

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

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A
ANÁLISE ENANTIOMÉRICA DA DULOXETINA E DE SUA IMPUREZA
QUIRAL EM FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA**

ELDER GONÇALVES DE OLIVEIRA

Porto Alegre, 2012

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

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A
ANÁLISE ENANTIOMÉRICA DA DULOXETINA E DE SUA IMPUREZA
QUIRAL EM FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA

Dissertação apresentada por **Elder Gonçalves
de Oliveira** para obtenção do GRAU DE
MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Martin Steppe

Porto Alegre, 2012

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível mestrado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 30 de março de 2012 pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dra. Elfrides Eva Scherman Schapoval

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. João Henrique Zimnoch dos Santos

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dra. Renata Pereira Limberger

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Gonçalves de Oliveira, Elder

Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para a análise enantiomérica da duloxetina e de sua impureza quiral em formulação farmacêutica / Elder Gonçalves de Oliveira. -- 2012.
145 f.

Orientador: Martin Steppe.

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. Duloxetina. 2. Separação quiral. 3. Enantiômero. 4. CLAE quiral. 5. EC quiral. I. Steppe, Martin, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Controle de Qualidade (LEPCQ) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em Porto Alegre e no Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento da empresa Multilab, na cidade de São Jerônimo, Rio Grande do Sul.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, primeiramente, por sempre ter iluminado meu caminho e mesmo nos momentos mais difíceis, ter sido Ele o grande responsável pela superação e motivação.

Ao professor Dr. Martin Steppe, pela orientação, confiança e acima de tudo pelos exemplos de profissionalismo e dignidade.

À professora Dr. Elfrides Eva Scherman Schapoval, pelo exemplo profissional e pessoal marcados pela competência e ética que serve de inspiração para diferentes gerações.

Aos professores e programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, pela oportunidade de aperfeiçoamento científico.

Ao Laboratório de Ensino e Pesquisa em Controle de Qualidade (LEPCQ) da Faculdade de Farmácia da UFRGS e a Indústria Farmacêutica Multilab, pela possibilidade de realização deste trabalho.

Aos amigos do LEPCQ: Alini, Amanda, Clésio, Diogo, Jaison, Marcelo, Maximiliano, Nathalie, Rúbia e Vítor pelo convívio e discussões técnicas que auxiliaram na realização deste trabalho.

Aos meus pais e irmãs, pelo amor, apoio e constante incentivo à educação.

À Bruna, pelo amor, carinho, atenção e principalmente compreensão, fundamentais para conclusão de mais uma etapa.

A todos que, mesmo não citados, contribuíram de alguma maneira para a conclusão deste trabalho.

“Tudo vale a pena, se a alma não é pequena”.

Fernando Pessoa

RESUMO

Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para a análise enantiomérica da duloxetina e de sua impureza quiral em formulação farmacêutica

A duloxetina é um potente inibidor duplo da recaptação de serotonina e norepinefrina, disponível como enantiômero puro, sob a forma *S*-duloxetina e comercializado como *pellets* em cápsulas. O *R* enantiômero da duloxetina é também um inibidor da recaptação, no entanto, este é menos potente que seu isômero, sendo considerado como impureza enantiomérica. Este trabalho teve como objetivos o desenvolvimento e a validação de métodos analíticos para o controle de qualidade da duloxetina e de sua respectiva impureza enantiomérica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), e por eletroforese capilar (EC). A resolução dos enantiômeros da duloxetina foi realizada a partir da utilização de fase estacionária quiral, baseada celulose, por CLAE. A separação por EC foi desenvolvida a partir da utilização de hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) como seletor quiral. A validação dos métodos foi efetuada de acordo com os guias de validação disponíveis na literatura e os métodos propostos foram considerados específicos, lineares, precisos, exatos e robustos. A análise comparativa entre os métodos desenvolvidos demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa na quantificação do enantiômero *S*-duloxetina.

Palavra chave: Duloxetina, separação quiral, enantiômero, CLAE quiral, EC quiral.

ABSTRACT

Development and validation of analytical methods for enantiomeric analysis of duloxetine and its chiral impurity in pharmaceutical formulation

Duloxetine is a double potent inhibitor of serotonin and norepinephrine reuptake, available as a pure enantiomer, in the *S*-duloxetine form and marketed as pellets into capsules. The *R* enantiomer of duloxetine is also an inhibitor of reuptake, however, less potent and being considered enantiomeric impurity. This work aimed the development and validation of analytical methods for quality control of duloxetine and its respective enantiomeric impurity by high performance liquid chromatography (HPLC) and capillary electrophoresis (CE). The resolution of the enantiomers of duloxetine was performed with the use of chiral stationary phase, based on cellulose, by HPLC. The separation by CE was developed with the use of hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD) as chiral selector. The method validation was performed according to the guides available in the literature and the proposed methods were considered specific, linear, precise, accurate and robust. The comparative analysis between the methods developed showed no statistically significant difference in the quantification of *S*-duloxetine enantiomer.

Keyword: Duloxetine, chiral separation, enantiomer, chiral HPLC, chiral CE.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. (a) fórmula tridimensional dos enantiômeros do 2-butanol. (b) modelos dos enantiômeros do 2-butanol. (c) modelos I e II não sobreponíveis.....	37
Figura 2. Ligação de enantiômeros ao receptor, segundo o modelo de contato em três pontos.....	39
Figura 3. Distribuição anual dos fármacos aprovados pelo FDA.....	45
Figura 4. Técnicas utilizadas na separação de enantiômeros.....	48
Figura 5. Fases quirais derivadas de fenilcarbamatos de celulose e amilose.....	53
Figura 6. (a) estrutura geral das ciclodextrinas. (b) representação esquemática da estrutura tridimensional das CDs.....	58
Figura 7. Estrutura química da duloxetina.....	61
Figura 8. Cromatograma extraído da condição 1 por CLAE.....	95
Figura 9. Cromatograma extraído da condição 2 por CLAE.....	96
Figura 10. Cromatogramas extraídos e sobrepostos das condições 3 a 5 por CLAE.....	97
Figura 11. Cromatogramas extraídos e sobrepostos das condições 6 a 11 por CLAE.....	97
Figura 12. Cromatogramas extraídos e sobrepostos da análise de especificidade por CLAE.....	100
Figura 13. Gráfico de pureza e espectro UV dos picos referentes aos enantiômeros da duloxetina por CLAE.....	101
Figura 14. Representação gráfica da curva padrão de S-duloxetina por CLAE.....	103
Figura 15. Representação gráfica da curva padrão de R-duloxetina por CLAE.....	103
Figura 16. Resíduos padronizados provenientes da curva da S-duloxetina por CLAE.....	104

Figura 17. Resíduos padronizados provenientes da curva da <i>R</i> -duloxetina por CLAE	104
Figura 18. Efeitos das alterações sobre o teor por CLAE.....	109
Figura 19. Efeitos das alterações sobre a resolução dos enantiômeros da duloxetina por CLAE	110
Figura 20. Efeitos das alterações sobre o fator de capacidade referente da <i>R</i> -duloxetina por CLAE.....	110
Figura 21. Efeitos das alterações sobre a simetria do pico da <i>R</i> -duloxetina por CLAE	111
Figura 22. Efeito da concentração de HP β CD sobre a resolução dos enantiômeros da duloxetina por EC	114
Figura 23. Efeito da concentração de tampão TRIS sobre a resolução dos enantiômeros da duloxetina por EC	115
Figura 24. Efeito do pH sobre a resolução dos enantiômeros da duloxetina por EC.....	115
Figura 25. Efeito da voltagem aplicada sobre a resolução dos enantiômeros da duloxetina por EC	116
Figura 26. Efeito da temperatura do cassete sobre a resolução dos enantiômeros da duloxetina por EC	116
Figura 27. Eletroferograma nas condições otimizadas para análise dos enantiômeros da duloxetina por EC	118
Figura 28. Eletroferogramas extraídos e sobrepostos da análise de especificidade por EC	119
Figura 29. Gráfico de pureza e espectro UV dos picos referentes aos enantiômeros da duloxetina por EC	120
Figura 30. Representação gráfica da curva padrão de <i>S</i> -duloxetina por EC	121
Figura 31. Representação gráfica da curva padrão de <i>R</i> -duloxetina por EC	122
Figura 32. Resíduos padronizados provenientes da curva da <i>S</i> -duloxetina por EC	122

Figura 33. Resíduos padronizados provenientes da curva da <i>R</i> -duloxetina por EC.....	123
Figura 34. Efeitos das alterações sobre o teor por EC.....	128
Figura 35. Efeitos das alterações sobre a resolução por EC.....	128
Figura 36. Efeitos das alterações sobre o número de pratos teóricos referentes à <i>S</i> -duloxetina por EC.....	129
Figura 37. Efeitos das alterações sobre a simetria do pico da <i>S</i> -duloxetina por EC.....	129
Figura 38. Cromatograma representativo obtido na determinação da impureza <i>R</i> -duloxetina em cápsulas de cymbalta [®] por CLAE.....	132

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diferentes propriedades fisiológicas de alguns fármacos quirais...	42
Tabela 2. Medicamento mais vendido nos EUA em 2010	44
Tabela 3. Distribuição anual dos medicamentos aprovados pelo FDA de 1992 a 2008	45
Tabela 4. Racemato a enantiômero puro. Exemplos de <i>chiral switch</i>	46
Tabela 5. Comparação dos tipos de fases estacionárias quirais e requisitos para análise enantiosseletiva	51
Tabela 6. Fases estacionárias proteicas disponíveis comercialmente.....	54
Tabela 7. Outros seletores quirais usados na EC.....	57
Tabela 8. Métodos para determinação quiral de duloxetina	61
Tabela 9. Parâmetros recomendados para métodos de pureza quiral	64
Tabela 10. Composição da amostra simulada de excipientes	73
Tabela 11. Condições cromatográficas empregadas na análise enantiomérica de duloxetina por CLAE	75
Tabela 12. Condições eletroforéticas empregadas para análise quiral da duloxetina	76
Tabela 13. Preparo e concentrações finais da linearidade por CLAE.....	80
Tabela 14. Determinação das concentrações das amostras para a análise de exatidão por CLAE	82
Tabela 15. Preparo das amostras utilizadas na exatidão por CLAE	82
Tabela 16. Dados do planejamento fatorial para o teste de robustez por CLAE	83
Tabela 17. Concentrações finais da linearidade por EC	86
Tabela 18. Determinação das concentrações das amostras para a análise de exatidão por EC.....	88
Tabela 19. Preparo das amostras utilizadas na exatidão por EC	88

Tabela 20. Dados do planejamento fatorial para o teste de robustez por EC	89
Tabela 21. Parâmetros de conformidade do sistema e recomendações	93
Tabela 22. Condições cromatográficas avaliadas no desenvolvimento por CLAE	94
Tabela 23. Resultados obtidos no desenvolvimento por CLAE	94
Tabela 24. Dados analíticos utilizados na curva de linearidade da S-duloxetina	102
Tabela 25. Dados analíticos utilizados na curva de linearidade da R-duloxetina	102
Tabela 26. ANOVA das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão de S-duloxetina por CLAE	105
Tabela 27. ANOVA das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão de R-duloxetina por CLAE	105
Tabela 28. Limite de detecção e quantificação para R-duloxetina por CLAE	106
Tabela 29. Resultados da precisão no LQ para R-duloxetina por CLAE	106
Tabela 30. Valores experimentais referentes à determinação de S-duloxetina para avaliação da precisão por CLAE	107
Tabela 31. Valores experimentais referentes à determinação de R-duloxetina para avaliação da precisão por CLAE	107
Tabela 32. Resultados do teste de recuperação por CLAE para a determinação de S-duloxetina	108
Tabela 33. Resultados do teste de recuperação por CLAE para a determinação de R-duloxetina	108
Tabela 34. Valores experimentais obtidos a partir de soluções de S-duloxetina SQR em 168 horas	112
Tabela 35. Dados analíticos utilizados na curva de linearidade da S-duloxetina por EC	120

Tabela 36. Dados analíticos utilizados na curva de linearidade da <i>R</i> -duloxetina por EC.....	121
Tabela 37. ANOVA das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão de <i>S</i> -duloxetina por EC	123
Tabela 38. ANOVA das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão de <i>R</i> -duloxetina por EC	123
Tabela 39. Limite de detecção e quantificação para <i>R</i> -duloxetina por EC.....	124
Tabela 40. Resultados da precisão no LQ para <i>R</i> -duloxetina por EC.....	124
Tabela 41. Valores experimentais referentes à determinação de <i>S</i> -duloxetina para avaliação da precisão por EC	125
Tabela 42. Valores experimentais referentes à determinação de <i>R</i> -duloxetina para avaliação da precisão por EC	126
Tabela 43. Resultados do teste de recuperação por EC para a determinação de <i>S</i> -duloxetina.....	127
Tabela 44. Resultados do teste de recuperação por EC para a determinação de <i>R</i> -duloxetina.....	127
Tabela 45. Valores experimentais obtidos a partir de soluções de <i>S</i> -duloxetina SQR em 168 horas	130
Tabela 46. Resultados obtidos na determinação de <i>S</i> -duloxetina em cápsulas de Cymbalta [®] por CLAE e EC	131
Tabela 47. ANOVA de valores obtidos na determinação de <i>S</i> -duloxetina em cápsulas de Cymbalta [®] por CLAE e EC	131
Tabela 48. Resultados obtidos na determinação da impureza <i>R</i> -duloxetina em cápsulas de Cymbalta [®] por CLAE	132

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	27
2. OBJETIVOS	31
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	35
3.1 Considerações Gerais	37
3.2 Quiralidade e atividade biológica e farmacológica	38
3.2.1 A Quiralidade e a farmacodinâmica	38
3.2.2 A Quiralidade e a farmacocinética.....	40
3.2.3 Atividade dos enantiômeros	41
3.3 A quiralidade no desenvolvimento de novos fármacos	43
3.4 Tendências no desenvolvimento de fármacos quirais	44
3.5 Métodos analíticos de separação enantiomérica	47
3.5.1 Análise enantiomérica com utilização de FEQs por CLAE	49
3.5.1.1 Fases estacionárias derivadas de polissacarídeos	52
3.5.1.1 Fases estacionárias derivadas de proteínas	53
3.5.2 Análise enantiomérica por eletroforese capilar (EC)	55
3.6 Duloxetina	59
3.7 Validação de metodologia analítica	63
3.7.1 Critérios de aceitação.....	63
3.7.2 Especificidade e seletividade	65
3.7.3 Linearidade.....	65
3.7.4 Limite de detecção e limite de quantificação	67
3.7.5 Exatidão	68
3.7.6 Precisão	68
3.7.7 Intervalo.....	69
3.7.8 Robustez	69
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	71

4.1 Substância química de referência (SQR)	73
4.2 Produto farmacêutico	73
4.3 Materiais utilizados na análise por CLAE	73
4.4 Materiais utilizados na análise por EC	74
4.5 Método utilizado por CLAE	74
4.6 Método utilizado por EC	76
4.7 Validação de método por CLAE	78
4.7.1 Avaliação da especificidade por CLAE	78
4.7.2 Avaliação da linearidade por CLAE	79
4.7.3 Avaliação da precisão por CLAE	80
4.7.4 Avaliação da exatidão por CLAE	81
4.7.5 Avaliação da robustez por CLAE	83
4.8 Validação de método por EC	83
4.8.1 Avaliação da especificidade por EC	84
4.8.2 Avaliação da linearidade por EC	85
4.8.3 Avaliação da precisão por EC	86
4.8.4 Avaliação da exatidão por EC	87
4.8.5 Avaliação da robustez por EC	89
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	91
5.1 Resultados por CLAE	93
5.1.1 Desenvolvimento e otimização do método por CLAE	93
5.1.2 Especificidade por CLAE	99
5.1.3 Linearidade por CLAE	101
5.1.4 Limite de Quantificação e Detecção por CLAE	105
5.1.5 Precisão por CLAE	106
5.1.6 Exatidão por CLAE	108
5.1.7 Robustez por CLAE	109

5.1.8 Estabilidade das soluções por CLAE	111
5.2 Resultados por EC	112
5.2.1 Desenvolvimento e otimização do método por EC	112
5.2.2 Especificidade por EC	118
5.2.3 Linearidade por EC	120
5.2.4 Limite de Quantificação e Detecção por EC.....	124
5.2.5 Precisão por EC	125
5.2.6 Exatidão por EC	126
5.2.7 Robustez por EC	127
5.2.8 Estabilidade das soluções por EC.....	130
5.3 Análise comparativa dos métodos analíticos.....	130
6. CONCLUSÕES	133
7. REFERÊNCIAS.....	137

1. INTRODUÇÃO

Quiralidade é um fenômeno que permeia o universo, sendo característica da maioria dos processos biológicos naturais. Os avanços na tecnologia quiral e a habilidade de produzir compostos puros enantiomericamente têm importante impacto no projeto de síntese, pesquisa e desenvolvimento de fármacos e nas estratégias e políticas das indústrias farmacêuticas (AGRANAT e CANER, 1999).

A quiralidade dos compostos químicos, especialmente de compostos terapêuticos, é tema muito importante do ponto de vista farmacológico, farmacocinético, toxicológico e nos órgãos fiscais de controle de qualidade de medicamentos. Para garantir a segurança e a eficácia dos fármacos disponíveis e em desenvolvimento, é necessário isolar e examinar cada um dos enantiômeros separadamente. Além disso, é importante também, o controle da composição estereoquímica desde a síntese até o consumo, envolvendo estudos farmacológicos, fabricação e controle de qualidade (SANTORO e SINGH, 2001).

Atualmente, sabe-se que os enantiômeros individuais de um fármaco racêmico muitas vezes possuem diferentes propriedades farmacocinéticas e farmacológicas, tendo em vista que as estruturas alvo no corpo humano podem ser quirais. A primeira observação das diferenças biológicas entre enantiômeros foi relatada por Louis Pasteur em 1858. Ao medir a rotação óptica de tartarato de amônio, onde se descobriu que o (d)-enantiômero é mais rapidamente metabolizado pelo fungo *Penicillium glaucum* do que o (l)-enantiômero (ABOUL-ENEIN e ALI, 2003).

Os enantiômeros frequentemente apresentam atividades farmacológicas e metabólicas diferentes entre si. Em muitos casos, apenas um dos isômeros ópticos exibe o efeito farmacológico. O outro pode não apresentar o efeito, diminuir ou inibir a ação farmacológica, ou mesmo, apresentar efeitos tóxicos. Considerando essas possibilidades, a utilização de fármacos em sua forma enantiomérica pura se mostra vantajosa, uma vez que se pode reduzir a dose total administrada, aperfeiçoar a janela terapêutica, reduzir a variabilidade entre indivíduos e obter uma estimativa mais precisa da relação dose resposta (CANER *et al.*, 2004). Um exemplo clássico que não pode ser esquecido é o da

talidomida. Somente depois das investigações da contribuição das propriedades estereosseletivas desse fármaco, é que foi possível estabelecer as propriedades teratogênicas do enantiômero (-)-(S) (BONATO *et al.*, 2005).

A *International Conference on Harmonization* (ICH, 1999), no documento intitulado “Orientações para a inscrição de novos fármacos” dispõe que impurezas quirais devem ser tratadas da mesma forma que quaisquer outras impurezas. Desta forma, a determinação enantiosseletiva deve ser incluída na especificação do fármaco.

Neste contexto, que o controle de qualidade de medicamentos desenvolve-se cada vez mais, inovando em tecnologia e aprimorando técnicas já existentes para a pesquisa e solução de problemas que acompanham as ciências farmacêuticas. Técnicas analíticas tais como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a cromatografia gasosa (CG), a eletroforese capilar (EC), a espectrometria de massas (EM), entre outras, são amplamente empregadas no controle de qualidade e na busca de metodologias analíticas que forneçam resultados reprodutíveis e confiáveis.

A fim de viabilizar a separação de enantiômeros, assegurando a qualidade e segurança de produtos farmacêuticos, cada vez mais são desenvolvidas metodologias analíticas enantiosseletivas. A técnica consiste no uso de substâncias quirais que interagem com os enantiômeros de modo seletivo. O reconhecimento quiral pode envolver ligação de hidrogênio, interações dipolo-dipolo e interações estéricas (SANTORO, 1992). Como resultado destas interações, as formas enantioméricas apresentam comportamentos diferentes, como velocidade de reação e solubilidade, o que possibilita a separação para a quantificação individual de cada enantiômero e isolamento para produção de fármacos opticamente puros (ABOUL-ENEIN, e ALI, 2003).

Este estudo focaliza a aplicação de métodos por CLAE e EC para a separação e quantificação dos enantiômero *S*-duloxetina que é empregado como produto farmacêutico, e *R*-duloxetina, o qual é considerado sua respectiva impureza enantiomérica.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de metodologia analítica por CLAE e EC para a análise dos enantiômeros *S*-duloxetina e *R*-duloxetina para posterior utilização no controle de qualidade do produto comercializado na forma de *pellets* em cápsulas.

As etapas para atingir este objetivo foram:

- Desenvolver e validar metodologia por CLAE utilizando fase estacionária quiral para determinação dos enantiômeros da duloxetina em produtos farmacêuticos;
- Desenvolver e validar metodologia analítica por EC utilizando ciclodextrina como seletor quiral para determinação dos enantiômeros da duloxetina no produto farmacêutico;
- Realizar análise estatística dos resultados obtidos na validação dos métodos analíticos;
- Analisar comparativamente os métodos propostos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Considerações Gerais

A estereoquímica é uma ciência da química orgânica que estuda a relação entre a estrutura molecular tridimensional e sua propriedade. Isômeros são compostos diferentes que possuem a mesma fórmula molecular. Os isômeros se dividem em isômeros constitucionais e estereoisômeros, sendo que os isômeros constitucionais possuem conectividades diferentes. Os estereoisômeros são isômeros que se diferem pela disposição dos átomos no espaço e podem ser divididos em duas categorias: enantiômeros e diastereômeros (SOLOMONS, 1996 e ABOUL-ENEIN, e ALI, 2003).

