.2.1.3	Precisão.....	33
4.5.1.4	Robustez.....	34
4.6	<i>Análise quantitativa do produto farmacêutico.....</i>	34
4.6.1	Espectrofotometria na região do ultravioleta.....	34
4.6.1.1	Validação do método UV para forma farmacêutica comprimido	35
4.6.1.1.1	Especificidade.....	35
4.6.1.1.2	Linearidade, limite de detecção e limite de quantificação	36
4.6.1.1.3	Precisão.....	37
4.6.1.1.4	Exatidão.....	37
4.6.2	Cromatografia líquida de alta eficiência.....	39
4.6.2.1	Validação do método CLAE para quantificação de comprimido de cloridrato de raloxifeno.....	39
4.6.2.1.1	Especificidade.....	39
4.6.2.1.2	Linearidade, limite de detecção e limite de quantificação	40
4.6.2.1.3	Precisão.....	41
4.6.2.1.4	Exatidão.....	42
4.6.2.1.5	Robustez.....	43

4.6.3	Eletroforese capilar.....	44
4.6.3.1	Validação do método EC para comprimidos de cloridrato de raloxifeno.....	44
4.6.3.1.1	Especificidade.....	44
4.6.3.1.2	Linearidade, limite de detecção e limite de quantificação	46
4.6.3.1.3	Precisão.....	47
4.6.3.1.4	Exatidão.....	47
4.6.3.1.5	Robustez.....	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5.1	<i>Avaliação físico-química da matéria-prima.....</i>	<i>53</i>
5.1.1	Solubilidade	53
5.1.2	Ponto de fusão.....	53
5.1.3	Calorimetria exploratória diferencial.....	54
5.2	<i>Caracterização e identificação da matéria-prima.....</i>	<i>56</i>
5.2.1	Identificação do cloreto.....	56
5.2.2	Identificação do grupo fenol.....	56
5.2.3	Espectrofotometria na região do infravermelho.....	57
5.2.4	Espectrofotometria na região do ultravioleta.....	59
5.2.5	Cromatografia líquida de alta eficiência.....	61
5.3	<i>Ensaio de pureza da matéria-prima.....</i>	<i>62</i>
5.3.1	Determinação da umidade.....	62
5.3.2	Perda por dessecação.....	62
5.4	<i>Caracterização e identificação da forma farmacêutica.....</i>	<i>63</i>
5.4.1	Espectrofotometria na região do ultravioleta.....	63
5.4.2	Cromatografia em camada delgada.....	63
5.4.3	Cromatografia líquida de alta eficiência.....	64
5.4.4	Eletroforese capilar.....	65
5.5	<i>Análise quantitativa da matéria-prima.....</i>	<i>66</i>
5.5.1	Volumetria em meio não aquoso.....	66

5.5.1.1	Determinação da precisão do método VMNA.....	67
5.5.2	Cromatografia líquida de alta eficiência.....	68
5.5.2.1	Validação do método CLAE.....	70
5.5.2.1.1	Especificidade.....	70
5.5.2.1.2	Linearidade, limite de detecção e limite de quantificação	73
5.5.2.1.3	Precisão.....	74
5.5.2.1.4	Robustez.....	75
5.6	<i>Análise comparativa dos métodos propostos para determinação da matéria-prima de cloridrato de raloxifeno.....</i>	76
5.7	<i>Análise quantitativa da forma farmacêutica.....</i>	78
5.7.1	Espectrofotometria na região do ultravioleta.....	79
5.7.1.1	Validação do método UV para comprimido de cloridrato de raloxifeno.....	79
5.7.1.1.1	Especificidade.....	79
5.7.1.1.2	Linearidade, limite de detecção e limite de quantificação	80
5.7.1.1.3	Precisão.....	81
5.7.1.1.4	Exatidão.....	82
5.7.2	Cromatografia líquida de alta eficiência.....	83
5.7.2.1	Validação do método CLAE para forma farmacêutica comprimido.....	83
5.7.2.1.1	Especificidade.....	83
5.7.2.1.2	Linearidade, limite de detecção e limite de quantificação	86
5.7.2.1.3	Precisão.....	87
5.7.2.1.4	Exatidão.....	88
5.7.2.1.5	Robustez.....	89
5.7.3	Eletroforese capilar.....	90
5.7.3.1	Validação do método EC para comprimido.....	92
5.7.3.1.1	Especificidade.....	92
5.7.3.1.2	Linearidade, limite de detecção e limite de quantificação.....	95

5.7.3.1.3	Precisão.....	97
5.7.3.1.4	Exatidão.....	98
5.7.3.1.5	Robustez.....	98
5.8	<i>Análise comparativa dos métodos propostos para determinação do cloridrato de raloxifeno em comprimidos.....</i>	100
6	CONCLUSÃO.....	103
7	REFERENCIAS.....	107

ANEXOS

A osteoporose é definida com uma doença do esqueleto caracterizada pelo comprometimento da resistência e da qualidade óssea. É um distúrbio osteometabólico caracterizado pela diminuição da densidade mineral óssea (DMO), com deterioração da microarquitetura óssea levando a aumento da fragilidade esquelética e do risco de fraturas (NETO et al, 2002, GUARNIERO & OLIVEIRA, 2004).

As fraturas são as principais manifestações clínicas da osteoporose, sendo as mais freqüentes as de vértebras, fêmur e antebraço. A osteoporose atinge homens e mulheres, mas há predominância do sexo feminino, especialmente as mulheres que apresentam deficiência estrogênica, sendo que são elas que apresentam a maior incidência de fraturas (NETO et al, 2002).

A reposição hormonal é uma potente terapia para mulheres na pós-menopausa que estão apresentando osteoporose. Os agentes hormonais como os estrogênios e os moduladores seletivos de receptores de estrogênio (MSRE) são os medicamentos mais utilizados na atualidade para a osteoporose pós-menopausa (RUSSO, 2001, RANG et al, 2006).

O raloxifeno pertence à classe dos moduladores seletivos de receptores de estrogênio. Os fármacos pertencentes a esta classe possuem ações agonistas em alguns tecidos e antagonistas em outros. O raloxifeno possui ação agonista nos ossos e sistema cardiovascular e antagonista nos tecidos mamário e uterino (RANG et al, 2006).

Em estudos clínicos, apresentou alta eficiência no aumento da densidade mineral óssea e redução do risco de fraturas em mulheres pós-menopausa com osteoporose. Está disponível para uso na prevenção e tratamento da osteoporose em mulheres na pós-menopausa (FUCHS et al, 2006, BRUTTON et al, 2010).

O raloxifeno parece também reduzir o risco de câncer de mama invasivo assim como o tamoxifeno. Existe uma ligação entre hormônios estrogênicos e o desenvolvimento do câncer de mama. O estrogênio estimula a proliferação das

células epiteliais mamárias (KATZUNG, 2006, BRUTTON et al, 2010). No ano de 2007, foi aprovado pelo FDA para uso em mulheres na pós-menopausa com alto risco de câncer de mama invasivo (NCI, 2009). No Brasil, seu uso está aprovado desde 2009 para prevenção e tratamento da osteoporose (ANVISA, 2009).

Diversos estudos para quantificação deste fármaco em matéria-prima, forma farmacêutica e matrizes biológicas foram realizados, alguns após o início deste trabalho. Os métodos desenvolvidos são principalmente por espectrofotometria na região do visível utilizando-se de métodos de derivatização do fármaco (ANNAPURNA M et al, 2007, BASAVIAH K et al, 2009, BASAVIAH K et al, 2008, DHARUMAN et al, 2004, KALYANARUMU B & RAGHUBABU K, 2011, KALYANARUMU B et al, 2011, LIU S, 2002, PAVITHRA & SIVASUBRAMANIAN, 2009) e cromatografia líquida onde as fases móveis utilizadas constituem-se de tampões e acetonitrila (BASAVIAH et al, 2008, JANCIC-STONJANOVIC et al, 2011, KUMAR B et al, 2011, PAVITHRA & SIVASUBRAMANIAN, 2006, REDDY et al, 2006, SUNEETHA & LAKSHMAN, 2010, TRONTELJ et al, 2005, YANG Y et al, 2006, YANG Z et al, 2006).

Levando em consideração a relevância deste fármaco, a necessidade de métodos rápidos, práticos, sensíveis e de fácil execução, sendo que na literatura são sugeridos métodos espectrofotométricos que necessitam de derivatização da molécula e por CLAE que utilizam soluções tampão como fase móvel, bem como o interesse do INCT-IF no desenvolvimento de métodos para a síntese e determinação da sua qualidade, este trabalho tem por objetivo desenvolver metodologias para a análise qualitativa e quantitativa, e assim assegurar eficácia terapêutica e segurança deste produto.

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e validar metodologia para determinação qualitativa e quantitativa do fármaco cloridrato de raloxifeno matéria-prima e sua forma farmacêutica comprimidos.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a substância química de referência do fármaco através da determinação do ponto de fusão, análise térmica, solubilidade, umidade, espectrofotometria na região do infravermelho (IV), espectrofotometria na região do ultravioleta (UV), cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (EC).
- Caracterizar a matéria-prima do fármaco através da determinação do ponto de fusão, análise térmica, solubilidade e umidade.
- Identificar a matéria-prima do fármaco por espectrofotometria na região do infravermelho, espectrofotometria na região do ultravioleta e cromatografia líquida de alta eficiência
- Identificar produto farmacêutico por espectrofotometria na região do ultravioleta, cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar.
- Desenvolver e validar método para quantificar cloridrato de raloxifeno por volumetria em meio não-aquoso (VMNA) e por cromatografia líquida de alta eficiência para matéria-prima.
- Desenvolver e validar método quantitativo por UV, CLAE e EC para determinação de cloridrato de raloxifeno em comprimidos.
- Comparar estatisticamente os métodos quantitativos propostos.

A osteoporose é uma doença considerada mundialmente um problema de saúde pública que invalida ou incapacita grande número de pessoas, principalmente mulheres nas últimas décadas da vida, podendo ser considerada uma enfermidade multifatorial em que tomam parte do papel os estrógenos e outros fatores de risco como os ambientais - falta de atividade física e inadequada ingestão de cálcio (MATSUDO & MATSUDO, 1991).

A osteoporose é definida como uma doença do esqueleto que é caracterizada pelo comprometimento da resistência e qualidade do osso predispondo a um aumento do risco de fraturas. Caracteriza-se pela redução da massa e desarranjo da microarquitetura dos ossos, que resultam em fraturas com traumatismo mínimo. A definição de osteoporose também está relacionada à alteração de valores de densitometria óssea devido à perda de massa. Assim teremos: osteopenia – 1 a 2,5 desvios padrões de perda de massa óssea identificados no exame, e osteoporose quando a perda é maior que 2,5 desvios padrões. Estes dados fornecem bases para a utilização de medicamentos que aumentam a densidade mineral óssea e reduzem o risco de fraturas (RUSSO, 2001, NETO et al, 2002, GUARNEIRO & OLIVEIRA, 2004, FREITAS et al, 2006).

Os locais característicos das fraturas são os corpos vertebrais, rádio distal e fêmur proximal, mas os indivíduos osteoporóticos têm fragilidade esquelética generalizada, possuindo também fraturas em locais como costelas e ossos longos. O risco de fratura aumenta com a idade, o que tem relação tanto com o decréscimo da densidade óssea quanto com fatores como redução da força muscular e maior risco de quedas. A osteoporose pode ser idiopático quando será denominada osteoporose primária e pode ocorrer também como uma doença secundária a condições clínicas como anormalidade endócrinas, neoplasias e administração de certas medicações como os glicocorticóides ou fenitoína. Um fator importante na osteoporose primária é o declínio dos níveis de estrogênio e súbita queda da massa óssea, que, nas mulheres, se segue à menopausa (NETO et al, 2002, GUARNEIRO & OLIVEIRA, 2004).

Existem diversos fatores considerados de risco para osteoporose: sexo feminino, etnia branca ou asiática, histórico familiar, menopausa precoce inadequações alimentares, estilo de vida inadequado. Costa-Paiva e colaboradores

(2003) observaram em seu estudo um taxa de prevalência de 3,8% para osteoporose na coluna lombar e 14,7% de osteoporose no fêmur em mulheres atendidas em ambulatórios de serviços de saúde do Estado de São Paulo. Já Zanette (2003) observou prevalência de 4,9% para coluna lombar e 29,9% no fêmur analisando laudos de densitometria óssea na cidade de São Leopoldo –RS. Faisal-Curry & Zacchello (2007), em estudo realizado em São Paulo, observaram que a média de idade para mulheres com menopausa apresentando osteoporose foi de 61,6 anos. O tempo médio de menopausa apresentado por estas mulheres foi de 13,2 anos e a prevalência de osteoporose no grupo estudo foi de 32,7%. Foi associada com a osteoporose: idade, tempo de amenorréia, etnia branca e menarca tardia. Lanzillotti e colaboradores (2003) observaram em seu estudo que a ausência de terapia de reposição hormonal foi o fator de risco que indicou maior probabilidade de ocorrência de osteoporose entre as mulheres com osteopenia.

O tratamento da osteoporose é feito através de terapia de reposição hormonal e medidas gerais associadas como adequada ingestão de cálcio e atividades físicas. Visa a restaurar a força dos ossos e prevenir fraturas. Os fármacos utilizados agem diminuindo a taxa de absorção óssea, reduzindo, assim a velocidade da perda óssea ou promovendo formação do osso. O emprego de fármacos antirreabsortivos, como os bifosfonatos, o estrogênio, moduladores seletivos de receptores estrogênicos (MSRE) e calcitonina são a terapia medicamentosa mais utilizada na atualidade (LEITE, 1999, RUSSO, 2001, BRUTTON et al, 2010).

Os moduladores seletivos de receptores estrogênicos exercem ações tecido-específicas, cujo objetivo farmacológico é produzir efeitos estrogênicos benéficos em certos tecidos e atividade antagonista em outros. O raloxifeno é um modulador seletivo de receptor estrogênico com atividade agonista nos ossos e sistema cardiovascular e antagonista no tecido mamário e útero (RANG et al, 2006). Foi desenvolvido pela *Eli Lilly and Company* sendo utilizado como agente terapêutico para osteoporose em mulheres na menopausa. Comercialmente é conhecido como EVISTA® e apresenta-se na forma farmacêutica de comprimidos com dosagem de 60mg. O raloxifeno produz aumento da atividade osteoblástica e redução da atividade osteoclastica, dose-dependentes. Aumenta a densidade mineral óssea e é capaz de reduzir o risco de fraturas vertebrais de compressão em até 50%. Reduz a taxa de perda óssea e pode aumentar a massa óssea em alguns locais, sendo

aprovado, então neste contexto, para a prevenção e tratamento da osteoporose. Este fármaco possui também ações benéficas no metabolismo das lipoproteínas, reduzindo tanto o colesterol total quanto o LDL (KAYATH, 1999, TARANTA et al, 2002, FUCHS *et al*, 2004, RANG et al, 2006).

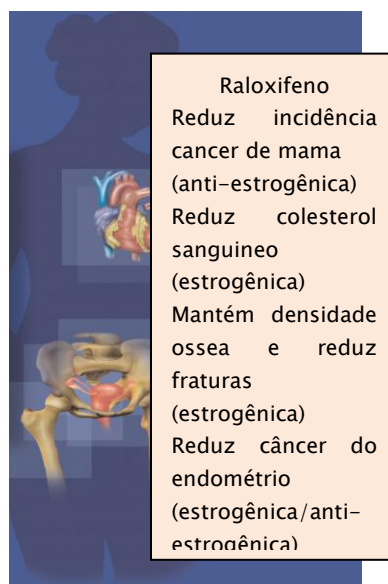


Fig 1: ações do raloxifeno nos seus locais alvos de acordo com atividade estrogênica ou anti-estrogênica (adaptado de JORDAN, 2006)

Sua seletividade tecidual ocorre devido a diversos mecanismos como diferentes receptores de estrógenos, distribuição diferencial destes receptores, diferentes co-fatores protéicos transcricionais e diferente conformação do receptor após ligação de raloxifeno. O mecanismo de ação molecular envolve alta afinidade de ligação com o receptor de estrógeno, provocando alteração conformacional na estrutura do receptor, sua dimerização e associação com elementos de resposta do DNA, sendo inclusive descritos sítios de ligação do DNA e elementos resposta específicos para o raloxifeno, distintos dos estrógenos (KAYATH, 1999, RUSSO, 2001).

O raloxifeno tem oportunidade de interagir ou com receptores de membrana estrogênicos ou como parte da cascada de sinalização de fosforilação/transdução. O formato da molécula é importante para a ligação ao receptor estrogênico alfa ou beta e produzir suas ações. Estes receptores podem produzir ações biológicas opostas baseadas no formato ou estado de fosforilação da molécula ligante. Pode haver interação com a proteína co-ativadora para induzir resposta ou com proteína

repressora que bloqueia a resposta. Também pode haver a ativação direta da região promotora dos genes ou ativação via proteína ativadora (AP-1) através de ligação proteína-proteína (JORDAN, 2006).

Pelo fato de atuarem como antagonistas estrogênicos na mama, os MSRE têm se mostrado eficazes na redução do risco de câncer de mama positivo para receptores de estrógeno (RE-positivos). O fármaco de escolha para o tratamento e prevenção de câncer de mama é o tamoxifeno. Estudos clínicos demonstraram que o raloxifeno apresenta um efeito antiproliferativo nos tumores de mama e sobre a proliferação de linhagens celulares do câncer de mama bem como reduz significativamente o risco de câncer de mama RE-positivo, porém não o RE-negativo. No principal estudo realizado com raloxifeno, o MORE, observou-se redução de risco de 76% (estatisticamente significativa) de casos de câncer de mama em mulheres na pós-menopausa com osteoporose, após três anos. Estes resultados confirmaram-se também após quatro anos (SALIH & FENTIMAN, 2002, OLIVEIRA et al, 2004, BAO et al, 2006, BRUTTON et al, 2010).

Em 2007, o raloxifeno foi aprovado pelo FDA para o uso na prevenção do câncer de mama em mulheres na pós-menopausa com osteoporose e mulheres na pós-menopausa com alto risco para câncer de mama. No STAR TRIAL, estudo clínico que compara os efeitos do raloxifeno e tamoxifeno na redução do câncer de mama em mulheres na pós-menopausa, foi demonstrado que o raloxifeno é tão efetivo quanto tamoxifeno na redução do risco de câncer de mama em 50% e obteve 36% menos indução de câncer uterino que é o evento adverso mais grave do tamoxifeno (NCI, 2009).

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres. A cada ano, cerca de 20% dos casos novos de câncer em mulheres são de mama. Apesar de ser considerado um câncer de relativamente bom prognóstico, as taxas de mortalidade por câncer de mama são elevadas no Brasil, muito provavelmente porque a doença ainda está sendo diagnosticada em estágios avançados. Na população mundial, a sobrevida média após cinco anos é de 61%, sendo que para países desenvolvidos essa sobrevida aumenta para 73%, já nos países em desenvolvimento fica em 57% (INCA, 2009).

No Brasil, o raloxifeno foi aprovado em 2009 para o tratamento e prevenção de osteoporose em mulheres na menopausa. É usado na forma de cloridrato, sendo que 60mg de cloridrato de raloxifeno correspondem a 55,71mg de base livre (ANVISA, 2009).

O raloxifeno é rapidamente absorvido no trato gastrointestinal, passando por extensa biotransformação sendo eliminado principalmente através das fezes após glicuronidação hepática. (REYNOLDS, 1999, KATZUNG, 2006, RANG et al, 2006, BRUTTON et al, 2010). Aproximadamente 60% da dose são absorvidos, mas a disponibilidade oral absoluta é de apenas 2%. (HOCKNER-CELNIKIER, 1999).

Este fármaco geralmente é bem tolerado, e seus eventos adversos mais comuns consistem em calorões e câibras nas pernas. O efeito adverso mais grave é o tromboembolismo nas pernas com incidência semelhante à terapia de reposição hormonal. A dose recomendada é de 60mg/dia oral (REYNOLDS, 1999, FUCHS et al, 2004).

É um derivado benzotiofeno não-esteróide que possui fórmula molecular [6 – hidroxí – 2 - (4 - hidroxifenil) – benzotiofen – 3 - il] - [4 - [2 - (1-piperidil)etoxi]fenil] - metadona, com massa molecular correspondente de 510,05. Apresenta-se na forma de pó esbranquiçado ou amarelado sendo fracamente solúvel em água. Possui absorção na região do ultravioleta com máximo de absorção em 287nm e absorvidade molar de 34.000 (TEETER & MEYERHOFF, 2002). Sua fórmula molecular é demonstrada na figura 2:

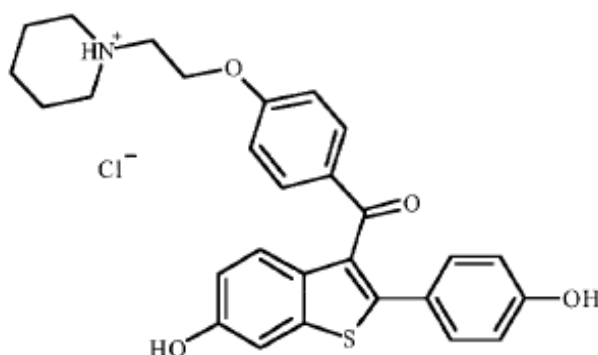


Fig. 2: estrutura molecular do cloridrato de raloxifeno

Diversos estudos relativos à análise deste fármaco estão disponíveis, tanto para matéria-prima como para produto farmacêutico e também para sua quantificação em plasma humano ou de animais. Entre os métodos desenvolvidos temos: por cromatografia líquida de alta eficiência para produto farmacêutico e plasma, espectrofotometria na região do ultravioleta ou visível para produto farmacêutico e matéria-prima e eletroforese capilar para os comprimidos. Vários destes métodos foram publicados após o início deste trabalho. Não foi encontrado na literatura método para determinação do teor por volumetria. As tabelas 1 e 2 apresentam os métodos para quantificação do cloridrato de raloxifeno encontrados na literatura.

Tabela 1: Determinação de cloridrato de raloxifeno por métodos cromatográficos tanto em forma farmacêutica quanto para matrizes biológicas

AMOSTRA	COLUNA	FASE MÓVEL	DETECÇÃO	AUTORES
Impurezas	XBRIGDE (100x3.0mm, 3.5µm)	Acetonitrila:água:dodecilsulfato de sódio (gradiente)	UV 254nm	Jancic-Stojanovic et al, 2011
Matéria-prima e comprimidos	Symmetry c18 150x4.5mm,5 µm	Tampão:acetonitrila (60:40)	UV 287nm	Kumar B et al, 2011
Matéria-prima e comprimidos	Rp c18 160x4.6mm,3 µm	Tampão fosfato:acetonitrila pH 6.8 (60:40)	UV 287nm	Suneetha & Lakshmana, 2010
Matéria-prima e comprimidos	Hypersil ODS 250x4.6mm,5 µm	Tampão acetato de amônio:acetonitrila (gradiente)	UV 287nm	Basavaiah et al, 2008
Plasma humano	Eurospher c18 120x1.1mm,5 µm Luna c18 50x2mm	Tampão acetato de amônio 10mM:acetonitrila pH4.0 (gradiente) (A)Ácido fórmico 0.1%:acetonitrila (B) Ácido fórmico 0.1%:água	UV 287nm MS	Trontelj J et al, 2007
Plasma rato	Cosmosil c18 150x4.6mm,5 µm	Tampão acetato de amônio 0.05M:acetonitrila pH 4.0 (67:33)	UV 289nm	Yang Y et al, 2006
Tecido rato	Cosmosil c18 150x4.6mm,5 µm	Tampão acetato de amônio 0.05:acetonitrila pH 4.0 (67:33)	UV 289nm	Yang Z et al, 2006

Comprimidos	Water's symmetry c18 150x4.6mm, 5µm	Água:metanol (50:50)	UV 230nm	Pavithra & Sivasubramania, 2006
Comprimidos	Inertsil c18 150x4.6mm,5 µm	Tampão fosfato:acetonitrila pH 2.0 (70:30)	UV 280nm	Reddy et al, 2006
Comprimidos	Nucleosil c18 250x4.0mm,5 µm	Tampão fosfato 50mM:acetonitrila pH 3.0 (64:36)	UV 287nm	Trontelj et al, 2005
Comprimidos e plasma humano	Capilar 50cm (eletroforese capilar de zona)	Tampão acetato 20mM pH 4.5 12kV	UV 286nm	Peres-Ruiz et al, 2004

MS – espectrometria de massas

Tabela 2: Determinação de raloxifeno por espectrofotometria em formas farmacêuticas e matéria-prima

Amostra	Condições analíticas	Deteção	Autores
Comprimidos	Reação oxidativa com 3-metil-2-benotiazolinona cloridrato (MBTH) na presença de cloreto férrico formando cor azul intensa	VIS 693nm	Kalyanaramu B & Raghubabu K, 2011
Comprimidos	Formação de cor verde escura pelo complexação com nitroprussiato de sódio na presença de hidróxido de sódio	VIS 720nm	Kalyanarumu B et al, 2011
Comprimidos e matéria-prima	Formação de cor verde pela complexação com tiocianato de cobalto que é extraído com nitrobenzeno	VIS 624,4nm	Kalyanaramu B & Raghubabu, 2011
Comprimidos e matéria-prima	A: formação de cor marrom amarelado pela reação com permanganato em meio ácido acético B: reação com excesso de permanganato em meio ácido sulfúrico e medição do permanganato não reagido	A: VIS 430nm B: VIS 550nm	Basavaiah K. et al, 2009
Comprimidos e matéria-prima	A: solvente metanol B: solvente hidróxido de sódio 0.1M C: formação de cor vermelha pela reação com nitrato férrico e 1.10-fenantrolina	A: UV 289nm B: UV 303nm C: VIS 511nm	Pavithra & Sivasubramanian, 2009
Comprimidos	A: reação com excesso de mistura de brometo e bromato em meio ácido e determinação do resíduo de bromino B: reação com rodamina B	A: VIS 655nm B: VIS 555nm	Basavaiah K et al, 2008

Comprimido e matéria-prima	A: formação de cor amarela com hidróxido de sódio B: reação com cloreto férrico e 1.10-fenantrolina formando cor amarela C: formação de cor vermelha com cloreto férrico e 2.2-bipiridil	A: VIS B: VIS C: VIS	Annapurna M et al, 2007
Comprimido e matéria-prima	A: formação de cor verde azulado pela oxidação com cloreto férrico e acoplamento com ferricianeto de potássio B: formação de cor marrom pela redução com reagente de Fehling	A: VIS 735nm B: VIS 430nm	Dharuman et al, 2004
Comprimido	Reação com Evans Blue	VIS 610nm	Liu S, 2002

UV – ultravioleta
VIS – visível

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Substância química de referência (SQR)

A substância química de referência foi adquirida através de fornecedor de fármacos para farmácias magistrais. Esta possuía teor declarado de 99,64% e estava identificada pelo fabricante pelo lote RAL/19120024 com validade de NOV/2014.

4.2 Matéria-prima

A matéria prima para obtenção da forma farmacêutica do fármaco foi também adquirida através de fornecedor de fármacos para farmácias magistrais, possuindo teor declarado 99,69% e identificado pelo fabricante pelo lote RAL/19060004 com validade de MAI/2014.

4.3 Forma Farmacêutica

Os comprimidos de Evista®, com lote A699109 e validade OUT/2011, foram fornecidos pelo INCT-IF. De acordo com a rotulagem cada comprimido deveria conter:

- 60mg de cloridrato de raloxifeno
- povidona, polissorbato 80, lactose, crospovidona, estearato de magnésio, dióxido de titânio, hidroxipropilmetilcelulose, polietilenoglicol, propilenoglicol e corante azul FD&C n° 2 com laca de alumínio como excipientes.

4.4 Análise qualitativa da matéria-prima e forma farmacêutica

4.4.1 Avaliação físico-química da matéria-prima

4.4.1.1 Solubilidade

O ensaio foi realizado conforme descrito na Farmacopéia Brasileira 5° Ed. (2010) e utilizou como solventes testados: água, ácido clorídrico 0,1M, hidróxido de sódio 0,1M, metanol, etanol, acetonitrila, dimetilformamida, diclorometano e acetato de etila.

4.4.1.2 Ponto de fusão

O ponto ou faixa de fusão foi determinado em dois equipamentos:

- Equipamento automático METTLER TOLEDO FP90, onde a amostra foi colocado em tubos capilares com 1 mm de diâmetro e 6 cm de comprimento e inseridos no equipamento. Para a calibração foram utilizados padrões com pontos de fusão próximos ao do fármaco. Os padrões utilizados foram a fenolftaleína com ponto de fusão de 262,1°C e sacarina, com ponto de fusão de 228°C.

- Platina de aquecimento Koffler (REICHERT), em que uma pequena quantidade de amostra foi adicionada entre uma lâmina e lamínula e colocada sobre um bloco metálico. A temperatura foi controlada por reostato e observada através de microscópio. O ponto de fusão foi determinado pela observação simultânea da amostra e do termômetro acoplado ao bloco metálico aquecido. Para calibração, também foram utilizados padrões de fusão, os mesmos que para o ensaio anterior. Foram realizadas três determinações do ponto de fusão.

4.4.1.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

O ponto de fusão também foi determinado por calorimetria exploratória diferencial, e assim caracterizando o fármaco por esta técnica. O experimento foi realizado no Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Farmacêutica (CDTF) da Faculdade de Farmácia (UFRGS). O equipamento utilizado foi SHIMADZU DSC-60 acoplado a integrador THERMAL ANALYZER TA-60WS e ao controlado de fluxo FC-60A, sob atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de 50mL/min e velocidade de aquecimento de 10°C/min até 300°C.

4.4.2 Caracterização e identificação da matéria-prima

4.4.2.1 Identificação do cloreto

A fim de identificar presença de cloreto na amostra, uma solução etanólica concentrada de cloridrato de raloxifeno foi preparada pesando-se aproximadamente 5,0 mg e dissolvendo em 1,0 mL de etanol. Esta solução, primeiramente acidificada com algumas gotas de ácido nítrico, foi tratada com nitrato de prata SR. Um precipitado branco caseoso insolúvel em ácido nítrico, mas solúvel em ligeiro excesso de hidróxido de amônio 6M é formado quando da presença de cloreto.

4.4.2.2 Identificação de grupo fenol

Para identificar grupo fenol na amostra, foi realizado o ensaio de complexação com cloreto férrico. Pesaram-se aproximadamente 30mg de cloridrato de raloxifeno e adicionou-se 1,0 mL de água e 1,0 mL de solução de cloreto férrico. Como a amostra se demonstrou insolúvel em água, foi adicionado 1,0 mL de etanol. O aparecimento de coloração azul, verde ou violeta caracteriza a presença de grupo fenol. A solução de cloreto férrico foi preparada pesando-se 5,4 g de cloreto férrico III e dissolvendo-se em 100mL de água. Para eliminar excesso de ácido desta solução, 4-5 gotas de amônia diluída foram adicionadas.

4.4.2.3 Espectrofotometria na região do infravermelho

O espectro de absorção na região do infravermelho foi obtido utilizando-se pastilhas de brometo de potássio contendo cloridrato de raloxifeno. As pastilhas foram analisadas em espectrofotômetro PerKinElmer FT-IR SYSTEM modelo Spectrum BX.

4.4.2.4 Espectrofotometria na região do ultravioleta

Os espectros na região do ultravioleta foram obtidos em espectrofotômetro SHIMADZU UV-1601PC. Foram utilizadas cubetas de quartzo com 1,0cm de percurso óptico e as leituras foram realizadas entre 400 e 200nm. Para obtenção dos espectros, foram preparadas soluções com concentração definida de 7,5µg/mL nos seguintes solventes: metanol, ácido clorídrico 0,1M e hidróxido de sódio 0,1M. Os espectros de SQR e matéria-prima foram comparados.

4.4.2.5 Cromatografia líquida de alta eficiência

A identificação do cloridrato de raloxifeno foi determinada através do seu tempo de retenção, comparando-se os tempos de retenção da SQR e da matéria-prima. O equipamento utilizado foi o cromatógrafo a líquido SHIMADZU LC-20AT PROMINANCE, equipado com detector UV-VIS SPD-10A e detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M10AVP, degaseificador DGU-14A, central de controle FCV-10A_{VP} e injetor manual. A aquisição e análise de dados foram realizados através do software LC SOLUTIONS. O sistema cromatográfico utilizado, que após testes demonstrou-se ser o ideal, foi: coluna NST C18 de fase reversa 250 x 4,6mm (5µm), fase móvel composta de acetonitrila, água e trietilamina (67:33:0,3 v/v) pH 3,5 (corrigido com ácido fosfórico 20%), fluxo de 1,0mL/min, volume de injeção de 20µl e detecção em 287nm. As amostras foram preparadas na concentração de 10µg/mL.

4.3 Ensaio de pureza da matéria-prima

4.4.3.1 Determinação da umidade

A determinação da umidade foi realizada através de método volumétrico pelo processo de Karl-Fisher em instrumento com determinação coulométrica. Foram pesadas duas amostras de 200 mg e inseridas no equipamento até obtenção do teor de umidade. Foram realizados brancos e estes utilizados no cálculo de umidade das amostras.

4.4.3.2 Perda por dessecação

O procedimento foi realizado de acordo com o descrito pela Farmacopéia Brasileira 5^o Ed. Foi pesado aproximadamente 1,0 g de amostra e transferido para um pesa-filtro previamente dessecado e pesado. O pesa-filtro pesado e contendo a amostra foi levado a estufa sem tampa em temperatura de 105°C por um prazo de 2h. Após este tempo, o pesa-filtro foi retirado da estufa e esfriado à temperatura ambiente em dessecador. Depois do resfriamento, este foi pesado e a porcentagem de perda por dessecação é dada pela seguinte equação:

$$\frac{P_u - P_s}{P_a} \times 100 \text{ (Eq. 1)}$$

P_a

P_a = peso da amostra

P_u = peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da dessecação

P_s = peso do pesa-filtro contendo amostra após a dessecação

4.4.4 Caracterização e identificação da forma farmacêutica

4.4.4.1 Espectrofotometria na região do ultravioleta

O procedimento foi realizado conforme descrito para análise da SQR e matéria prima, sendo que na obtenção da solução da amostra, os comprimidos foram pesados e triturados em gral de porcelana. A partir do peso dos comprimidos, foi pesado o equivalente a 150 mg de raloxifeno e diluído com metanol em balão volumétrico de 100 mL. Alíquota de 1,0 mL foi transferida para balão volumétrico de 20 mL e volume foi completado com metanol. As soluções foram filtradas para eliminar resíduos de revestimento do comprimido em papel filtro. Os espectros obtidos foram comparados aos da SQR para sua identificação.

4.4.4.2 Cromatografia em camada delgada

Para identificação do cloridrato de raloxifeno nos comprimidos diversos sistemas eluentes foram testados como sistema cromatográfico até chegar ao eluente ideal. Os cromatogramas foram desenvolvidos em placas de alumínio cobertas com gel de sílica 60 F₂₅₄ Merck. As placas foram reveladas em luz UV a 254nm e também com vapores de iodo para medição dos fatores de retenção (Rf). As soluções para o ensaio foram preparadas pesando-se 10mg de cloridrato de raloxifeno SQR e comprimidos, assim como citrato de tamoxifeno SQR e dissolvendo-se em 10 mL de metanol com concentração final de 1,0 mg/mL. A aplicação nas placas foi de 5µl e o tamanho das placas foi de 10x5cm (NETO & NUNES, 2003). A eluição das placas foi feita em cubas contendo 0,5cm de eluente e revestidas com papel-filtro. Foi marcado 1,0cm em cada extremidade das placas para marcar a corrida cromatográfica. O sistema eluente ideal se demonstrou ser metanol:acetona (50:50 v/v).

4.4.4.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A solução para caracterização dos comprimidos foi preparada conforme descrito para caracterizar a matéria-prima, sendo que foi realizada filtração da amostra para retirada de resíduos de excipiente. Os tempos de retenção observados nos cromatogramas foram comparados aos obtidos para a SQR.

4.4.4.4 Eletroforese capilar (EC)

Para identificação do cloridrato de raloxifeno comprimido foi investigada sua migração e a influência dos seguintes parâmetros: natureza e concentração do tampão utilizado, pH e voltagem utilizada no tempo de migração, simetria do pico e eficiência do método. Este ensaio foi realizado em equipamento AGILENT^{3D} CE (Agilent Technologies, Alemanha) equipado com auto-injetor, detector UV com arranjo de diodos e alimentação de até 30 kV. A análise e aquisição de dados foram obtidos através de software CE Chemstation. Após diversos testes, o sistema de análise ideal foi: capilar de sílica fundida 48,5 cm (40 cm efetivos, 50 µm de diâmetro interno), tampão de corrida consistindo de ácido bórico 35 mM e dodecilsulfato de sódio (SDS) 50 mM pH 8,8 (corrigido com hidróxido de sódio 0,1M), voltagem aplicada de 25 kV, temperatura de análise 32°C, detecção em 280nm, injeção de 45 mBar em 4s e como padrão interno diclofenaco de potássio 200 µg/mL. As soluções amostra obtidas a partir dos comprimidos foram filtradas e preparadas na concentração de 80 µg/mL dissolvidos na solução tampão de corrida. Os tempos de migração foram comparados aos obtidos com a SQR.

4.5 *Análise quantitativa da matéria prima*

4.5.1 Volumetria em meio não-aquoso (VMNA)

A solução titulante utilizada foi o ácido perclórico 0,05M. Foram utilizados como solventes da amostra mistura de anidrido acético:ácido acético (50:50 v/v). O cloridrato de raloxifeno sendo um sal de amina terciária, sua titulação geralmente se

dá com ácido perclórico diluído em ácido acético. O anion cloreto presente na molécula é uma base muito fraca para reagir com a solução titulante, é sugerido então a utilização de mistura de ácido acético e anidrido acético como solventes para o doseamento, sendo que anion cloreto é substituído produzindo uma base forte em solução e passível de reação quantitativa (FB, 2010, JP, 2009, USP, 34).

O método foi desenvolvido e validado por duas técnicas: uso de indicador e potenciometria para indicação do ponto final da determinação. O indicador utilizado foi o cloreto de metilrosanílinio (cristal violeta) que se demonstrou mais adequado ao método.

A relação estequiométrica da reação foi determinada e foi verificado que 1,0 mL de ácido perclórico 0,05M reagia com 51,0 mg de cloridrato de raloxifeno. As determinações foram realizadas com potenciômetro DENVER INSTRUMENT UB-10 pH/MV METER ULTRABASIC e o eletrodo utilizado foi eletrodo para volumetria em meio não-aquoso modelo V640 ANALION.

4.5.1.1 Determinação da precisão do método VMNA para matéria-prima

Foram pesadas exatamente seis amostras de cerca de 150 mg de cloridrato de raloxifeno matéria-prima em béqueres de 150 mL. A estes béqueres foram adicionados 75 mL da mistura de solventes anidrido acético:ácido acético (50:50 v/v) a qual foi aquecida com agitação até total dissolução das amostras. Após a dissolução, as soluções foram resfriadas à temperatura ambiente, duas gotas do indicador cristal violeta foram adicionadas e o eletrodo posicionado. Foram procedidas titulações utilizando mistura de solvente da amostra para determinação do branco do ensaio. Os testes foram realizados em três dias consecutivos.

Os teores das amostras foram calculados a partir da seguinte equação:

$$\% = 100 (n-n') \text{ mEq/p} \quad (\text{Eq. 2})$$

p = tomada da amostra

n = volume em mL de ácido perclórico gasto com a amostra

n' = volume em mL de ácido perclórico gasto com o branco

mEq = equivalente da amostra

O ácido acético glacial apresenta variações do volume em função do coeficiente temperatura dependente, sendo assim foi considerado nos cálculos de teor da amostra o coeficiente de expansão do ácido acético glacial, que é determinado através da seguinte equação:

$$v_t = v \cdot [1 + (t_1 - t_2) \cdot 0,0011] \text{ (Eq. 3)}$$

t₁ = temperatura na padronização do ácido perclórico

t₂ = temperatura em que ocorreu o doseamento

v_t = volume corrigido

v = volume de ácido perclórico gasto no doseamento

Também foi considerado nos cálculos de teor das amostras, o título do ácido perclórico utilizado. Antes de ser utilizado nos doseamentos, este titulante foi padronizado com biftalato de potássio, e com o título obtido, um fator de correção foi calculado e utilizado para calcular o teor do fármaco.

A precisão intradia foi avaliada pelos desvios padrões relativos da média das seis determinações. A precisão interdias foi avaliada através do desvio padrão relativo obtido nos três dias de análise.

4.5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A quantificação da matéria-prima de cloridrato de raloxifeno foi realizada em um cromatógrafo a líquido SHIMADZU LC-20AT PROMINANCE equipado com detector UV-VIS SPD-10AVA_{VP}, central de controle COMUNICADOR BUS MODULE

CBM-20A, auto-injetor AUTOSAMPLER SIL-20A, forno para coluna CTO-20A. A aquisição e análise dos dados foram feitos através de aplicativo CLASS-VP.

Foram realizados ensaios preliminares para selecionar os melhores parâmetros para determinação da matéria-prima e validação do método. Os parâmetros utilizados são:

- coluna NST C18 de fase reversa 250 x 4,6mm (5 μ m),
- como fase móvel mistura de água:acetonitrila:triethylamina (67:33:0,3 v/v) pH 3,5 (corrigido com ácido fosfórico 20%),
- fluxo da fase móvel de 1,0 mL/min,
- volume de injeção de 20 μ l,
- detecção de 287nm,
- temperatura de análise de 30°C.

Em todas as análises, foram utilizados reagentes com grau CLAE de pureza e água ultrapura obtida por sistema MILI-Q PLUS (Milipore®).

4.5.2.1 Validação do método CLAE para quantificação da matéria-prima

Para a validação do método foram avaliados os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, precisão e robustez.

4.5.2.1.1 Especificidade

Para determinar se método por CLAE era específico, amostra de cloridrato de raloxifeno matéria-prima sofreu degradação forçada através de hidrólise alcalina, hidrólise ácida, oxidação, fotólise e degradação térmica, e assim foi avaliada a interferência dos possíveis produtos de degradação na análise. As condições de stress aqui determinados para serem utilizadas foram baseadas em dissertação de

colegas anteriores a este trabalho (Dias, Carolina L., 2006 e Rossi, Rossi, Rochele C., 2006).

Solução-mãe com concentração de 1,0 mg/mL foi preparada pesando-se 50mg de cloridrato de raloxifeno MP em balão volumétrico de 50mL e dissolvendo-se com metanol. Após dissolução, o volume foi completado com este mesmo solvente. A partir desta solução-mãe, foram retiradas alíquotas para o preparo das soluções submetidas às condições forçadas de degradação. A toda solução submetida à degradação, uma solução branco sem adição da amostra, também foi submetida ao mesmo processo de degradação. Uma solução de cloridrato de raloxifeno MP foi mantida em condições normais sem que fosse degradada.

Os picos cromatográficos obtidos foram analisados quanto à sua pureza através de detector com arranjo de diodos (DAD). Os resultados foram comparados com os da solução branco e a solução não submetida às condições de degradação. O preparo das soluções analisadas nas condições de degradação às quais foram submetidos é descrito a seguir:

Hidrólise ácida: a partir da solução-mãe, uma alíquota de 1,0 mL foi retirada e transferida para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com ácido clorídrico 1M. Esta solução foi deixada em repouso por 24h. Após este período, 1,0 mL da solução foi transferido para balão volumétrico de 10 mL e neutralizou-se com hidróxido de sódio 1M. O volume foi completado com a fase móvel utilizada nas análises. A solução branco foi preparada nestas mesmas condições.

Hidrólise alcalina: foi transferido 1,0 mL da solução mãe para balão volumétrico de 10 mL. O volume deste balão foi completado com hidróxido de sódio 1M e deixado em repouso por 24h. Após este período, uma alíquota de 1,0mL foi retirada e transferida para balão volumétrico. Esta alíquota foi neutralizada com ácido clorídrico 1M e o volume foi completado com fase móvel. Preparou-se o branco nas mesmas condições.

Oxidação: 1,0 mL da solução mãe foi transferido para balão volumétrico de 10 mL. O volume foi completado com peróxido de hidrogênio 3%. Após período de 24h de repouso da solução, alíquota de 1,0 mL foi retirado para balão volumétrico de 10 mL

e o volume completado com fase móvel. A solução branco foi preparada nas mesmas condições.

Degradação térmica: foi transferido 1,0 mL da solução mãe para balão volumétrico e o volume foi completado com metanol. Esta solução foi levada à estufa a 80°C por 24h. Transferiu-se 1,0 mL desta solução após as 24h para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com fase móvel. A solução branco recebeu o mesmo tratamento.

Fotólise: transferiu-se 1,0 mL da solução mãe para um cubeta de quartzo (UV-CUVETTE, MICRO-BRAND). Esta solução foi deixada a exposta à lâmpada de radiação luz UV a 352nm (Black Light Blue Lamp Orion UV-A, 30W, 130V, $1,26 \times 10^{-3}$ watts/cm²) em câmara espelhada (100x16x16) por 24h. Após este período, transferiu-se toda a solução para um balão volumétrico de 10 mL e volume foi completado com fase móvel. A solução branco recebeu o mesmo tratamento.

4.5.2.1.2 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada a partir da construção de curvas de calibração com sete níveis de concentração por três dias consecutivos. A curva padrão foi obtida a partir das áreas dos picos em função das concentrações das soluções correspondentes nos diferentes dias em que ocorreu a análise. Pelas curvas de calibração desenvolvidas, a equação da reta e o coeficiente de correlação (r) foram determinados. A linearidade foi verificada pela análise estatística da regressão, correlação e cálculo da análise de variâncias (ANOVA).

Foram pesados 10 mg de cloridrato de raloxifeno SQR e transferidos para balão volumétrico de 100 mL e diluídos com a mistura de solvente água:acetonitrila (60:40 v/v). O volume foi completado e a partir desta solução foram preparadas as soluções para traçar a curva. Alíquotas foram retiradas correspondendo as concentrações a serem utilizadas e transferidas para balão volumétrico de 20 mL. O volume foi completado com fase móvel do método. As alíquotas retiradas e as respectivas concentrações foram as seguintes:

➤ 0,8mL (4,0 µg/mL)

➤ 1,2mL (6,0 µg/mL)

- 1,6mL (8,0 µg/mL)
- 2,0mL (10,0 µg/mL)
- 2,4mL (12,0 µg/mL)
- 2,8mL (14,0 µg/mL)
- 3,2mL (16,0 µg/mL)

Para maior precisão das alíquotas, foi utilizado bureta de 10,0 mL.

4.5.2.1.3 Precisão

A precisão do método foi avaliada pela determinação do teor de seis soluções de cloridrato de raloxifeno matéria-prima com a mesma concentração por três dias consecutivos. A precisão intra e interdias foi verificada e avaliada pelo cálculo do desvio padrão relativo (DPR) das médias das determinações das amostras. Todas as leituras foram feitas em triplicatas e as médias das leituras utilizadas nos cálculos.

Para isso, foram pesados 10 mg de cloridrato de raloxifeno MP e transferidos para balão volumétrico de 100 mL. Foi adicionado como solvente para dissolução mistura de água:acetonitrila (60:40 v/v) e completado o volume com este mesmo solvente. Uma alíquota de 2,0 mL foi retirada e transferida para balão volumétrico de 20 mL e o volume foi completado com fase móvel do método e homogeneizado obtendo concentração final de 10,0 µg/mL. A solução de SQR foi preparada nas mesmas condições obtendo concentração similar.

A concentração das amostras (c_a) foi calculada de acordo com a equação abaixo:

$$C_a = \frac{(A_a \cdot C_{SQR})}{A_{SQR}} \quad (\text{Eq.5})$$

C_a = concentração da amostra em µg/mL

A_a = área absoluta do pico obtida para a solução

C_{SQR} = concentração da solução de SQR

A_{SQR} = área absoluta do pico para solução de SQR

4.5.2.1.4 Robustez

A robustez do método cromatográfico foi verificada avaliando parâmetros variados como: coluna de marca diferente da atualmente utilizada, vazão da fase móvel, proporção da fase móvel, pH e temperatura de análise. Foram considerados para analisar a robustez o tempo de retenção, pratos teóricos e assimetria do pico.

Soluções de 10,0 µg/mL de SQR e matéria-prima foram injetadas e todos os parâmetros foram variados, de forma não concomitante, em até 0,5% para mais ou para menos.

Também foram considerados na avaliação da robustez os DPR obtidos entre as injeções para cada condição analítica testada e os teores de recuperação calculados a partir do teor obtido com o método proposto, sendo este considerado 100%, e assim, calculadas as recuperações para cada parâmetro modificado e analisado. Se os teores de recuperação não variaram de $\pm 5\%$ o método é considerado robusto.

4.6 Análise quantitativa do produto farmacêutico

4.6.1 Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)

Para quantificar cloridrato de raloxifeno em comprimidos, o equipamento utilizado foi SHIMADZU UV-1601PC, sendo as análises realizadas em cubetas de quartzo com 1,0cm de percurso óptico. Diversos testes foram conduzidos a fim de selecionar os melhores parâmetros visando a verificar o cumprimento da Lei de Lambert-Beer. O comprimento de onda selecionado para determinação de teor foi de 284nm e o solvente que se demonstrou mais adequado foi o metanol. As soluções das amostras foram preparadas neste solvente e submetidas à análise, utilizando o metanol como branco.

4.6.1.1 Validação do método UV para a forma farmacêutica comprimido

O método de UV para quantificar comprimidos de cloridrato de raloxifeno foi validado com relação aos parâmetros de especificidade, linearidade, precisão e exatidão.