Os enantiômeros são estereoisômeros cujas moléculas se relacionam como imagens espaciais que não se sobrepõem. Estes compostos possuem as mesmas características físico-químicas, como ponto de fusão, ponto de ebulição, índice de refração e solubilidade, diferindo apenas na capacidade de desviar o plano-polarizado da luz (ABOUL-ENEIN, e ALI, 2003), conforme demonstrado Figura 1.

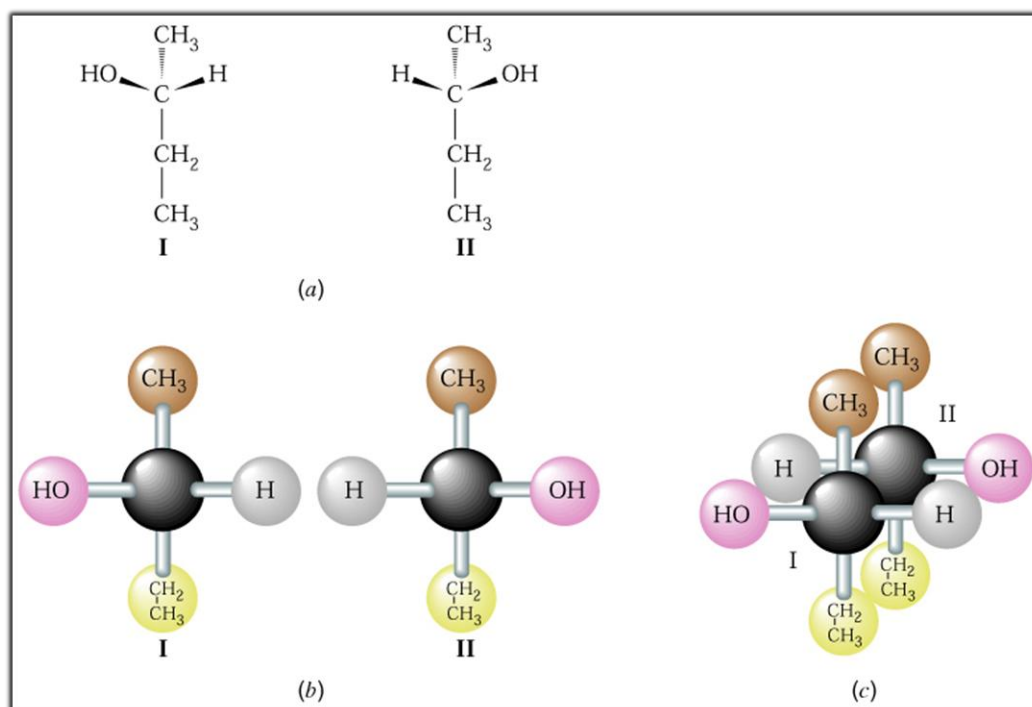


Figura 1. (a) Fórmula tridimensional dos enantiômeros do 2-butanol, (b) modelos dos enantiômeros do 2-butanol, (c) modelos I e II não sobreponíveis (FONTE: SOLOMONS, 1996).

Os enantiômeros só ocorrem com os compostos cujas moléculas são quirais. Quiralidade é a propriedade geométrica de um objeto ser não-sobreponível a sua imagem especular. Se um objeto for sobreponível à sua imagem especular então ele é denominado aquiral (MOSS, 1996). Em outras palavras, uma molécula é aquiral se a mesma possuir um plano de simetria, que é definido como um plano imaginário que corta a molécula de tal forma que as duas metades sejam imagem especular uma da outra.

Uma substância opticamente ativa é aquela que produz rotação do plano da luz polarizada. Um feixe de luz polarizado ao emergir de uma substância opticamente ativa, apresenta um diferente plano de vibração em relação ao incidido, possuindo diferentes vibrações para cada enantiômero e tendo feixe que emerge em direções opostas. Se o feixe for para a direita a substância denomina-se *dextrogira* (d), (+) ou (R), se a rotação for para a esquerda, a substância designa-se *levogira* (l), (-) ou (S) (ABOUL-ENEIN e ALI, 2003).

3.2 Quiralidade e atividade biológica e farmacológica

A maioria das moléculas que constituem os seres vivos são quirais e, usualmente, apenas uma forma de cada molécula quiral ocorre em uma determinada espécie. Dos vinte aminoácidos que constituem as proteínas de origem natural, dezenove são quirais e todos são classificados como *levogiros*. Os processos químicos nas células vivas dependem dessas simetrias e as mantêm, uma vez que são dirigidos por catálise enzimática. As enzimas são moléculas proteicas que possuem uma complexa estrutura tridimensional, capaz de fornecer um sítio ativo onde os substratos podem interagir. Apenas moléculas com a forma esperada podem participar de reações catalisadas por enzimas. Dessa maneira, enzimas constituídas de L-aminoácidos tendem a sintetizar mais L-aminoácidos (BAILEY, 2000).

3.2.1 A Quiralidade e a farmacodinâmica

A existência de enzimas e receptores estereoespecíficos no organismo conduz a características biológicas diferenciadas para as estruturas quirais. O resultado desta ação estereosseletiva sobre os receptores proteicos é devido à ocupação preferencial de um sítio receptor por um dos enantiômeros. Como consequência direta, pode-se ter as mais diversas respostas biológicas para os estereoisômeros (THALL, 1996).

A enantiosseletividade na interação fármaco-receptor foi proposta por Cushny em 1926, segundo o qual a diferença na atividade biológica entre dois enantiômeros seria devido à ligação destes sítios de mesma quiralidade. Suas ideias, posteriormente, inspiraram o amplamente aceito modelo em três pontos. Segundo esse modelo, o enantiômero mais ativo se ajusta melhor ao receptor porque seus três grupos XYZ, adjacentes ao estereocentro, se apresentam em uma sequência que melhor corresponde à sequência formada pelos grupos X'Y'Z' que representam os pontos de ligação no sítio de ligação quiral do receptor proteico. O enantiômero menos ativo seria incapaz de se ligar tão efetivamente ao receptor, uma vez que representa a imagem especular do enantiômero mais ativo. A Figura 2 ilustra a ligação dos enantiômeros ao receptor, segundo o modelo de contato em três pontos. Esse mesmo modelo foi aplicado mais tarde para a compreensão da especificidade enzimática e também serviu de base para a compreensão da separação cromatográfica de enantiômeros em colunas quirais (ABOUL-ENEIN, e ALI, 2003).

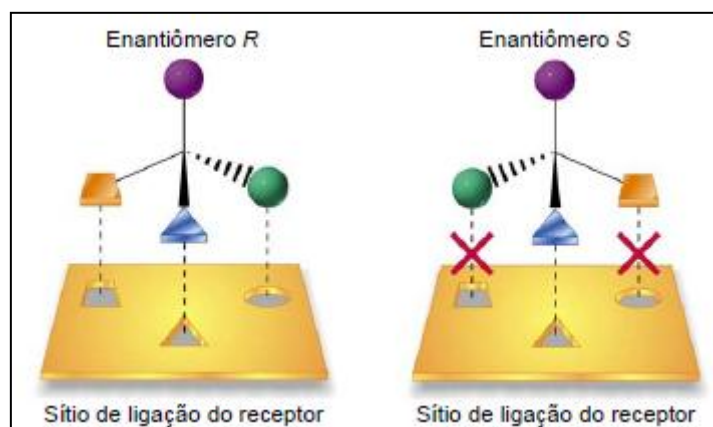


Figura 2. Ligação de enantiômeros ao receptor, segundo o modelo de contato em três pontos (FONTE: SOLOMONS, 1996).

3.2.2 A Quiralidade e a farmacocinética

A farmacocinética é a parte da farmacologia que estuda os processos de absorção, distribuição, metabolização e eliminação dos fármacos. Os processos de absorção, distribuição e eliminação são fenômenos que geralmente não se diferenciam entre os enantiômeros. No entanto, se o fármaco interage com uma enzima ou sistema de transporte, então pode haver discriminação quiral e, com isso, diferenças farmacocinéticas entre enantiômeros podem ser observadas (BARREIRO *et al.*, 1997).

Os processos farmacocinéticos são regulados, em parte, pelo transporte através de barreiras epiteliais. A pele e o trato gastrointestinal representam barreiras epiteliais importantes relacionados à absorção de um fármaco. Durante a absorção pode ocorrer estereosseletividade, principalmente se o fármaco se assemelhar a um nutriente para o qual sistemas de transporte ativo estão disponíveis; exemplos incluem a L-dopa, L-metotrexato e a L-cefalexina (MASON e HUTT, 1997).

No tocante à eliminação renal dos fármacos, espera-se que a filtração glomerular de estereoisômeros livres no plasma seja a mesma para cada isômero. Entretanto, a secreção e absorção ativas do fármaco nos túbulos renais podem apresentar estereosseletividade, como já demonstrado pelo metoprolol, pindolol e cloroquina (MASON e HUTT, 1997).

No entanto, a contribuição mais importante para as diferenças nos perfis farmacocinéticos de uma mistura de isômeros ocorre, geralmente, como resultado da estereosseletividade em seu metabolismo. Esse fato não chega a ser surpreendente, uma vez que reações de biotransformação envolvem a interação direta entre substrato e enzima quiral. Nessas reações, um isômero em particular pode ser metabolizado mais rapidamente que o outro, ou um estereoisômero em particular pode ser produzido preferencialmente (MASON e HUTT, 1997).

3.2.3 Atividade dos enantiômeros

No que diz respeito aos compostos quirais em geral postula-se, de maneira resumida, que existam quatro tipos de comportamentos biológicos esperados. O primeiro tipo ocorre quando um dos estereoisômeros apresenta atividade farmacológica e o outro é inativo. Um exemplo desse caso é a α -metildopa, onde toda a atividade anti-hipertensiva se deve ao (S) isômero. Neste caso o (R) isômero pode ser considerado como uma impureza enantiomérica (THALL, 1996).

Outra possibilidade ocorre quando ambos os enantiômeros apresentam potência e atividades similares. Esta é uma situação extremamente rara, uma vez que se espera que os receptores e as enzimas atuem seletivamente frente diferentes arranjos espaciais. Os isômeros da prometazina ilustram esta característica, pois possuem atividades semelhantes no que diz respeito à atividade anti-histamínica e toxicidade efetiva (ABOUL-ENEIN e BASHA, 1997).

Uma situação comum ocorre quando os enantiômeros possuem atividades similares, porém com potências diferentes. Contrariamente aos casos anteriores, esta é uma situação bastante comum. A nimodipina, um potente antagonista do cálcio, apresentou estereosseletividade de ação para seus enantiômeros em estudos realizados *in vivo*. Os resultados mostram que o isômero puro S (-) foi duas vezes mais potente que a forma racêmica e que esta foi igualmente mais potente que o antípoda R (+) (ABOUL-ENEIN e BASHA, 1997).

Os β -bloqueadores, e nessa classe inclui-se o propranolol, ligam-se seletivamente aos receptores β , sendo que o enantiômero S (-) é o maior responsável por esta atividade β -bloqueadora. Como a varfarina, as diferenças na farmacocinética deste fármaco são as responsáveis pelo comportamento diferenciado dos enantiômeros, onde a forma R (+) liga-se mais às proteínas plasmáticas que a forma S (BARREIRO *et al.*, 1997).

Inclui-se neste item ainda o verapamil, onde ambos os estereoisômeros são equivalentes na potência para os efeitos vasodilatadores, mas o R (+) é

cerca de 8 a 10 vezes menos potente no que diz respeito a sua ação cardiodepressora (THALL, 1996).

A última possibilidade pode ocorrer quando a atividade farmacológica de um enantiômero é antagonizada pelo outro enantiômero. Como exemplo, o (*R*)-(+)-enantiômero do diurético indacrinona apresenta o efeito colateral de reter ácido úrico, enquanto o (*S*)-(-) enantiômero age como uricossúrico, promovendo a secreção do ácido úrico e, dessa forma, combatendo o efeito colateral do (*R*)-isômero (ABOUL-ENEIN e BASHA 1997).

A Tabela 1 apresenta a atividade fisiológica de diferentes fármacos quirais.

Tabela 1. Diferentes propriedades fisiológicas de alguns fármacos quirais.

Fármaco	(<i>R</i>)- Enantiômero	(<i>S</i>)-Enantiômero
Dobutamina	Agonista de adrenoreceptores β_1 e β_2 (vasodilatação)	Agonista adrenoreceptor α_1 (vasoconstrição)
Fluoxetina	Inibidor da receptação de serotonina	Efeito mínimo
Cetamina	Anestésico forte	Anestésico fraco
Fenfluramina	Inibidor da receptação de serotonina	Inibidor da receptação de norepinefrina/dopamina (efeito adverso)
Levodopa	Antiparkinsoniano	Agranulocitose
Metadona	Efeito mínimo	Analgésico forte
Metanfetamina	Estimulante do sistema nervoso central	Vasodilatador periférico
Penicilamina	Antirreumático	Neurotóxico
Pentazocina	Ansiolítico	Analgesia, depressão respiratória
Propoxifeno	Analgesia	Antitussígeno
Morfina	Efeito mínimo	Analgésico forte
Varfarina	Anticoagulante fraco	Anticoagulante

Fonte: ABOUL-ENEIN e ALI, 2003.

3.3 A quiralidade no desenvolvimento de novos fármacos

Atualmente, a importância e as implicações da quiralidade no desenvolvimento de novos fármacos são bem reconhecidas, seja no meio acadêmico, industrial e regulatório. Há alguns anos, o desenvolvimento de medicamentos contendo apenas o enantiômero mais ativo não era considerado viável (SRINVAS *et al.*, 2001).

Atualmente existem dois métodos básicos para a produção de enantiômeros, que são: a síntese assimétrica e separação de misturas racêmicas. Ambas as técnicas são capazes de fornecer enantiômeros em pequena ou em larga escala, ajustando-se à demanda imposta. Os dois métodos evoluíram substancialmente nos últimos anos, diminuindo os custos envolvidos na produção (STRONG, 1999).

Como em várias questões emergentes, a regulamentação do desenvolvimento de fármacos quirais começou sua história lentamente. A primeira abordagem direta à questão da quiralidade no desenvolvimento de novos fármacos foi feita em 1992, pelo FDA, no documento intitulado *FDA's Policy Statement for the Development of New Stereoisomeric Drugs* (FDA, 1992). No ano seguinte, foi a vez do EMEA expor seu posicionamento quanto à matéria, com a publicação do guia *Investigation of Chiral Active Substances* (EMEA, 1993). Sequencialmente, em 1998, agência reguladora canadense, *Health Canada*, também publicou sua guia, intitulada *Stereochemical Issues in Chiral Drug Development* (HEALTH CANADA, 1998).

Apesar de diferirem em pequenos detalhes, quatro pontos importantes são comuns entre as várias recomendações das agências supracitadas: (1) os desenvolvedores devem reconhecer a ocorrência de quiralidade em novos fármacos, (2) tentar separar os estereoisômeros, (3) determinar a contribuição de cada estereoisômero para a atividade farmacológica de interesse e então selecionar racionalmente a forma estereoisomérica que será proposta para a comercialização.

3.4 Tendências no desenvolvimento de fármacos quirais

A venda de fármacos com enantiômeros puros tem crescido anualmente. Os fármacos quirais compreendem mais da metade dos medicamentos aprovados no mundo. Por exemplo, dos dez medicamentos mais vendidos nos EUA em 2010, oito são comercializados como enantiômero puro e dois são aquirais, conforme o demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2. Medicamentos mais vendidos nos EUA em 2010.

Ranque	Produto	Fármaco	Forma do Fármaco	Vendas totais 2010 (bilhões de dólares)
1	Nexium	Esomeprazol	Enantiômero puro	5,28
2	Lipitor	Atorvastatina	Enantiômero puro	5,27
3	Plavix	Clopidogrel	Enantiômero puro	4,68
4	Advair Diskus	Fluticasona	Enantiômero puro	3,66
5	OxyContin	Oxycodone	Enantiômero puro	3,55
6	Abilify	Aripiperazol	Aquiral	3,51
7	Singulair	Montelukast	Enantiômero puro	3,32
8	Seroquel	Quetiapina	Aquiral	3,22
9	Crestor	Rosuvastatina	Enantiômero puro	2,92
10	Cymbalta	Duloxetina	Enantiômero puro	2,64

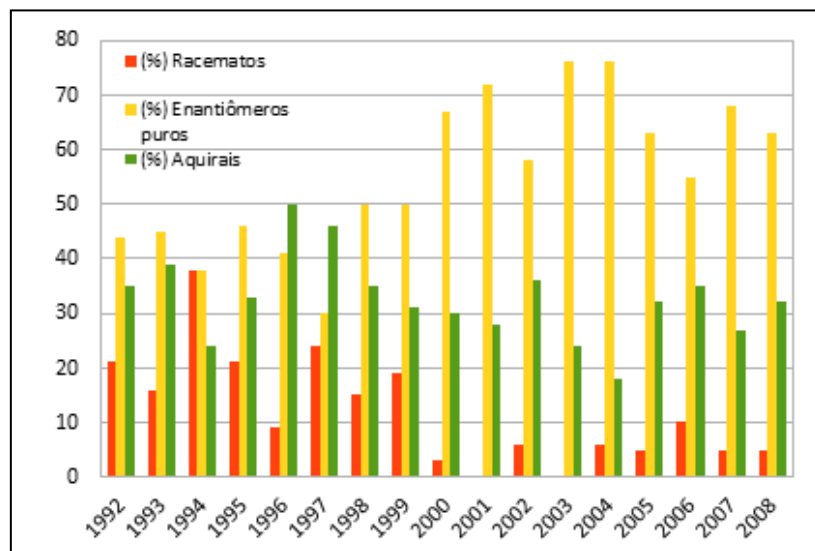
Fonte: www.drugs.com/top200

A partir da avaliação dos novos fármacos aprovados pelo FDA em 2008, tem-se a seguinte distribuição: 63% enantiômeros puros, 32% aquirais e apenas 5% racematos. No geral, existe uma clara tendência de diminuição de medicamentos registrados como mistura racêmica, diminuindo de cerca de 21% em 1992 para 5% em 2008, sendo que não foram registrados novos medicamentos racêmicos nos anos de 2001 e 2003, conforme o demonstrado na Tabela 3 e Figura 3 (LIN *et al.*, 2011).

Tabela 3. Distribuição anual dos medicamentos aprovados pelo FDA de 1992 a 2008.

Ano	(%) Racematos	(%) Enantiômeros puros	(%) Aquirais
1992	21	44	35
1993	16	45	39
1994	38	38	24
1995	21	46	33
1996	9	41	50
1997	24	30	46
1998	15	50	35
1999	19	50	31
2000	3	67	30
2001	0	72	28
2002	6	58	36
2003	0	76	24
2004	6	76	18
2005	5	63	32
2006	10	55	35
2007	5	68	27
2008	5	63	32

Fonte: LIN *et al.*, 2011.

**Figura 3.** Distribuição anual dos fármacos aprovados pelo FDA de 1992 a 2006.

Além do estudo de novas moléculas, uma das alternativas para o desenvolvimento de fármacos enantiomericamente puros, é o *chiral switch*. Neste caso o enantiômero puro é desenvolvido de um racemato já previamente comercializado. A ideia de investigar o enantiômero puro deriva da observação de efeitos adversos oriundos do racemato. Quando enantiômeros puros são desenvolvidos a partir de racematos, as agências regulatórias permitem a comparação entre os estudos originais e as novas submissões (HUTT e VALENTOVÁ, 2003). A Tabela 4 sumariza alguns compostos desenvolvidos a partir de *chiral switch*.

Tabela 4. Racemato a enantiômero puro. Exemplos de *chiral switch*.

Fármaco	Ação/indicação	Comentário
Dexcetoprofeno	Anti-inflamatório não esteroide	A inibição da ciclooxigenase reside predominantemente no enantiômero S. Redução da dose requerida em comparação com o racemato. Redução no potencial ulcerogênico em animais.
Dexibuprofeno	Anti-inflamatório não esteroide	A inibição da ciclooxigenase reside predominantemente no enantiômero S. Diferentes estudos comparativos indicam que o tratamento com a metade da dose do enantiômero puro é melhor ou equivalente ao tratamento com o racemato.
Esomeprazol	Inibidor da bomba de próton	Enantiômero S do omeprazol. Menor metabolismo de primeira passagem. Menor <i>clearance</i> e aumento da disponibilidade sistêmica. Redução da resposta inter-paciente.
Levobupivacaína	Anestésico local	Estudos indicam que o perfil clínico do enantiômero puro é essencialmente o mesmo do racemato, porém o enantiômero S exibe menor cardiotoxicidade.
Escitalopram	Inibidor da receptação de serotonina	Enantiômero S de 130 a 160 vezes mais potente. Diminuição da dose efetiva associada à diminuição de efeitos adversos e aumento do perfil de tolerabilidade
R – Salbutamol	Agonista de receptor β_2	Estudos em humanos indicam que o enantiômero puro produz um aumento significativo no efeito broncodilatador

Fonte: HUTT e VALENTOVÁ, 2003.