4.6.1.1.1 Especificidade

Uma solução placebo contendo os excipientes da formulação do cloridrato de raloxifeno comprimidos foi preparada a fim de avaliar a interferência destes na quantificação do fármaco. O preparo da solução placebo foi feito a partir dos excipientes descritos na bula deste medicamento:

- Povidona (3%)
- Polissorbato 80 (0,5%)
- Lactose 70% (qs)
- Crospovidona (2%)
- Estearato de magnésio (0,5%)
- Dióxido de titânio (0,1%)
- Hidroxipropilmetilcelulose (3%)
- Polietilenoglicol (0,1%)
- Propilenoglicol (0,1%)

A concentração de cada excipiente utilizado foi estimada com base nas informações do *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (2009). A partir do peso médio de 20 comprimidos (252,73 mg), foi estimado o conteúdo referente aos excipientes. Foram preparados 500mg da mistura de excipientes, e a partir desta pesada quantidade da mesma correspondente a 15 mg de cloridrato de raloxifeno; a mistura foi diluída em metanol. A solução foi transferida para balão volumétrico de 100 mL e completado o volume com o mesmo solvente. Foi retirada alíquota de 1,0 mL e transferida para balão volumétrico de 20 mL. O volume foi completado com metanol e esta solução filtrada. A solução de SQR, na concentração de 7,5 µg/mL também foi preparada em metanol.

As soluções foram analisadas separadamente, e posteriormente os espectros foram sobrepostos e avaliados.

4.6.1.1.2 Linearidade, limite de detecção e limite de quantificação

A linearidade do método UV foi avaliada através da construção de curvas padrão em sete níveis de concentração em três dias diferentes. A partir destas curvas foram calculados as equações da reta e os coeficientes de correlação. A linearidade foi verificada através de métodos estatísticos como análise da variância (ANOVA), regressão e correlação.

Uma solução de cloridrato de raloxifeno SQR com concentração de 150 µg/mL foi preparada, e a partir desta retiradas, com auxílio de bureta, alíquotas de 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,2, 1,4 e 1,6 mL e transferidas para balões volumétricos de 20 mL, sendo o volume completado com metanol e perfazendo concentrações de 3,0, 4,5, 6,0, 7,5, 9,0, 10,5, 12,0 µg/mL. As leituras foram realizadas em triplicata e as curvas padrão obtidas a partir das absorvâncias das soluções em função das concentrações correspondentes.

Os limites de detecção e de quantificação foram estimados através da seguinte equação de acordo com Resolução RE nº 899/2003 (Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos), sendo que o limite de detecção é estimado com relação de três vezes o ruído da linha de base e o limite de quantificação com relação de 10 vezes o ruído da linha de base,

$$LD = DP\alpha \times 3/IC \text{ (Eq. 6)} \quad LQ = DP\alpha \times 10/IC \text{ (Eq. 7)}$$

LD – limite de detecção

LQ – limite de quantificação

DP α – desvio padrão do intercepto com eixo Y de, no mínimo, três curvas de calibração

IC – inclinação da curva de calibração

4.6.1.1.3 Precisão

Para o preparo da solução mãe dos comprimidos foi pesado o equivalente a 15 mg de cloridrato de raloxifeno a partir do peso médio dos comprimidos, e transferido para balão volumétrico de 100 mL. Foi adicionado metanol e sonicado por 10 min para dissolução. O volume foi completado com metanol e esta solução filtrada com papel filtro. Alíquotas de 0,8, 1,0 e 1,2 mL foram transferidas para balões volumétricos de 20 mL completando o volume com metanol para obter as concentrações de 6,0, 7,5 e 9,0 µg/mL de cloridrato de raloxifeno. Solução de SQR foi preparada na concentração de 7,5 µg/mL e metanol foi utilizado como branco.

As leituras foram realizadas em triplicata e por três dias consecutivos. A precisão intra e interdias foi avaliada através do desvio padrão relativo (DPR) das médias das leituras das amostras. A concentração das amostras (µg/mL) foi calculada de acordo com a equação:

$$C_a = \frac{A_a \cdot C_{SQR}}{A_{SQR}} \quad (\text{Eq.8})$$

C_a = concentração da amostra em µg/mL

A_a = área absoluta do pico obtida para a solução

C_{SQR} = concentração da solução de SQR

A_{SQR} = área absoluta do pico para solução de SQR

4.6.1.1.4 Exatidão

A exatidão do método UV foi verificada pela análise de soluções de cloridrato de raloxifeno comprimido, onde foi adicionada quantidade definida de SQR e avaliadas quanto à recuperação da amostra.

Foi, então, preparada solução de SQR pesando-se 10 mg de cloridrato de raloxifeno SQR em balão volumétrico de 100 mL. Metanol foi adicionado para dissolução e o volume foi completado. A solução de comprimidos foi preparada

pesando-se o equivalente a 10mg de cloridrato de raloxifeno em balão volumétrico de 100 mL. Foi adicionado metanol e levado à sonicação (10 min) para dissolução. O volume foi completado e a solução foi filtrada. Alíquotas de 0,8 mL foram transferidas para balões volumétricos de 20 mL. A estes balões, foram adicionadas alíquotas de 0,4, 0,7 e 1,0 mL, sendo que um balão permaneceu sem adição de alíquotas (4,0 µg/mL). O volume foi completado com metanol. Solução de SQR na concentração de 7,5 µg/mL foi preparada e metanol foi utilizado como branco.

As soluções de análise foram denominadas SR0, SR1, SR2 e SR3 estão esquematizadas no quadro abaixo:

Quadro 1 - Preparo das soluções para teste de exatidão e recuperação por UV

Solução	Volume de solução de amostra (mL)	Volume de solução de SQR (mL)	Concentração final da amostra (µg/mL)
SR0	0,8	—————	4,0
SR1	0,8	0,4	6,0
SR2	0,8	0,7	7,5
SR3	0,8	1,0	9,0

As leituras foram realizadas em triplicata, e cálculo do teor de recuperação é feito a partir da equação abaixo:

$$R\% = \frac{R_x - C_a}{C_p} \cdot 100 \quad (\text{Eq. 9})$$

R% = porcentagem de recuperação

R_x = concentração da solução contendo o fármaco e SQR ($\mu\text{g/mL}$)

C_a = concentração da solução amostra ($\mu\text{g/mL}$)

C_p = concentração da solução SQR ($\mu\text{g/mL}$)

4.6.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O teor de cloridrato de raloxifeno nos comprimidos foi determinado por método CLAE. O equipamento utilizado foi mesmo que para quantificação da matéria prima, assim como os parâmetros selecionados para a análise.

4.6.2.1 Validação do método CLAE para quantificação de comprimidos de cloridrato de raloxifeno

O método foi validado quanto aos parâmetros especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez.

4.6.2.1.1 Especificidade

A interferência dos excipientes da formulação e de possíveis produtos de degradação foi avaliada para verificar se método CLAE é específico para quantificação de cloridrato de raloxifeno em comprimidos.

Uma solução placebo contendo os excipientes da formulação foi preparada. As concentrações de cada excipiente foram baseadas na literatura (*Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 2009) e calculadas partir do peso médio dos comprimidos. A partir de mistura de excipientes preparada conforme descrito no item 4.6.1.1.1 (especificidade método UV para comprimido), foi pesado o equivalente a 10 mg de cloridrato de raloxifeno e transferido para balão de 100 mL adicionando-se 20 mL da mistura de solvente acetonitrila:água (60:40 v/v). Esta solução foi sonicada por 10 min, e após dissolução completado o volume com os mesmos solventes. A

partir desta solução, 2,0 mL foram retirados e transferidos para balão volumétrico de 20 mL e volume foi completado com fase móvel do método.

Os comprimidos foram submetidos a processo de degradação forçada com o objetivo de formação de produtos de degradação. As condições às quais os mesmos foram submetidos são: hidrólise ácida, hidrólise alcalina, oxidação, fotólise e degradação térmica. Todas as soluções preparadas foram submetidas à degradação por período de 24h. Foram preparadas: uma solução em branco que também era submetida à degradação, uma solução com a amostra e também uma solução contendo amostra que foi mantida em condição ambiente, sendo que as soluções contendo amostra partiram de solução-mãe com concentração de 1,0 mg/mL do fármaco. O preparo das soluções, condições de degradação e parâmetros de análise estão descritos no item 4.5.2.1.1 para especificidade do método CLAE para matéria-prima.

4.6.2.1.2 Linearidade, limite de detecção e limite de quantificação

Foram construídas curvas padrão com sete níveis de concentração para verificar linearidade do método CLAE. A partir destas curvas foram calculados a equação da reta e o coeficiente de correlação (r). Métodos estatísticos foram utilizados como regressão, correlação e análise da variância (ANOVA) para determinar se o método era linear.

A partir de uma solução de cloridrato de raloxifeno SQR com concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, foram retiradas, com auxílio de bureta, alíquotas de 0,8, 1,2, 1,6, 2,0, 2,4, 2,8, 3,2 mL e transferidos para balões volumétricos de 20 mL e volume foi completado com fase móvel do método, perfazendo concentrações de 4,0, 6,0, 8,0, 10,0 12,0, 14,0, 16,0 $\mu\text{g/mL}$. Todas as corridas cromatográficas foram realizadas em triplicata para cada solução. As curvas padrões, obtidas a partir das médias das áreas absolutas em função das concentrações das soluções respectivas, foram realizadas em três dias diferentes.

Os limites de detecção e de quantificação foram estimados através da seguinte equação de acordo com Resolução RE nº 899/2003 (Guia para validação

de métodos analíticos e bioanalíticos), sendo que o limite de detecção é estimado com relação de três vezes o ruído da linha de base e o limite de quantificação com relação de 10 vezes o ruído da linha de base,

$$LD = DP\alpha \times 3/IC \text{ (Eq. 10)} \quad LQ = DP\alpha \times 10/IC \text{ (Eq. 11)}$$

LD – limite de detecção

LQ – limite de quantificação

DP α – desvio padrão do intercepto com eixo Y de, no mínimo, três curvas de calibração

IC – inclinação da curva de calibração

4.6.2.1.3 Precisão

A precisão foi verificada pela análise de seis amostras de cloridrato de raloxifeno comprimido com mesma concentração e avaliados os desvios padrões relativos (DPRs) das determinações.

Foi pesado o equivalente a 10 mg de cloridrato de raloxifeno comprimidos em balão volumétrico de 100 mL, adicionando-se 20 mL da mistura de água:acetonitrila (60:40 V/V) e levado a sonicação (10 min) para dissolução. Após, o volume foi completado com esta mistura de solventes, filtrando com papel filtro, posteriormente. A partir desta solução com concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, alíquota de 2,0 mL foi transferida para balão volumétrico de 20 mL e o volume completado com fase móvel do método. Solução de SQR de cloridrato de raloxifeno foi preparada na concentração de 10,0 $\mu\text{g/mL}$.

As determinações foram realizadas em triplicata em três dias diferentes. A concentração das amostras foi calculada a partir da equação abaixo:

$$C_a = \frac{(A_a \cdot C_{SQR})}{A_{SQR}} \quad (\text{Eq.12})$$

C_a = concentração da amostra ($\mu\text{g/mL}$)

A_a = absorvância da amostra

C_{SQR} = concentração da solução de SQR ($\mu\text{g/mL}$)

A_{SQR} = absorvância da solução de SQR

Os DPRs das médias das determinações foram calculados para avaliar a precisão intra e interdias.

4.6.2.1.4 Exatidão

Teste de recuperação, onde uma quantidade definida de SQR é adicionada à solução amostra, foi realizado para verificar a exatidão do método CLAE de quantificação para comprimidos de cloridrato de raloxifeno.

Solução com concentração de $100 \mu\text{g/mL}$ foi preparada a partir dos comprimidos e filtrada com papel filtro. A partir desta, alíquotas de $1,0 \text{ mL}$ foram retiradas e transferidas para balões volumétricos de 20 mL . Foram também adicionados aos balões, alíquotas de $0,6$, $1,0$ e $1,4 \text{ mL}$ da solução de SQR ($100 \mu\text{g/mL}$). Uma solução permaneceu sem adição de alíquota de SQR e o volume foi completado com fase móvel. O quadro abaixo demonstra o preparo das soluções:

Quadro 2 - Preparo das soluções para teste de exatidão e recuperação por CLAE para comprimidos

Solução	Volume comprimido (mL)	Volume SQR (mL)	Concentração final ($\mu\text{g/mL}$)
SR0	1,0	_____	5,0
SR1	1,0	0,6	8,0

SR2	1,0	1,0	10,0
SR3	1,0	1,4	12,0

As soluções foram denominadas SR0, SR1, SR2 E SR3. Todas as determinações foram realizadas em triplicata e o teor de recuperação foi calculado de acordo com a equação:

$$R\% = \frac{R_x - C_a}{C_o} \cdot 100 \quad (\text{Eq. 13})$$

R% = porcentagem de recuperação

R_x = concentração da solução contendo o fármaco e SQR (µg/mL)

C_a = concentração da solução amostra (µg/mL)

C_p = concentração da solução SQR (µg/mL)

4.6.2.1.5 Robustez

A robustez do método foi avaliada quanto aos seguintes parâmetros: coluna de marca diferente da utilizada, vazão da fase móvel, proporção das quantidades da fase móvel, pH e temperatura de análise.

Soluções com concentração de 10,0 µg/mL de SQR e de fármaco nos comprimidos foram preparadas e analisadas frente às variações das condições do método. Foram considerados para análise da robustez: tempo de retenção, assimetria do pico e número de pratos teóricos. Também foram considerados os DPRs obtidos entre as injeções para cada condição analítica e a recuperação obtida para cada parâmetro modificado, sendo 100% o teor obtido com o método proposto.

4.6.3 Eletroforese capilar (EC)

Diversas condições foram testadas para desenvolver método de quantificação de cloridrato de raloxifeno em comprimidos por EC. Os parâmetros que se demonstraram ideais são os citados na identificação dos comprimidos (item 4.4.4.4).

A técnica de eletroforese utilizada foi a eletroforese capilar micelar (*MECC - micellar electrokinetic capillary chromatography*), e dadas as peculiaridades da técnica, foi necessário o uso de padrão interno para realizar as determinações de teor. O equipamento utilizado foi o AGILENT^{3D} CE (Agilent Technologies, Alemanha) equipado com auto-injetor, detector UV com arranjo de diodos e alimentação de até 30kV. A análise e aquisição de dados foram obtidas através de software CE Chemstation.

4.6.3.1 Validação do método EC para comprimidos de cloridrato de raloxifeno

O método EC foi validado através dos seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez.

4.6.3.1.1 Especificidade

A avaliação da interferência dos excipientes da formulação foi verificada pela análise de solução placebo contendo os excipientes presentes na formulação do comprimido. A solução placebo foi preparada a partir de mistura de excipientes previamente pronta e descrita no item 4.6.1.1.1 para especificidade de método UV para matéria prima. Desta mistura de excipientes, foi pesado o equivalente 10 mg de cloridrato de raloxifeno em balão volumétrico de 10 mL. Foi adicionado metanol como solvente e levado a sonicação (10 min). Após dissolução, o volume foi completado com metanol e alíquota de 0,8 mL foi transferida para balão volumétrico de 10 mL e volume foi completado com solução tampão de corrida para realizar as leituras.

Uma solução de cloridrato de raloxifeno comprimido foi preparada com concentração de 2,5 mg/mL. A partir desta solução, foram preparadas soluções aos

quais foram submetidas à degradação forçada com o objetivo de formação de produtos de degradação e avaliação da interferência destes produtos na quantificação do fármaco. Em balões volumétricos de 10 mL, foram adicionadas alíquotas de 2,0 mL e o volume foi completado com solventes relativos à degradação ao qual o fármaco estava sendo submetido. As condições de degradação foram:

Hidrólise ácida: onde foi adicionado ao balão da amostra ácido clorídrico 1M e deixado em repouso por 24h. Após este período, foi retirada alíquota de 1,6 mL, neutralizada com hidróxido de sódio 1M e transferida para balão de 10 mL completando volume para perfazer concentração de fármaco de 80 µg/mL.

Hidrólise alcalina: foi adicionado ao balão da amostra hidróxido de sódio 1M e repouso por 24h. Foi, então, retirada alíquota 1,6 mL, neutralizada com ácido clorídrico 1M e preparada solução com concentração de 80 µg/mL em balão volumétrico de 10 mL.

Oxidação: o volume foi completado com peróxido de hidrogênio 3% e período de repouso por 24h. Após, 1,6 mL desta solução foi retirado e transferido para balão volumétrico de 10 mL completando-se o volume.

Fotólise: foi retirada alíquota de 1,6 mL para cubeta de quartzo e levada a degradação em luz UV a 352nm em câmara espelhada por 24h. Após este período, a solução foi diluída em balão volumétrico de 10 mL para obter concentração de 80 µg/mL.

Degradação térmica: o volume foi completado com metanol e a solução levada à estufa a 80°C por 24h. Após, foi preparada solução para análise em balão volumétrico de 10mL com 1,6mL da solução degradada e completado volume com solução tampão de corrida.

Todas as soluções de análise foram preparadas no tampão eletrólito de corrida (ácido bórico 35 mM + SDS 50 mM pH 8,8) e padrão interno de diclofenaco de potássio (200µg/mL) foi adicionado. Foram também preparadas soluções em branco que também foram submetidas às mesmas condições de degradação e uma solução contendo amostra que permaneceu em condição ambiente.

Todas as análises foram feitas em triplicata e foram obtidas com detector de arranjo de diodos para observar a pureza dos picos. Os resultados das soluções amostra foram comparados com os da solução branco.

4.6.3.1.2 Linearidade, limite de detecção e limite de quantificação

Para verificar linearidade do método EC, curvas padrão com cinco níveis de concentração foram construídas em três dias diferentes.

A partir de solução de cloridrato de raloxifeno SQR (1,0 mg/mL), foram retiradas alíquotas para obter soluções com concentrações de 40, 60, 80, 100 e 120 µg/mL para traçar a curva. Estas soluções foram preparadas no tampão eletrólito de corrida e padrão interno de diclofenaco de potássio (200 µg/mL) foi adicionado.

Todas as análises foram realizadas em triplicata para cada solução, e a curva foi construída a partir da relação entre a área do fármaco e área do padrão interno em função da concentração correspondente da solução de SQR. A partir das curvas padrão obtidas, e equação da reta e o coeficiente de correlação (r) foram calculados. A linearidade foi verificada pela análise estatística de regressão, correlação e análise da variância (ANOVA).

Os limites de detecção e de quantificação foram estimados através da seguinte equação de acordo com Resolução RE nº 899/2003 (Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos), sendo que o limite de detecção é estimado com relação de três vezes o ruído da linha de base e o limite de quantificação com relação de 10 vezes o ruído da linha de base,

$$LD = DP\alpha \times 3/IC \text{ (Eq. 14)} \quad LQ = DP\alpha \times 10/IC \text{ (Eq. 15)}$$

LD – limite de detecção

LQ – limite de quantificação

DP α – desvio padrão do intercepto com eixo Y de, no mínimo, três curvas de calibração

IC – inclinação da curva de calibração

4.6.3.1.3 Precisão

Foram analisadas seis amostras de solução de raloxifeno comprimido com mesma concentração para verificar se método EC para quantificação de cloridrato de raloxifeno nos comprimidos é preciso. As análises foram realizadas em três dias diferentes.

Solução de SQR (1,0 mL/mL) foi preparada pesando-se 25mg de SQR em balão volumétrico de 25 mL e dissolvendo em metanol. Alíquota de 0,8 mL foi retirada para balão volumétrico de 10 mL. Foi adicionada alíquota de padrão interno de diclofenaco de potássio e volume foi completado com solução tampão de corrida.

Para o preparo das soluções amostra, alíquota 0,8 mL da solução de comprimidos com concentração de 1,0 mg/mL foi retirada para balão volumétrico de 10 mL. Foi adicionado padrão interno de diclofenaco de potássio e volume foi completado com solução tampão de corrida para perfazer concentração de 80 μ g/mL para raloxifeno e 200 μ g/mL para padrão interno. A solução de diclofenaco de potássio utilizada como padrão interno foi preparada pesando-se 25 mg de SQR de diclofenaco de potássio em balão volumétrico de 25 mL e diluindo-se com metanol.

As soluções foram analisadas em triplicata e a precisão intradia foi verificada através do desvio padrão relativo (DPR) das médias das seis determinações, e a precisão interdias foi avaliada pela DPR das determinações dos três dias diferentes.

4.6.3.1.4 Exatidão

A exatidão do método EC foi determinada pela análise de soluções de amostra, onde foram adicionados alíquotas de solução de SQR, em três níveis de concentração e o teor de recuperação foi calculado.

Solução de cloridrato de raloxifeno comprimido foi preparada pesando-se o equivalente a 25 mg em balão volumétrico de 25mL. Foi adicionado metanol e levado à sonicação por 10 min. O volume foi completado e alíquotas de 0,4 mL foram retiradas e transferidas para balões volumétricos de 10 mL. Foram adicionadas a estes balões, alíquotas de 0,2, 0,4 e 0,6 mL de solução de SQR (1,0 mg/mL). Também adicionada a estas soluções alíquota de padrão interno. O volume, então, foi completado com solução tampão de corrida. as soluções obtiveram concentrações de 60, 80 e 100 µg/mL e a uma das soluções não foi adicionado alíquota de SQR, permanecendo com concentração de 40 µg/mL. O preparo e concentração das soluções está esquematizado a seguir:

Quadro 3 - Preparo das soluções para teste de exatidão e recuperação por EC para comprimidos

Solução	Volume comprimido (mL)	Volume SQR (mL)	Concentração final (µg/mL)
SR0	0,4	—————	40
SR1	0,4	0,2	60
SR2	0,4	0,4	80
SR3	0,4	0,6	100

Foram realizadas as corridas em triplicata e o cálculo do teor de recuperação foi feito de acordo com a seguinte equação:

$$R\% = \frac{R_x - C_a}{C_p} \cdot 100 \quad (\text{Eq. 16})$$

R% = porcentagem de recuperação

R_x = concentração da solução contendo o fármaco e SQR ($\mu\text{g/mL}$)

C_a = concentração da solução amostra ($\mu\text{g/mL}$)

C_p = concentração da solução SQR ($\mu\text{g/mL}$)

4.6.3.1.5 Robustez

Alguns parâmetros foram alterados para verificar robustez do método EC para quantificação de cloridrato de raloxifeno em comprimidos. Os parâmetros alterados foram:

- Concentração de ácido bórico e do dodecilsulfato de sódio (SDS) na solução tampão de corrida
- pH
- temperatura de análise
- voltagem aplicada

Os fatores alterados nas análises foram combinados através de fatorial 2^4 através de software Minitab®15, assim como a análise dos resultados também foi realizada por este software.

As soluções de SQR e amostra para análise foram preparadas na concentração de $80\mu\text{g/mL}$ de fármaco de $200\mu\text{g/mL}$ de padrão interno. As soluções foram preparadas de acordo com cada fatorial pela concentração dos componentes da solução tampão e pH. As condições alteradas e concentrações são apresentadas no quadro 4.

Quadro 4 – Tabela de fatorial para robustez de método EC para comprimidos

Condição	Concentração de ácido bórico (mM)	Concentração de SDS (mM)	pH	Temperatura (°C)	Voltagem aplicada (kV)
1	37	48	8,6	30	23
2	35	50	8,8	32	25
3	33	48	9,0	34	23
4	37	52	9,0	34	27
5	33	52	9,0	30	23
6	33	52	8,6	30	27
7	37	52	8,6	34	23
8	33	48	8,6	34	27
9	37	48	9,0	30	27

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação físico-química da matéria- prima

5.1.1 Solubilidade

A solubilidade foi testada conforme descrito no item 4.4.1.1 e classificada de acordo com critérios determinados pela Farmacopéia Brasileira 5° Ed. O fármaco, tanto SQR quanto a matéria prima, demonstrou ser pouco solúvel em água, ácido clorídrico 0,1M, acetonitrila, diclorometano e acetato de etila. Apresentou ser solúvel em etanol, facilmente solúvel em dimetilformamida e muito solúvel em metanol e hidróxido de sódio 0,1M.

5.1.2 Ponto de fusão

Os pontos de fusão foram determinados através de dois equipamentos: METTLER TOLEDO FP90 e platina de aquecimento KOFFLER conforme procedimentos descritos no item 4.4.1.2. Os valores obtidos são apresentados a seguir na tabela 1 e foram determinados em triplicata. Padrões (sacarina – 228 °C e fenolftaleína – 262,1 °C) foram utilizados em ambos os equipamentos para calibração. A faixa de fusão utilizada como referência constava no laudo de análise da matéria prima e consistia de 258 – 262 °C.

Tabela 3 – Valores de ponto de fusão obtidos para cloridrato de raloxifeno matéria prima

Equipamento	1	2	3	DPR
Koffler	254 °C	257 °C	254 °C	0,68
Mettler Toledo	278 °C	277,3 °C	266,6 °C	2,33

DPR – desvio padrão relativo

Como é possível observar, os resultados variaram bastante, especialmente para o equipamento Mettler Toledo, e não estavam de acordo com a faixa de fusão fornecida no laudo de análise do produto. O fármaco apresentou caramelização ao final das análises, o que possivelmente dificultou a determinação do ponto de fusão por estes equipamentos. Sais, geralmente apresentam pontos de fusão elevado, que também foi o caso do cloridrato de raloxifeno. (Um ponto de fusão alto como apresentado por este fármaco) Isto torna difícil sua determinação pelo equipamento Koffler, que tendo como fonte de calor uma platina de aquecimento, pode ter sofrido com perda de calor durante a análise. O ponto de fusão é importante parâmetro para caracterização de uma substância; portanto a fim de caracterizá-la foi realizado então o ensaio de calorimetria exploratória diferencial.

5.1.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial (DSC – differential scanning calorimetry) é um método de análise térmica amplamente utilizado, sendo a análise térmica uma técnica no qual as propriedades físico-químicas da substância são medidas, enquanto a amostra é submetida à variação de temperatura. Em experimento de calorimetria exploratória diferencial, mede-se a variação de entalpia que ocorre entre amostra e referência durante processo de aquecimento/resfriamento. É possível avaliar a estabilidade térmica e através da observação das mudanças de estado que ocorrem na substância submetida à variação de temperatura, obter pontos de fusão e ebulição com exatidão, importantes no controle de qualidade e desenvolvimento farmacêutico. Assim como também é possível determinar reações de decomposição e combustão que ocorrem e observar a presença de polimorfismo devido às transições cristalinas que podem acontecer durante processo de aquecimento ou resfriamento. (SKOOG, 2002, STORPIRTIS *et al*, 2009)

O ensaio de DSC foi realizado conforme no item 4.4.1.3 a fim de caracterizar a SQR e matéria prima de cloridrato de raloxifeno. As figuras 4 e 5 ilustram, respectivamente, as curvas de DSC obtidas para a SQR e matéria prima. É possível observar eventos endotérmicos característicos de fusão para ambas as amostras. Os dados obtidos estão representados em cada termograma, sendo os pontos de

fusão obtidos através da determinação do *Onset* já calculado e fornecido pelo próprio equipamento. Para SQR, foi determinado ponto de fusão de 261,06°C e para matéria-prima, 263,7°C, o que corresponde à faixa de fusão indicada pelo fornecedor da substância.

Os resultados dos outros métodos utilizados para determinação do ponto de fusão foram bastante diferentes, provavelmente, devido a interferências, como já discutido anteriormente.

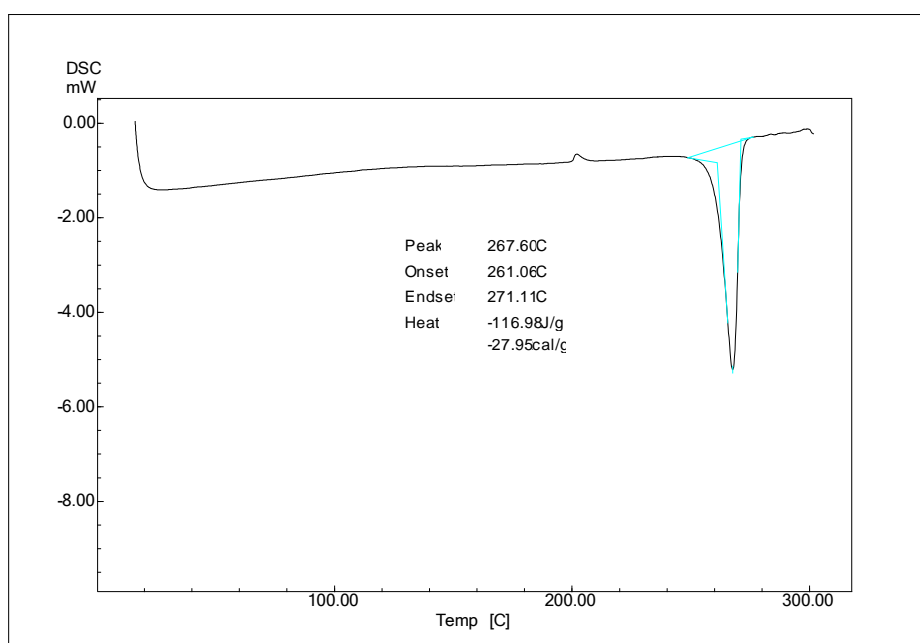


Fig. 3: Calorimetria exploratória diferencial de cloridrato de raloxifeno SQR realizada no equipamento SHIMADZU DSC-60 acoplado ao integrador THERMAL ANALYZER TA-60WS e ao controlador de fluxo FC-60A sob atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de 50mL/min. Velocidade de aquecimento de 10°C/min.

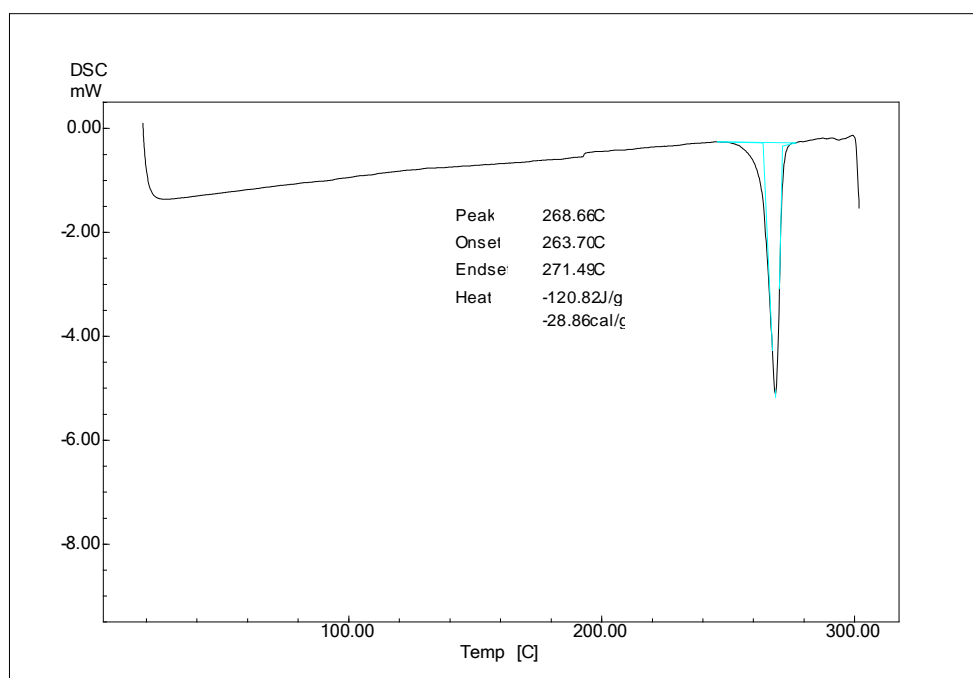


Fig 4: Calorimetria exploratória diferencial de cloridrato de raloxifeno matéria prima realizada no equipamento SHIMADZU DSC-60 acoplado ao integrador THERMAL ANALYZER TA-60WS e ao controlador de fluxo FC-60A sob atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de 50mL/min. Velocidade de aquecimento de 10°C/min.

5.2 Identificação e caracterização da matéria-prima

5.2.1 Identificação do cloreto

Como o fármaco raloxifeno apresenta-se na forma de um cloridrato, tornou-se interessante a sua determinação, a fim de caracterizar a substância e confirmar sua presença na estrutura. Depois de realizado o teste, conforme descrito no item 4.4.2.1, houve a formação de precipitado branco que se demonstrou ser insolúvel em ácido nítrico e solúvel em hidróxido de amônio 6M, confirmando então ser um cloridrato a SQR e matéria-prima testadas.

5.2.2 Identificação de grupo fenol

Em sua estrutura, o fármaco possui grupamento fenol, e a fim de identificá-lo, foi realizado teste para presença de grupos fenólicos. Com o procedimento

realizado, foi verificado o aparecimento de coloração esverdeada, e assim confirmando a presença de grupo fenólico nas amostras de SQR e matéria prima.

5.2.3 Espectrofotometria na região do infravermelho (IV)

A espectrofotometria no IV é uma técnica simples e rápida para caracterização de vários grupos funcionais em uma substância. É uma técnica qualitativa que pode apontar pontos estruturais nas substâncias, e assim identificar o fármaco utilizado auxiliando no controle de qualidade de matéria primas. Pode também ser usado para detecção de polimorfos, pois estes possuem formas cristalinas diferentes, sendo que estas formas cristalinas possuem propriedades físicas diferentes. O funcionamento se baseia na irradiação eletromagnética que varia entre 500cm^{-1} e 4000cm^{-1} e passa através da amostra, sendo absorvida pelas ligações existentes na molécula causando afrouxamento ou aumentando a força destas ligações. O comprimento de onda da radiação absorvida é característico de cada ligação (SOLOMONS & FRYHLE, 2001, WATSON, 1999).

A análise espectrofotométrica foi realizada de acordo com item 4.4.2.3 e os espectros obtidos são apresentados nas figuras 6 e 7. As bandas de absorção observadas e possíveis atribuições que caracterizam o fármaco são apresentados na tabela 4.

Tabela 4 – Frequências de absorção das principais bandas no infravermelho e suas respectivas atribuições para cloridrato de raloxifeno

Frequência (cm^{-1})	Atribuições
3142,57 (SQR) 3140,29 (MP)	Deformação axial N-H de álcool
1642,05 (SQR) 1641,74 (MP)	Deformação axial C=O da carbonila
806,61 (SQR) 806,09 (MP)	Deformação axial anel aromático <i>p</i> -substituído

Pavia *et al*, 2001; Silverstein & Webster, 2000; Solomons & Fryhle, 2001

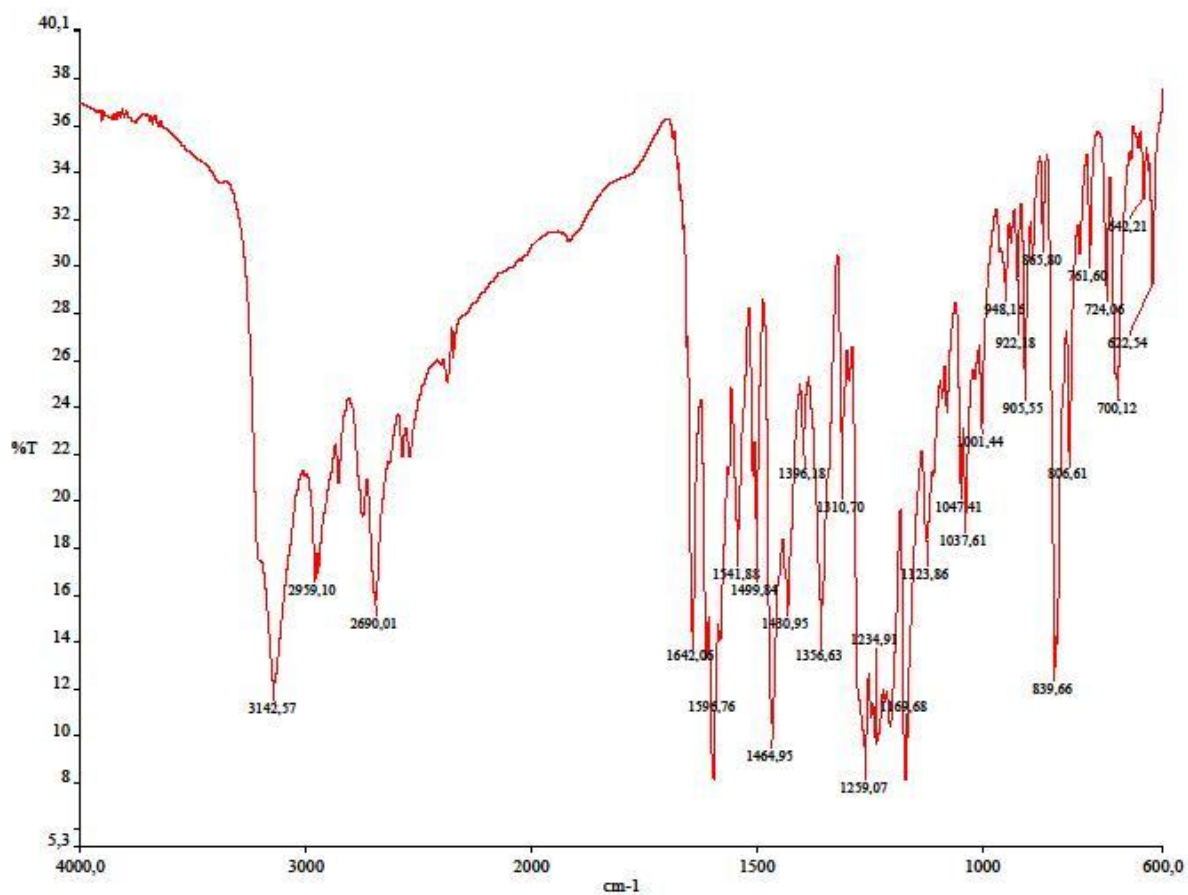


Fig. 5: Espectro de absorção na região do IV para cloridrato de raloxifeno SQR em KBr (4000 a 400cm⁻¹)

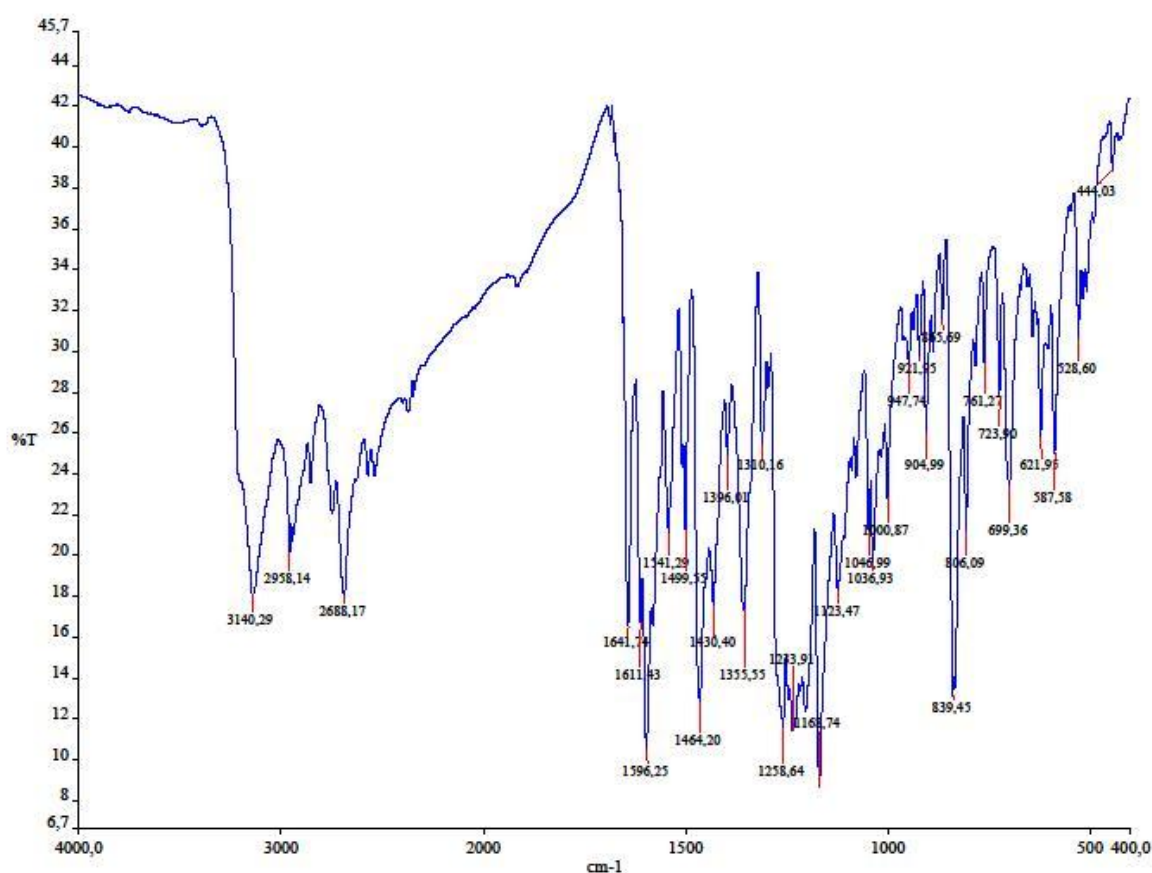


Fig 6: Espectro de absorção na região do IV para cloridrato de raloxifeno matéria-prima em KBr (4000 a 400cm⁻¹)

Pode-se observar, tanto pelos espectros apresentados quanto pelas atribuições, que se trata da mesma substância, e foi possível identificar diversos grupos funcionais pertencentes ao cloridrato de raloxifeno. Este ensaio demonstrou-se útil para a identificação do fármaco estudado e também para sua caracterização.

5.2.4 Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)

A análise espectrofotométrica é realizada através de uma radiação de comprimento de onda entre 400 e 200nm que atravessa a solução a ser estudada. Os elétrons nas ligações excitam-se e ocupam um estado de energia maior neste processo de absorção da radiação. Os espectros de UV de fármacos submetidos a este processo são geralmente ferramentas úteis para identificação de substâncias (WATSON, 1999).

A análise espectrofotométrica foi realizada de acordo com descrito no item 4.4.2.4. As figuras 8 e 9 apresentam os espectros obtidos da SQR e matéria prima a partir de soluções com concentração de 7,5µg/mL em três diferentes solventes: metanol, ácido clorídrico 0,1M e hidróxido de sódio 0,1M. Podem-se observar desvio hipocrômico para a solução ácida da SQR e desvios batocrômicos e hiperocrômicos para as soluções alcalinas de cloridrato de raloxifeno em relação à solução metanólica. Os máximos de absorção encontraram-se em 220-221nm e 284-287nm na solução metanólica. Os máximos de absorção na faixa de 284-287nm estão de acordo com o encontrado na literatura, onde foi observado máximo de absorção para esta molécula em 287nm (TEETER & MEYRHOFF, 2002).

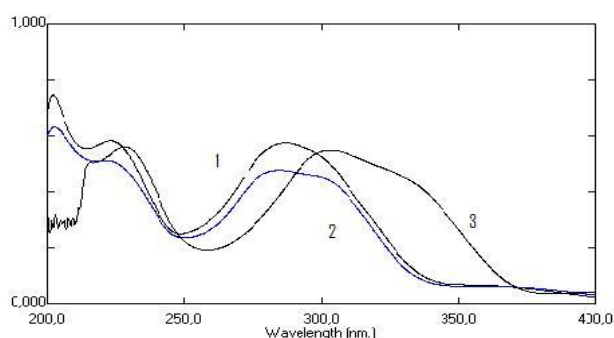


Fig. 7 - Espectro de absorção na região do UV para cloridrato de raloxifeno SQR em solução de metanol (1), ácido clorídrico 0,1M (2) e hidróxido de sódio 0,1M (3)

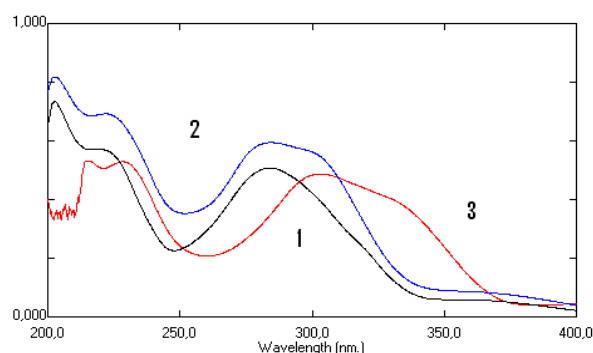


Fig. 8 - Espectro de absorção na região do UV para cloridrato de raloxifeno matéria prima em solução de metanol (1), ácido clorídrico 0,1M (2) e hidróxido de sódio 0,1M (3)

No espectro da matéria-prima, foi encontrado um desvio hiperacrômico da solução ácida quando na SQR ocorreu um desvio hipocrômico, mantendo-se o desvio batocrômico da solução alcalina. O máximo de absorção foi semelhante para SQR e matéria prima (284-287nm). Acredita-se que a diferença de desvio possa ter ocorrida devido à presença de alguma impureza na matéria-prima, porém, apesar desta diferença, no restante, ambas as soluções apresentaram o mesmo perfil, o que aponta para mesma identidade das substâncias estudadas. O desvio batocrômico apresentado pelo fármaco pode ser devido ao fato deste encontrar-se em meio alcalino (o solvente utilizado foi hidróxido de sódio 0,1M), sendo que o grupamento fenol apresentado na molécula tem seu próton removido nesta condição liberando um par extra de elétrons deslocando absorção para comprimento de onda mais alto.

5.2.5 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os perfis cromatográficos das amostras analisadas (solução de cloridrato de raloxifeno SQR e matéria prima na concentração de 10 μ g/mL) estão apresentados nas figuras 10 e 11, e foram realizados conforme descrito no item 4.4.2.5. Ambos os cromatogramas foram obtidos em equipamento de CLAE equipado com detector com arranjo de fotodiodos, e assim foi possível analisar a purezas dos picos cromatográficos. Os perfis dos picos demonstraram-se semelhantes, com tempos de retenção similares, assim como também apresentaram pureza cromatográficas.

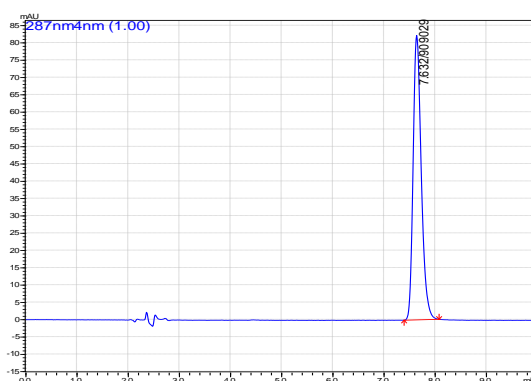


Fig 9 - Cromatograma de solução de cloridrato de raloxifeno SQR (10 μ g/mL). Condições cromatográficas: fase móvel água:acetonitrila:triethylamina (67:33:0,3) pH 3,5, coluna NSTC18 fase reversa 250x4,6mmx5 μ m, vazão 1,0mL/min, volume de injeção 20 μ l, detecção 287nm, tempo de retenção de 7,6min

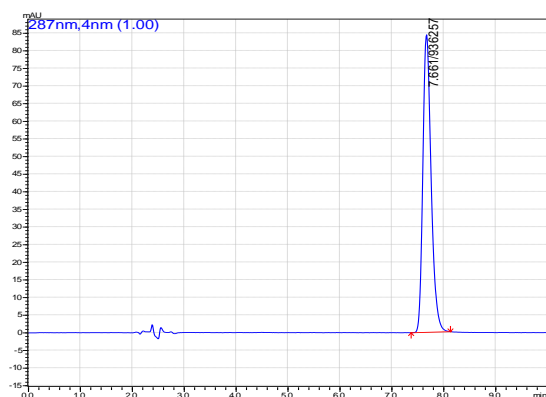


Fig 10 - Cromatograma de solução de cloridrato de raloxifeno MP (10 μ g/mL). Condições cromatográficas: fase móvel água:acetonitrila:triethylamina (67:33:0,3) pH 3,5, coluna NSTC18 fase reversa 250x4,6mmx5 μ m, vazão 1,0mL/min, volume de injeção 20 μ l, detecção 287nm, tempo de retenção de 7,6min

5.3 Ensaio de pureza da matéria prima

5.3.1 Determinação da umidade

O cloridrato de raloxifeno matéria prima foi submetido ao ensaio conforme descrito no item 4.4.3.1. A determinação realizada através de método volumétrico pelo processo de Karl-Fisher em instrumento com determinação coulométrica resultou em 0,12% de umidade para a SQR e 0,06% de umidade para a matéria prima. A baixa umidade encontrada está de acordo com o fornecido no laudo de análise do fármaco obtido do fornecedor e também com o preconizado na monografia do fármaco inclusa na USP 32.

5.3.2 Perda por dessecação

As amostras foram submetidas ao ensaio descrito no item 4.4.3.2. A perda obtida neste processo foi calculada em 0,32% para a matéria prima e 0,1% para SQR. Estes valores encontrados estão de acordo com os fornecidos no laudo de análise do produto obtido do fornecedor e com o preconizado para o fármaco na monografia inclusa na USP 32. A diferença de umidade encontrada para as

amostras de SQR e matéria-prima pode ser devido à presença de outros produtos voláteis na matéria-prima, como alguns resíduos de síntese, além da água.

5.4 Caracterização e identificação do fármaco da forma farmacêutica

5.4.1 Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)

O procedimento foi realizado conforme item 4.4.4.1. O espectro encontrado para o comprimido de cloridrato de raloxifeno é apresentado na figura 12. Neste espectro, pode ser observado desvio hipocrômico para a solução ácida e batocrômico e hiperacrômico para a solução alcalina. Os máximos de absorção se encontraram em 220-221nm e 284-287nm assim como encontrado para a SQR. A forma farmacêutica apresentou perfil de absorção semelhante ao da SQR, apontando então para a mesma identidade do fármaco testado e coincidindo com máximo de absorção apresentado na literatura e mencionado anteriormente na análise da matéria-prima (máximo de absorção de 287nm - TEETER & MEYRHOFF, 2002).