Todavia, a utilização de um enantiômero único, a partir de sua mistura racêmica, não está isenta de problemas e, em alguns casos, pode não resultar em vantagens terapêuticas determinando, ainda, a ocorrência de efeitos adversos inesperados. O desenvolvimento do enantiômero puro (R,R)-dilevalol com único efeito β -bloqueador, a partir do labetelol, foi interrompido devido a efeitos adversos associados à hepatotoxicidade. Mais recentemente, o projeto envolvendo o desenvolvimento da (R)-fluoxetina também foi finalizado devido à observação de efeito colateral durante a fase de avaliação clínica (TUCKER, 2000; HUTT e VALENTOVÁ, 2003).

3.5 Métodos analíticos de separação enantiomérica

O desenvolvimento de métodos analíticos é necessário para controle da pureza enantiomérica de matérias-primas e produtos acabados de fármacos quirais. Além disso, os registros das agências regulatórias tornam compulsória a disponibilidade de técnicas enantiosseletivas para assegurar a composição estereoisomérica de substâncias quirais.

Métodos imunológicos altamente sensíveis têm sido relatados para determinação da pureza enantiomérica com anticorpos, os quais se ligam especificamente a aminoácidos dextro ou levorotatórios. Estes anticorpos foram utilizados com sucesso em teste de ELISA para detecção da presença de vários aminoácidos em um meio contendo uma concentração 100.000 vezes maior que o seu respectivo enantiômero (MAIER *et al.*, 2001).

Ao lado das técnicas imunológicas, diferentes técnicas analíticas de separação enantiomérica são reportadas na literatura, tais como: CLAE, cromatografia a gás, a cromatografia em fluido supercrítico, a EC, a cromatografia em camada delgada e a técnica por dispositivos sensores. Em qualquer uma destas técnicas, o tempo de corrida, a sensibilidade e a seletividade devem ser realçados no intuito de melhorar o limite de detecção e o tempo total de análise. Os principais grupos de técnicas analíticas e preparativas atualmente empregadas podem ser visualizados na Figura 4, onde

as técnicas cromatográficas e eletroforéticas constituem o maior campo de desenvolvimento na resolução de enantiômeros.

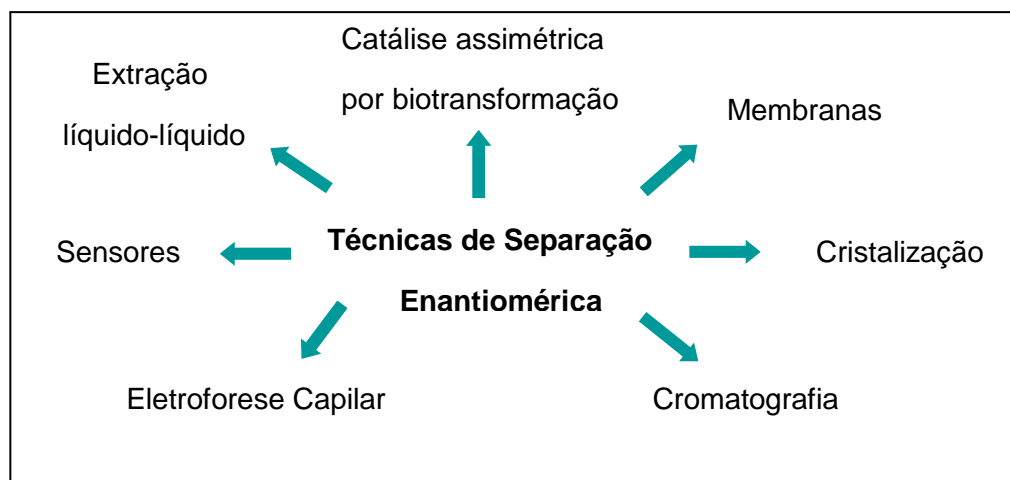


Figura 4. Técnicas utilizadas na separação de enantiômeros (Fonte: MAIER *et al*, 2001).

A separação de enantiômeros por cromatografia pode ser feita através de métodos indiretos ou diretos. O método indireto consiste na reação inicial de moléculas quirais com um agente quiral derivatizador, enantiomericamente puro (pureza > 99%). Esta reação resulta em dois diastereômeros que podem ser separados por CG ou CLAE com coluna não quiral. Ao utilizar-se cromatografia líquida, a fase normal é preferível para separar derivados diastereoméricos, pois possui melhor seletividade para isômeros. A derivatização quiral está em desuso, pois requer grande tempo e esforço para análise, há possibilidade de racemização e a reação pode apresentar diferentes rendimentos das duas formas (ABOUL-ENEIN e ALI, 2003).

O método direto de separação de enantiômeros mais empregado faz uso de colunas contendo fase estacionária quiral (FEQ), em que moléculas quirais estão quimicamente ligadas a um suporte, sendo mais comuns os de sílica ou aminopropilsílica. A ligação química pode ser do tipo covalente, iônica ou por revestimento físico. A utilização de fase estacionária quiral na cromatografia líquida de alta eficiência conduz à formação de complexos diastereoisoméricos transitórios entre os enantiômeros presentes em uma amostra e o material constituinte da coluna quiral. Quando os enantiômeros passam através da FEQ, cada enantiômero forma com esta fase um adsorbato transitório. Estes

adsorbatos são diastereoisômeros e sua formação é condição necessária, mas insuficiente para ultimar a separação dos enantiômeros. Os adsorbatos devem diferir adequadamente na energia livre para que a separação enantiomérica possa ser observada (SANTORO, 1992).

Os complexos diastereoméricos transitórios formados devem possuir diferenças em suas energias livres, sendo mais estável aquele cuja energia livre for menor. O enantiômero que formar o complexo mais estável, por sua vez, será aquele que ficará mais tempo retido na coluna. A diferença de energia livre entre os complexos diastereoméricos transitórios formados determina a magnitude da enantiosseletividade observada nas interações quirais entre o seletor quiral e o analito, ao passo em que a retenção e a eficiência observadas são determinadas pela soma das interações quirais e aquirais entre os mesmos (ABOUL-ENEIN e ALI, 2003).

3.5.1 Análise enantiomérica com utilização de FEQs por CLAE

Entre os métodos analíticos mais empregados para a separação, identificação e quantificação de enantiômeros, pode-se destacar a CLAE com fase estacionária quiral. A técnica tem sido amplamente utilizada na determinação da pureza ótica e da constituição isomérica de matérias-primas, preparações farmacêuticas, estudos de estabilidade configuracional de fármacos e determinação da farmacocinética e metabolismo de fármacos. Atualmente cerca de 90% dos trabalhos em resolução quiral tem sido realizados por CLAE (ABOUL-ENEIN e ALI, 2003).

Para que os enantiômeros possam ser cromatograficamente separados em FEQs, duas condições fundamentais devem ser atendidas: 1) os complexos ou adsorbatos diastereoisoméricos devem ser formados entre a FEQ e pelo menos um dos enantiômeros da mistura de isômeros a ser separada; 2) uma vez formados devem diferir nas suas energias livres de formação. O grau de enantiosseletividade será determinado principalmente pelo adsorbato diastereoisomérico que contenha as espécies complexadas na conformação de mais baixa energia e com o menor grau de interação estérica. Este complexo ficará mais retido na FEQ e, por conseguinte, apresentará um maior tempo de

retenção resultando na separação enantiomérica (SANTORO, 1992, ABOUL-ENEIN e ALI, 2003).

O fator mais importante na cromatografia líquida quiral é a fase estacionária quiral. No entanto, a separação dos enantiômeros é muito sensível às mudanças de temperatura, pH, força iônica, polaridade e composição de fase móvel. Pequenas mudanças nestes parâmetros causam drásticas modificações nos tempos de retenção e na resolução. Este fato é explicado devido à alta especificidade e às interações simultâneas que são necessárias para haver o reconhecimento quiral (WARD e BAKER, 2008).

Segundo Snyder *et al.*, (1997), as quatro principais classes de fases estacionárias, na ordem por universalidade de separação de enantiômeros, são: proteína, carboidrato, *pirkle* e ciclodextrina. Outras duas classes empregadas em menor escala são: troca de ligante e antibiótico macrocíclico. Atualmente existem mais de 100 fases estacionárias quirais disponíveis comercialmente.

A Tabela 5 mostra um resumo comparativo dos tipos de fases estacionárias quirais, incluindo a base do mecanismo de reconhecimento quiral e os requisitos do analito e da fase móvel para promover a separação enantiomérica.

Tabela 5. Comparação dos tipos de fases estacionárias quirais e requisitos para análise enantiosseletiva.

Mecanismos e requisitos do analito e fase móvel	Tipo de fase estacionária				
	Proteína	Carboidrato	Pirkle	Ciclodextrina	Antibióticos
Interação hidrofóbica	X				
Interação eletrostática	X				
Interações atrativas		X			
Interações π - π			X		X
Ligação dipolo			X		X
Ponte de hidrogênio			X	X	X
Complexação de inclusão		X		X	
Impedimento estérico					X
Aprisionamento hidrofóbico					X
Grupo ionizável	X				
Grupo aromático	X			X	
Grupo polar				X	
Habilidade para ponte de hidrogênio		X	X		X
Habilidade para interação π			X		X
Habilidade para ligação dipolo					X
Grupo estérico próximo ao centro quiral		X			X
Fase reversa	X	X	X	X	X
Fase normal		X	X	X	X
Fase reversa não aquosa		X		X	X

Fonte: Adaptado de SNYDER *et al.*, 1997.

Nas últimas duas décadas, inúmeros seletores quirais foram avaliados tanto para verificar suas habilidades de resolução quiral, quanto para seu emprego na preparação de centenas de fases estacionárias quirais. Dentre essas fases, aquelas que se mostraram mais promissoras estão disponíveis comercialmente e são empregadas para aplicações diversas. Para a análise de fármacos quirais e seus metabólitos, a literatura destaca o sucesso das fases estacionárias quirais baseadas em derivados de carboidratos e em proteínas (BONATO, 2005).

3.5.1.1 Fases estacionárias derivadas de polissacarídeos

Os carboidratos são polissacarídeos de ocorrência natural. Derivados deste polímero, como a celulose e a amilose, exibem a propriedade de interação quiral. Os polissacarídeos mais empregados na análise enantiosseletiva são os derivados de celulose e amilose. A celulose apresenta uma estrutura linear rígida e a amilose estrutura helicoidal e esta que determina os diferentes graus de separação de enantiômeros. Existe comercialmente disponível uma extensa quantidade de fases estacionárias quirais contendo derivados de polissacarídeo. Estas colunas são empregadas para a separação de muitas classes de enantiômeros em que a diferença na seletividade está associada a diferentes estruturas dos polissacarídeos (SINGH *et al.*, 2001).

As fases estacionárias do tipo carboidrato apresentam vantagens como elevada capacidade de carregamento de amostra, geralmente são usadas com solventes orgânicos, facilmente removidos para isolamento de espécies e são aplicáveis na separação de grande número de compostos. Como desvantagem, as colunas de carboidratos convencionais (usadas no modo de fase normal) são sensíveis à solventes aquosos, requerendo amostras e solventes livres de água e apresentam eficiência moderada em relação às fases estacionárias proteicas. O emprego de fase móvel aquosa é viável, quando em conjunto com colunas de carboidrato modificadas para fase reversa (BONATO, 2005).

Dentre as FEQs baseadas em tris-fenilcarbamatos, as fases tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose e amilose são as mais estudadas e utilizadas, devido à elevada estabilidade e grande capacidade de discriminação e resolução de uma ampla variedade de compostos. Nestes derivados, os enantiômeros podem interagir com os grupos -NH e C=O da fase estacionária, além de interações dipolo-dipolo com os grupos C=O. Interações π - π também são importantes na resolução quiral de racematos aromáticos (LOURENÇO, *et al.*, 2010). A Figura 5 exemplifica a estrutura das colunas de celulose e amilose.

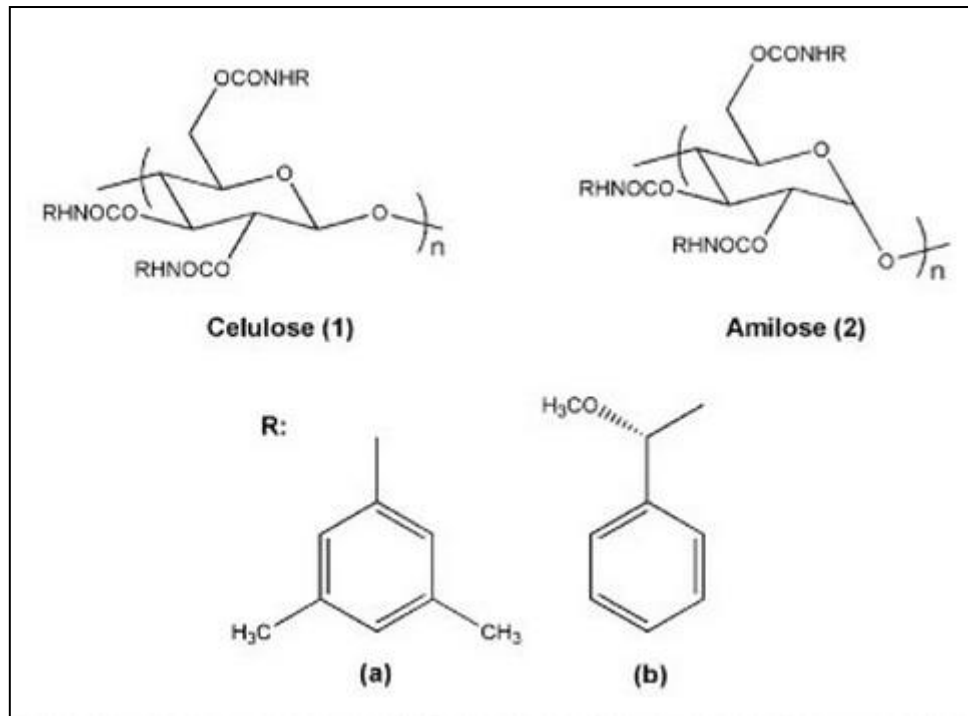


Figura 5. Fases quirais derivadas de fenilcarbamatos de celulose e amilose 1(a): tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose, 2(a) tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose, e 2(b): tris [(S)-1—feniletilcarbamato] de amilose (LOURENÇO *et al.*, 2010).

Registros em literatura mostram que a fase estacionária quiral Chiralcel OD[®], contendo o derivado de celulose tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose é a que tem sido mais empregada na separação de centenas de racematos. Além das fases estacionárias do tipo carboidrato, exclusivamente empregadas em fase normal, foram desenvolvidas colunas quirais compatíveis com análises em fase reversa e com o uso de solvente polar aquoso. A coluna Chiralcel OD-R[®] é exemplo para aplicação em fase reversa. (LOURENÇO *et al.*, 2010).

3.5.1.2 Fases estacionárias derivadas de proteínas

As proteínas são polímeros complexos de elevada massa molecular específica. A habilidade das proteínas em se ligar estereoespecificamente a moléculas menores foi objeto de estudo para o desenvolvimento de uma série de FEQs comercialmente disponíveis. Entre as proteínas empregadas na fabricação dessas FEQs estão a glicoproteína α 1-ácida, albumina sérica,

ovomucóide, celobiohidrolase e pepsina (THOMPSON, 2005). Essas fases apresentam enantiosseletividade para um grande número de compostos, permitindo a análise direta, ou seja, sem necessidade de derivação. Por outro lado, a baixa capacidade e menor estabilidade das colunas e o limitado entendimento dos mecanismos de separação são fatores limitantes de sua utilização (BONATO, 2005).

Interações altamente seletivas entre certas moléculas e as proteínas no sistema biológico fornecem a base da cromatografia com fases quirais proteicas. O mecanismo de resolução quiral envolve interações eletrostáticas e hidrofóbicas, fatores estéreos, ligações de hidrogênio e interações por transferência de cargas. Portanto, a resolução quiral depende das condições cromatográficas tais como pH, força iônica, concentração e tipo do modificador orgânico, temperatura e presença de aditivos carregados (BONATO, 2005).

Atualmente, colunas quirais baseadas em várias proteínas estão disponíveis comercialmente e encontram-se descritas na Tabela 6. Essas fases apresentam enantiosseletividade para um grande número de compostos, permitindo a análise direta, ou seja, sem necessidade de derivação. Por outro lado, a baixa capacidade e menor estabilidade das colunas e o limitado entendimento dos mecanismos de separação são fatores limitantes (BONATO *et al.*, 2005).

Tabela 6. Fases estacionárias proteicas disponíveis comercialmente.

Proteína	Origem	Nome comercial	Fabricante
Soroalbumina	Soro bovino	RESOLVOSIL, BSA-7 ULTRON ES-BSA CHIRAL BSA	MACHERY NAGEL SHINWA CHEM. IND. SHANDON
Soroalbumina	Soro humano	CHIRAL HSA CHIRAL HSA	SHANDON CHROMTECH AB
α -glicoproteína ácida	Soro humano ou bovino	CHIRAL AGP	CHROMTECH AB
Ovomucóide	Clara de ovo	ULTRON ES-OVM	SHINWA CHEM. IND.
Avidina	Clara de ovo	BIOPTIC AV-1	GL SCIENCES
Celobiohidrolase	Fungo	CHIRAL-CBH	CHROMTECH AB
Pepsina	Estômago suíno	ULTRON ES-PEPSIN	SHINWA CHEM. IND.

Fonte: Adaptado de BONATO *et al.*, 2005.

3.5.2 Análise enantiomérica por eletroforese capilar (EC)

A eletroforese é definida como o transporte, em solução eletrolítica, de compostos carregados eletricamente sob a influência de um campo elétrico, no qual a separação entre dois solutos ocorre de acordo com diferenças entre suas mobilidades eletroforéticas. A EC se estabeleceu como alternativa atrativa na separação de compostos enantioméricos, essa separação ocorre principalmente pela presença de seletor quiral ao eletrólito (RUDAZ *et al.*, 2003).

A EC se estabeleceu como uma ferramenta importante para a separação enantiomérica, sendo reconhecida por apresentar alto poder de resolução aliada à grande flexibilidade no que diz respeito às condições de separação (ZHANG *et al.*, 2005). Essa flexibilidade da EC, por sua vez, é uma de suas vantagens mais atraentes. Usando a mesma instrumentação e o mesmo capilar, é possível, simplesmente alterando a composição do eletrólito de análise, encontrar o meio ótimo para separação enantiomérica (NISHI, 1996).

Devido à quantidade reduzida de seletor quiral necessária para alcançar a separação quiral, a EC possui uma grande vantagem econômica quando comparada com a separação por CLAE. Adicionalmente, o tempo de análise, o consumo de solventes e a simplicidade instrumental são outras vantagens que fazem a EC se estabelecer entre as principais técnicas utilizadas para a separação enantiomérica (BONATO *et al.*, 2005).

No entanto, existem duas razões principais para que esta técnica não esteja sendo amplamente utilizada. Uma das razões é a baixa sensibilidade atribuída à pequena quantidade de amostra injetada no capilar, associado ao pequeno caminho óptico de detecção. A segunda razão é relacionada à dificuldade de reprodutibilidade dos tempos de migração e a menor precisão relacionada à quantificação (HOLZGRABE *et al.*, 2006).

Existe uma série de alternativas para aumentar a sensibilidade da EC. Uma das alternativas consiste na utilização de células de detecção com

caminho óptico aumentado. Porém, o uso dessas células só é vantajoso no caso em que o eletrólito de corrida não apresente absorção no comprimento de onda empregado. Outra possibilidade de se aumentar a sensibilidade é empregando outros sistemas de detecção em substituição a detecção por espectrofotometria UV-Vis, como a detecção por espectrofotometria de massas, a detecção por fluorescência induzida a laser e a detecção condutométrica (HOLZGRABE *et al.*, 2006).

No tocante à reprodutibilidade dos tempos de migração, Holzgrabe e colaboradores (2006) afirmam que ela é extremamente dependente do condicionamento do capilar. Os autores afirmam ainda que a adoção de procedimentos adequados de condicionamento é necessária e, ao mesmo tempo suficiente para garantir à técnica a mesma reprodutibilidade observada por CLAE. A temperatura à qual o capilar é exposto é outro fator importante que deve ser controlado para garantir a reprodutibilidade nas análises, pois afeta a viscosidade e condutividade do eletrólito de corrida, influenciando sobre os tempos de migração.

Dos vários seletores quirais utilizados, as ciclodextrinas (CD) e seus derivados são, reconhecidamente, os mais importantes. Estima-se que cerca de 80% das separações enantioméricas em EC são obtidas pelo uso de CDs (BLANCO e VALVERDE, 2003). Dessa forma, esses seletores quirais serão discutidos em detalhes. A Tabela 7 relaciona outros seletores quirais importantes, bem como algumas de suas propriedades.

Tabela 7. Outros seletores quirais usados na EC.

Seletor Quiral	Exemplos	Mecanismo
Éter coroa	Ácido (+)-(18-coroa-6)-2,3,11,12- tetracarboxílico	Complexos de inclusão baseados em interações íon - dipolo
Polissacarídeos Neutros	Dextrana e dextrina	Em solução aquosa apresentam conformação helicoidal, responsável pelo reconhecimento quiral
Polissacarídeos carregados	Heparina e aminoglicóideos	Interação com a estrutura helicoidal e grupos carregados
Proteínas	Soroalbumina e α 1-glicoproteína ácida	Separação baseada em princípios de bioafinidade
Antibióticos macrolídeos	Ansamicinas (rifamicina B e rifamicina SV) e glicopeptídeos (vancomicina, teicoplanina e ristocéina A)	Inclusão do analito nas cavidades hidrofóbicas
Tensoativos quirais	Colato de sódio, taucolato de sódio e deoxicolato de sódio	Inclusão em micelas helicoidais

Fonte: BONATO *et al.*, 2005.