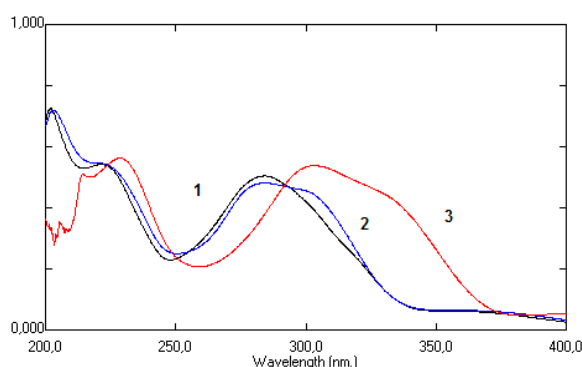


Fig. 11 Espectro de absorção na região do UV para cloridrato de raloxifeno na forma farmacêutica em solução de metanol (1), ác. clorídrico 0,1M (2) e hidróxido de sódio 0,1M (3)

5.4.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada é uma ferramenta para análises qualitativas rápidas e é eficiente para esse propósito. É conveniente para isolamento

de pequenas quantidades de frações de misturas complexas ou purificação de substâncias. É, também, uma ferramenta útil para determinação de impurezas em matérias primas e produtos farmacêuticos e frequentemente utilizada para fazer a identificação de fármacos (WATSON, 1999, NUNES & NETO, 2003).

A técnica foi desenvolvida conforme descrito no item 4.4.4.2. Os cromatogramas obtidos são apresentados na figura 13. Diferentes sistemas eluentes foram testados e o mais adequado foi a mistura de metanol:acetona (50:50 v/v) com boa migração. A revelação foi realizada por meio de vapores de iodo e lâmpada ultravioleta a 254nm que se demonstraram eficientes. A semelhança das manchas e valores de Rf obtidos ($R_{f_{SQR}}=R_{f_{FF}}=0,5$) indica presença do fármaco na amostra e comprova capacidade de identificação do métodos com boa diferenciação do tamoxifeno ($R_f= 0,3$) um modulador de receptor estrogênico com estrutura semelhante. O coeficiente Rx ($R_{f_{tamoxifeno}}/R_{f_{raloxifeno}}$) foi calculado obtendo valor de 0,6, podendo ser considerado também um fator de identificação para o raloxifeno.

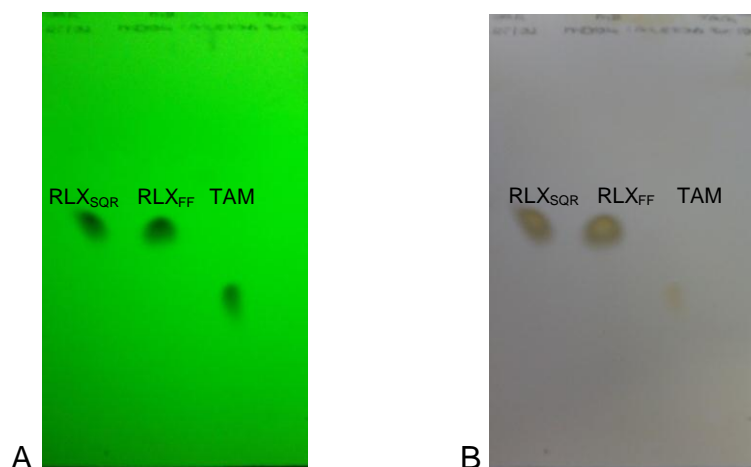


Fig. 12 - CCD cloridrato de raloxifeno SQR, forma farmacêutica e tamoxifeno SQR. Condições cromatográficas: placas de alumínio recobertas com gel de sílica 60 F₂₅₄, mistura de metanol e acetona (50:50 v/v) como eluente. (A) revelação por UV (254nm) (B) revelação por exposição a vapores de iodo

5.4.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O perfil cromatográfico foi obtido conforme descrito no item 4.4.4.3 e está apresentado na figura 14. O pico principal obtido demonstrou tempo de retenção

similar ao pico principal da solução de SQR, assim como também apresentou pureza cromatográfica quando analisado através do detector com arranjo de fotodiodos.

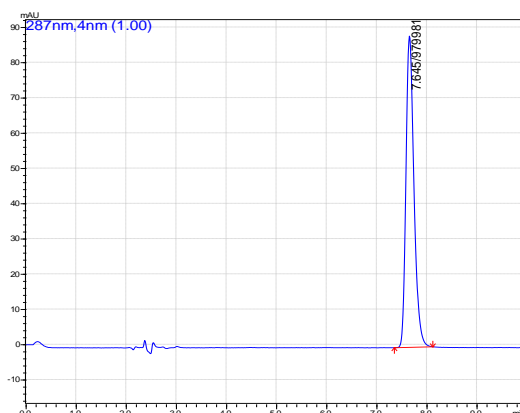


Fig 13 - Cromatograma de solução de cloridrato de raloxifeno forma farmacêutica (10 μ g/mL). Condições cromatográficas: fase móvel água:acetonitrila:triethylamina (67:33:0,3 v/v) pH 3,5, coluna NSTC18 fase reversa 250x4,6mmx5 μ m, vazão 1,0mL/min, volume de injeção 20 μ l, detecção 287nm, tempo de retenção de 7,6min

5.4.4 Eletroforese capilar (EC)

A técnica de eletroforese capilar se baseia na separação por aplicação de alta voltagem (10-30kV) a um capilar de sílica onde flui a fase móvel. É uma técnica precisa e exata para analisar diversos tipos de formulações farmacêuticas e eficiente na detecção de impurezas (WATSON, 1999).

Os perfis de migração do cloridrato de raloxifeno foram obtidos através de uma das técnicas de eletroforese, a eletroforese capilar micelar (*MECC - micellar electrokinetic chromatography*), de acordo com descrito no item 4.4.4.4. Os eletroferogramas das soluções de 80 μ g/mL de SQR e dos comprimidos são representados nas figuras 15 e 16. Ambos apresentaram tempos de migração semelhantes e relação área amostra/área padrão interno similares. Este equipamento possuía detector UV com arranjo de fotodiodos e foi possível também avaliar a pureza dos picos, sendo que estes se apresentaram puros. O primeiro pico corresponde ao padrão interno (diclofenaco de potássio 200 μ g/mL) e o segundo pico corresponde ao cloridrato de raloxifeno, podendo se perceber que o perfil dos comprimidos corresponde ao da SQR.

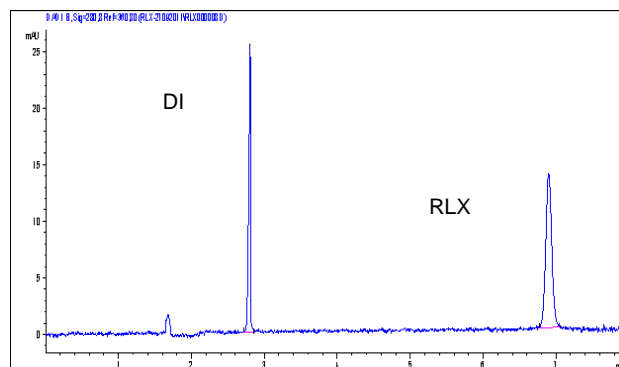


Fig. 14 – Eletroferograma da solução de cloridrato de raloxifeno (RLX) SQR (80µg/mL). Condições de análise: capilar de sílica fundida 48,5cm (40cm efetivos, 50 µm de diâmetro interno), tampão de corrida consistindo de ácido bórico 35mM e dodecilsulfato de sódio(SDS) 50mM pH 8,8, voltagem aplicada de 25kV, temperatura 32 °C, detecção em 280nm, injeção 45 mBar em 4s e como padrão interno diclofenaco de potássio (DI) 200µg/mL, tempo de retenção RLX 6,9min

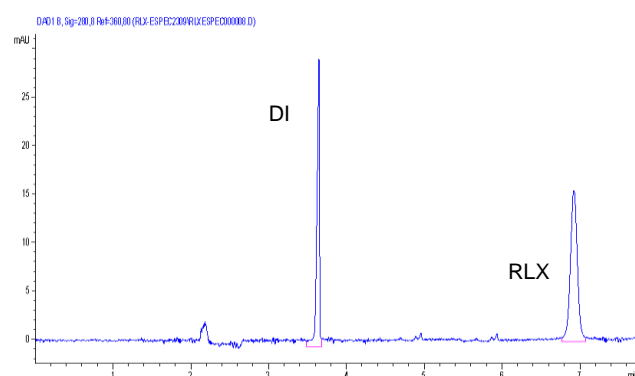


Fig. 15 – Eletroferograma da solução de cloridrato de raloxifeno (RLX) comprimidos (80µg/mL). Condições de análise: capilar de sílica fundida 48,5cm (40cm efetivos, 50 µm de diâmetro interno), tampão de corrida consistindo de ácido bórico 35mM e dodecilsulfato de sódio (SDS) 50mM pH 8,8, voltagem aplicada de 25kV, temperatura 32 °C, detecção em 280nm, injeção 45 mBar em 4s e como padrão interno diclofenaco de potássio (DI) 200µg/mL, tempo de retenção RLX 6,9min

5.5 Análise quantitativa da matéria-prima

5.5.1 Volumetria em meio não-aquoso (VMNA)

As titulações são amplamente utilizadas para determinação do teor de fármacos. A titulação se baseia em uma reação entre o analito e um reagente padrão conhecido como titulante. Incrementos da solução titulante são adicionados

ao analito (titulado) até sua reação ficar completa. Essa reação é de estequiometria conhecida e reprodutível. Da quantidade de titulante requerida, podemos calcular a quantidade de constituinte em análise que está presente (HARRIS, 2001). As titulações em meio não-aquoso são realizadas na ausência de água. Estas são úteis para o doseamento de fármacos que são bases ou ácidos fracos, pois a água os ionizaria quando na presença desta. Para a maioria dos fármacos o titulante geralmente utilizado é o ácido perclórico, por serem bases fracas (CAIRNS, 2008, SKOOG, 2002).

O raloxifeno está na forma de cloridrato e neste caso o cloreto é a base fraca a ser determinada. Como é uma base muito fraca, há a necessidade de se fazer a titulação em solvente que venha ressaltar a basicidade do mesmo. Por isto a utilização de anidrido acético neste caso.

5.5.1.1 Determinação da precisão do método VMNA

A determinação do teor da matéria-prima de cloridrato de raloxifeno foi realizada conforme descrito no item 4.5.1.1. Os resultados são encontrados na Tabela 5 para resultado com indicador e Tabela 6 para resultados com determinação potenciométrica. Os valores de DPR encontrados para a precisão intradia e interdias indicam que o método por volumetria para quantificar o fármaco é preciso. Foi feita análise estatística através da análise da variância (ANOVA) para conferir se a determinação do teor feita utilizando indicador ou potenciometria para determinar o ponto final das titulações difere na quantificação do fármaco (Tabela 22 - ANEXO). Foi encontrado que estatisticamente os métodos não apresentam diferença para análise de teor do cloridrato de raloxifeno matéria-prima.

Tabela 5 – Resultados obtidos em três dias na quantificação das amostras de cloridrato de raloxifeno matéria prima por VMNA utilizando indicador para determinar o ponto final para avaliar a precisão intra e interdias.

	Teor (%) encontrado com indicador						Teor intradia(%) ± e.p.m.	DPR
Dia I	96,58	97,46	97,08	97,14	96,78	97,46	97,08±0,35	0,36
Dia II	97,45	101,33	97,36	97,58	97,36	94,99	96,68±2,04	2,08
Dia III	97,64	96,86	96,52	96,54	95,39	95,33	96,38±0,88	0,92
	Teor (%) interdias ± e.p.m.						97,05±1,33	1,37

e.p.m. – erro padrão da média
DPR – desvio padrão relativo

Tabela 6 – Resultados obtidos em três dias na quantificação das amostras de cloridrato de raloxifeno matéria prima por VMNA utilizando potenciometria para determinar o ponto final para avaliar a precisão intra e interdias.

	Teor (%) encontrado por potenciometria						Teor intradia(%) ± e.p.m.	DPR
Dia I	98,36	98,31	98,01	97,85	97,59	98,28	98,06±0,31	0,31
Dia II	98,33	102,28	98,24	98,43	98,06	95,88	98,54±2,07	2,10
Dia III	98,45	97,58	97,41	97,24	96,19	96,30	97,20±0,84	0,86
	Teor (%) interdias ± e.p.m.						97,93±1,35	1,38

e.p.m. – erro padrão da média
DPR – desvio padrão relativo

5.5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida é o tipo mais versátil e amplamente utilizado entre as técnicas cromatográficas. Neste método, a fase móvel é um solvente líquido, o qual contém a amostra na forma de mistura de solutos. A fase móvel é bombeada através

de uma coluna recheada com fase estacionária, onde a separação dos solutos ocorre, de acordo com as afinidades entre a fase móvel e fase estacionária. A técnica de quantificação por CLAE é um método preciso, exato e robusto para determinação de teor de fármacos e produtos farmacêuticos, tornando-se uma ferramenta analítica indispensável para o controle de qualidade (CIOLA, 1998, LEITE, 2008).

No desenvolvimento da metodologia, diversos parâmetros foram analisados, como diferentes solventes e proporções, pH, coluna, vazão da fase móvel e temperatura de análise. Para avaliar a influência destas condições na análise do fármaco, parâmetros cromatográficos (assimetria do pico, pratos teóricos e tempo de retenção) foram observados, até se obter as condições que foram consideradas mais adequadas para quantificação do cloridrato de raloxifeno.

Os métodos encontrados na literatura (KUMAR B *et al*, 2011, SUNEETHA & LAKSHMANA, 2010, BASAVIAH *et al*, 2008, PAVITHRA & SIVASUBRAMANIA, 2006, REDDY *et al*, 2006, TRONTELJ *et al*, 2005) que quantificaram raloxifeno em produtos farmacêuticos utilizaram, em sua maior parte, coluna C18 de fase reversa (150 ou 250mm) e como fase móvel solução tampão:acetonitrila em proporções variáveis com pH que variou na faixa de 2,0 a 6,8 (mais utilizado 4,0). A detecção se deu por UV a 287nm na grande maioria. PAVITHRA & SIVASUBRAMANIA (2006) utilizaram como fase móvel mistura de água:metanol (50:50 v/v) e detecção a 230nm. Os tempos de retenção obtidos variaram para cada método desenvolvido. O fármaco também foi quantificado em matrizes biológicas utilizando condições semelhantes as já citadas, sendo que TRONTELJ e colaboradores (2007) utilizaram o acoplamento a espectrofotômetro de massas para detecção. Todos estes fatores pesquisados foram considerados no desenvolvimento das condições cromatográficas do método.

Optou-se por trabalhar com fase móvel constituída por água:acetonitrila, ao invés de soluções tampão e coluna C18 de fase reversa com 250mm, desenvolvendo assim método mais simples, não tão prejudicial à coluna.

Assim, as condições cromatográficas estabelecidas para quantificação do fármaco são: fase móvel água:acetonitrila:triethylamina (67:33:0,3) pH 3,5, coluna NST

C18 de fase reversa com 250x4,6mmx5µm, vazão de 1,0mL/min, volume de injeção de 20µl, detecção a 287nm e temperatura de análise de 30°C. Um tempo de retenção de cerca de 7,0min foi obtido para o raloxifeno. Os picos obtidos apresentaram assimetria de 1,33 e pratos teóricos de aproximadamente 8000, parâmetros foram considerados apropriados para a metodologia. As análises foram realizadas com as soluções na concentração de 10,0µg/mL e os cromatogramas obtidos das soluções de SQR e matéria-prima estão apresentados no item 5.4.3 (Caracterização e identificação de matéria prima – Cromatografia líquida de alta eficiência).

5.5.2.1 Validação do método CLAE

5.5.2.1.1 Especificidade

A especificidade do método foi avaliada quanto aos possíveis produtos de degradação apresentados após o fármaco ser submetido a processos de degradação forçada, entre eles: hidrólise ácida, hidrólise alcalina, oxidação, fotólise e degradação térmica. Com o auxílio de detector com arranjo de diodos foi verificada a pureza dos picos cromatográficos obtidos. Os procedimentos de degradação estão descritos no item. 4.5.1.1.1.

A pureza dos picos cromatográficos foi verificada pela DAD e observou-se que nenhum dos picos dos potenciais produtos de degradação interferiu com o pico do cloridrato de raloxifeno após os testes de degradação forçada, indicando que o método CLAE é específico para quantificação do fármaco. Os cromatogramas obtidos das soluções de amostra e branco são apresentados a seguir.

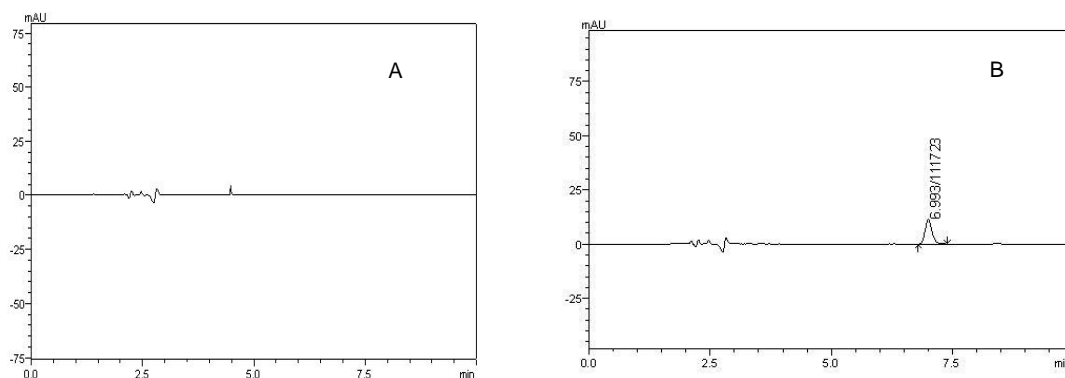


Fig. 16: Especificidade do método CLAE para cloridrato de raloxifeno MP submetida à hidrólise ácida por 24h, (A) cromatograma da solução em branco (B) cromatograma da solução de MP. Condições cromatográficas: fase móvel água:acetonitrila:triethylamina (67:33:0,3) pH 3,5, coluna NST C18 de fase reversa com 250x4,6mmx5 μ m, vazão de 1,0mL/min, volume de injeção de 20 μ l, detecção a 287nm e temperatura de análise de 30 °C.

O fármaco apresentou degradação intensa (> 50%) na condição ácida, porém não foram observados picos de possíveis produtos de degradação.

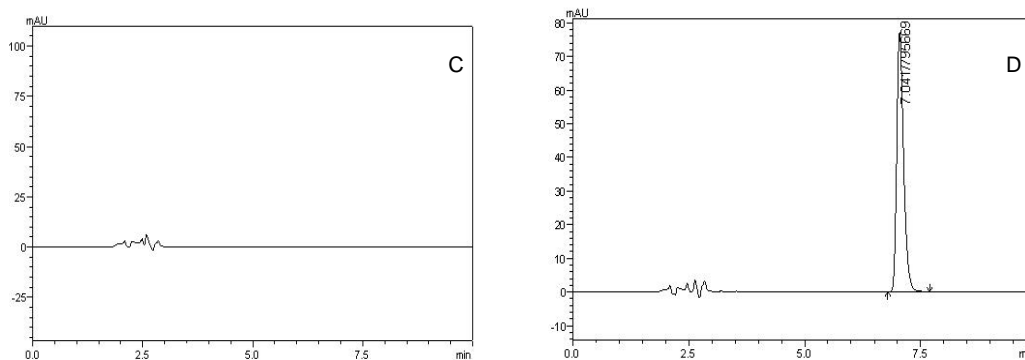


Fig. 17: Especificidade do método CLAE para cloridrato de raloxifeno MP submetida à hidrólise alcalina por 24h, (C) cromatograma da solução em branco (D) cromatograma da solução de MP. Condições cromatográficas: fase móvel água:acetonitrila:triethylamina (67:33:0,3) pH 3,5, coluna NST C18 de fase reversa com 250x4,6mmx5 μ m, vazão de 1,0mL/min, volume de injeção de 20 μ l, detecção a 287nm e temperatura de análise de 30 °C.

Na condição alcalina, o raloxifeno apresentou pouca degradação (5%). Há o aparecimento de picos secundários anteriores aos do fármaco, que possivelmente são devido à solução de hidróxido de sódio utilizada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

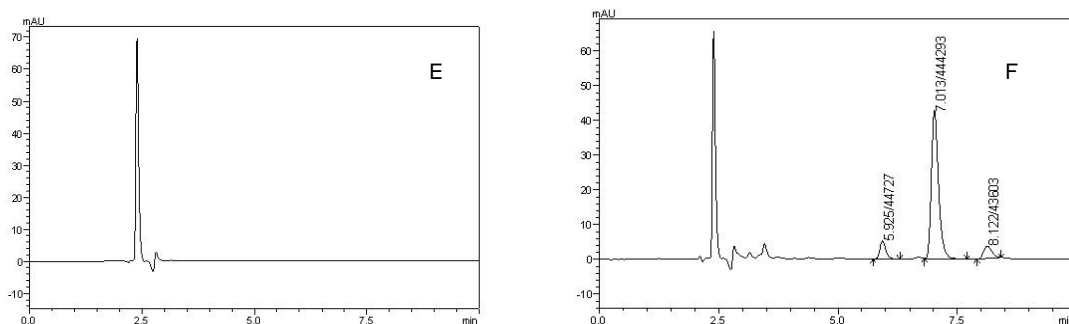


Fig. 18: Especificidade do método CLAE para cloridrato de raloxifeno MP submetida à oxidação com peróxido de hidrogênio 3% por 24h, (E) cromatograma da solução em branco (F) cromatograma da solução de MP. Condições cromatográficas: fase móvel água:acetonitrila:triethylamina (67:33:0,3) pH 3,5, coluna NST C18 de fase reversa com 250x4,6mmx5 μ m, vazão de 1,0mL/min, volume de injeção de 20 μ l, detecção a 287nm e temperatura de análise de 30 °C.

Foi observado que houve formação de potenciais produtos de degradação na oxidação (H_2O_2 3%), com o aparecimento de dois picos secundários aos 5,9 e 8,1 minutos. O fármaco apresentou aproximadamente 50% de degradação. Houve também aparecimento de picos secundários anteriores ao do fármaco, sendo o pico intenso relativo ao conservante usado na solução de peróxido de hidrogênio utilizada e os picos menores a alguns outros produtos de degradação que se formaram.

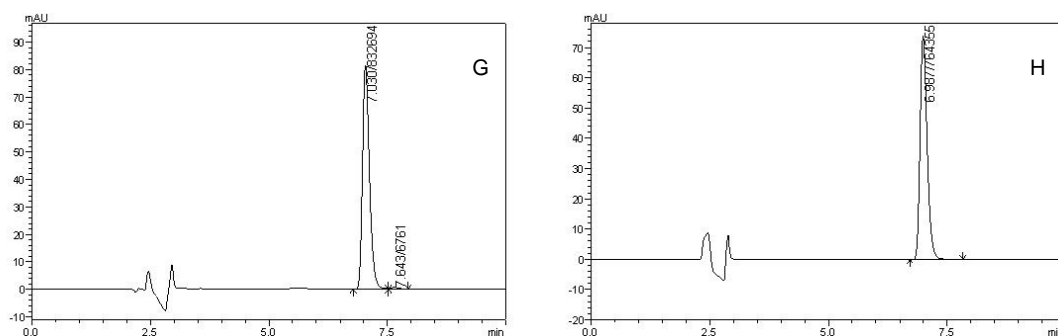


Fig. 19: Especificidade do método CLAE para cloridrato de raloxifeno (G) cromatograma da solução MP submetido a fotólise (luz UV 352nm) (H) cromatograma da solução de MP submetido a degradação térmica (estufa a 80°C). Condições cromatográficas: fase móvel água:acetonitrila:triethylamina (67:33:0,3) pH 3,5, coluna NST C18 de fase reversa com 250x4,6mmx5 μ m, vazão de 1,0mL/min, volume de injeção de 20 μ l, detecção a 287nm e temperatura de análise de 30 °C.

Na fotólise (Fig. 19-G), houve o aparecimento de pequeno pico secundário em torno de 8 min. Não houve formação de produtos de degradação na condição térmica (Fig. 19-H) e o raloxifeno MP apresentou pouca degradação (< 5%).

5.5.2.1.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada através da construção de curvas padrão com sete níveis de concentração em três dias diferentes a partir de solução de SQR. As concentrações variaram de 4,0 – 16 µg/mL. A curva está representada na figura 21 juntamente com a equação da reta resultante e o coeficiente de correlação (r). A tabela 7 apresenta as áreas médias absolutas e os DPRs de cada concentração.

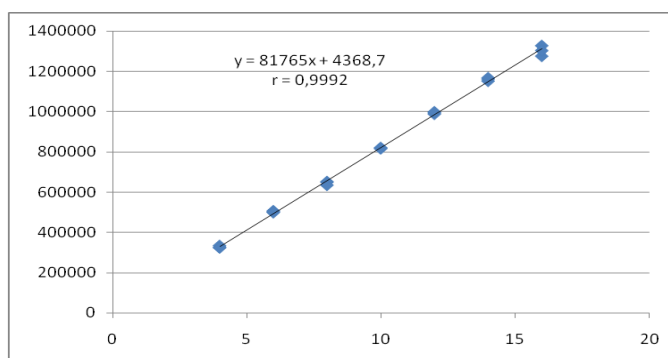


Fig. 20 – Representação gráfica da curva padrão média do cloridrato de raloxifeno SQR obtido por CLAE

Tabela 7 – Valores de áreas obtidos para a curva padrão de cloridrato de raloxifeno por CLAE

Concentração (µg/mL)	Área*	Média das áreas ± e.p.m.	DPR
4,0	326773	329026±5407	1,64
	335196		
	325110		
6,0	507472	504130±3875	0,76
	505037		
	499881		
8,0	652301	645984±9107	1,41
	650108		
	635544		
10,0	820225	819318±2287	0,28

	816715		
	821012		
12,0	992971	993291±5249	0,53
	988209		
	998693		
14,0	1161442	1160335±8161	0,70
	1151677		
	1167887		
16,0	1327417	1302075±25964	1,99
	1275529		
	1303278		

* resultado de três injeções
e.p.m. – erro padrão da média
DPR – desvio padrão relativo

Os resultados obtidos, através da análise da variância (ANOVA) e regressão (Tabela 23 - ANEXO), indicaram que a curva padrão apresenta regressão linear significativa ($p < 0,05$) e não apresenta desvio de linearidade. Estes resultados somados ao coeficiente de correlação de 0,9992 indicam que o método é linear na faixa de 4,0 a 16,0 µg/mL de cloridrato de raloxifeno.

5.5.2.1.3 Precisão

A precisão foi avaliada pela análise de seis amostras de raloxifeno MP com mesma concentração em três dias diferentes determinando os DPR intradia e interdias. Os procedimentos de análise estão descritos no item 4.5.1.1.3 e os resultados obtidos estão apresentados na tabela 8.

Tabela 8 – Resultados obtidos em três dias de quantificação de amostra de cloridrato de raloxifeno matéria prima para avaliação de precisão intra e interdias

Dia	Teor (%)*						Teor intradia (%)±e.p.m.	DPR
Dia I	99,89	100,12	99,96	99,47	99,37	99,19	99,67±0,37	0,38
Dia II	99,41	96,85	99,10	97,98	99,01	97,10	98,08±0,94	0,97

Dia III	100,73	99,18	99,24	97,44	98,08	98,43	98,85±1,14	1,16
Teor (%) interdias ± e.p.m.							98,86±1,07	1,08

* resultado de três injeções
 e.p.m. – erro padrão da média
 DPR – desvio padrão relativo

Os valores de DPR obtidos para a precisão intra e interdias indicam que o método apresentou repetibilidade, portanto pode ser considerado preciso com média de teor de 98,86%.

5.5.2.1.4 Robustez

Para verificar robustez foram variados os seguintes parâmetros: coluna, temperatura de análise, vazão da fase móvel, proporção dos solventes da fase móvel e pH. O procedimento das análises esta descrito no item 4.5.2.1.5 e os resultados obtidos estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9 – Avaliação robustez do método CLAE para quantificação de cloridrato de raloxifeno matéria prima

Parâmetro	Tempo de retenção* (min)	Assimetria* (T<1,50)	Pratos teóricos* (N>2000)	DPR	Rec** (%)
Método proposto	7,69	1,33	9670	0,32	-----
Coluna phenomenex	6,93	1,07	6888	0,31	98,9
Temperatura 29°	6,91	1,39	8676	0,17	99,6
Temperatura 31°	6,78	1,40	9194	0,08	99,6
Vazão 0,95 mL/min	7,30	1,40	10213	0,09	99,6
Vazão 1,05 mL/min	6,64	1,37	8779	0,08	99,8
Água:acet:triet (66:34:0,3)	6,22	1,36	8429	0,29	100,3
Água:acet:triet (68:32:0,3)	7,88	1,37	9272	0,17	99,6

pH 3,4	6,81	1,37	6854	0,16	99,6
pH 3,6	6,73	1,40	8629	0,17	99,3

* média de três injeções

** recuperação – teor obtido com método proposto foi considerado 100%

DPR – desvio padrão obtido entre as injeções

Acet – acetoneitrila Triet - trietanolamina

Pela tabela, pode-se perceber que os parâmetros cromatográficos apresentaram poucas alterações. O tempo de retenção teve uma pequena diminuição para a maioria das modificações realizadas, porém a assimetria do pico teve um pequeno aumento.

A coluna Phenomenex utilizada possui as mesmas especificações da coluna do método proposto (C18 fase reversa 250x4,6mm - 5µm) e obteve modificação dos pratos teóricos e assimetria do pico.

Todas as modificações avaliadas resultaram em baixos DPRs entre as injeções e os teores de recuperação obtidos variaram pouco, não sendo superiores a 5%. Portanto, as variações dos parâmetros influenciaram pouco na determinação do teor da matéria-prima e assim o método foi considerado robusto.

5.6 Análise comparativa dos métodos propostos para determinação da matéria-prima de cloridrato de raloxifeno

Os teores obtidos nos doseamentos da matéria prima através de CLAE e VMNA estão apresentados na tabela 10.

Tabela 10 – Resultados obtidos na determinação dos teores de cloridrato de raloxifeno matéria-prima por CLAE, VMNA – POT e VMNA – IND.

	CLAE	VMNA - POT	VMNA - IND
Teor (%)	99,89	98,36	96,58
	100,12	98,31	97,46
	99,96	98,00	97,08
	99,47	97,86	97,14

	99,37	97,60	96,78
	99,17	98,28	97,46
	98,41	98,33	97,45
	96,85	102,29	101,33
	99,10	98,24	97,36
	97,98	98,44	97,58
	99,01	98,06	97,36
	97,10	95,88	94,99
	100,74	98,45	97,64
	99,18	97,59	96,86
	99,24	97,42	96,52
	97,44	97,24	96,54
	98,08	96,20	95,40
	98,43	96,30	95,33
Média ± e.p.m.	98,86 ± 1,04	97,94 ± 1,35	97,05 ± 1,33
DPR	1,05	1,38	1,37

e.p.m.- erro padrão da média

DPR - desvio padrão relativo

Ao ser feita, por ANOVA, a comparação dos resultados obtidos pelos três métodos foi verificado que havia diferença significativa entre os mesmos. Assim sendo, foi realizado teste de Tukey (Tabela 24 - ANEXO) para comparar as médias obtidas nas análises do fármaco em matéria-prima pelos métodos propostos. Este foi calculado através de software Minitab®15 para análises estatísticas. As médias dos métodos CLAE e VMNA-POT não apresentam diferença estatisticamente significativa, porém CLAE e VMNA-IND apresentaram diferenças estatísticas. Pode-se dizer, então, que os métodos CLAE e VMNA-POT são equivalentes e métodos CLAE e VMNA-IND não são, mas os métodos VMNA-POT e VMNA-IND são equivalentes na quantificação de cloridrato de raloxifeno matéria-prima, como já observado anteriormente. Os limites de teor fornecidos indicados pela USP34, onde

consta monografia deste fármaco, nos diz que pode variar entre 97,5 e 102,5%. Considerando os teores obtidos, para os métodos de CLAE e VMNA-POT estes estão dentro dos limites de teores preconizados, mas o mesmo não ocorrendo para o método de VMNA-IND.

Ressalta-se aqui o desenvolvimento e validação de método volumétrico em meio não-aquoso, uma vez que o cloridrato de raloxifeno é uma base fraca, com determinação potenciométrica do ponto final, que demonstrou ser equivalente ao método CLAE, mas de muito mais fácil execução.

5.7 Análise quantitativa da forma farmacêutica

5.7.1 Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)

A espectrofotometria é uma análise no qual se determina a concentração de uma substância presente em uma amostra medindo o quanto de luz UV/VISÍVEL é absorvida por esta. É um método robusto e fácil para quantificação de fármaco em produtos farmacêuticos que oferece boa precisão de análise. (WATSON, 2005, HARRIS, 2001).

Vários autores desenvolveram e validaram método por espectrofotometria na região do visível, reagindo o raloxifeno com substâncias que intensificam a coloração da solução amostra e um método foi desenvolvido na região do UV. Baseado na literatura referida, os parâmetros mais adequados que obedeciam a Lei de Lambert-Beer para quantificação de cloridrato de raloxifeno em comprimidos foram testados e determinados. Como o fármaco se demonstrou ser mais facilmente solúvel em metanol, este foi escolhido como solvente para as soluções e o comprimento de onda das leituras mais adequado foi em 284nm, pois pelo equipamento utilizado, neste comprimento de onda demonstrou ser ocorreu o máximo de absorção para este fármaco nas condições analíticas determinadas obedecendo à Lei de Lambert-Beer. Os espectros resultantes nas condições escolhidas para as análises estão apresentados figura 22-A e B.

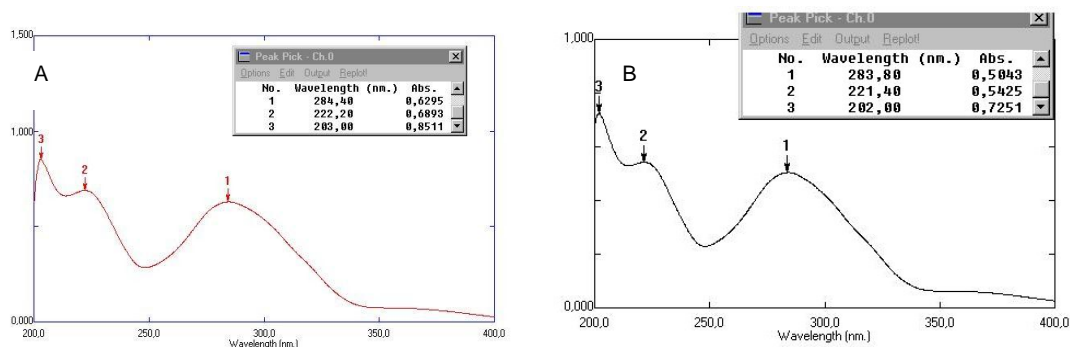


Fig. 21 – Espectro de absorção na região do UV para cloridrato de raloxifeno em solução de metanol (A) SQR e (B) comprimidos.

5.7.1.1 Validação método UV para comprimidos de cloridrato de raloxifeno

5.7.1.1.1 Especificidade

A especificidade do método UV foi avaliada pela análise de uma solução placebo contendo os excipientes da formulação do produto farmacêutico para verificar se ocorria interferência destes excipientes na quantificação do fármaco. As análises e preparo da solução placebo foram realizadas conforme descrito no item 4.6.1.1.1. Os espectros da solução de raloxifeno SQR e placebo foram plotados para comparação e está apresentado na figura 23. Não houve interferência dos excipientes no espectro de absorção do cloridrato de raloxifeno demonstrando, então, o método ser específico.

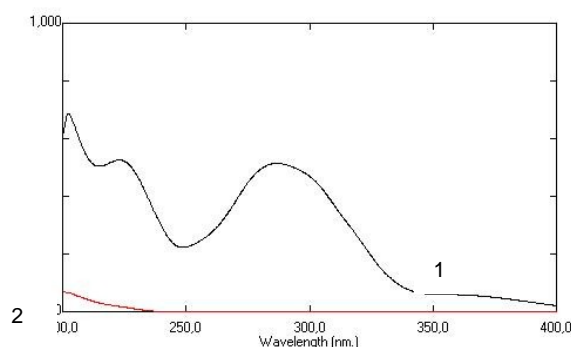


Fig. 22 – Espectro de absorção na região do UV para cloridrato de raloxifeno em solução de metanol (1) amostra e (2) solução placebo.

5.7.1.1.2 Linearidade, limite de detecção e limite de quantificação

Curvas padrão na faixa de concentração de 3,0 a 12,0 µg/mL foram construídas a partir de solução de cloridrato de raloxifeno SQR para verificar linearidade do método, conforme descrito procedimento no item 4.6.2.1.1.

A tabela 11 apresenta os valores de absorvância obtidos para cada concentração da curva padrão.

Tabela 11 – Valores de absorvância obtidos para a curva padrão de cloridrato de raloxifeno por UV

Concentração (µg/mL)	Absorbância*	Média das absorbâncias ± e.p.m.	DPR
3,0	0,213	0,215±0,005	2,55
	0,222		
	0,212		
4,5	0,306	0,311±0,005	1,62
	0,316		
	0,310		
6,0	0,408	0,411±0,003	0,87
	0,415		
	0,410		
7,5	0,507	0,510±0,006	1,19
	0,517		
	0,506		
9,0	0,608	0,614±0,007	0,72
	0,623		
	0,613		
10,5	0,706	0,717±0,01	1,61
	0,729		
	0,715		
12,0	0,809	0,817±0,01	1,26
	0,829		
	0,815		

* resultado de três determinações

e.p.m. – erro padrão da média

DPR – desvio padrão relativo

A figura 24 apresenta a curva padrão construída a partir de sete níveis de concentração analisados em três dias diferentes também representados o coeficiente de correlação e a equação da reta calculados.

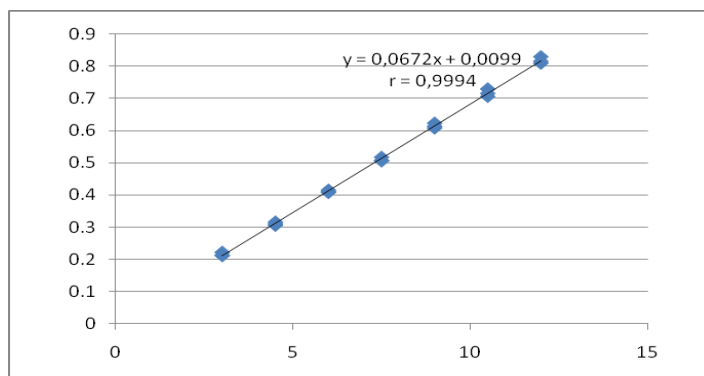


Fig. 23 – Representação gráfica da curva padrão média para cloridrato de raloxifeno para UV

Os dados da regressão estatística e análise da variância (ANOVA – Tabela 25) indicam que a curva padrão obtida para este método não apresenta desvio da linearidade e obteve regressão linear significativa ($p < 0,05$). O coeficiente de correlação de 0,9994 indica correlação entre as absorvâncias e concentração do fármaco analisados. Pode-se dizer que o método proposto é linear na faixa de concentração de 3,0 a 12,0 µg/mL.

Os limites de detecção e quantificação foram estimados de acordo com cálculo sugerido na RE n° 899/2003 e foram calculados em 0,10 µg/mL e 0,31 µg/mL respectivamente. Os baixos limites encontrados demonstraram a boa sensibilidade do método para determinação de raloxifeno.

5.7.1.1.3 Precisão

Para verificar precisão do método UV, soluções de comprimido com três níveis de concentração (6,0, 7,5 e 9,0 µg/mL), em triplicata, foram analisadas e os desvios padrões relativos (DPR) calculados. O preparo das soluções foi realizado conforme descrito no item 4.6.1.1.3.

Os resultados obtidos para avaliação da precisão intra e interdias encontram-se na tabela 12, e os valores de DPR calculados indicam que o método UV para quantificação de cloridrato de raloxifeno é preciso com teor médio de 101,57%.

Tabela 12 – Resultados obtidos em três dias diferentes na quantificação de três amostras com concentrações diferentes ($\mu\text{g/mL}$) de cloridrato de raloxifeno comprimidos por UV para avaliação da precisão intra e interdias

Amostra ($\mu\text{g/mL}$)	Teor (%) das soluções*			Teor intradia (%) \pm e.p.m.	DPR
	6,0	7,5	9,0		
Dia I	100,86	99,3	102,59	101,09 \pm 1,28	1,27
Dia II	101,27	100,36	102,23	100,29 \pm 0,95	0,94
Dia III	101,26	102,29	103,50	102,35 \pm 1,15	1,12
Média (%)	101,13	100,83	102,78	Teor interdias (%) \pm e.p.m. DPR	101,57 \pm 1,23 1,12

* resultado de três determinações
e.p.m. – erro padrão da média
DPR – desvio padrão relativo

5.7.1.1.4 Exatidão

A exatidão do método foi verificada analisando amostras do fármaco nos comprimidos adicionadas de quantidade definida e conhecida de SQR e, com isso, calculando o teor de recuperação do adicionado de SQR. As amostras e o procedimento das análises estão descritos no item 4.6.1.1.4. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 13. O teor médio de recuperação de 100,1% indica que o método é exato.

Tabela 13 – Resultados obtidos na determinação da exatidão do método por UV para cloridrato de raloxifeno em comprimidos

Solução	Concentração adicionado ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração média recuperado* ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%) \pm e.p.m.	DPR
SR1	2,0	2,03	100,87 \pm 0,71	0,71
SR2	3,5	3,48	99,14 \pm 1,07	1,08
SR3	5,0	5,04	100,34 \pm 0,59	0,59

* resultado de três determinações
e.p.m. – erro padrão da média
DPR – desvio padrão relativo

5.7.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O desenvolvimento do método se deu conforme descrito no item 4.5.2 (CLAE para matéria prima), sendo que os parâmetros utilizados para a quantificação dos comprimidos são os mesmos.

As condições cromatográficas determinadas para o método estão descritas no item 4.5.2 e o cromatograma para o comprimido obtido nestas condições esta apresentado no item 4.4.4.3, sendo que apresentou tempo de retenção de cerca de 7,0 min, similar ao da SQR.

5.7.2.1 Validação do método CLAE para forma farmacêutica comprimido

5.7.2.1.1 Especificidade

O método foi verificado quanto à especificidade avaliando soluções de cloridrato de raloxifeno comprimido submetidas a condições de degradação forçada e também frente à solução placebo contendo excipiente da formulação do comprimido.

A solução placebo foi obtida preparando solução com concentração equivalente a 10,0 µg/mL de cloridrato de raloxifeno, a partir de mistura de excipientes obtido conforme descrito no item 4.6.1.1.1 (especificidade método UV para comprimido). Esta solução foi analisada e o cromatograma obtido sobreposto ao cromatograma de solução de SQR a 10 µg/mL para avaliar interferência dos excipientes na quantificação do raloxifeno. O cromatograma resultante está apresentado na figura 25 e pode-se perceber ausência de qualquer pico interferente no tempo de retenção do fármaco analisado.

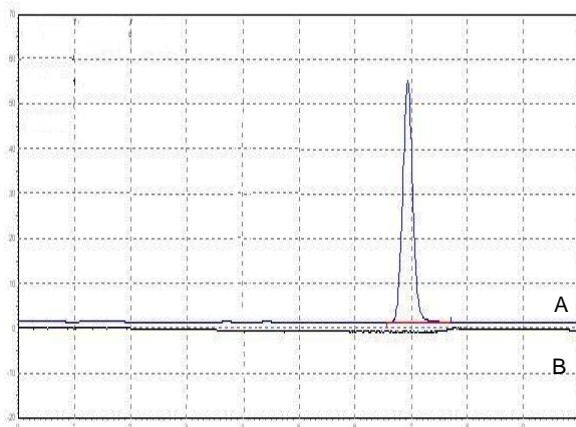


Fig. 24 – Cromatograma para avaliar especificidade (A) solução de cloridrato de raloxifeno SQR (10,0 μ g/mL), (B) solução placebo contendo excipientes da formulação do comprimido. Condições cromatográficas: fase móvel água:acetonitrila:trietilamina (67:33:0,3 v/v) pH 3,5, coluna NST C18 de fase reversa com 250x4,6mmx5 μ m, vazão de 1,0mL/min, volume de injeção de 20 μ l, detecção a 287nm e temperatura de análise de 30 °C.

As condições de degradação forçada às quais a solução de comprimido foi submetida foram: hidrólise ácida, hidrólise alcalina, oxidação, fotólise e degradação térmica. O preparo das soluções e análise destas estão descritos no item 4.5.2.1.1 (especificidade método CLAE para matéria-prima). Os cromatogramas obtidos foram comparados com os cromatogramas das soluções branco obtidas nas mesmas condições de degradação.

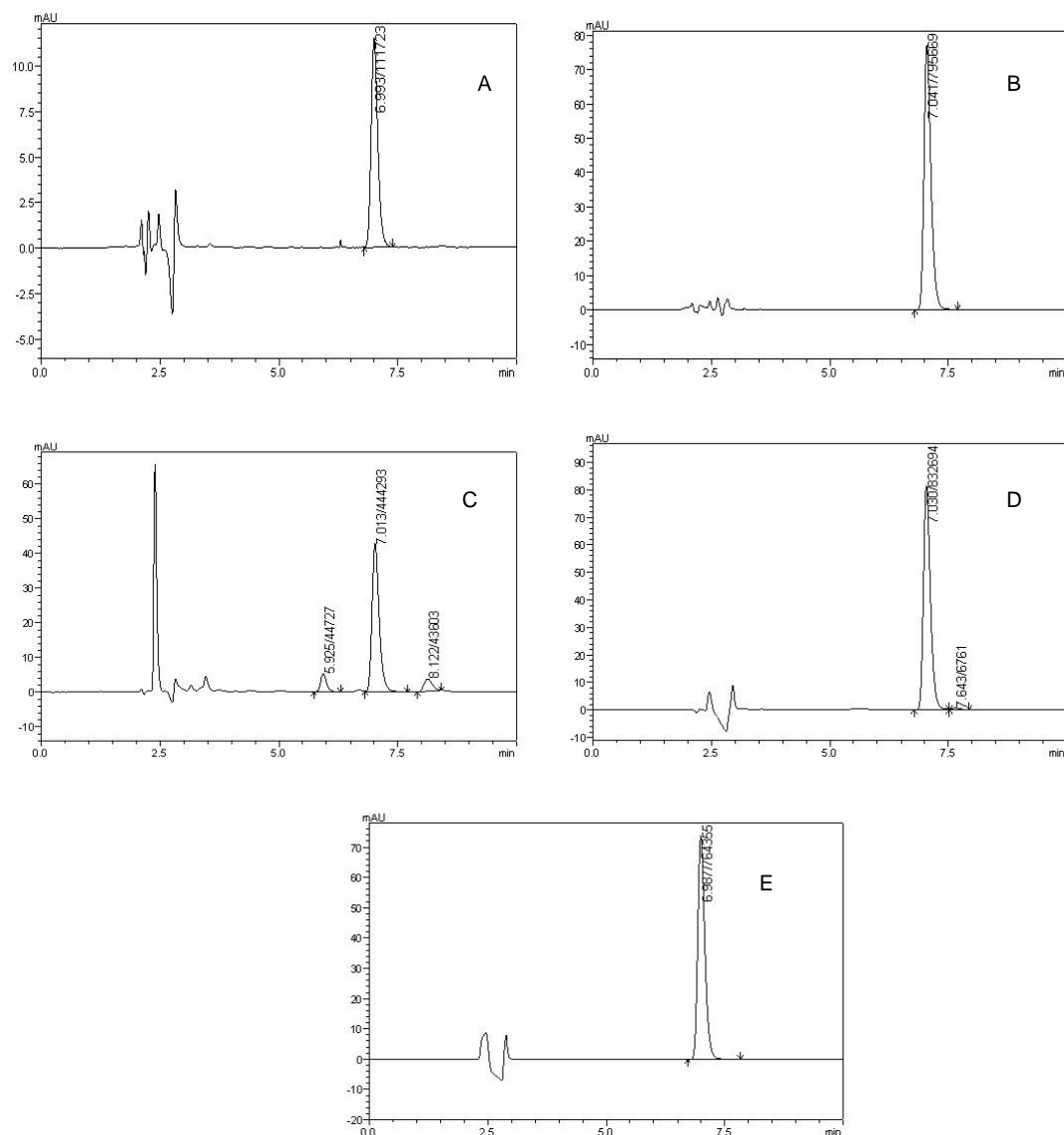


Fig 25 – Cromatogramas de solução de cloridrato de raloxifeno comprimido submetido a degradação forçada para avaliação da especificidade de método CLAE: (A) hidrólise ácida (HCl 1M), (B) hidrólise alcalina (NaOH 1M), (C) oxidação (H_2O_2 3%), (D) fotólise (luz UV a 352nm) e (E) degradação térmica (estufa a 80°C). Condições cromatográficas: fase móvel água:acetonitrila:triethylamina (67:33:0,3) pH 3,5, coluna NST C18 de fase reversa com 250x4,6mmx5 μm , vazão de 1,0mL/min, volume de injeção de 20 μl , detecção a 287nm e temperatura de análise de 30 °C.