As principais vantagens das CDs originam-se de sua estrutura única (Figura 6). As CDs são moléculas cíclicas de oligossacarídeos quirais de origem natural, com forma similar à de um cone truncado, consistindo de seis, sete ou oito unidades de (+)-(D)-glicopiranosose unidas por ligações $\alpha(1-4)$, as quais são denominadas α -, β - e γ -CD, respectivamente. O diâmetro e o volume da cavidade variam com o número de unidades de glicose no anel da CD. A cavidade interna da CD é relativamente hidrofóbica, enquanto que as bordas da cavidade são hidrofílicas, devido à presença de grupos hidroxilas primários e secundários. Esses grupos hidroxilas podem ser facilmente modificados, originando inúmeros derivados neutros ou carregados. Essa derivação aumenta a solubilidade da CD e altera suas propriedades enantiosseletivas eletrólito (RUDAZ *et al.*, 2003).

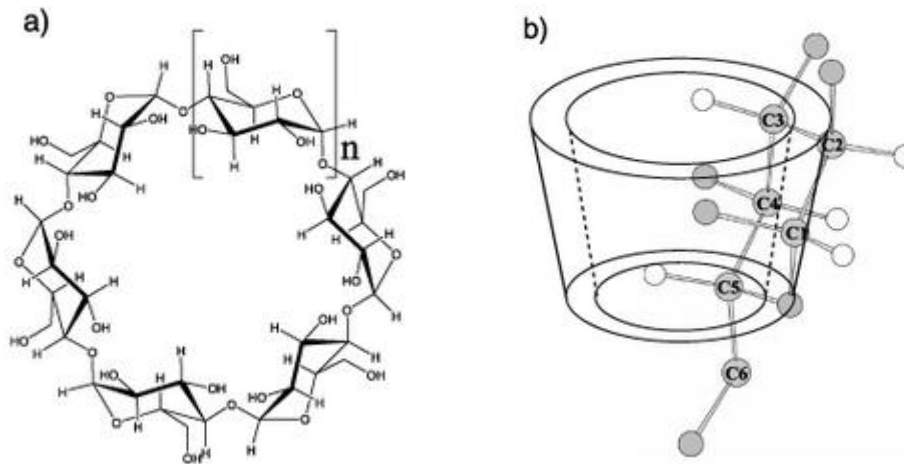


Figura 6. A) Estrutura geral das ciclodextrinas. Os derivados α , β e γ -CD são definidos por $n=1$, 2 e 3, respectivamente. B) Representação esquemática da estrutura tridimensional das CDs, mostrando as características estruturais definidas pelo arranjo das unidades de glicose (BRITO *et al.*, 2004).

Para que ocorra o reconhecimento quiral, pelo menos uma parte da molécula hóspede deverá interagir adequadamente com a cavidade da CD. O complexo de inclusão formado pode ser estabilizado por interações secundárias específicas entre a parte da molécula do soluto que permaneceu na parte externa da cavidade e os grupos hidroxilas ou outros grupos funcionais da borda da CD, principalmente por interações como ligações de hidrogênio. Outras interações incluem as interações hidrofóbicas, dipolo-dipolo e de transferência de carga (FANALI, 2000).

A estabilidade dos complexos de inclusão é influenciada por diversos parâmetros como, por exemplo, a estrutura química e hidrofobicidade da molécula hóspede, contra-íon, pH e concentração da solução de eletrólitos, presença de solvente orgânico, temperatura, tipo do grupo funcional de derivação e concentração da CD (FANALI, 2000).

Dentre os derivados neutros das CDs, destacam-se as β CD metiladas e β CD hidroxipropilada (HP β CD). Derivados neutros de outras CDs (α -CD e γ -CD) também têm sido empregados, embora em menor proporção. A separação enantiosseletiva de solutos básicos empregando CDs e seus derivados neutros é feita em meio ácido para que esses solutos possam apresentar carga positiva e migrar do ponto de injeção em direção ao detector. Se a CD empregada não possuir carga, sua migração será mínima, já que ela irá migrar junto com o

fluxo eletrosmótico que, nesse caso, é baixo. Portanto, o enantiômero que formar o complexo de inclusão mais estável com a CD terá um maior tempo de migração. Os solutos ácidos deveriam ser separados em meio básico para que pudessem apresentar carga negativa e fossem retardados em relação ao fluxo eletrosmótico. Entretanto, separações de solutos ácidos na forma carregada não têm se mostrado muito eficazes (RUDAZ *et al.*, 2003).

A separação de enantiômeros empregando CDs está em contínuo desenvolvimento, surgindo, a todo o momento, novos derivados e formas de se realizar as separações. Uma das tendências é a utilização de mais de um seletor quiral na solução de eletrólitos, ou seja, duas CDs ou ainda, uma CD e outro seletor quiral. Resultados bastante satisfatórios têm sido observados particularmente com o uso de uma CD neutra e outra carregada. A CD neutra confere enantiosseletividade ao sistema, enquanto que a CD carregada pode conferir enantiosseletividade adicional, ou simplesmente conferir carga aos analitos analisados na forma não carregada, para que possam migrar em direção ao detector (GAITANI *et al.*, 2003).

3.6 Duloxetina

A depressão é uma condição psiquiátrica extremamente comum, para a qual existe uma série de teorias neuroquímicas e uma variedade correspondente de diferentes tipos de fármacos usados em seu tratamento. Pesquisas sugerem que desequilíbrios apresentados em dois neurotransmissores, serotonina (5-HT) e norepinefrina (NE), possuem importante papel, não somente nos sintomas emocionais da depressão, mas também nos sintomas físicos dolorosos, frequentemente associados com a doença (STAHL, 2002).

A teoria bioquímica da depressão está baseada na compreensão do papel dos neurotransmissores em todo o organismo. A hipótese monoaminérgica sugere uma base biológica para a depressão, isto é, uma deficiência da 5-HT e/ou NE no sistema nervoso central (HIRCHFILD, 2000). Supõe-se que certos sintomas da doença sejam mediados pela 5-HT, como agressividade, apetite e libido. Por outro lado, supõe-se que a concentração, o

interesse e a motivação sejam mediados pela NE. Entretanto, os principais sintomas da depressão incluem: humor depressivo, ansiedade, dores, perda de energia e prejuízo da função cognitiva, sendo que estes não estão claramente identificados com um ou outro neurotransmissor.

Há uma grande sobreposição dos sintomas mediados por estes dois neurotransmissores, tornando impossível determinar clinicamente se um paciente deprimido responderá melhor a um inibidor de recaptação de 5-HT ou de NE. Além disso, pelo fato de muitos pacientes apresentarem tanto sintomas emocionais quanto físicos da depressão, usar um antidepressivo que atue tanto na 5-HT como na NE pode aumentar a chance de melhora dos sintomas dos pacientes (WECKER e CATALANO, 2006).

A duloxetina foi descoberta pelos mesmos pesquisadores da fluoxetina, David Robertson, Joseph Krushinski e David Wong. A primeira publicação sobre a descoberta da racemização da duloxetina foi publicada em 1988 (WONG *et al.*, 1988).

A duloxetina [(S)-N-metil-3-(1-naftaleniloxi)-3-(2-tienil)-propanoamina] (Figura 7) foi aprovada para uso clínico em 2004 pelo FDA. No Brasil, a duloxetina foi introduzida no mercado em 2005 com o nome de Cymbalta[®] (cloridrato de duloxetina), sob apresentação de cápsulas gelatinosas contendo microgrânulos de cobertura entérica na dosagem de 30 e 60 mg. O desenvolvimento e a comercialização do produto são de responsabilidade das indústrias farmacêuticas Eli Lilly e Boehringer Ingelheim, sendo controlado pela lista "C1" da resolução RDC nº 15/2007.

A utilização da duloxetina oferece vantagens frente a outros antidepressivos existentes como a fluoxetina, tomoxetina e nisoxetina, devido ao aumento da eficácia, diminuição de efeitos adversos e dupla inibição de receptores de serotonina e norepinefrina (SONI e BANERJEE, 2005).

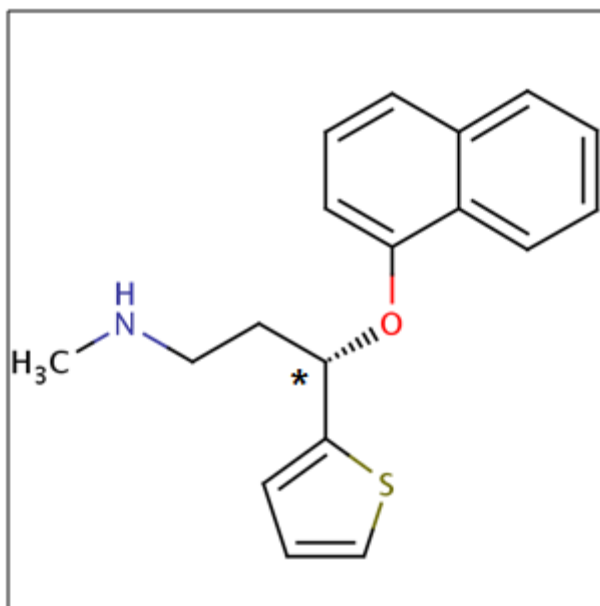


Figura 7. Estrutura química da duloxetina.

A duloxetina é um potente e balanceado inibidor duplo da recaptação de 5-HT e NE. O (*R*) enantiômero da duloxetina é também um inibidor da recaptação de 5-HT e NE, no entanto, o enantiômero (*S*) se mostrou duas vezes mais potente que o isômero *R* (BYMASTER *et al.*, 2003; YANG *et al.*, 2007; TRAFF *et al.*, 2011). De acordo com o processo de fabricação, o enantiômero (*S*) é rotineiramente obtido e o enantiômero (*R*) é considerado como uma impureza (EMEA, 2005). A Tabela 8 apresenta os métodos enantiosseletivos descritos na literatura para a duloxetina.

Tabela 8. Métodos para determinação quiral de duloxetina.

Técnica	Seletor Quiral	Referência
CLAE	Coluna Chirobiotic V (vancomicina) e HP β CD como aditivo de fase móvel	YANG <i>et al.</i> , 2007
CLAE	Coluna Chiralpak AD (amilose)	RANE e SHINDE, 2008
CLAE	Coluna Chiral-AGP (glicoproteína)	DAVADRA <i>et al.</i> , 2011
EC	Ciclodextrinas	LIU e NUSSBAUM, 1998
EC	Glicogênio	ZHU <i>et al.</i> , 2007
EC	Lactobionato de Eritromicina	CHEN <i>et al.</i> , 2010

Os trabalhos envolvendo a separação dos enantiômeros da duloxetina possuem diferentes abordagens. Yang e colaboradores (2007) propuseram primeiramente a separação por CLAE dos enantiômeros utilizando coluna quiral Chirobiotic V que é composta por uma glicoproteína macrocíclica (vancomicina). A resolução máxima alcançada foi de 1,8 e a separação cromatográfica otimizada obteve tempo de retenção de aproximadamente 14,0 minutos para a *S*-duloxetina e 15,2 minutos para a *R*-duloxetina. Outra proposta de separação foi a utilização de HP β CD como aditivo de fase móvel e separação em coluna de fase reversa aquiral (coluna C8). Nesta situação os enantiômeros da duloxetina também foram resolvidos, porém a resolução de 1,65 só foi alcançada com tempos de corrida superiores a 50 minutos.

A separação dos enantiômeros da duloxetina por CLAE foi descrita também por Rane e Shinde (2008) utilizando coluna quiral de amilose (chiralpak AD). O método otimizado teve resolução de 2,8 e foi validado para determinar a *R*-duloxetina como impureza na matéria-prima de duloxetina.

Em 2011, Davandra e colaboradores desenvolveram método enantiosseletivo por CLAE para a duloxetina utilizando coluna quiral de α -1-ácido glicoproteína (chiral-AGP). O método foi validado para determinação dos enantiômeros *S* e *R* da duloxetina em matéria-prima e formulações farmacêuticas.

Quando se trata da análise dos enantiômeros da duloxetina por EC, Liu e Nussbaum (1998) estudaram o comportamento de diversos compostos básicos utilizando ciclodextrinas modificadas como seletor quiral. De acordo com os resultados obtidos, os seletores quirais HP- β -CD, HP- α -CD e SUL- β -CD se mostraram eficazes para separar os compostos de interesse. Este trabalho não propôs nenhum tipo de validação por se tratar de um *screening*.

Em 2009, Zhu e colaboradores propuseram a separação quiral da duloxetina por EC utilizando glicogênio como seletor quiral. A resolução otimizada foi de 1,84 e os autores discutiram o mecanismo de separação dos enantiômeros sem abordar a validação do método.

A separação quiral de fármacos básicos a partir da utilização do lactobionato de eritromicina foi estudada por Chen e colaboradores (2010). Segundo dados do estudo, obteve-se resolução satisfatória entre os enantiômeros da duloxetina, porém o tempo de corrida foi superior a 50

minutos. Neste estudo também não foi abordada a validação do método analítico.

3.7 Validação de metodologia analítica

3.7.1 Critérios de aceitação

Validação refere-se ao ato de validar, tornar legítimo. Este termo é empregado e inclusive requerido em legislações e normas nacionais e internacionais para assegurar a validade de processos de distinta natureza. Validar é assegurar através de evidência consistentemente documentada que um sistema ou processo funciona como deve funcionar, de acordo com as especificações técnicas e atributos de qualidade previamente estabelecidos (HEBER, 2002).

Os conceitos e definições sobre validação de metodologia analítica são encontrados em vasta literatura, incluindo compêndios como as Farmacopeias, guias técnicos de agências regulatórias como o FDA, conferências como o ICH (*International Conference on Harmonization*), legislações como a RE 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), normas e orientações do INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial), artigos de revisão (RIBANI *et al.*, 2004) entre outros. Entretanto, estes guias são geralmente não específicos e carecem detalhes de “como fazer” os testes de validação na prática.

Conforme legislação vigente da ANVISA (RE nº 899, de 29 de maio de 2003), a validação de metodologia analítica é o ato de demonstrar que um método é confiável e reproduzível para as finalidades propostas. Para isto, o método é desafiado mediante a avaliação dos seguintes parâmetros:

- Especificidade (ou seletividade)
- Linearidade
- Limite de detecção
- Limite de quantificação
- Exatidão
- Precisão (repetibilidade e reprodutibilidade)

- Intervalo
- Robustez (estabilidade de solução e planejamento fatorial)

A Tabela 9 apresenta os parâmetros recomendados para métodos de pureza quiral.

Tabela 9. Parâmetros recomendados para métodos de pureza quiral.

Parâmetro	Composto majoritário	Composto minoritário (impureza enantiomérica)
Especificidade	Não deve apresentar interferências do branco O tempo de retenção e resolução deve ser aceitável	Não deve apresentar interferências do branco O tempo de retenção e resolução deve ser aceitável
Linearidade	Faixa de 80-120% do teor Demonstrar inclinação, intercepto, coeficiente de correlação e soma dos quadrados residuais	Faixa de 80-120% da especificação Demonstrar inclinação, intercepto, coeficiente de correlação e soma dos quadrados residuais
Sensibilidade	Não se aplica	Limite de quantificação de 50-100% da especificação S/N ≥ 10 Limite de detecção S/N ≥ 3
Precisão	Repetibilidade a 100%. Replicatas n=6 (DPR < 5,0%)	Repetibilidade na especificação Replicatas n=6 (DPR < 20,0%)
Exatidão	Inferida baseada na linearidade, precisão e especificidade	Inferida baseada na linearidade, precisão e especificidade
Intervalo	Inferida baseada na linearidade, exatidão e precisão	Inferida baseada na linearidade, exatidão e precisão
Estabilidade do analito	Verificar o tempo de estabilidade da solução de amostra preparada	Verificar o tempo de estabilidade da solução de amostra preparada

Fonte: Wrezel *et al.*, 2006

A seguir, será feita uma abordagem sobre validação de metodologia analítica, baseada nos guias e legislação disponíveis sobre o tema.

3.7.2 Especificidade e seletividade

Os termos especificidade e seletividade algumas vezes são empregados como sinônimos. Por definição, diz-se que um método é específico quando responde para uma única substância de interesse. Um método é seletivo quando exprime resposta para vários compostos químicos, com características comuns (RIBANI *et al.*, 2004). Em validação de metodologia analítica na área farmacêutica, o termo especificidade é comumente o mais adotado. Especificidade é a capacidade de o método distinguir inequivocamente o analito na presença de outros componentes, por exemplo, matriz da amostra, produtos de degradação, impureza, subprodutos de síntese, contaminantes, etc. A amostra simulada de excipientes também é comumente chamada de placebo e refere-se à mistura de todos os componentes da amostra, exceto os analitos de interesse, nas mesmas concentrações previstas para a solução teste.

O método será considerado específico se atender a dois requerimentos gerais: 1) os cromatogramas das soluções isentas do analito não devem apresentar resposta na região de eluição dos picos de interesse; 2) a resposta dos picos de interesse não deve ser afetada por outros solutos.

Para assegurar o cumprimento desses requisitos deve ser demonstrada separação satisfatória do pico do analito e outros picos do cromatograma. Os picos de interesse devem apresentar também fator de pureza satisfatório, ou seja, não deve haver coeluição. A determinação do fator de pureza, através da comparação de espectros sobre a área do pico, empregando detector de arranjo de diodos (detector PDA), em conjunto com os demais resultados do teste de especificidade, é indicativo satisfatório da especificidade do método.

3.7.3 Linearidade

Linearidade é a capacidade que o método tem de fornecer respostas proporcionais à concentração, numa faixa determinada (ANVISA, RE 899 de 29 de maio de 2003).

Para demonstrar a linearidade devem-se preparar soluções padrão de concentração seriada, de acordo com a faixa pretendida para utilização do método. Em geral são avaliados, no mínimo, cinco níveis de concentração. A análise do resultado de cada solução injetada deve ser feita com base na resposta de altura e/ou área dos picos de interesse. Deve-se calcular a resposta média e o correspondente DPR obtido para as replicatas de um mesmo nível de concentração. A resposta relativa média obtida para cada nível de concentração injetado deve ser calculada e comparada com a resposta relativa obtida para o nível 100% de concentração. Isto permite avaliar o quanto a resposta de cada nível desviado ponto central de concentração estabelecido para o método e é possível identificar alguma tendência que põe em risco a proporcionalidade entre resposta e concentração.

Os resultados médios de resposta obtidos em duplicata para cada nível de concentração são tratados estatisticamente, segundo o método dos mínimos quadrados, com base no modelo de regressão linear. Os parâmetros do modelo linear são obtidos e correspondem ao coeficiente de correlação linear, intercepto (“a”) e coeficiente de correlação angular, “slope” (“b”). Desta forma, está definida a equação de primeira ordem do modelo linear: $y = a + bx$. A significância estatística do intercepto é determinada através da soma dos desvios e seu erro padrão.

Com os dados da regressão linear, é feita a análise de variância (ANOVA) para testar a significância do modelo e dos resíduos associados. A relação entre as variáveis x e y é determinada através do cálculo do coeficiente de determinação (R^2), que mostra o grau de variabilidade explicada pelo método e do coeficiente de correlação ($r = \sqrt{R^2}$). Para análise de fármacos por cromatografia líquida, recomenda-se $r > 0,999$ (SNYDER *et al.*, 1997).

Para verificar se há falta de ajuste dos dados ao modelo escolhido é realizado o “*Lack of Fit Test*”, através da ANOVA. Os resíduos são decompostos em erro puro (aleatório) e erro devido à falta de ajuste dos dados (pode ser originado de erros sistemáticos ou grosseiros). A significância da falta de ajuste é avaliada através da comparação das variâncias obtidas para a soma quadrática dos desvios de erro puro e dos desvios de falta de ajuste. Se não houver diferença entre estas variâncias, está comprovado que não há falta

de ajuste dos dados ao modelo linear escolhido. A avaliação visual do gráfico de resíduos padronizados é importante para identificar tendência ou indicação de autocorrelação serial entre os desvios dos diferentes níveis de concentração avaliado. O gráfico deve exibir perfil aleatório, randômico, mostrando que a variabilidade é a mesma ao longo da faixa de concentração avaliada no teste de linearidade (RIBEIRO *et al.*, 2008).

A linearidade do método é plenamente comprovada para a faixa avaliada quando são atendidos de modo satisfatório os critérios de aceitação quanto ao coeficiente de correlação linear, desvio da resposta relativa, significância do intercepto e da falta de ajuste e distribuição dos resíduos.

3.7.4 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) de um método é a menor concentração detectada, mas não necessariamente quantificada. O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração que foi detectada e pode ser quantificada com precisão e exatidão adequadas (ANVISA, RE 899 de 29 de maio de 2003. Teoricamente, múltiplo de 3,3 vezes, o ruído gera um sinal (medido em altura do pico) suficientemente distinguível do ruído, a ponto de ser sempre detectado (LD). Do mesmo modo, múltiplo de 10 vezes o ruído, gera um sinal quantificável com precisão e exatidão adequada. Na prática, com base no valor teórico calculado, devem ser preparadas soluções padrão diluídas, com concentração equivalente à área esperada para o valor de LD e LQ calculados. Estas soluções devem ser cromatografadas, injetadas sequencialmente, por no mínimo seis vezes.

A resposta das injeções da solução de LQ deve ser avaliada quanto ao valor de concentração resultante e ao DPR. Se o resultado obtido apresentar precisão adequada, então realmente a solução testada corresponde ao limite de quantificação do método. Caso os valores teóricos de LQ não sejam comprovados na prática, deve-se preparar solução gradativamente mais concentrada para que o método seja novamente desafiado.