Os cromatogramas se apresentaram de forma semelhante aos da matéria-prima. Todos os cromatogramas foram analisados em CLAE equipado com detector de arranjo de diodos, onde foi possível observar que todos os picos apresentaram pureza cromatográfica. Nos comprimidos analisados, nenhum dos picos de possíveis produtos de degradação apresentou interferência nos picos do fármaco,

indicando que o método é específico para quantificação do cloridrato de raloxifeno em comprimidos.

5.7.2.1.2 Linearidade, limite de detecção e limite de quantificação

Foram construídas curvas padrão com sete níveis de concentração (4,0 a 16,0 µg/mL) em três dias diferentes a partir de solução de cloridrato de raloxifeno SQR. O preparo das amostras está descrito no item 4.6.2.1.2.

Os valores de área absolutos obtidos para cada concentração testada estão apresentados na tabela 14. A curva padrão média construída a partir das sete concentrações de SQR analisadas está representada na figura 27, bem como a equação da reta e o coeficiente de correlação resultantes.

Tabela 14 – Valores de áreas obtidos para a curva padrão de cloridrato de raloxifeno por CLAE

Concentração (µg/mL)	Área*	Média das áreas ± e.p.m.	DPR
4,0	325117 310515 314179	316602±7697	2,40
6,0	464233 456771 609073	461873±4422	0,95
8,0	609073 585156 603028	599085±12436	2,07
10,0	747496 738276 755301	747024±8521	1,14
12,0	911276 898914 909115	906434±6602	0,72
14,0	1060657 1045403 1059501	1055187±8492	0,80
16,0	1237176 1194794 1198967	1210312±23359	1,92

* resultado de três determinações
e.p.m. – erro padrão da média
DPR – desvio padrão relativo

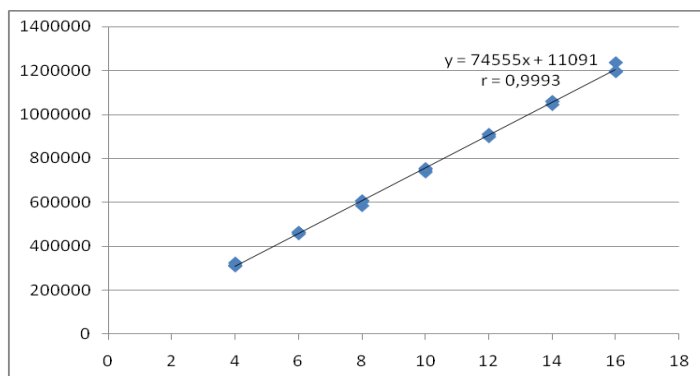


Fig. 26 – Representação gráfica da curva padrão média do cloridrato de raloxifeno SQR obtido por CLAE

A análise da variância (ANOVA) e a regressão estatística dos resultados obtidos (Tabela 26) indicam que a curva padrão apresenta regressão linear significativa ($p < 0,05$) e não apresenta desvio de linearidade. O coeficiente de correlação de 0,9993 apresentado indica correlação entre as áreas absolutas e as concentrações analisadas do fármaco.

Os limites de detecção e de quantificação foram estimados em $0,50 \mu\text{g/mL}$ e $1,50 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Estes foram calculados de acordo com RE nº 899/2003. Os baixos limites encontrados demonstraram a boa sensibilidade do método para a determinação do cloridrato de raloxifeno.

5.7.2.1.3 Precisão

Para verificar a precisão do método CLAE para quantificação de cloridrato de raloxifeno em comprimidos, foram realizadas determinações do teor de seis amostras do fármaco nos comprimidos com mesma concentração, em três dias diferentes calculando-se o DPR das médias das determinações.

O preparo das amostras está descrito no item 4.6.2.1.3 e todas as análises foram realizadas em triplicata. As condições cromatográficas foram as mesmas usadas para análise da matéria-prima e estão descritas no item 4.5.2.

Os resultados obtidos e os DPRs da precisão intra e interdias estão apresentados na tabela 15. Os DPRs apresentados indicam que o método é preciso com média de teor de 100,11%.

Tabela 15 – Resultados obtidos em três dias de quantificação de amostra de cloridrato de raloxifeno comprimido (10,0µg/mL) para avaliação de precisão intra e interdias

Dia	Teor(%) das soluções*						Teor intradia (%)±e.p.m.	DPR
I	99,01	99,50	99,28	100,28	98,94	98,49	99,24±0,60	0,61
II	98,97	99,49	100,63	99,19	99,24	98,88	99,39±0,63	0,64
II	101,09	102,87	101,24	101,99	100,94	100,98	101,69±0,73	0,72
Teor (%) interdias ± e.p.m.							100,11±1,31	1,37

* resultado de três determinações
e.p.m. – erro padrão da média
DPR – desvio padrão relativo

5.7.2.1.4 Exatidão

O método de quantificação de cloridrato de raloxifeno comprimido por CLAE foi avaliado quanto à sua exatidão pela análise de preparações diferentes do fármaco, onde foram adicionadas quantidades definidas e conhecidas de SQR, perfazendo soluções com concentração de 8,0, 10,0 e 12,0µg/mL.

As soluções foram preparadas conforme item 4.6.2.1.4. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 16, e pelos teores de recuperação apresentados pode-se dizer que o método CLAE para comprimidos é exato.

Tabela 16 – Resultados obtidos na determinação da exatidão do método por CLAE para cloridrato de raloxifeno comprimido

Solução	Concentração adicionado ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração média recuperado* ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%) \pm e.p.m.	DPR
SR1	3,42	3,41	99,91 \pm 1,50	1,50
SR2	5,70	5,67	99,50 \pm 0,38	0,38
SR3	7,98	7,97	99,87 \pm 0,18	0,18

* resultado de três determinações
e.p.m. – erro padrão da média
DPR – desvio padrão relativo

5.7.2.1.5 Robustez

O método foi avaliado quanto à robustez de acordo com item 4.6.2.1.5. Foram realizadas modificações nas condições analíticas como: coluna, temperatura de análise, vazão da fase móvel, proporção dos solventes da fase móvel e pH. Os parâmetros cromatográficos obtidos estão apresentados na tabela 17.

Assim como para a matéria-prima pequenas variações foram observadas. Os DPRs entre as injeções foram baixos e os teores de recuperação variaram pouco. Os resultados demonstram que as alterações nas condições do método não influenciaram na determinação do cloridrato de raloxifeno em comprimidos.

Tabela 17 – Avaliação da robustez do método CLAE para quantificação de cloridrato de raloxifeno em comprimido

Parâmetro	Tempo de retenção* (min)	Assimetria* (T<1,50)	Pratos teóricos* (N>2000)	DPR	Rec** (%)
Método proposto	7,64	1,33	9395	0,25	-----
Coluna phenomenex	6,96	1,06	6743	0,44	100,1
Temperatura 29°	6,90	1,40	9060	0,04	100,6
Temperatura 31°	6,77	1,40	9066	0,07	100,2
Vazão 0,95	7,29	1,40	9931	0,07	100,5

mL/min					
Vazão 1,05 mL/min	6,64	1,37	8930	0,10	100,4
Água:acetonitrila (66:34)	6,19	1,36	8356	0,08	100,3
Água:acetonitrila (68:32)	7,89	1,37	9148	0,10	100,4
pH 3,4	6,78	1,32	9120	0,11	100,2
pH 3,6	6,73	1,40	8535	0,05	100,1

* média de três determinações

** recuperação – teor obtido com método proposto foi considerado 100%

DPR – desvio padrão obtido entre as injeções

O método proposto utiliza água adicionada de trietilamina pH 3,5 que se demonstrou ser tão eficiente na determinação de raloxifeno quanto solução tampão utilizada em metodologias encontradas na literatura. Apresentou um tempo de retenção adequado, demonstrou ser sensível com concentração de trabalho das análises baixa.

5.7.3 Eletroforese capilar (EC)

Nos últimos anos, a eletroforese capilar tem sido utilizada como uma técnica para separação e análise de produtos farmacêuticos, compostos clínicos e ambientais. A separação das substâncias ocorre pela diferença de carga, onde partículas carregadas eletricamente (positiva ou negativamente) quando submetidas a campo elétrico externo migram em direção aos polos positivos ou negativos. O grande êxito desta técnica pode ser atribuído à simplicidade, variação de modos de separação que podem ser efetuados em uma única coluna capilar e diversidade de compostos passíveis de análise (TAVARES, 1997).

As técnicas mais usadas são eletroforese capilar de zona e a eletroforese capilar micelar ou cromatografia eletrocinética micelar (*micellar electrokinetic capillary chromatography*, MECC). Na eletroforese capilar determinada quantidade de amostra é injetada no capilar em um meio tamponado. Quando o potencial é aplicado, cada zona migra independentemente com velocidade constante, porém diferenciada, característica de sua própria mobilidade. Na MECC, a limitação primária do método em zona de separar compostos neutros que migram no capilar

por ação exclusiva do fluxo eletroosmótico é modificado pela introdução de agentes tensoativos iônicos em concentração na qual ocorre formação de micelas. Estes quando adicionados à solução eletrólito de corrida proporcionam um sistema cromatográfico de duas fases. O eletrólito representa a fase móvel que é transportada pela ação do campo elétrico, e as micelas formadas representam fase pseudo estacionária que é transportada por combinação de eletroforese e eletrosmose. A diferença dos solutos neutros nas duas fases resulta na separação dos componentes (NETO & NUNES, 2003, WATSON, 2005).

No desenvolvimento do método para quantificação de cloridrato de raloxifeno em comprimidos, diversos parâmetros relativos à técnica foram analisados. Soluções tampão diferentes, como fosfato, citrato e acetato foram testadas em diferentes concentrações e pH. Perez-Ruiz e colaboradores (2004) desenvolveram método por eletroforese capilar de zona utilizando como tampão de corrida acetato 20 mM pH 4,5. Com a técnica de zona, não foi possível a quantificação, pois a técnica não se mostrou reproduzível originando picos de pouca intensidade sofrendo com interferência da linha de base. Foram, então, testadas soluções tampão com a adição de agentes tensoativos. Após várias análises o tampão de corrida mais adequado se mostrou ser ácido bórico 35 mM com adição de dodecilsulfato de sódio (SDS) 50 mM em pH 8,8. Nestas condições, o fármaco se mostrou neutro e apresentou picos reproduzíveis e com boa intensidade. Também foram testados outros parâmetros do método como voltagem aplicada, temperatura de análise, detecção e injeção da amostra. Para maior precisão dos resultados, no método desenvolvido, foi adicionado padrão interno de análise. A substância escolhida foi o diclofenaco de potássio (200,0 µg/mL). As condições analíticas que se mostraram mais adequadas foram:

Capilar: sílica fundida com 48,5cm (40,0cm de comprimento efetivos e 50µm de diâmetro)

Voltagem aplicada: 25 kV

Temperatura de análise: 32 °C

Detecção: UV a 280nm

Injeção: 45 mBar em 4s

Ativação do capilar: NaOH 1M (30minutos)

Condicionamento diário: NaOH 1M (20min), água (15min) e tampão eletrólito de corrida (15min)

Condicionamento entre corridas: NaOH 0,1M (3min), água (1min) e tampão eletrólito de corrida (2min).

Os eletroferogramas obtidos com as condições analíticas selecionadas estão apresentados no item 5.4.4 (identificação do produto farmacêutico – EC).

5.7.3.1 Validação do método EC para comprimidos

5.7.3.1.1 Especificidade

A interferência de possíveis produtos de degradação e dos excipientes da formulação foi investigada para verificar a especificidade do método de EC.

Uma solução placebo contendo os excipientes da formulação do comprimido de cloridrato de raloxifeno foi preparada conforme descrito no item 4.6.3.1.1 e analisada nas condições analíticas do método. O eletroferograma obtido está apresentado figura 28, e como pode ser observado os excipientes não interferiram nos picos do fármaco e do padrão interno.

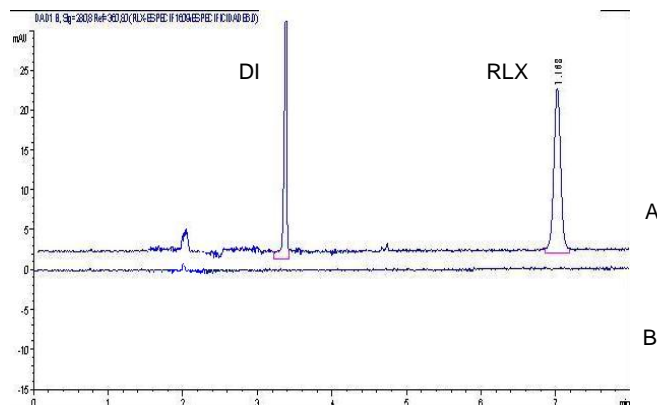


Fig. 27 – Eletroferograma para avaliação da especificidade de método EC para comprimidos (A) solução amostra contendo SQR e padrão interno de diclofenaco de potássio (DI) (B) solução placebo contendo excipientes da formulação do comprimido de cloridrato de raloxifeno (RLX)

O pó de comprimidos de raloxifeno, em solução, foi submetido a condições de degradação forçada, tais como hidrólise ácida, hidrólise alcalina, oxidação, fotólise e degradação térmica, para formação dos possíveis produtos de degradação do fármaco. O procedimento de análise e preparo das amostras foi realizado conforme descrito no item 4.6.3.1.1. Os eletroferogramas das amostras foram comparados aos da solução branco.

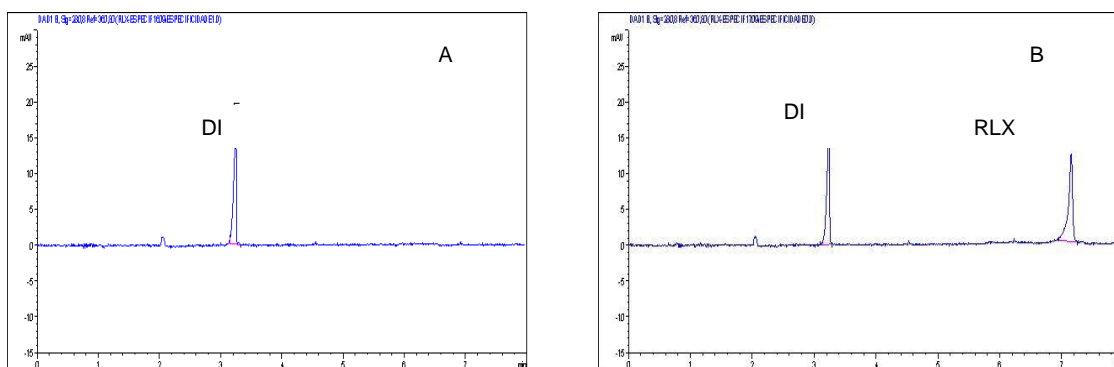


Fig. 28 – Eletroferogramas da solução de cloridrato de raloxifeno comprimido (RLX) submetida à hidrólise ácida (HCl 1M) para avaliação da especificidade (A) solução branco com padrão interno (B) solução de RLX e padrão interno (DI)

Na condição de hidrólise ácida, o fármaco apresentou degradação de cerca de 50%, porém não houve o aparecimento de picos secundários aos picos do raloxifeno ou do padrão interno.

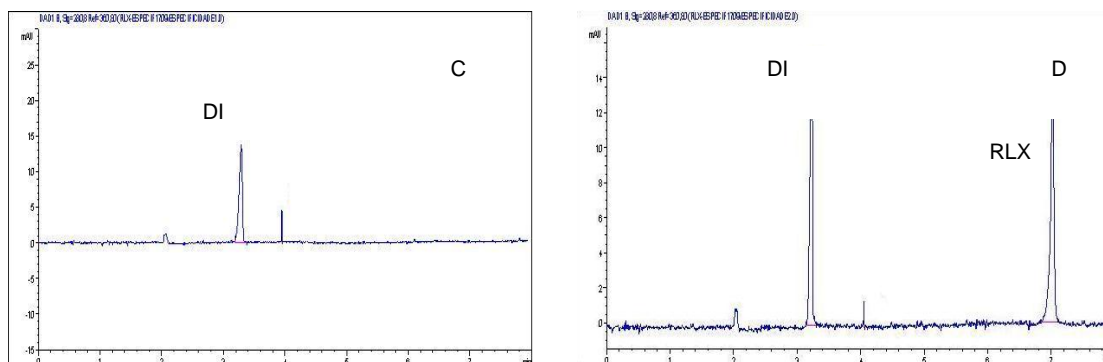


Fig. 29 - Eletroferogramas da solução de cloridrato de raloxifeno comprimido (RLX) submetida à hidrólise alcalina (NaOH 1M) para avaliação da especificidade (C) solução branco com padrão interno (D) solução de RLX e padrão interno (DI)

Na condição alcalina, o fármaco apresentou pouca degradação (< 5%). Houve o aparecimento de um pequeno pico entre os picos do raloxifeno e o do padrão interno, que possivelmente é devido à solução de hidróxido de sódio utilizada.

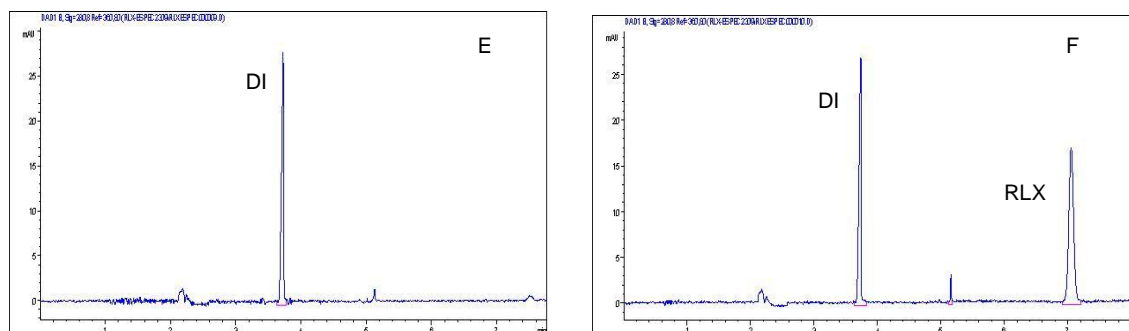


Fig. 30 - Eletroferogramas da solução de cloridrato de raloxifeno comprimido (RLX) submetida à oxidação (H₂O₂ 3%) para avaliação da especificidade (E) solução branco com padrão interno (F) solução de RLX e padrão interno (DI)

O raloxifeno apresentou degradação de cerca de 10% para a condição oxidativa. Houve o aparecimento de pico secundário entre os picos do raloxifeno e do padrão interno, que possivelmente é devido à solução de peróxido de hidrogênio. Nesta condição não houve o aparecimento de picos de possíveis produtos de degradação.

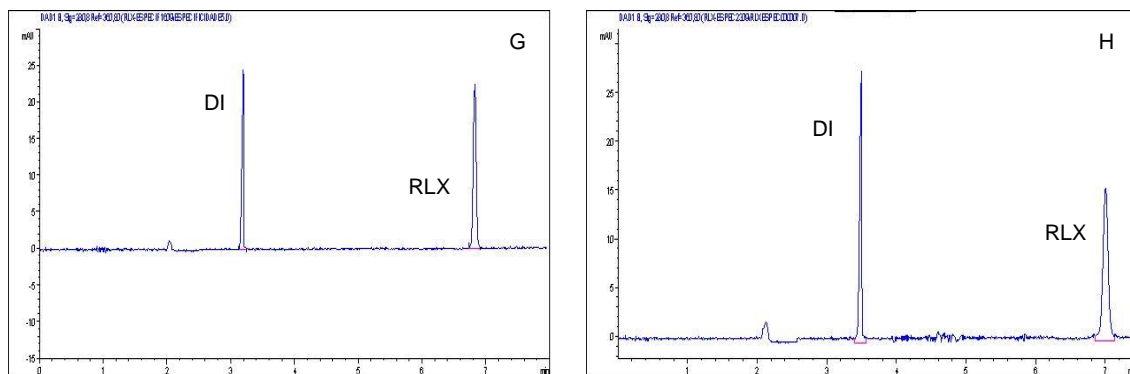


Fig. 31 - Eletroferogramas da solução de cloridrato de raloxifeno comprimido (RLX) submetida à degradação forçada para avaliação da especificidade (G) fotólise (luz UV a 352nm), (H) degradação térmica (estufa a 80°C). DI – diclofenaco de potássio

Na fotólise, o raloxifeno não apresentou degradação (Fig. 31-G). Na condição térmica, apresentou < 5% de degradação. Não houve o aparecimento de picos secundários aos picos do raloxifeno e do padrão interno.

Os picos foram avaliados quanto a sua pureza cromatográfica com auxílio de detector de arranjo de diodos e apresentaram-se puros. Os resultados indicam que o método EC é específico para quantificação do cloridrato de raloxifeno em comprimidos.

5.7.3.1.2 Linearidade, limite de detecção e limite de quantificação

A linearidade do método EC foi verificada através da construção de curvas padrão com cinco níveis de concentração a partir de solução de SQR realizadas em três dias diferentes. O procedimento de preparo das amostras está descrito no item 4.6.3.1.2 e a curva média obtida com a respectiva equação da reta e coeficiente de correlação (r) resultante estão representados na figura 33.

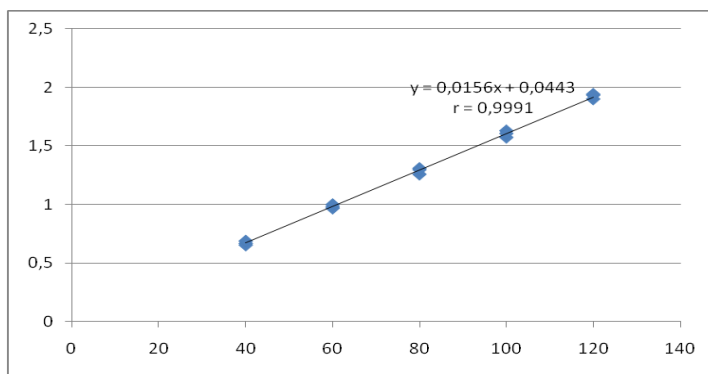


Fig. 32 – Representação gráfica da curva padrão de cloridrato de raloxifeno SQR obtido por EC

A tabela 18 apresenta as relações área fármaco/área padrão interno e DPRs para cada concentração obtidos na elaboração da curva padrão.

Tabela 18 – Valores de áreas obtidos para a curva padrão de cloridrato de raloxifeno por EC

Concentração (µg/mL)	P/PI* **	Média das áreas ± e.p.m.	DPR
40,0	0,6688	0,6714±0,02	2,59
	0,6554		
	0,6899		
60,0	0,9807	0,9833±0,02	1,60
	0,9691		
	1,0003		
80,0	1,2582	1,2880±0,03	2,05
	1,3087		
	1,2972		
100,0	1,5724	1,6022±0,03	1,77
	1,6290		
	1,6054		
120,0	1,8991	1,9237±0,02	1,12
	1,9324		
	1,9396		

* P/PI – relação área fármaco/área padrão interno

**resultado de três injeções

e.p.m. – erro padrão da média

DPR – desvio padrão relativo

A avaliação da linearidade se deu pela análise da regressão e análise da variância (ANOVA – Tabela 27). Os resultados demonstraram que a curva padrão obtida apresenta regressão linear significativa ($p < 0,05$) e não apresenta desvio da

linearidade. O coeficiente de correlação obtido de 0,9991 indica, juntamente aos outros resultados, que o método é linear na faixa de concentração de 40,0 a 120,0 µg/mL de cloridrato de raloxifeno.

Foram estimados, de acordo com a RE n° 899/2003, os limites de detecção e de quantificação. Estes foram calculados em 12,1 µg/mL e 36,6 µg/mL, respectivamente. Estes limites encontrados a sensibilidade da técnica para quantificação do fármaco por eletroforese capilar micelar.

5.7.3.1.3 Precisão

Para avaliar se o método EC é preciso para quantificar cloridrato de raloxifeno em comprimidos, foram feitas em três dias diferentes determinações de teor em seis amostras de raloxifeno comprimido. O procedimento das determinações e preparo das amostras foram realizados conforme item 4.6.3.1.3. Os desvios padrão relativos (DPR) das médias das determinações foram calculados para avaliar a precisão intra e interdias e assim verificar a repetibilidade do método. Os resultados estão apresentados na tabela 19.

Tabela 19 – Resultados obtidos em três dias de quantificação por EC de amostra de cloridrato de raloxifeno comprimido (80,0 µg/mL) para avaliação de precisão intra e interdias

Dia	Teor(%) das soluções*						Teor intradia (%)±e.p.m.	DPR
I	100,59	99,98	101,25	97,57	95,83	99,18	99,07±2,03	2,05
II	102,29	99,14	100,90	97,69	97,20	99,80	99,51±1,93	1,94
III	99,50	101,26	104,36	101,76	99,77	99,80	101,07±1,85	1,83
Teor (%) interdias ± e.p.m.							99,84±2,02	2,03

* resultado de três injeções
e.p.m. – erro padrão da média
DPR – desvio padrão relativo

Os valores de cerca de 2,0% obtidos para os DPR da precisão intra e interdias indicam que o método apresentou repetibilidade e assim pode se dizer que é preciso para determinação do cloridrato de raloxifeno.