3.7.5 Exatidão

A exatidão do método exprime o grau de concordância entre um valor observado experimentalmente e um valor aceito como verdadeiro (RIBANI *et al.*, 2004). A exatidão deve ser demonstrada através da avaliação de pelo menos nove replicatas, sendo três replicatas de três diferentes níveis de concentração (baixa, média e alta), concordante com o intervalo recomendado para a finalidade do método (ANVISA, RE 899 de 29 de maio de 2003). Para fazer o teste de exatidão, deve-se analisar concentração conhecida do analito, na presença dos componentes da matriz e mediante a submissão de todas as etapas envolvidas no procedimento de preparação da solução teste.

Os resultados de resposta obtidos com as soluções de recuperação são comparados com as respostas de uma solução padrão controle, no nível de concentração 100%, preparada a partir da mesma solução padrão estoque usada para fazer as soluções de recuperação. Recuperação de 98% a 102% é usualmente recomendada em análise de medicamentos.

3.7.6 Precisão

A precisão de um método é dada pelo grau de concordância (grau de dispersão) entre uma série de medidas obtidas a partir de múltiplas amostragens de uma mesma amostra homogênea sob as condições prescritas no método (ANVISA, 2003).

A repetibilidade do método é definida como o nível de concordância entre os resultados obtidos a partir da aplicação do procedimento experimental diversas vezes ($n \geq 6$ para o nível de concentração 100% ou um mínimo de 9 determinações, como por exemplo, 3 replicatas de três níveis de concentração), sob as condições prescritas pelo método, num curto intervalo de tempo.

A precisão intermediária indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias, diferentes analistas, diferentes equipamentos ou uma combinação desses fatores. É reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório (RIBANI *et al.*, 2004).

A reprodutibilidade é a avaliação dos resultados obtidos em diferentes laboratórios, mediante o uso da mesma metodologia analítica. Deve ser considerada em situações de padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos, por exemplo, em farmacopeias (RIBANI *et al.*, 2004).

3.7.7 Intervalo

O intervalo de um método analítico é a faixa entre a maior e a menor concentração (quantidade) de analito em uma amostra para a qual se demonstra que o procedimento analítico tem um nível adequado de linearidade, exatidão e precisão (ANVISA, 2003). O intervalo de um método analítico deriva, portanto, das faixas testadas para a determinação da linearidade, exatidão e precisão.

3.7.8 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida da capacidade do método manter-se inalterado mesmo após pequenas, mas deliberadas variações de alguns de seus parâmetros (ANVISA, RE 899 de 29 de maio de 2003). É um indicativo da sua confiabilidade para seu uso rotineiro.

A demonstração da robustez pode ser etapa integrante do desenvolvimento do método. Para demonstrar a robustez deve-se comprovar que pequenas variações de alguns fatores como pH, temperatura, fornecedor de coluna, porcentagem de componentes da fase móvel e vazão não tenham efeito significativo sobre a resposta para a quantificação do analito na amostra. Isto pode ser feito através de planejamento fatorial (DEJAEGER e VANDER HEYDEN, 2007).

A estabilidade das soluções refere-se à capacidade das soluções de amostra e padrão manterem inalteradas suas características e propriedades físico-químicas, quando submetidas a condições de armazenamento específicas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Substância química de referência (SQR)

A SQR de *S*-duloxetina (98,5%, m/m) foi adquirida junto a empresa EcoChem International (Copenhague, Dinamarca) e *R*-duloxetina (99,0% m/m) junto a AKSci (Califórnia, EUA). A SQR de Cimetidina, usada como padrão interno foi fornecido pela USP (Rockville, EUA). O composto 1-Naftol foi adquirido junto à empresa Nuclear (São Paulo, Brasil).

4.2 Produto farmacêutico

Cápsulas contendo 60 mg de duloxetina, em microgrânulos de cobertura entérica, foram adquiridas no mercado sob o nome comercial de Cymbalta[®] produzido pela empresa Eli Lilly and Company (Indianápolis, EUA).

Os excipientes contidos no produto farmacêutico foram adquiridos de diferentes fontes comerciais. A Tabela 10 apresenta a composição da amostra simulada de excipientes.

Tabela 10. Composição da amostra simulada de excipientes.

Excipiente	Concentração (%) ¹
Sacarose	65,0
Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC)	10,0
Acetato succinato de HPMC	4,0
Talco	1,0
Dióxido de titânio	0,5
Citrato de trietila	1,0

1– Determinadas de acordo com as especificações de concentrações percentuais médias descritas para cada excipiente em q.s.p 100% do fármaco (KIBBE, 2000; SHIN-ETSU, 2008).

4.3 Materiais utilizados na análise por CLAE

As colunas Chiralcel OD-H e AD foram adquiridas junto a Diacel Chemical Industries (Tokyo, Japan). Os reagentes *n*-hexano (HEX), etanol

(ETOH) e isopropanol (ISO) grau CLAE foram obtidos da empresa Tedia Company Inc. (Fairfield, EUA). Dietilamina (DEA) 99,5% redestilada foi adquirida da Aldrich Chemicals Inc. (Milwaukee, EUA). As amostras foram filtradas através de membrana de 0,45 μm da Macherey Nagel (Berlin, Alemanha). O equipamento CLAE utilizado foi o Shimadzu Prominence com detector PDA (Kyoto, Japan). Os dados obtidos foram monitorados e processados utilizando o software integrado *LC solutions*.

4.4 Materiais utilizados na análise por EC

O capilar foi adquirido junto a empresa Polymicro Technologies (Phoenix, EUA). O reagente tris-hidroximetilaminometano (TRIS) foi comprado junto a Nuclear (São Paulo, Brasil). β -ciclodextrina (βCD) e Hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP βCD) foram adquiridas da empresa Sigma Aldrich (Saint Louis, EUA). A água foi purificada através do sistema Milli-Q (Bradford, EUA). As amostras foram filtradas através de membrana de 0,45 μm Millex (Bradford, EUA). Os experimentos foram conduzidos em sistema de eletroforese capilar da Agilent Technologies, modelo HP 3D CE (California, EUA), equipado com detector PDA, injetor automático e sistema de controle de temperatura. Os dados foram adquiridos e processados pelo software *ChemStation*.

4.5 Método utilizado por CLAE

As condições cromatográficas para a análise por CLAE estão descritas na Tabela 11.

Tabela 11. Condições cromatográficas empregadas na análise enantiomérica de duloxetina por CLAE.

Característica	Descrição
Coluna	Chiralcel OD-H [®] (250 mm x 4,6 mm x 5 µm)
Fase Móvel	HEX:ETOH:DEA 90:10:0,2 (v/v/v)
Vazão	1,0 mL/min
Volume de injeção	50 µL
Comprimento de Onda	293 nm
Temperatura do forno	30 °C

Fase móvel: Preparou-se uma mistura volumétrica de HEX, ETOH e DEA grau CLAE na proporção 90:10:0,2 (v/v/v). Homogeneizou-se e filtrou-se a vácuo utilizando membrana de 0,45 µm.

Solução diluente: Utilizou-se fase móvel como solução diluente.

Solução estoque padrão S-duloxetina (SES): Transferiu-se 10,0 mg de padrão de S-duloxetina para balão volumétrico de 10 mL, adicionou-se aproximadamente 7 mL diluente e levou-se ao ultrassom sem aquecimento por 15 minutos. Na sequência completou-se o volume com diluente (conc. final 1000,00 µg/mL).

Solução estoque padrão R-duloxetina (SER): Transferiu-se 10,0 mg de padrão de R-duloxetina para balão volumétrico de 10 mL, adicionou-se aproximadamente 7 mL diluente e levou-se ao ultrassom sem aquecimento por 15 minutos e completou-se o volume com solução diluente. Desta transferiu-se 1 mL para balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com diluente (conc. final 10,00 µg/mL).

Padrão RS-duloxetina: Transferiu-se 1mL da SES e 1 mL da SER para balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume com diluente, homogeneizou-se e filtrou-se com membrana de 0,45 µm (conc. final 100,00 µg/mL para S-duloxetina e 1,00µg/mL para R-duloxetina)

Amostra: Transferiu-se amostra equivalente a 50,0 mg de duloxetina para balão volumétrico de 50 mL. Adicionou-se aproximadamente 35 mL de diluente, agitou-se em vórtex por 1 minuto e levou-se ao ultrassom sem aquecimento por 15 minutos. Completou-se o volume com diluente e centrifugou-se por 3 minutos. Transferiu-se 1 mL do sobrenadante para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com diluente, homogeneizou-se e filtrou-se com membrana de 0,45 μm (conc. teórica final 100,00 $\mu\text{g/mL}$ para *S*-duloxetina).

4.6 Método utilizado por EC

As condições eletroforéticas para a análise por EC estão descritas na Tabela 12.

Tabela 12. Condições eletroforéticas empregadas para análise quiral da duloxetina.

Característica	Descrição
Capilar de sílica fundida	40 cm de comprimento efetivo e 50 μm de diâmetro interno
Eletrólito	Tampão TRIS 40 mM pH 2,5 e HP β CD 5 mM
Tensão aplicada	20 kV
Injeção hidrodinâmica	40 mbar
Tempo de injeção	3 segundos
Comprimento de Onda	230 nm
Temperatura	25°C
Pré-condicionamento	2 min NaOH 0,1 M; 1 min H ₂ O; 2 min Eletrólito

Eletrólito: O eletrólito para análise foi constituído por tampão TRIS 40 mM pH 2,5 e HP β CD 5mM. Esta solução foi preparada em água ultrapura e permaneceu em ultrassom durante 15 minutos, sendo posteriormente filtrada através de membrana de celulose de 0,45 μm de diâmetro de poro.

Diluente: O diluente para análise foi a acetonitrila grau CLAE.

Solução estoque padrão S-duloxetina (SES): Transferiu-se 10,0 mg de padrão de S-duloxetina para balão volumétrico de 10 mL, adicionou-se aproximadamente 7 mL diluente e levou-se ao ultrassom sem aquecimento por 15 minutos. Na sequência completou-se o volume com diluente (conc. final 1000,00 µg/mL).

Solução estoque padrão R-duloxetina (SER): Transferiu-se 10,0 mg de padrão de R-duloxetina para balão volumétrico de 10 mL, adicionou-se aproximadamente 7 mL diluente e levou-se ao ultrassom sem aquecimento por 15 minutos. Na sequência completou-se o volume com diluente (conc. final 1000,00 µg/mL).

Solução estoque padrão interno (SEPI): Transferiu-se 100,0 mg de padrão de cimetidina para balão volumétrico de 50 mL, adicionou-se aproximadamente 35 mL diluente e levou-se ao ultrassom sem aquecimento por 15 minutos. Na sequência completou-se o volume com diluente (conc. final 2000,00 µg/mL).

Padrão: Transferiu-se 1 mL da SES, 1 mL da SER e 1 mL da SEPI para balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume com diluente, homogeneizou-se e filtrou-se com membrana de 0,45 µm (conc. final 100,00 µg/mL para S-duloxetina e 100,00 µg/mL para R-duloxetina e 200,00 µg/mL para o PI).

Amostra: Transferiu-se amostra equivalente a 50,0 mg de duloxetina para balão volumétrico de 50 mL. Adicionou-se aproximadamente 35 mL de diluente, agitou-se em vórtex por 1 minuto e levou-se ao ultrassom sem aquecimento por 15 minutos. Completou-se com diluente e centrifugou-se por 3 minutos. Transferiu-se 1 mL do sobrenadante juntamente com 1 mL da SEPI para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com diluente, homogeneizou-se e filtrou-se com membrana de 0,45 µm (conc. teórica final 100,00 µg/mL para S-duloxetina e 200,00 µg/mL para o PI).

4.7 Validação de método por CLAE

O instrumental e o procedimento para a análise cromatográfica foram descritos no item 4.5, Tabela 11.

4.7.1 Avaliação da especificidade por CLAE

A avaliação da especificidade foi realizada através da investigação dos possíveis interferentes presentes na amostra. Desta forma avaliaram-se os seguintes compostos:

Padrão S-duloxetina: Transferiu-se 10,0 mg de padrão de S-duloxetina para balão volumétrico de 10 mL, adicionou-se aproximadamente 7 mL diluente e levou-se ao ultrassom sem aquecimento por 15 minutos. Na sequência completou-se o volume com diluente. Desta, transferiu-se 1 mL para balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume com diluente, homogeneizou-se e filtrou-se com membrana de 0,45 µm (conc. final 100,00 µg/mL).

Padrão R-duloxetina: Transferiu-se 10,0 mg de padrão de R-duloxetina para balão volumétrico de 10 mL, adicionou-se aproximadamente 7 mL diluente e levou ao ultrassom sem aquecimento por 15 minutos. Na sequência completou-se o volume com diluente. Desta solução, transferiu-se 1 mL para balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume com diluente, homogeneizou-se e filtrou-se com membrana de 0,45 µm (conc. final 100,00 µg/mL).

Amostra: Transferiu-se amostra equivalente a 50,0 mg de duloxetina para balão volumétrico de 50 mL. Adicionou-se aproximadamente 35 mL de diluente, agitou-se em vórtex por 1 minuto e levou-se ao ultrassom sem aquecimento por 15 minutos. Em seguida, transferiu-se 1 mL para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com diluente, homogeneizou-se e filtrou-se com membrana de 0,45 µm (conc. teórica final 100,00 µg/mL para S-duloxetina).

Placebo: Transferiu-se cerca de 270,58 mg de placebo para balão volumétrico de 50 mL. Adicionou-se aproximadamente 35 mL de diluente, agitou-se em vórtex por 1 minuto e levou-se ao ultrassom sem aquecimento por 15 minutos. Desta solução transferiu-se 1 mL para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com diluente, homogeneizou-se e filtrou-se com membrana de 0,45 µm.

A pureza dos picos cromatográficos foi verificada através do detector PDA, empregando as ferramentas disponíveis no *software LCSolutions*.

4.7.2 Avaliação da linearidade por CLAE

Para a avaliação da linearidade foram construídas 3 curvas padrão para S-duloxetina e R-duloxetina.

Solução estoque padrão S-duloxetina (SES): Transferiu-se 10,0 mg de padrão de S-duloxetina para balão volumétrico de 10 mL, adicionou-se aproximadamente 7 mL de diluente e levou-se ao ultrassom sem aquecimento por 30 minutos. Na sequência completou-se o volume com diluente (conc. final 1000,00 µg/mL).

Solução estoque padrão R-duloxetina (SER): Transferiu-se 10,0 mg de padrão de R-duloxetina para balão volumétrico de 100 mL, adicionou-se aproximadamente 70 mL de diluente e levou-se ao ultrassom sem aquecimento por 30 minutos. Na sequência completou-se o volume com diluente (conc. final 1000,00 µg/mL).

O preparo e as concentrações finais estão descritos na tabela 13.

Tabela 13. Preparo e concentrações finais da linearidade por CLAE.

Ponto da curva	Volume SES	Volume SER	Balão volumétrico ¹	Conc. Final S-duloxetina (µg/mL)	Conc. Final R-duloxetina (µg/mL)
1	0,5	0,5	10	50,0	0,5
2	0,8	0,8	10	80,0	0,8
3	0,9	0,9	10	90,0	0,9
4	1,0	1,0	10	100,0	1,0
5	1,1	1,1	10	110,0	1,1
6	1,2	1,2	10	120,0	1,2
7	1,5	1,5	10	150,0	1,5

1- Os balões foram completados com diluente.

As médias das áreas absolutas correspondentes a cada diluição foram utilizadas para a obtenção das curvas padrão. A equação da reta foi determinada pelo método dos quadrados mínimos e a validade da curva foi verificada através de análise de variância (ANOVA).

4.7.3 Avaliação da precisão por CLAE

Para avaliação da precisão foram preparadas seis amostras distintas de duloxetina (S-duloxetina) a 100% incrementadas com a impureza R-duloxetina a 1%. O preparo das amostras está descrito abaixo.

Solução estoque padrão S-duloxetina (SES): Conforme o descrito no item 4.5.

Solução estoque padrão R-duloxetina (SER): Conforme o descrito no item 4.5.

Padrão RS-duloxetina: Conforme o descrito no item 4.5.

Solução Amostra: Transferiu-se o equivalente 50,0 mg de duloxetina para balão volumétrico de 50 mL, adicionou-se aproximadamente 35 mL de diluente

e levou-se ao ultrassom sem aquecimento por 15 minutos. Completou-se com diluente e centrifugou-se 3 minutos. Transferiu-se 1 mL do sobrenadante juntamente com 1 mL de *SER* para balão volumétrico de 10 mL e completou-se com fase móvel.

Determinou-se individualmente a concentração de *S*-duloxetina e *R*-duloxetina nas amostras analisadas em percentagem utilizando a fórmula:

$$C(\%) = \frac{Aa \times Cp \times Tp}{Ap \times Ca}$$

Onde: *Aa* e *Ap* são as respectivas áreas da amostra e do padrão em unidades de área; *Ca* e *Cp* são as respectivas concentrações da amostra e do padrão em $\mu\text{g/mL}$; e, *Tp* é o teor do padrão em percentagem.

O desvio padrão relativo entre as 6 amostras analisadas foi calculado utilizando a fórmula:

$$DPR (\%) = \frac{DP \times 100}{CMD}$$

Onde: *DPR* é o desvio padrão relativo, *DP* é o desvio padrão e *CMD* é a concentração média determinada entre as 6 amostras.

4.7.4 Avaliação da exatidão por CLAE

Para a análise da exatidão foi utilizado o método de adição de padrão, na qual foram adicionadas quantidades conhecidas dos analitos à solução placebo. A Tabela 14 correlaciona as soluções nas concentrações baixa, média e alta com as respectivas percentagens de *S*-duloxetina e *R*-duloxetina contidas nas mesmas.

Tabela 14. Determinação das concentrações das amostras para a análise de exatidão.

Concentração ¹	Relação (%)		Conc. de Placebo (%)	Conc. S-DLX (µg/mL)	Conc. R-DLX (µg/mL)
	S-DLX	R-DLX			
Baixa	50%	0,5%		50,00	0,50
Média	100%	1,0%	100	100,00	1,00
Alta	150%	1,5%		150,00	1,50

1-Amostras preparadas em triplicata.

As amostras utilizadas para a avaliação da exatidão foram preparadas a partir da pesagem do placebo e das soluções estoque *SES* e *SER* conforme o descrito no item 4.5. A partir das massas pesadas de placebo e das soluções estoque, foram preparadas as três diferentes concentrações, em triplicata, utilizando a Tabela 15 como referência.

Tabela 15. Preparo das amostras utilizadas na exatidão.

Concentração ¹	Massa de placebo (mg) ²	Volume (mL)		Balão Volumétrico (mL) ³
		SES	SER	
Baixa	270,58	0,5	0,5	10
Média	270,58	1,0	1,0	10
Alta	270,58	1,5	1,5	10

1- Triplicata de amostra.

2- Levando-se em conta o peso médio de 330,58 mg.

3- Os balões foram completados com fase móvel.

A concentração recuperada de cada amostra determinada experimentalmente foi calculada utilizando a fórmula:

$$(\%) \textit{ Recuperada} = \frac{CME \times 100}{CT}$$

Onde: *CME* é a concentração média determinada experimentalmente e *CT* é a concentração teórica.

4.7.5 Avaliação da robustez por CLAE

A robustez do método foi avaliada através de planejamento fatorial de Plackett-Burman, utilizando-se quatro fatores e ponto central. Para demonstrar a robustez do método quanto a pequenas variações estudou-se o efeito de quatro fatores potenciais: vazão, temperatura do forno, concentração de HEX e DEA na fase móvel. Este tipo de planejamento prevê treze ensaios, que foram realizados conforme apresentado na Tabela 16.

Tabela 16. Dados do planejamento fatorial para o teste de robustez por CLAE.

Ensaio	(A) Vazão (mL min ⁻¹)	(B) Temp. (°C)	(C) (%) HEX	(D) (%) DEA
	(-) 0,9 (+) 1,1	(-) 28 (+) 32	(-) 88 (+) 92	(-) 0,1 (+) 0,3
1	1	-1	-1	-1
2	1	-1	1	1
3	-1	1	1	1
4	-1	1	1	-1
5	1	-1	1	-1
6	-1	-1	1	1
7	-1	-1	-1	-1
8	-1	-1	-1	1
9	1	1	-1	1
10	1	1	1	-1
11	1	1	1	1
12	0	0	0	0
13	-1	1	-1	-1

Foi avaliada também a estabilidade das soluções durante o período de 48 horas em temperatura de 25 °C e protegida da exposição da luz.

4.8 Validação de método por EC

O instrumental e o procedimento para a análise cromatográfica foram descritos no item 4.6 Tabela 12.

4.8.1 Avaliação da especificidade por EC

A avaliação da especificidade foi realizada através da investigação dos possíveis interferentes presentes na amostra. Desta forma, avaliaram-se os seguintes compostos:

Padrão S-duloxetina: Transferiu-se 10,0 mg de padrão de S-duloxetina para balão volumétrico de 10 mL, adicionou-se aproximadamente 7 mL diluente e levar ao ultrassom sem aquecimento por 15 minutos. Na sequência completou-se o volume com diluente. Desta solução, transferiu-se 1 mL para balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume com diluente, homogeneizou-se e filtrou-se com membrana de 0,45 µm (conc. final 100,00 µg/mL).

Padrão R-duloxetina: Transferiu-se 10,0 mg de padrão de R-duloxetina para balão volumétrico de 10 mL, adicionou-se aproximadamente 7 mL diluente e levar ao ultrassom sem aquecimento por 15 minutos. Na sequência completou-se o volume com diluente. Desta solução, transferiu-se 1 mL para balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume com diluente, homogeneizou-se e filtrou-se com membrana de 0,45 µm (conc. final 100,00 µg/mL).

Padrão interno: Transferiu-se 100,0 mg de padrão de cimetidina para balão volumétrico de 50 mL, adicionou-se aproximadamente 35 mL diluente e levou-se ao ultrassom sem aquecimento por 15 minutos. Na sequência completou-se o volume com diluente. Desta solução, transferiu-se 1 mL para balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume com diluente, homogeneizou-se e filtrou-se com membrana de 0,45 µm (conc. final 200,00 µg/mL).

Amostra: Transferiu-se amostra equivalente a 50,0 mg de duloxetina para balão volumétrico de 50 mL. Adicionou-se aproximadamente 35 mL de diluente, agitou-se em vórtex por 1 minuto e levou-se ao ultrassom sem aquecimento por 15 minutos. Desta solução transferiu-se 1 mL para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com diluente, homogeneizou-se e filtrou-se com membrana de 0,45 µm (conc. teórica final 100,00 µg/mL para S-duloxetina).

Placebo: Transferiu-se cerca de 270,58 mg de placebo para balão volumétrico de 50 mL. Adicionou-se aproximadamente 35 mL de diluente, agitou-se em vórtex por 1 minuto e levou-se ao ultrassom sem aquecimento por 15 minutos. Desta solução, transferiu-se 1 mL para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com diluente, homogeneizou-se e filtrou-se com membrana de 0,45 µm.

A pureza dos picos presentes nos eletroferogramas foi verificada através do detector PDA, empregando as ferramentas disponíveis no *software ChemStation*.

4.8.2 Avaliação da linearidade por EC

Para a avaliação da linearidade foram construídas 3 curvas padrão para a S-duloxetina e R-duloxetina. A partir de duas soluções estoques.

Solução estoque padrão S-duloxetina (SES): Transferiu-se 10,0 mg de padrão de S-duloxetina para balão volumétrico de 10 mL, adicionou-se aproximadamente 7 mL de diluente e levou-se ao ultrassom sem aquecimento por 30 minutos. Na sequência, completou-se o volume com diluente (conc. final 1000,00 µg/mL).

Solução estoque padrão R-duloxetina (SER): Transferiu-se 10,0 mg de padrão de R-duloxetina para balão volumétrico de 10 mL, adicionou-se aproximadamente 7 mL de diluente e levou-se ao ultrassom sem aquecimento por 30 minutos. Na sequência completou-se o volume com diluente (Conc. Final 1000,00 µg/mL).

Solução estoque padrão interno (SEPI): Transferiu-se 100,0 mg de padrão de cimetidina para balão volumétrico de 50 mL, adicionou-se aproximadamente 35 mL diluente e levou-se ao ultrassom sem aquecimento por 15 minutos. Na sequência completou-se o volume com diluente (conc. final 2000,00 µg/mL).

O preparo e as concentrações finais estão descritos na Tabela 17.

Tabela 17. Concentrações finais da linearidade.

Ponto da curva	Volume SES	Volume SER	Volume SEPI	Balão volumétrico ¹	Conc. Final S-duloxetina (µg/mL)	Conc. Final R-duloxetina (µg/mL)
1	0,5	0,5	1,0	10	50	50
2	0,8	0,8	1,0	10	80	80
3	0,9	0,9	1,0	10	90	90
4	1,0	1,0	1,0	10	100	100
5	1,1	1,1	1,0	10	110	110
6	1,2	1,2	1,0	10	120	120
7	1,5	1,5	1,0	10	150	150

1-Os balões foram completados com diluente.

As médias das razões das áreas correspondentes a cada diluição foram utilizadas para a obtenção das curvas padrão. A equação da reta, o coeficiente de correlação (r) e os resultados foram calculados através de análise de variância (ANOVA).

4.8.3 Avaliação da precisão por EC

Para avaliação da precisão foram preparadas 6 amostras distintas de duloxetina a 100% contaminadas com a impureza R-duloxetina a 100%. O preparo das amostras está descrito abaixo.

Solução estoque padrão S-duloxetina (SES): Conforme o descrito no item 4.6.

Solução estoque padrão R-duloxetina (SER): Conforme o descrito no item 4.6.

Solução estoque padrão interno (SEPI): Conforme o descrito no item 4.6.

Padrão: Conforme o descrito no item 4.6.

Solução Amostra: Transferiu-se o equivalente 50,0 mg de duloxetina para balão volumétrico de 50 mL, adicionou-se aproximadamente 35 mL de diluente e levou-se ao ultrassom sem aquecimento por 15 minutos. Na sequência, completou-se o volume com diluente. Desta solução transferiu-se 1 mL juntamente com 1 mL de *SER* e 1 mL de *SEPI* para balão volumétrico de 10 mL e completou-se com fase móvel (conc. final 100,00 µg/mL para S-duloxetina, 100,00 µg/mL para R-duloxetina e 200,00 µg/mL para o PI)

Determinou-se individualmente a concentração de S-duloxetina e R-duloxetina nas amostras analisadas em porcentagem utilizando a fórmula:

$$C(\%) = \frac{Aa \times Cp \times Tp}{Ap \times Ca}$$

Onde: *Aa* e *Ap* são as respectivas áreas da amostra e do padrão em unidades de área; *Ca* e *Cp* são as respectivas concentrações da amostra e do padrão em µg/mL; e, *Tp* é o teor do padrão em porcentagem.

O desvio padrão relativo entre as 6 amostras analisadas foi calculado utilizando a fórmula:

$$DPR (\%) = \frac{DP \times 100}{CMD}$$

Onde: *DPR* é o desvio padrão relativo, *DP* é o desvio padrão e *CMD* é a concentração média determinada entre as 6 amostras.

4.8.4 Avaliação da exatidão por EC

Para a análise da exatidão foi utilizado o método de adição de padrão, na qual foram adicionadas quantidades conhecidas dos analitos ao placebo. A Tabela 18 correlaciona as concentrações baixa, média e alta com as porcentagens de S-duloxetina e R-duloxetina contida nela.

Tabela 18. Determinação das concentrações das amostras para a análise de exatidão.

Concentração ¹	Relação (%)		Conc. de Placebo (%)	Conc. S-DLX (µg/mL)	Conc. R-DLX (µg/mL)
	S-DLX	R-DLX			
Baixa	50	50		50,00	50,00
Média	100	100	100	100,00	100,00
Alta	150	150		150,00	150,00

1-Amostras preparadas em triplicata.

As amostras utilizadas na avaliação da exatidão foram preparadas a partir da pesagem do placebo e das soluções estoque *SES* e *SER* e *SEPI* conforme o descrito no item 4.6. A partir das massas pesadas de placebo e das soluções estoque, foram preparadas as três diferentes concentrações da exatidão, em triplicata, utilizando a Tabela 19 como referência.

Tabela 19. Preparo das amostras utilizadas na exatidão.

Concentração ¹	Massa de placebo (mg) ²	Volume (mL)			Balão Volumétrico (mL) ³
		SES	SER	SEPI	
Baixa	270,58	0,5	0,5	1,0	10
Média	270,58	1,0	1,0	1,0	10
Alta	270,58	1,5	1,5	1,0	10

1- Triplicata de amostra.

2- Levando-se em conta o peso médio de 330,58 mg.

3- Os balões foram completados com diluente.

A concentração recuperada de cada amostra determinada experimentalmente foi calculada utilizando a fórmula:

$$(\%) \textit{ Recuperada} = \frac{CME \times 100}{CT}$$

Onde: *CME* é a concentração média determinada experimentalmente e *CT* é a concentração teórica.

4.8.5 Avaliação da robustez por EC

A robustez do método foi avaliada através de planejamento fatorial de Plackett-Burman, com quatro fatores e utilizando ponto central. Para demonstrar a robustez do método quanto a pequenas variações estudou-se o efeito de quatro fatores potenciais: concentração de HP β CD, pH, voltagem e temperatura. Este tipo de planejamento prevê treze ensaios, que foram realizados, conforme apresentado na Tabela 20.

Tabela 20. Dados do planejamento fatorial para o teste de robustez por EC.

Ensaio	(A) HP β CD (mM)	(B) pH	(C) Voltagem (kV)	(D) Temp. (°C)
	(-) 4,5 (+) 5,5	(-) 2,4 (+) 2,6	(-) 19 (+) 21	(-) 24 (+) 26
1	1	-1	-1	-1
2	1	-1	1	1
3	-1	1	1	1
4	-1	1	1	-1
5	1	-1	1	-1
6	-1	-1	1	1
7	-1	-1	-1	-1
8	-1	-1	-1	1
9	1	1	-1	1
10	1	1	1	-1
11	1	1	1	1
12	0	0	0	0
13	-1	1	-1	-1

Foi avaliada também a estabilidade das soluções durante o período de 48 horas em temperatura de 25 °C e protegida da exposição da luz.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Resultados por CLAE

5.1.1 Desenvolvimento e otimização do método por CLAE

Os testes de desenvolvimento e adequação do sistema são partes integrantes do método de análise por cromatografia líquida. A seletividade e o tempo de eluição dos enantiômeros são fatores importantes no desenvolvimento de métodos rápidos e eficientes. Os parâmetros a serem medidos e seus limites recomendados, de acordo com o FDA, estão apresentados na Tabela 21. Tipicamente, no mínimo dois destes critérios são requeridos para garantir a conformidade do sistema (RIBANI *et al.*, 2004).

Tabela 21. Parâmetros de conformidade do sistema e recomendações.

Parâmetro	Recomendação
Fator de retenção (k)	O pico deve estar bem separado de outros picos e do componente não retido. Geralmente $k > 2$
Repetibilidade	É aconselhável $DPR \leq 1\%$ para $n \geq 5$
Resolução (Rs)	A resolução entre o pico de interesse e o interferente potencial mais próximo deve ser > 2
Fator de simetria (T)	O fator de assimetria deve estar compreendido entre 0,8 e 2,0
Número de pratos teóricos (N)	Em geral deve ser > 2000

Fonte: RIBANI *et al.* (2004)

Com esta finalidade, várias condições de análise foram testadas visando à obtenção de um sistema otimizado. Neste estudo, duas colunas quirais foram avaliadas a fim de obter um método enantiosseletivo, com alta sensibilidade e baixo tempo de análise. Além disso, a influência de diferentes parâmetros analíticos foi considerada para aperfeiçoamento do método. Na sequência, nas Tabelas 22 e 23, são apresentadas as condições cromatográficas testadas e os resultados obtidos no desenvolvimento e otimização do método por CLAE.

Tabela 22. Condições cromatográficas avaliadas no desenvolvimento CLAE.

	Coluna	Fase móvel (v/v/v)	Temp.(°C)
Condição 1	Chiralcel AD-H	HEX: ETOH (90:10)	Ambiente
Condição 2	Chiralcel OD-H	HEX: ETOH (90:10)	Ambiente
Condição 3	Chiralcel OD-H	HEX: ETOH:DEA (90:10:0,1)	Ambiente
Condição 4	Chiralcel OD-H	HEX: ETOH:DEA (90:10:0,2)	Ambiente
Condição 5	Chiralcel OD-H	HEX: ETOH:DEA (90:10:0,3)	Ambiente
Condição 6	Chiralcel OD-H	HEX: ETOH:DEA (90:10:0,2)	25
Condição 7	Chiralcel OD-H	HEX: ETOH:DEA (90:10:0,2)	30
Condição 8	Chiralcel OD-H	HEX: ETOH:DEA (90:10:0,2)	35
Condição 9	Chiralcel OD-H	HEX: ETOH:DEA (87,5:12,5:0,2)	30
Condição 10	Chiralcel OD-H	HEX: ETOH:DEA (92,5:7,5:0,2)	30
Condição 11	Chiralcel OD-H	HEX:ISO:DEA (90:10:0,2)	30

Tabela 23. Resultados obtidos no desenvolvimento CLAE.

	TR¹	TR¹	T²	T²	N³	N³	Rs⁴
	S-DLX	R-DLX	S-DLX	R-DLX	S-DLX	R-DLX	
Condição 1		5,090		1,027		4420	0
Condição 2	13,610	18,771	1,849	2,211	332,1	379,9	1,510
Condição 3	7,791	10,622	1,193	1,155	7779	7388	6,678
Condição 4	7,801	10,653	1,192	1,153	8469	7750	6,929
Condição 5	7,681	10,498	1,196	1,146	8220	7917	6,949
Condição 6	7,430	10,082	1,092	1,074	8723	7344	6,724
Condição 7	7,167	9,512	1,098	1,072	8973	7947	6,430
Condição 8	6,856	8,954	1,108	1,069	9284	8282	6,187
Condição 9	8,934	11,863	1,096	1,070	10078	8905	6,820
Condição 10	7,141	9,487	1,103	1,072	9087	7948	6,469
Condição 11	7,181	9,546	1,745	1,732	8814	7076	6,221

1 – Tempo de Retenção (min); 2 – Simetria; 3 – Número de Pratos teóricos; 4 – Resolução.

Para o desenvolvimento do método por CLAE, avaliou-se preliminarmente, dentre a coluna de amilose (Chiralcel AD-H) e celulose (Chiralcel OD-H), a mais adequada para a separação dos enantiômeros da duloxetina. Ambas as colunas supracitadas utilizam o modo normal de eluição e desta forma possuem uma série de restrições quanto aos componentes a serem utilizados. Inicialmente testou-se a resolução dos enantiômeros da duloxetina com a coluna de amilose. Conforme o demonstrado na Figura 8, pode-se observar que a coluna testada não se mostrou capaz de resolver os enantiômeros da duloxetina.

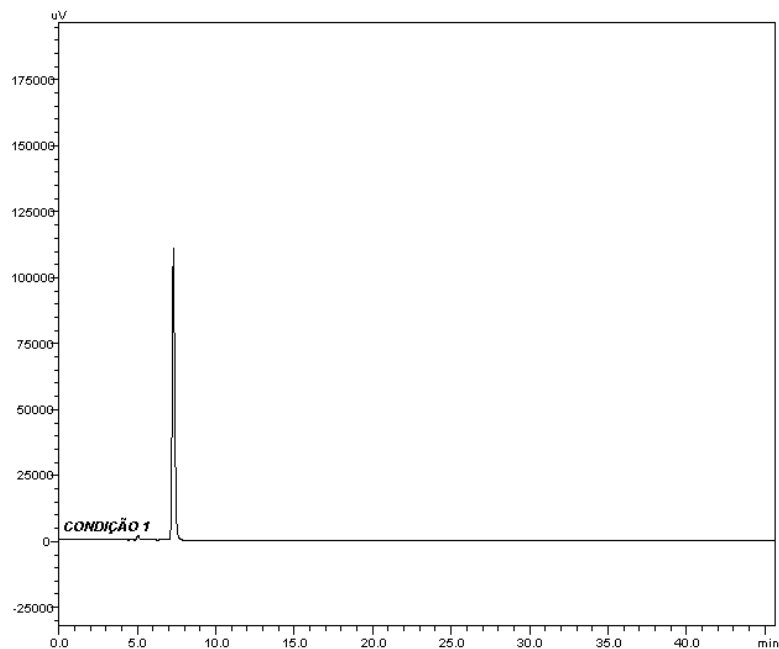


Figura 8. Cromatograma extraído da condição 1, conforme o descrito na Tabela 22. Padrão *RS*-duloxetina.

Tendo em vista a falta de seletividade da coluna de amilose foram conduzidos testes com a coluna de celulose, conforme o demonstrado na Figura 9.

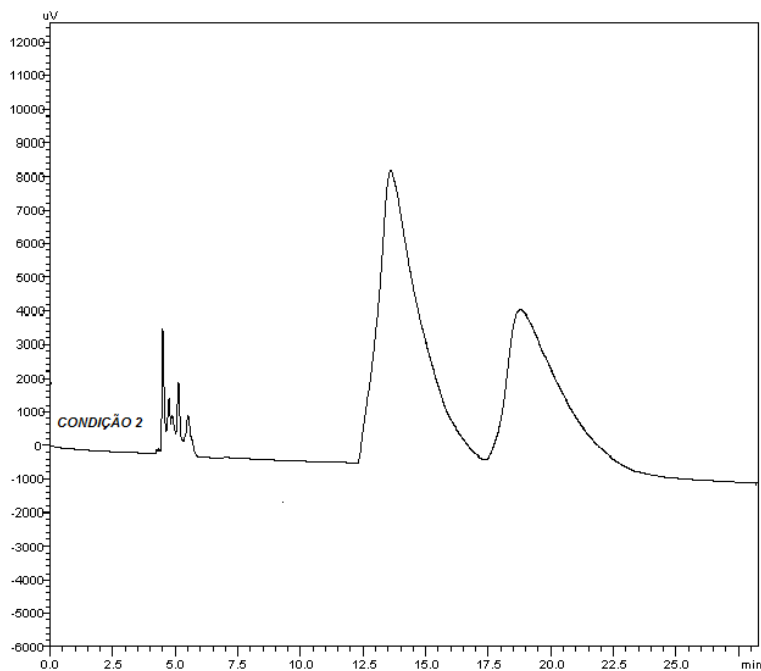


Figura 9. Cromatograma extraído da condição 2, conforme o descrito na Tabela 22. Padrão *RS*-duloxetina.

A partir da avaliação da Figura 9 pode-se constatar que a coluna de celulose (Chiralcel OD-H) é capaz de separar os enantiômeros da duloxetina. No entanto, o perfil dos picos cromatográficos nas condições apresentadas não foi satisfatório, uma vez que os parâmetros de assimetria, pratos teóricos e resolução não foram adequados, associados a um tempo de retenção elevado (Tabela 23).

Visando a melhoria do perfil cromatográfico dos enantiômeros da duloxetina, optou-se pela adição do modificador DEA a fase móvel. A Figura 10 apresenta o efeito da adição de DEA na composição da fase móvel e pode-se constatar que a adição deste modificador na fase móvel acarreta em uma melhora considerável no perfil dos picos cromatográficos (Tabela 23).

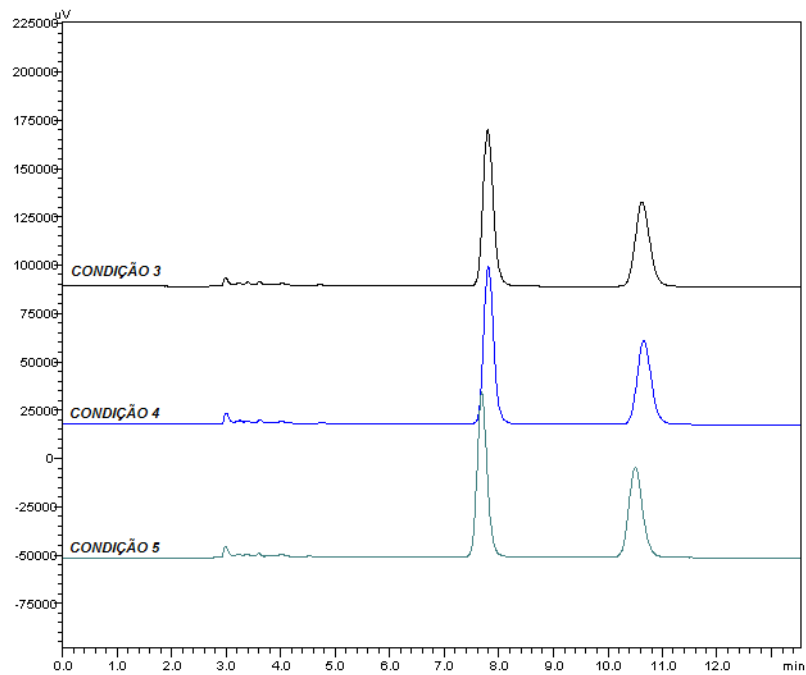


Figura 10. Cromatogramas extraídos e sobrepostos das condições 3 a 5. Padrão RS-duloxetina.

A partir dos resultados obtidos com as condições descritas, optou-se pela avaliação dos demais fatores na separação dos enantiômeros. Os resultados estão demonstrados abaixo.

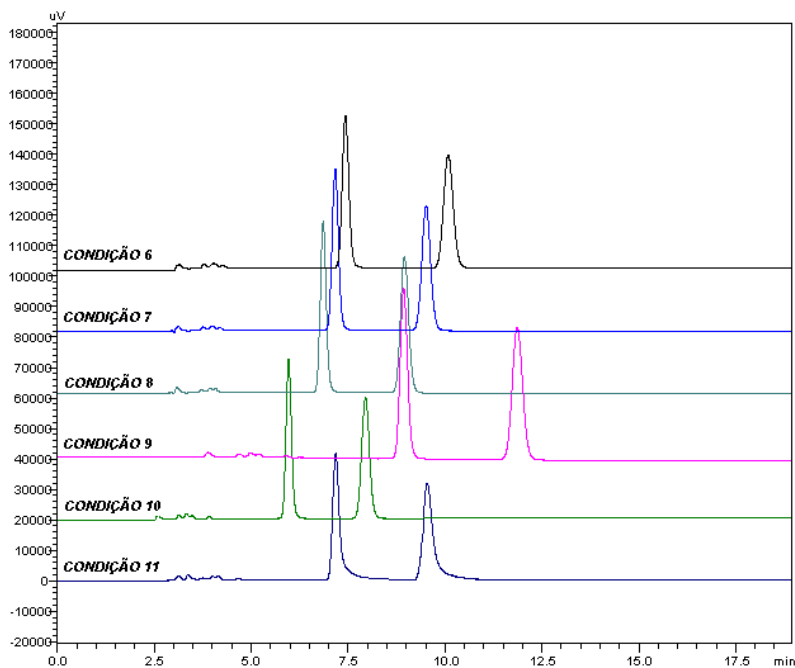


Figura 11. Cromatogramas extraídos e sobrepostos das condições 6 a 11.