5.7.3.1.4 Exatidão

A exatidão do método EC foi verificada analisando soluções de comprimido de cloridrato de raloxifeno com concentração conhecida e concentrações definidas de solução de SQR adicionados a estas soluções perfazendo concentrações de 60,0, 80,0 e 100,0 µg/mL, e assim calculando o teor de recuperação do adicionado conforme descrito no item 4.6.3.1.4.

Os valores experimentais obtidos estão apresentado na tabela 20. Os teores de recuperação obtidos com média de recuperação de 98,32% demonstram que o método proposto é exato na quantificação do fármaco.

Tabela 20 – Resultados obtidos na determinação da exatidão do método por EC para cloridrato de raloxifeno comprimido

Solução	Concentração adicionado (µg/mL)	Concentração média recuperado* (µg/mL)	Recuperação (%) ± e.p.m.	DPR
SR1	21,06	21,35	100,86±2,85	2,83
SR2	42,03	39,18	97,11±3,28	3,38
SR3	63,05	58,69	97,00±3,21	3,30

* resultado de três determinações
e.p.m. – erro padrão da média
DPR – desvio padrão relativo

5.7.3.1.5 Robustez

Modificações nos parâmetros do método EC foram avaliadas para verificar a robustez. Os fatores analisados foram combinados através de desenho fatorial de 2⁴

calculados através do software Minitab®15 e a análise dos dados obtidos também foi realizada através do mesmo software.

A combinação dos fatores experimentais resultantes foi analisada através de Gráfico de Pareto obtido pela análise dos dados, onde é possível observar quais os parâmetros modificados que mais influenciam na determinação do fármaco pelo método de EC. O gráfico está representado na figura 34. É possível observar que a concentração do tensoativo associado ao pH da solução tampão é o fator que mais influencia o método, porém não acarreta mudança significativa na quantificação do fármaco. O segundo fator de maior influência é temperatura de análise também não alterando significativamente a determinação do teor da solução amostra. Os outros fatores, concentração do ácido bórico no tampão, voltagem aplicada e concentração do tensoativo e voltagem aplicada combinados influenciam em menor grau não interferindo nas análises. É possível observar que nenhum dos fatores acarreta mudanças significativas que interfiram no método EC para quantificação do cloridrato de raloxifeno, podendo-se dizer que o método é robusto.

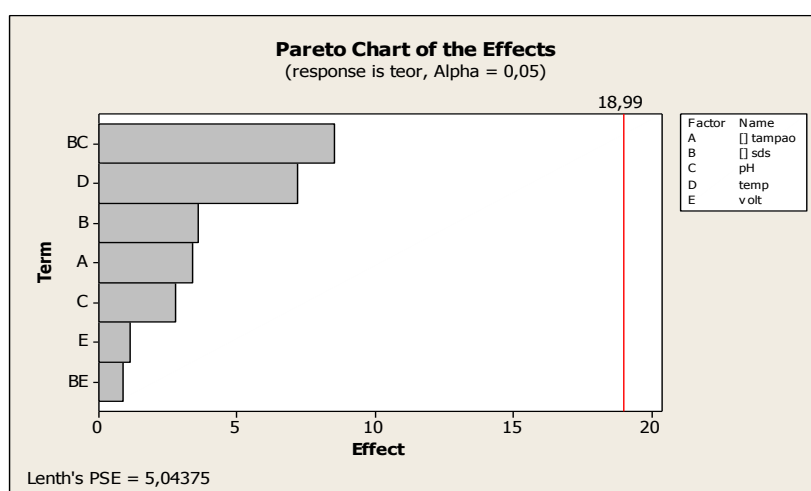


Fig. 33 – Gráfico de Pareto (Minitab®15) obtido através da análise dos resultados obtidos na verificação da robustez do método EC para comprimido ([tampão – concentração de ácido bórico no tampão, [] sds – concentração de tensoativo, pH – pH da solução tampão de corrida, temp – temperatura de análise, volt – voltagem aplicada)

A MECC utilizada aqui como método proposto apresenta uma eficiência maior quando comparada à técnica de zona livre, em decorrência das características inerentes ao fluxo eletroosmótico, particularmente pelo caráter linear do perfil radial da velocidade dos solutos em micelas através do capilar. O método de quantificação de fármacos por eletroforese capilar possui como vantagem o uso de solventes não orgânicos como fase móvel e também por produzir quantidade muito pequena de resíduos.

5.8 Análise comparativa dos métodos propostos para determinação de cloridrato de raloxifeno em comprimidos

Os métodos de UV, CLAE e EC foram comparados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA – Tabela 28) observando significância ou não das diferenças. Os resultados obtidos na determinação dos teores são apresentados na tabela 21.

Tabela 21 – Resultados obtidos na determinação dos teores de cloridrato de raloxifeno em comprimidos por UV, CLAE e EC

	UV	CLAE	EC
Teor (%)	100,98	99,01	100,58
	100,26	99,49	99,98
	99,53	99,27	101,25
	98,97	100,27	97,57
	99,37	98,94	95,83
	99,37	98,49	99,18
	100,97	98,97	102,29
	100,48	99,46	99,14
	102,46	100,63	100,90
	101,37	98,18	97,69
	100,66	99,24	97,20

	99,96	98,88	99,80
	100,48	101,49	99,50
	99,96	102,87	101,26
	99,10	101,24	104,35
	101,62	101,99	101,76
	101,78	100,94	99,77
	101,46	101,98	99,80
Média ± e.p.m.	100,58 ± 1,09	100,11 ± 1,31	99,88 ± 2,02
DPR	1,09	1,31	2,03

e.p.m.- erro padrão da média
DPR - desvio padrão relativo

Para a avaliação estatística foram utilizados os valores obtidos nas determinações para verificar a precisão dos métodos. O resultado da ANOVA demonstrou não haver diferença estatística entre os métodos desenvolvidos. Assim, os mesmos podem ser considerados equivalentes na quantificação de cloridrato de raloxifeno em comprimidos.

6. CONCLUSÃO

- A avaliação dos caracteres físicos e solubilidade da substância química de referência e da matéria-prima, assim como determinação do ponto de fusão e a análise térmica permitiram a caracterização do fármaco.
- A identificação da matéria-prima foi possível através das análises espectrofotométricas na região do UV, IV e cromatográficas por CLAE.
- A presença do fármaco na forma farmacêutica foi assegurada através de identificação pelos métodos desenvolvidos por UV, CCD, CLAE e EC.
- A análise do teor de água por método volumétrico pelo processo de Karl Fisher e através da determinação da perda por dessecação apresentou baixo teor de umidade ($< 0,5\%$) estando de acordo com o preconizado para este fármaco em monografia inclusa na USP 34.
- O método desenvolvido para quantificação da matéria-prima de cloridrato de raloxifeno por volumetria em meio não-aquoso com detecção do ponto final por indicador e por potenciometria foi validado demonstrando ser preciso.
- Os métodos de detecção do ponto final da volumetria por indicador e potenciometria foram comparados entre si, estatisticamente, e verificou-se não haver diferença estatística entre eles, indicando equivalência para a determinação do teor da matéria-prima.
- O método desenvolvido por CLAE para quantificação da matéria-prima e produto farmacêutico foi validado e demonstrou ser específico, linear, preciso, exato e robusto.
- Os métodos desenvolvidos por UV e EC para quantificar produto farmacêutico foram validados e demonstraram ser específicos, lineares, precisos, exatos e robustos.
- A análise comparativa dos métodos por VMNA e CLAE para determinação da matéria-prima demonstrou não haver diferença estatística entre os métodos CLAE e VMNA-POT, porém houve diferença entre os métodos CLAE e VMNA-IND.

- A análise comparativa dos métodos por UV, CLAE e EC para determinação do produto farmacêutico demonstrou não haver diferença estatística entre eles, indicando equivalência entre os mesmos na quantificação do teor de cloridrato de raloxifeno em comprimidos.
- Todos os métodos desenvolvidos para quantificação do cloridrato de raloxifeno em matéria-prima e produto farmacêutico demonstraram ser rápidos, sensíveis e de fácil execução.

7. REFERÊNCIAS

ANNAPURNA M., RAO B., KUMAR R.; Spectrophotometric determination of raloxifene hydrochloride in pharmaceutical formulations, E-Journal of Chemistry, v. 4 (1), p. 79-82, 2007.

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Bulário eletrônico, disponível em <http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM%5B25557-2-0%5D.PDF> acessado em 19/01/2011

BAO T., PROWELL T., STEARNS V., Chemoprevention of breast cancer: tamoxifen, raloxifene and beyond, American Journal of Therapeutics, v. 13 (4), p. 337-348, 2006.

BASAVIAH K., THARPA K., KUMAR V., RAJEDRAPASAD N., HIRIYANNA S., VINAY K.; Optimized and validated spectrophotometric methods for the determination of raloxifene in pharmaceuticals using permanganate, Archives of Pharmaceutical Research, v. 32 (9), p. 1271-1279, 2009.

BASAVIAH K., KUMAR U. R. A., THARPA K.; Gradient HPLC analysis of raloxifene hydrochloride and its applications to drug quality control, Acta Pharm, v. 58, p. 347 – 356, 2008.

BASAVIAH K., KUMAR U. R. A., THARPA K.; Validated spectrophotometric methods for the determination of raloxifene hydrochloride in pharmaceuticals, J. Chil. Chem. Soc., p. 1635 – 1639, v. 53, nº 3, 2008.

BRUNTON, L., PARKER, K., BLUMENTHAL, D., BUXTON I.; Goodman & Gilman: Manual de Farmacologia Terapêutica, AMGH Editora Ltda, Porto Alegre, p. 1003-1004, 2010.

CAIRNS D.; Essentials of Pharmaceutical Chemistry, 3° Ed., Pharmaceutical Press, Londres, 280p., 2008.

CIOLA, R. Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho: *HPLC*, São Paulo, SP, 1998.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S.; Introdução a métodos cromatográficos, 5ª ed. Campinas, SP, 1993.

COSTA-PAIVA L., HOROWITZ A.P., SANTOS A.O., FONSECHI-CARVASAN G.A., PINTO-NETO A.A.; Prevalência de osteoporose em mulheres na pós-menopausa e associação com fatores clínicos e reprodutivos, Rev Bras Ginecol Obstet., v. 25, p.507-512, 2003.

DIAS, CAROLINA LUPI, Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação do inibidor de protease ritonavir matéria-prima e cápsulas, Dissertação de Mestrado, 147p., 2006

DHARUMAN J., RAVICHANDRAN V., THIRUMOON N., DHARRAMSI A.; Spectrophotometric analysis of raloxifene hydrochloride in pure and pharmaceutical formulations, Pharmazie, v. 59 (9), p. 720-721, 2004.

FAISAL-CURRY A., ZACHELLO K., Osteoporose: prevalência e fatores de risco em mulheres de clínica privada maiores de 49 anos de idade, Acta Ortop. Brasil., v. 15 (3), p. 146-150, 2007.

Farmacopéia Brasileira, 5º Ed., Brasília, 2010.

FREITAS E.V.; CANÇADO P.A.X; DOLL J; GORZINE M.L.; Tratado de Geriatria e Gerontologia, 2ºed.; Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 809, 2006.

FUCHS, F.D., WANNAMACHER L., FERREIRA, B. C., Farmacologia clínica – Fundamento da terapia racional, 3º Ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 869-873, 2004.

GUARNIERO R., OLIVEIRA L., Osteoporose: atualização no diagnóstico e principais etapas básicas para o tratamento, Rev. Bras. Ortop., v. 39 (9), p. 477-485, 2004.

HARRIS, D. C.; Análise Química Quantitativa; 5ª Ed., Editora LTC, Rio de Janeiro, RJ, 862p., 2001.

HOCHNER-CELNICKER, D.; Pharmacokinetics of raloxifene and its clinical application, European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, v. 85 (1), p. 23-29, 1999.

INCA: Instituto Nacional de Câncer - Estatísticas do câncer: Vigilância do câncer e de fatores de risco, disponível em <http://www1.inca.gov.br/vigilancia/> acessado em 23/08/2011

JANCIC-STOJANOVIC B, RAKIC T, KOSTIC N, VEMIC A, MALENOVIC A, IVANOVIC D, MEDENIA M; Advancement in optimization tactic achieved by newly developed chromatographic response function: application to LC separation of raloxifene and its impurities, *Talanta*, V 85, p. 1453-1460, 2011.

JORDAN V.; The science of selective estrogen receptor modulators: concept to clinical practice, *Clin. Cancer Res.*, v. 12 (17), p. 5010-5013, 2006.

KALYANARAMU B. RAGHUBABU K. KUMAR Y., JAGANNADHARAO V., A novel method for estimation of raloxifene hydrochloride in bulk and pharmaceutical preparations by visible spectrophotometry, *Der Pharma Chemica*, V 3(2), pag. 250-256, 2011.

KALYANARAMU B, RAGHUBATU K.; Determination of raloxifene hydrochloride by oxidative coupling reaction in pharmaceutical formulations, *International Journal of Applied Pharmaceuticals*, V 3 (2), p. 6-9, 2011.

KATZUNG, B. G.; *Basic and Clinical Pharmacology*, 9° Ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 960-961, 2006.

KAYATH M., Raloxifeno e osteoporose: revisão de um novo modulador seletivo do receptor de estrogênio, *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v. 43 (6), p. 433-441, 1999.

KUMAR, B. V., KUMAR K. P., SUNESH K., APSAR S., SRI KANTH P., SUNEETHA X., Development and validation of RP-HPLC method for determination of raloxifene hydrochloride from pharmaceutical preparation, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, v. 3 (3), p. 784 – 791, 2011

LANZILLOTTI H., LANZILLOTTI R., TROTE A.P., DIAS A., BORNAND B., COSTA E., Osteoporose em mulheres na pós-menopausa, cálcio dietético e outros fatores de risco, *Rev. Nutr.*, v. 16 (2), p. 181-193, 2003

LEITE F., *Validação em análise química*, 5° Ed., Editora Átomo, Rio de Janeiro, p. 213-235, 2008.

LEITE M.O.; Tratamento da osteoporose pós-menopausa, *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v. 45 (6), p. 442-445, 1999.

LIU, S.; Fading spectrophotometric method for the determination of raloxifene with Evans blue, V. 30 (12), p. 1486 – 1489, 2002.

MATSUDO S., MATSUDO V., Osteoporose e atividade física, Rev. Bras. Ciên. Mov., v. 5 (3), p. 33-59, 1991.

NCI: National Cancer Institute – Cancer Drug Information, disponível em <http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/raloxifenehydrochloride>, acessado em 19/01/2011.

NETO A., SOARES A., URBANETZ A., SOUZA e ARAUJO A., FERRARI A., AMARAL B., MOREIRA C., FERNANDEZ C., ZERBINI C., BACARAT E., FREITAS E., MEIRELLES E., BANDEIRA F., GONÇALVES H., LEMBRUBER I., NETO J., BORGES J., CASTRO J., FIAT J., MENDONÇA L., OLIVEIRA L., RUSSO L., GREGÓRIO L., MARONE M., CASTRO M., HAIDAR M., SANTOS P., PLABLER P., CARNEIRO R., GUARNIERO R., MACHADO R., PEREIRA R., LEDERMAN R., RADOMINSKI S., EIS S., PEREIRA R., SZJENFELD V., CHACHADE W.; Consenso Brasileira de Osteoporose 2002, Rev. Bras. Reumatol., v. 42(6), p. 343-354, 2002.

NETO, F. R. A.; NUNES, D. S. S.; Cromatografia: Princípios básicos e técnicas afins, Rio de Janeiro, RJ, 187p., 2003.

OLIVEIRA J., BRACCO O., KAYATH M., MORAIS E., URBANETZ A., COSTA M., Moduladores seletivos do receptor estrogênico e redução do risco de câncer de mama: tamoxifeno e raloxifeno, Rev. Bras. Mastologia, v. 14 (1), p. 29-33, 2004.

PAVIA P., LAMPMAN P., KRIZ G.; Introduction to spectroscopy: A new guide for students of organic chemistry, 3^o Ed., Thomson Learning Inc, 680p., 2001.

PAVITHRA D. C., SIVASUBRAMANIAN L.; New spectrophotometric determination of raloxifene hydrochloride in tablets, India Journal of Pharmaceutical Sciences, p. 375-376, 2006.

PAVITHRA D. C., SIVASUBRAMANIAN L.; RP-HPLC estimation of raloxifene hydrochloride in tablets, India Journal of Pharmaceutical Sciences, p. 401-402, 2006.

PEREZ-RUIZ T., MARTINEZ-LOZANO C., SANZ A., BRAVO E.; Development and validation of a quantitative assay for raloxifene by capillary electrophoresis, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 34, p. 891-897; 2004.

RANG H. P., DALE M. M., RITTER J. M., FLOWER R. J.; Rang & Dale's Pharmacology, 6° Ed., Churchill/Linvingstone, Nova York, p. 467-469, 2006.

REDDY P., RANI B., BABU G., SESHAGINI J.; RP-HPLC Determination of Raloxifene in Pharmaceuticals Tablets, E-Journal of Chemistry, v. 3 (10), p. 60-64, 2006.

Resolução RE n° 899 de 29 de maio de 2003 D.O.U. 02/06/2003, ANVISA, Brasília, Brasil

REYNOLDS, J. E. F.; Martindale: The complete drug reference, 32° Ed., Pharmaceutical Press, London, p. 1461-1462, 1999.

ROSSI, ROCHELE CASSANTA, Desenvolvimento e validação de ensaio de dissolução para o ritonavir cápsulas utilizando correlação *in vitro* – *in vivo*, Dissertação de Mestrado, 132p., 2006.

ROWE, R. C., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6° Ed., The Pharmaceutical Press, London, 1056p., 2009

RUSSO L.A.; Osteoporose pós-menopausa: opções terapêuticas, Arq. Bras. Endocrinol. Metab., v. 45 (4), p. 401-406, 2001.

SALIH A., FENTIMAN I., Breast cancer prevention; International Journal of Clinical Practice, v. 56 (4), p. 276-271, 2002.

SILVERSTEIN R., WEBSTER F.; Identificação espectrométrica de compostos orgânicos, 6° Ed., Rio de Janeiro, LTC Editora, p. 67-135, 2000.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A.. Princípios de Análise Instrumental, 5.ed, Porto Alegre, Bookman, 1024p., 2002.

SOLOMONS T., FRYHLE C., Química Orgânica, 7° Ed., LTC Editora, Rio de Janeiro, 649p., 2001.

STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C.; GAI, M.N., Biofarmacotécnica, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.32-65, 2009.

SUNEETHA D., LAKSHMANA R.; A new validated RP-HPLC method for the estimation of raloxifene in pure and tablet dosage form, *Rasayan Journal of Chemistry*, v. 3 (1), p. 117-121, 2010.

TARANTA A., BRAMA M., TETI A., DE LUCA V., SCANDURRA R., SPERA G., AGNUSDEI D., TERMINE J.D., MIGLIACCIO S.; The selective estrogen receptor modulator raloxifene regulates osteoclast and osteoblast activity in vitro, *Bone*, v. 30 (2), p. 368-376, 2002.

TAVARES M.; Mecanismos de separação em eletroforese capilar, *Química Nova*, v. 20 (5), p. 493-511, 1997.

TEETER, J. S., MEYERHOFF, R. D.; Environmental fate and chemistry of raloxifene hydrochloride; *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 21 (4), p. 729-736, 2002.

The Pharmacopoeia of Japan 15.ed. Tokyo: Society of Japanese Pharmacopoeia, 2009.

TRONTELJ J., BOGALAJ M., MAVIĆ J., MRHAR H.; Development and validation of liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for determination of raloxifene and its metabolites in human plasma, *Journal of Chromatography B*, v. 855, p. 220-227, 2007.

TRONTELJ J., VOVK T., BOGATAJ M.; HPLC analysis of raloxifene hydrochloride and its applications to drug quality control studies; *Pharmacological Research*, v. 52, p. 334 – 339, 2005.

USP 34. The United States Pharmacopoeia. 34th ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2009.

WATSON D.; *Pharmaceutical Analysis: A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists*, 2^o Ed., Churchill Livingstone, Londres, 337p., 2005.

YANG Y., ZHANG F., HE X., ZHAO, G., ZHANG Y.; Validation of a novel HPLC method for the determination of raloxifene and its pharmacokinetics in rat plasma, *Chromatographia*, v. 65 (314), p. 197 – 201, 2007.

YANG Z., HE X. ZHANG Y.; The determination of raloxifene in rat tissue using HPLC, Biomedical Chromatography, v. 21, p. 229 – 233, 2007.

ZANETTE E., STRINGARI F.F., MACHADO F., MARRONI B.J., NG D.P.K., CANANI L.H.; Avaliação do diagnóstico densitométrico de osteoporose/osteopenia conforme o sítio ósseo, Arq. Bras. Endocrinol. Metab., v. 47(1), p. 30-36, 2003.

Tabela 22 – ANOVA (Microsoft Excel, 2007) das médias obtidas nos doseamentos de cloridrato de raloxifeno matéria prima por VMNA utilizando indicador ou potenciometria para determinação do ponto final das titulações.

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	7,0579	1	7,05796	3,90539	0,05629	4,130018
Dentro dos grupos	61,445	34	1,80723			
Total	68,503	35				

Tabela 23 – Regressão e ANOVA das áreas absolutas determinadas para obtenção da curva padrão do cloridrato de raloxifeno MP por CLAE

<i>Estatística de regressão</i>					
R múltiplo	0,9992318				
R-Quadrado	0,9984642				
R-quadrado ajustado	0,9983834				
Erro padrão	13485,015				
Observações	6				
	21				
ANOVA					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	2,2464+12	2,25E+12	12353,08	*
Resíduo	19	345506729	1,82E+08		3,36593E-28
Total	20	2,2498E+12			

* significativo para $p < 0,05$.

Tabela 24 – Teste de tuckey (Minitab®15) das médias dos métodos CLAE, VMNA-POT e VMNA-IND para verificar equivalência

Fonte de variação	GL	SQ	MQ	F	P
Factor	2	29.67	14.84	9.35	0,000
Error	51	80.90	1.59		
Total	53	110.57			

Intervalos de confiança individuais (95%) para as médias baseado nos DPR

Fator	N	Média	DPR	
clae	18	98.863	1.067	(-----*-----)
pot	18	97.936	1.352	(-----*-----)
ind	18	97.048	1.338	(-----*-----)
				-----+-----+-----+-----+-----
				96.80 97.60 98.40 99.20

$$DPR_{total} = 1.259$$

Intervalos de confiança simultâneos Tuckey 95% - comparações pareadas

Nível de confiança individual= 98.05%

clae a partir de:

	Abaixo	Central	Acima	
pot	-1.940	-0.927	0.085	(-----*-----)
ind	-2.828	-1.816	-0.803	(-----*-----)
				-----+-----+-----+-----+-----
				-2.4 -1.2 0.0 1.2

pot a partir de:

	Abaixo	Central	Acima	
ind	-1.901	-0.888	0.124	(-----*-----)
				-----+-----+-----+-----+-----
				-2.4 -1.2 0.0 1.2

Tabela 25 – Regressão e ANOVA das áreas absolutas determinadas para obtenção da curva padrão do cloridrato de raloxifeno comprimido por UV

<i>Estatística de regressão</i>					
R múltiplo		0,999452			
R-Quadrado		0,998905			
R-quadrado ajustado		0,998847			
Erro padrão		0,007017			
Observações		21			
ANOVA					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	0,85305	0,85305	17325,2*	1,35911E-29
Resíduo	19	0,000936	4,92E-05		
Total	20	0,853986			

* significativo para $p < 0,05$.

Tabela 26 – Regressão e ANOVA das áreas absolutas determinadas para obtenção da curva padrão do cloridrato de raloxifeno comprimido por CLAE

<i>Estatística de regressão</i>					
R múltiplo		0,9992670			
R-Quadrado		0,9985346			
R-quadrado ajustado		0,9984575			
Erro padrão		12010,490			
Observações		8			
Observações		21			
ANOVA					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	1,86766E+1	1,8677E+1	12947,23	
Resíduo	19	2740785916	144251890		
Total	20	1,8704E+12			

* significativo para $p < 0,05$.

Tabela 27 – Regressão e ANOVA das relações área fármaco/área padrão interno determinadas para obtenção da curva padrão do cloridrato de raloxifeno por EC

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,9990948
R-Quadrado	0,9981904
R-quadrado ajustado	0,9980512
Erro padrão	0,0202032
Observações	15

ANOVA					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F*</i>	<i>F de significação</i>
				7170,991	
Regressão	1	2,9270006	2,9270006	2	3,24504E-19
Resíduo	13	0,0053062	0,0004081		
Total	14	2,9323068			

*significativo para $p < 0,05$.

Tabela 28 – ANOVA (Microsoft Excel, 2007) das médias obtidas dos doseamentos de cloridrato de raloxifeno em comprimidos por UV, CLAE e EC

ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	4.6355	2	2.3177	0.99163	0.378007	3.178799
Dentro dos grupos	119.203	51	2.3373			
Total	123.8392	53				