Baseado nos resultados pode-se constatar que a coluna de celulose se mostrou específica na separação dos enantiômeros da duloxetina. O uso de fases estacionárias baseadas em derivados de celulose e amilose têm mostrado que o mesmo derivado, embora proveniente de polissacarídeo diferente, pode resultar em habilidade de resolução quiral totalmente distinta. Foi proposto que as conformações 3/2 da cadeia helicoidal dos derivados de celulose e 4/1 dos derivados de amilose são responsáveis pelas diferenças cromatográficas entre as fases estacionárias baseadas em tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de celulose e amilose (BONATO, 2005).

Foram realizados testes empregando-se hexano, isopropanol e etanol em diferentes proporções. Aumentando-se a polaridade da fase móvel, seja pelo aumento da proporção ou por alteração do tipo de álcool (isopropanol ou etanol). Os ensaios com etanol e isopropanol indicaram resultados favoráveis ao etanol devido ao perfil dos picos cromatográficos obtidos. Constatou-se também que a adição de DEA é imprescindível para a obtenção de cromatogramas com parâmetros adequados. O emprego desta base orgânica tem por finalidade principal reduzir a interação do analito com os grupos silanóis residuais presentes no suporte de sílica (BONATO, 2005).

Observou-se que a temperatura tem influência direta no tempo de retenção dos compostos. O aumento de temperatura resulta na redução considerável no tempo de retenção dos enantiômeros. Essa diferença é devida à redução nas interações químicas entre os enantiômeros e os seletores quirais das fases estacionárias, reduzindo assim o tempo de retenção.

Segundo o fabricante da coluna Chiralcel OD-H[®], existe uma série de restrições quanto a sua utilização. Como fase móvel, recomenda-se a utilização de hexano, isopropanol ou etanol. Como modificador de fase móvel deve-se utilizar ácido trifluoracético ou dietilamina. Componentes como acetonitrila, dimetilformamida, tetraidrofurano, dimetilsulfóxido e quaisquer tampões são desaconselhados. Outros pontos limitantes na utilização destas colunas são a pressão de trabalho recomendada, que deve ser de até 700 psi e a temperatura máxima de utilização não deve ser superior a 40 °C. Tendo em

vista as restrições supracitadas e os resultados obtidos nos testes preliminares, definiram-se os parâmetros cromatográficos testados na condição 7 como sendo inicialmente os mais adequados para avaliação dos enantiômeros da duloxetina.

Baseado no sistema cromatográfico da condição 7, testes suplementares foram conduzidos para a definição dos demais parâmetros do método, tais como, comprimento de onda, volume de injeção, concentração de trabalho e diluente. A condição final otimizada encontra-se detalhada no item 4.5.

5.1.2 Especificidade por CLAE

A avaliação da especificidade do método analítico por CLAE foi realizada através da injeção do fármaco *S*-duloxetina, da impureza enantiomérica *R*-duloxetina e do produto de degradação majoritário 1-Naftol. Avaliou-se também amostra do produto Cymbalta[®], os excipientes simulados (placebo), juntamente com a solução diluente. A Figura 12 apresenta os cromatogramas extraídos e sobrepostos da análise de especificidade.

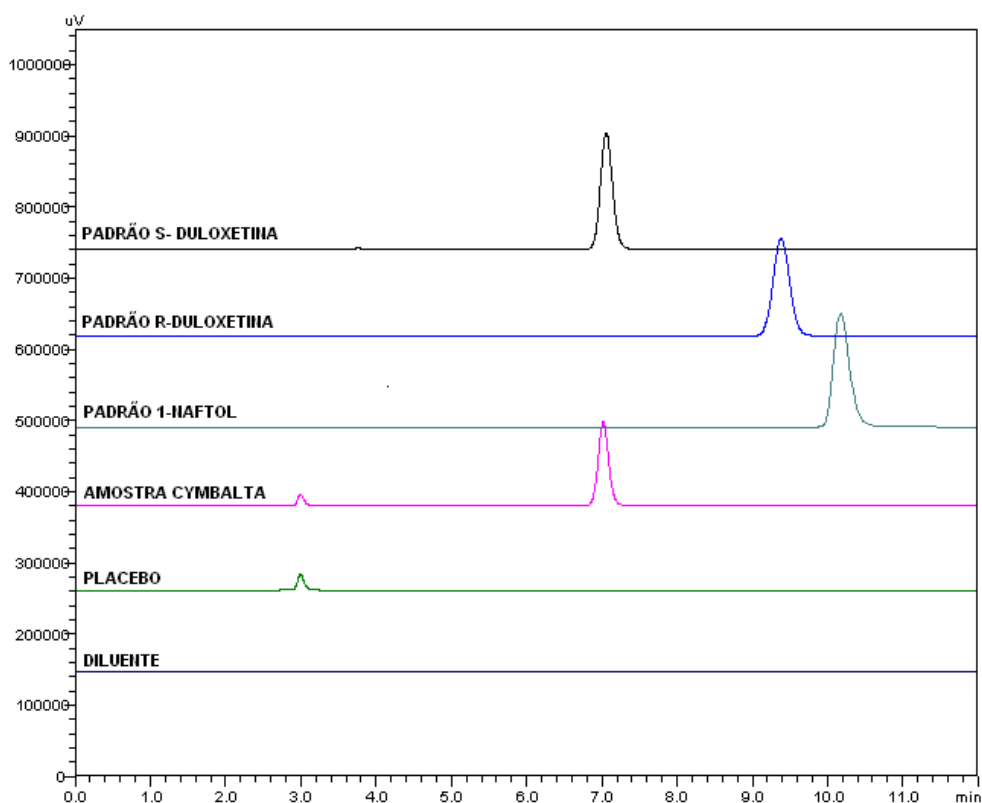


Figura 12. Cromatogramas extraídos e sobrepostos da análise de especificidade (condições conforme o descrito no item 4.5).

A partir dos resultados obtidos, pôde-se constatar a capacidade do método em separar os compostos estruturalmente semelhantes, como a impureza majoritária 1 naftol. Constatou-se também a não interferência do placebo e do diluente na análise, pois não se observou a presença de picos de absorção provenientes destas soluções nos tempos de retenção dos analitos de interesse.

Com o objetivo de certificar que o método é específico, foram observados os gráficos de pureza de cada pico cromatográfico, utilizando detector de arranjo de diodos, com cálculos realizados pelo software *LC Solutions*. Todos os picos analisados apresentaram pureza de pico superior a 0,99, sem detecção de impureza, indicando a não contaminação dos picos cromatográficos.

A Figura 13 demonstra a pureza de pico dos enantiômeros da duloxetina e o espectro de absorção no UV oriundo da análise por PDA.

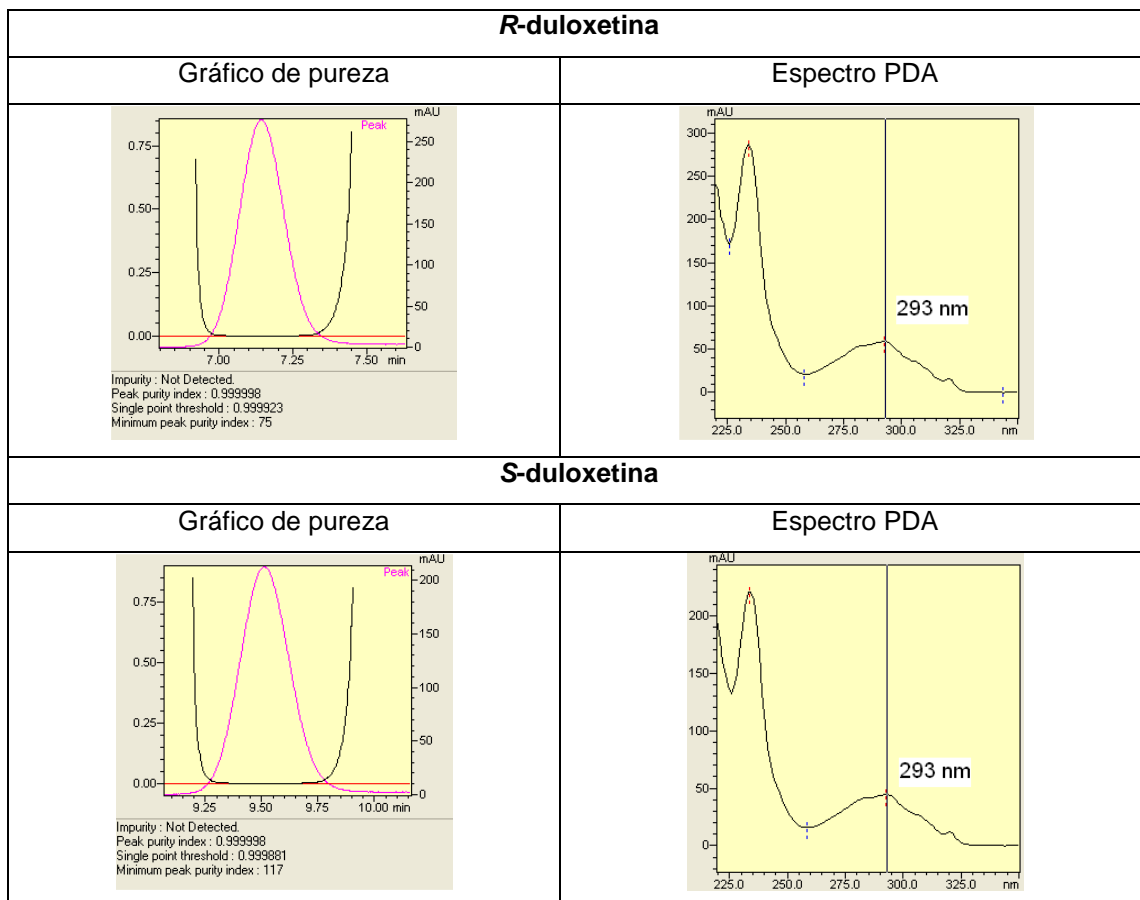


Figura 13. Gráfico de pureza e espectro UV dos picos referentes aos enantiômeros da duloxetina por CLAE.

5.1.3 Linearidade por CLAE

As Tabelas 24 e 25 apresentam as áreas correspondentes a cada concentração de *S*-duloxetina e *R*-duloxetina, dados estes utilizados para a confecção das curvas padrão dos compostos.

Tabela 24. Dados analíticos utilizados na curva de linearidade da *S*-duloxetina por CLAE.

Concentração (µg/mL)	Área	Área Média	DPR (%)
50,0	2722033	2739172	0,96
	2726122		
	2769361		
80,0	4396365	4405147	0,86
	4372240		
	4446836		
90,0	4964909	4970736	0,84
	4932388		
	5014911		
100,0	5469578	5512756	1,05
	5490058		
	5578631		
110,0	6085034	6097865	0,83
	6055063		
	6153498		
120,0	6666373	6668632	0,79
	6616931		
	6722592		
150,0	8378201	8361013	0,77
	8289669		
	8415170		

Tabela 25. Dados analíticos utilizados na curva de linearidade da *R*-duloxetina por CLAE.

Concentração (µg/mL)	Área	Área Média	DPR (%)
0,5	36904	37744	1,93
	38210		
	38118		
0,8	59640	60781	1,78
	60914		
	61788		
0,9	68378	69356	1,23
	69733		
	69958		
1,0	74732	76314	1,80
	77078		
	77131		
1,1	83283	85028	1,88
	85369		
	86432		
1,2	90969	93147	2,04
	93991		
	94483		
1,5	115493	116966	1,17
	117213		
	118192		

A representação gráfica das curvas obtidas para os enantiômeros da duloxetina encontram-se nas Figuras 14 e 15.

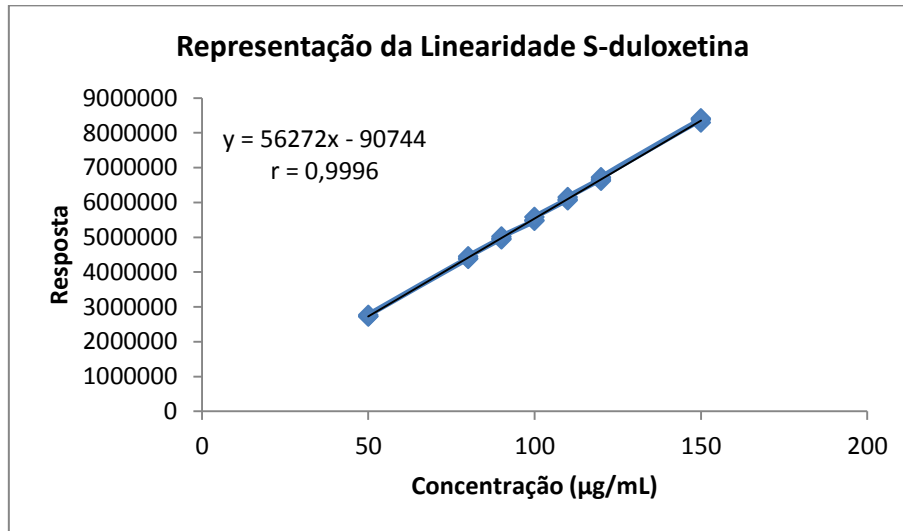


Figura 14. Representação gráfica da curva padrão de S-duloxetina.

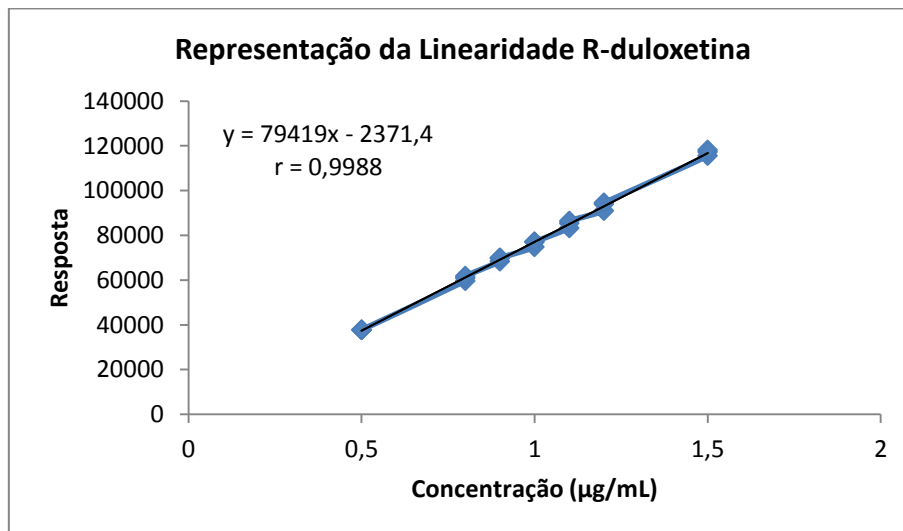


Figura 15. Representação gráfica da curva padrão de R-duloxetina.

As representações gráficas dos resíduos obtidos com as curvas dos enantiômeros da duloxetina são apresentadas nas Figuras 16 e 17.

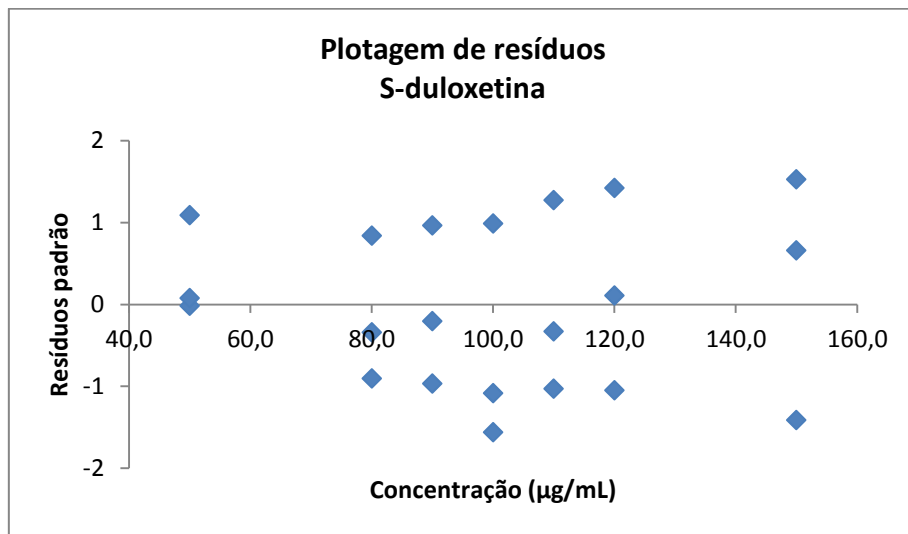


Figura 16. Resíduos padronizados provenientes da curva da S-duloxetina.

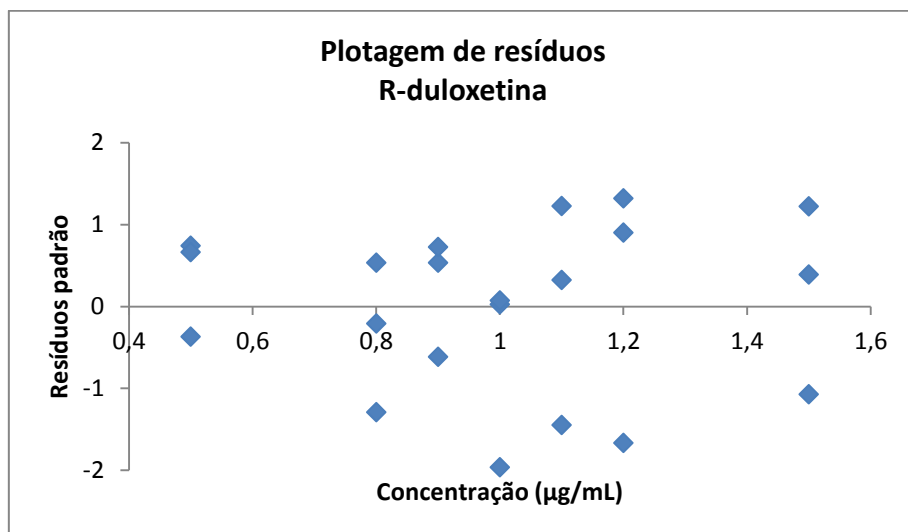


Figura 17. Resíduos padronizados provenientes da curva da R-duloxetina.

A análise estatística através de ANOVA para verificar a linearidade do método por CLAE está demonstrada nas Tabelas 26 e 27.

Tabela 26. ANOVA das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão de *S*-duloxetina por CLAE.

Fontes de Variação	gl	SQ	Variância	Fcal
Entre doses	6	$5,70.10^{13}$	$9,50.10^{12}$	3976,38
Regressão linear	1	$5,70.10^{13}$	$5,70.10^{13}$	23857,13
Desvio linearidade	5	$2,76.10^9$	$5,51.10^8$	0,23
Dentro	14	$3,34.10^{10}$	$2,39.10^9$	
Total	20	$5,70.10^{13}$		

Tabela 27. ANOVA das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão de *R*-duloxetina por CLAE.

Fontes de Variação	gl	SQ	Variância	Fcal
Entre doses	6	$1,13.10^{10}$	$1,89.10^9$	1071,93
Regressão linear	1	$1,13.10^{10}$	$-1,13.10^{10}$	6429,93
Desvio linearidade	5	$2,88.10^6$	$5,95.10^5$	0,33
Dentro	14	$2,47.10^7$	$1,76.10^6$	
Total	20	$1,14.10^{10}$		

Os resultados obtidos na análise da linearidade apresentaram-se satisfatórios para ambos os compostos. O coeficiente de correlação linear (*r*) obtido para *S*-duloxetina foi de 0,9996 e para a *R*-duloxetina de 0,9988, estando os dois, dentro do esperado. A análise de ANOVA efetuada demonstra regressão linear significativa para ambos os compostos, não havendo desvio da linearidade para um nível de significância de 5%. Os gráficos dos resíduos não apresentaram indicadores de variância não constante, pois se obtiveram resíduos homocedásticos e aleatoriamente distribuídos com ausência de amostras atípicas, comprovando a validade do método em relação à linearidade.

5.1.4 Limite de Quantificação e Detecção por CLAE

O LQ e o LD foram calculados para a impureza *R*-duloxetina baseados no desvio padrão do intercepto e na inclinação, a partir das curvas padrão da linearidade. A Tabela 28 apresenta os resultados de LQ e LD para a impureza *R*-duloxetina.

Tabela 28. Limite de detecção e quantificação para *R*-duloxetina.

Composto	LD ($\mu\text{g/mL}$)	LQ ($\mu\text{g/mL}$)
<i>R</i> -duloxetina	0,0171	0,0519

Baseado nos limites obtidos avaliou-se a precisão do método no LQ a partir do preparo de padrão na concentração próxima ao LQ. Na Tabela 29 podem-se observar os resultados da precisão no LQ.

Tabela 29. Resultados da precisão no LQ para *R*-duloxetina.

Injeção	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Área	DPR (%)
1		4193	
2		4142	
3		4141	
4	0,0500	4224	1,47
5		4235	
6		4072	

A avaliação da precisão na concentração do LQ demonstra que o método é preciso no limite proposto, indicando a sensibilidade satisfatória do mesmo.

5.1.5 Precisão por CLAE

A precisão do método foi demonstrada pela repetibilidade (intradia) e precisão intermediária (interdia), sendo expresso pelo DPR de uma série de leituras. A avaliação foi realizada com amostra do produto farmacêutico, na concentração nominal de 100% para o fármaco *S*-duloxetina, contaminada com 1% da impureza enantiomérica *R*-duloxetina. Os valores experimentais obtidos na avaliação da precisão intra e interdia para os enantiômeros da duloxetina estão demonstrados nas Tabelas 30 e 31.

Tabela 30. Valores experimentais referentes à determinação de S-duloxetina para avaliação da precisão por CLAE.

Amostras	Avaliação intradia		
	1° dia (%)	2° dia (%)	3° dia (%)
1	99,94	100,80	101,52
2	100,53	100,72	100,24
3	98,65	99,94	99,81
4	99,96	102,54	100,3
5	99,67	99,36	100,54
6	101,77	100,97	99,48
Média	100,09	100,72	100,32
DPR (%)	1,03	1,07	0,70
	Avaliação interdia		
Média (%)		100,38	
DPR (%)		0,93	

Tabela 31. Valores experimentais referentes à determinação de R-duloxetina para avaliação da precisão por CLAE.

Amostras	Avaliação intradia		
	1° dia (%)	2° dia (%)	3° dia (%)
1	1,06	1,01	1,03
2	1,09	1,05	1,07
3	1,07	1,06	1,05
4	1,05	1,06	1,04
5	1,01	1,06	1,03
6	1,07	1,05	1,05
Média	1,06	1,05	1,05
DPR (%)	2,56	1,85	1,45
	Avaliação interdia		
Média (%)		1,05	
DPR (%)		1,97	

A precisão do método para a determinação dos enantiômeros da duloxetina em cápsulas foi investigada através da repetibilidade e da precisão intermediária. Os valores percentuais médios encontrados no doseamento das amostras intra e interdias foram satisfatórios. Os baixos valores de DPR obtidos neste estudo caracterizam a precisão do método.

5.1.6 Exatidão por CLAE

As porcentagens de recuperação obtidas a partir do teste de exatidão para os enantiômeros da duloxetina, na avaliação da exatidão, estão apresentadas nas Tabelas 32 e 33.

Tabela 32. Resultados do teste de recuperação por CLAE para a determinação de S-duloxetina.

	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)		Recuperação (%)	Média (%)	DPR (%)
	Adicionada	Recuperada ¹			
Baixa	50	49,35	98,70		
Média	100	101,44	101,44	99,87	1,42
Alta	150	149,21	99,47		

1 – Cada valor representa a média de três determinações

Tabela 33. Resultados do teste de recuperação por CLAE para a determinação de R-duloxetina.

	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)		Recuperação (%)	Média (%)	DPR (%)
	Adicionada	Recuperada ¹			
Baixa	0,5000	0,5072	101,44		
Média	1,0000	1,0188	101,88	101,34	0,59
Alta	1,5000	1,5104	100,69		

1 – Cada valor representa a média de três determinações

A exatidão do método proposto foi determinada através do teste de recuperação dos enantiômero da duloxetina. O método desenvolvido demonstrou exatidão através dos resultados obtidos, exibindo porcentagem de

recuperação média de 99,87% para o S-duloxetina e 101,34% para R-duloxetina.

5.1.7 Robustez por CLAE

Para verificação da robustez avaliou-se o efeito das variações frente ao teor, a resolução entre os enantiômeros, o fator de capacidade a simetria da R-duloxetina. Os resultados obtidos na determinação dos enantiômeros da duloxetina através de pequenas alterações nas condições cromatográficas estão demonstrados nas Figuras 18 a 21.

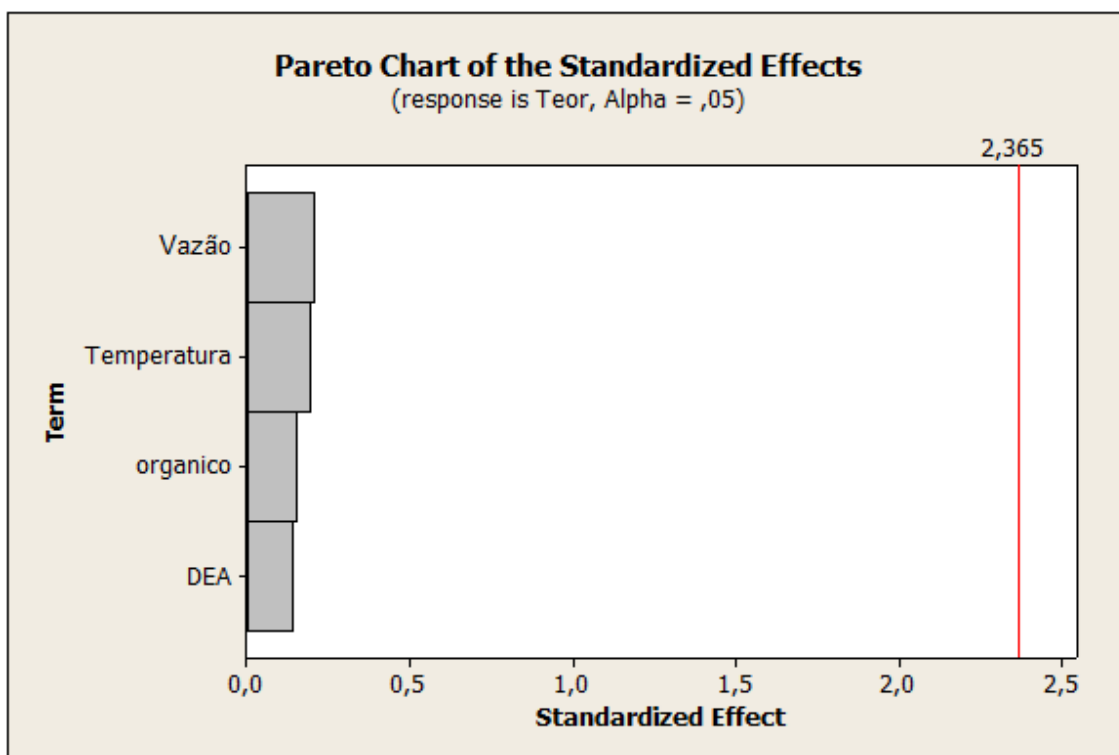


Figura 18. Efeitos das alterações sobre o teor.

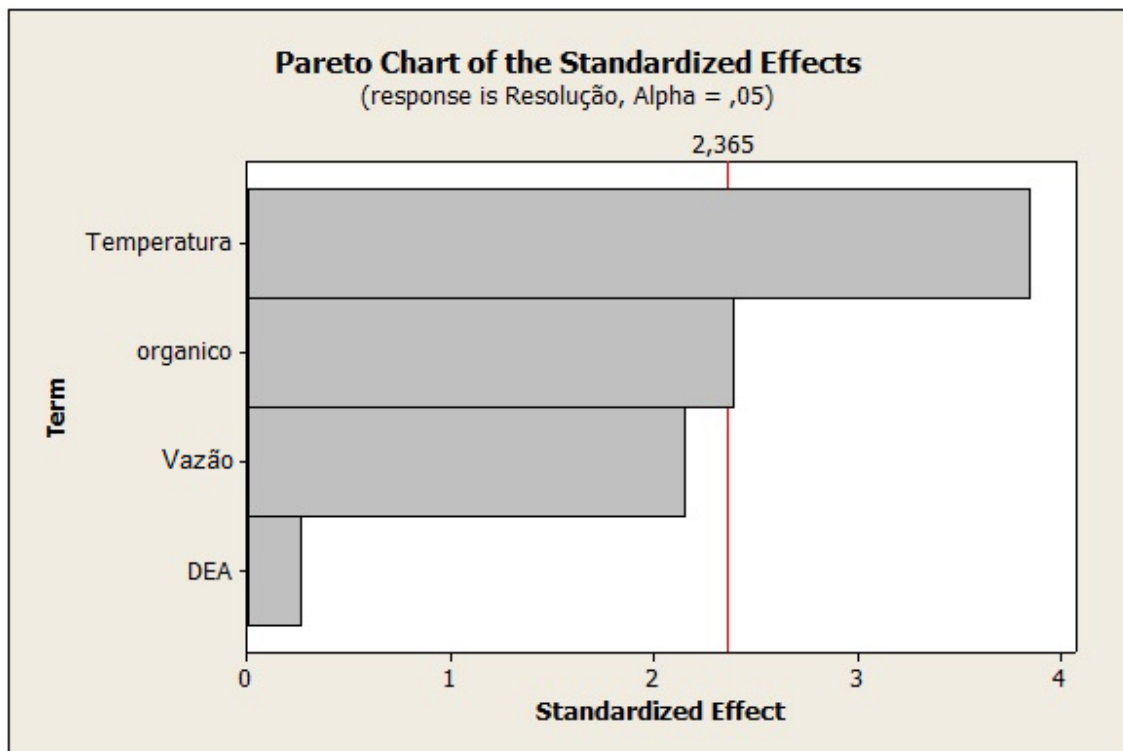


Figura 19. Efeitos das alterações sobre a resolução dos enantiômeros da duloxetina.

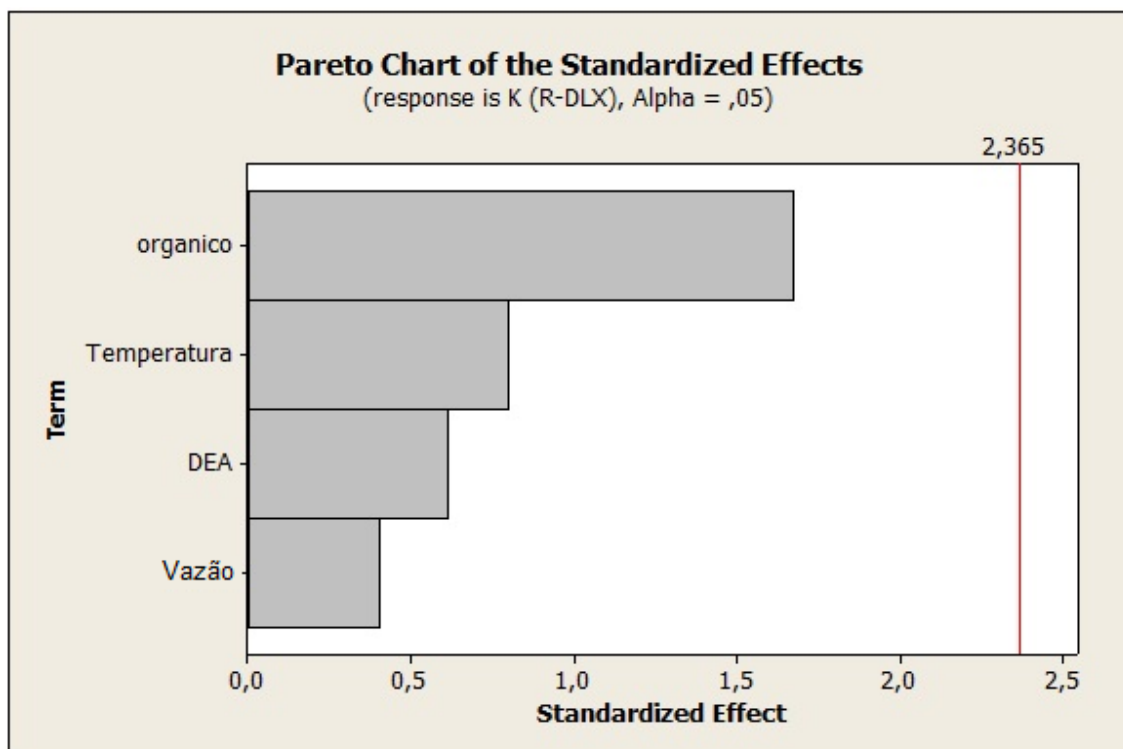


Figura 20. Efeitos das alterações sobre o fator de capacidade referente da *R*-duloxetina.

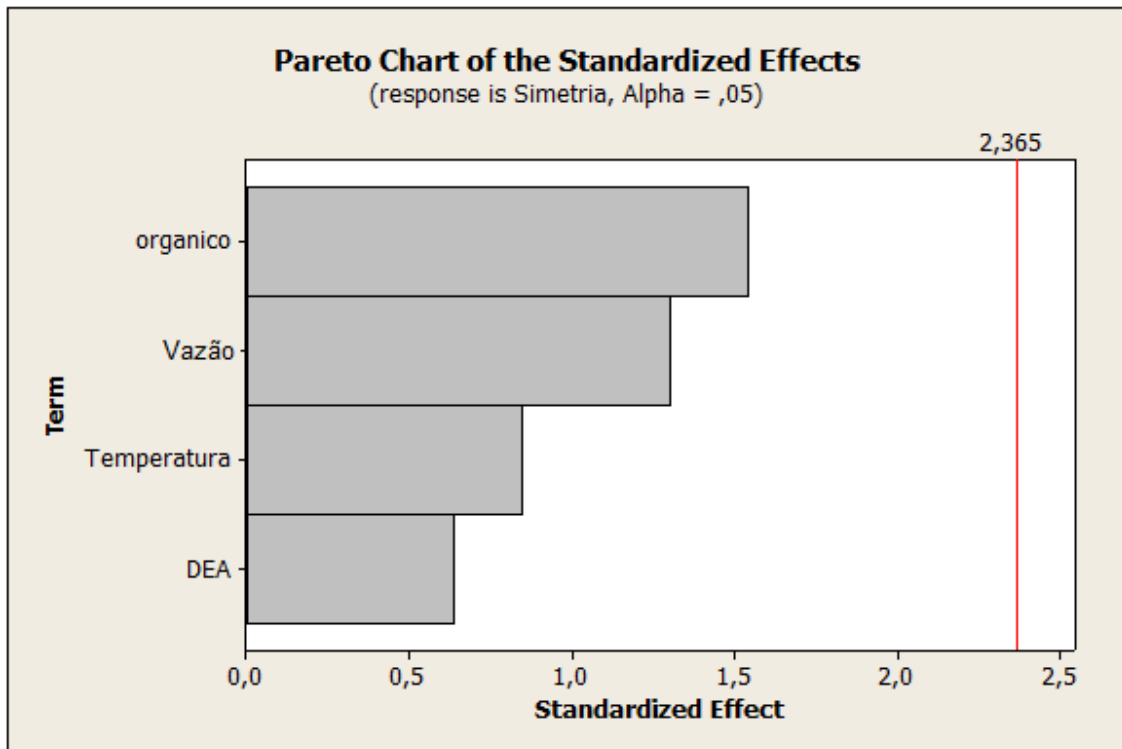


Figura 21. Efeitos das alterações sobre a simetria do pico da *R*-duloxetina.

Para a verificação do efeito da variação dos fatores, utilizou-se o *software* Minitab para cálculo dos efeitos e geração do gráfico de Pareto. Com os resultados obtidos pode-se observar que apenas a resolução foi afetada pela modificação da temperatura e concentração de solvente orgânico, no entanto, todos os valores de resolução obtidos foram superiores a 2,0, não se mostrando crítico para a análise em questão. Para os outros parâmetros avaliados nenhum efeito foi maior que o efeito crítico, em um nível de confiança de 95%, ou seja, o efeito entre os fatores não foi significativo.

5.1.8 Estabilidade das soluções por CLAE

Na Tabela 34 estão demonstrados os valores experimentais obtidos por CLAE de soluções de *S*-duloxetina, preparadas na concentração de 100 µg/mL, armazenadas a temperatura de 2 a 8 °C por 168 horas.

Tabela 34. Valores experimentais obtidos a partir de soluções de S-duloxetina SQR em 168 horas.

Tempo (h)	Área	Varição (%)
0	5541638	-
12	5529821	-0,21
24	5543147	0,03
168	5566213	0,44

Com base nos resultados obtidos pode-se constatar que a solução de SQR de S-duloxetina é considerada estável por pelo menos 168 horas quando em temperatura de 2 a 8 °C. Observou-se, também, um pequeno aumento na área quando injetada em 168 horas, relacionada provavelmente à evaporação do diluente.

Com base na avaliação dos resultados obtidos através dos parâmetros analíticos verificados no método por CLAE, pode-se afirmar que o método foi validado de maneira satisfatória e, portanto, é adequado para o controle de qualidade do medicamento em questão.

5.2 Resultados por EC

5.2.1 Desenvolvimento e otimização do método por EC

A EC oferece uma ampla seletividade em combinação com alta eficiência de separação, trabalhando com pequenos volumes de amostra e tempo de análise reduzido, sendo, portanto, uma técnica alternativa e complementar a CLAE, mas tendo como vantagens a geração de pequena quantidade de resíduos, bem como não requerer a utilização de grandes quantidades de solventes orgânicos (CLARKES, 2004). Diversos parâmetros devem ser considerados para otimização das separações por EC, tais como: seletor quiral, composição e pH do eletrólito, dimensões e temperatura do capilar, voltagem aplicada, modo e tempo de injeção (KWATERCZAC *et al.*, 2009).

As dimensões dos capilares mais utilizadas atualmente variam entre 25 e 100 cm de comprimento e entre 25 a 100 μm de diâmetro interno. Quanto à composição, os materiais mais comuns são: vidro tipo Pyrex, teflon e sílica fundida, cada um com suas vantagens respectivas. Os capilares de vidro tipo Pyrex são resistentes e não requerem revestimento externo para dissipar o calor, mas não são ópticamente transparentes para comprimentos de onda abaixo de 280 nm. Os capilares de teflon são ópticamente transparentes e são mais flexíveis, mas possuem uma baixa taxa de dissipação do calor quando submetidos a altas diferenças de potencial. Os de sílica fundida, em geral mais utilizados, são ópticamente transparentes, mas pouco resistentes e para aumentar sua resistência são comumente recobertos por uma fina camada de poliamida (BAKER, 1995).

Ao realizar a escolha do capilar deve se considerar o diâmetro interno do mesmo, pois quanto maior, mais calor será gerado e maior será a diferença de temperatura (e por tanto de FEO) entre o centro e as paredes do capilar e quanto maior o comprimento, maior será o tempo de análise. Como um dos propósitos do método é a praticidade, foi escolhido, por ser o material mais utilizado, um capilar de sílica fundida, tendo 40 cm efetivos e com diâmetro interno de 50 μm . Capilar este com especificações amplas o suficiente para ser utilizado por métodos eletroforéticos de rotina.

A composição do eletrólito é importante para ajuste dos parâmetros de retenção, seletividade e simetria dos picos em EC. Segundo Wingert e colaboradores (2011), no desenvolvimento de método aquiral para a avaliação da duloxetina, o tampão TRIS foi o que apresentou melhor *performance*. Chen e colaboradores (2010) também utilizaram tampão TRIS utilizando lactobionato de eritromicina como seletor quiral para análise dos enantiômeros da duloxetina e desta forma este tampão foi o inicialmente utilizado.

Avaliou-se o seletor quiral a ser utilizado para a resolução dos enantiômeros da duloxetina. Dos vários seletos quirais utilizados, as ciclodextrinas (CD) e seus derivados são, reconhecidamente, os mais

importantes. Estima-se que cerca de 80% das separações enantioméricas em CE são obtidas pelo uso de CDs (BONATO, 2005).

Os enantiômeros da duloxetina são aminas secundárias, com pKa de 9,6, tendo portanto um caráter básico. A separação enantiosseletiva de solutos básicos empregando CDs e seus derivados neutros é feita em meio ácido para que esses solutos possam apresentar carga positiva e migrar do ponto de injeção em direção ao detector (BONATO, 2005).

Das ciclodextrinas disponíveis, avaliou-se inicialmente a capacidade da β CD em separar os enantiômeros da duloxetina. Os resultados obtidos não foram satisfatórios, uma vez que em nenhuma das condições testadas foi possível a resolução dos compostos *R* e *S*-duloxetina. Na sequência, foram realizados diversos testes a fim de verificar o comportamento da HP β CD na separação quiral. As Figuras 22 a 26 apresentam a influência das diferentes condições testadas sobre a resolução dos enantiômeros da duloxetina.

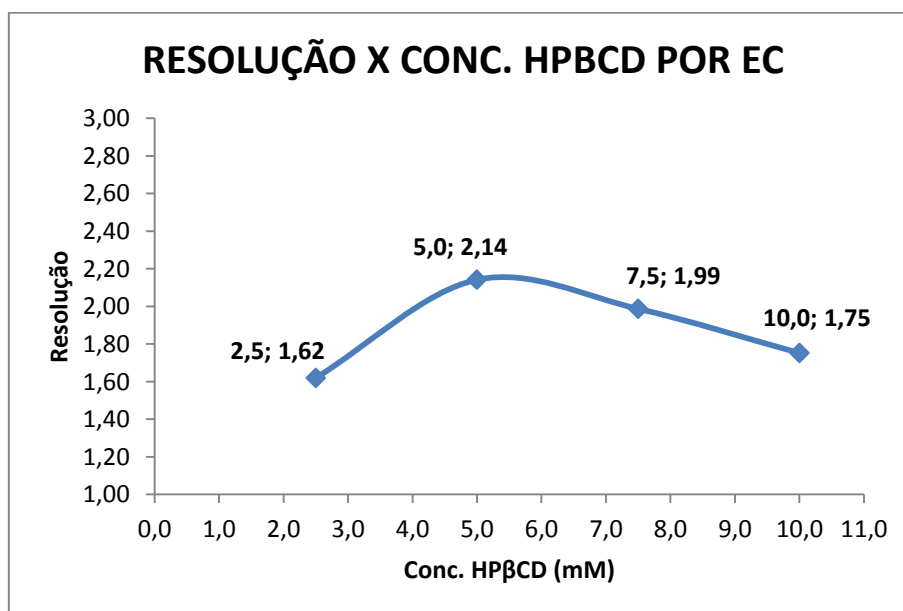


Figura 22. Efeito da concentração de HP β CD sobre a resolução dos enantiômeros da duloxetina (Condição: Tampão TRIS 50 mM, pH 2,5, Voltagem 20 kV, temperatura 25 °C).

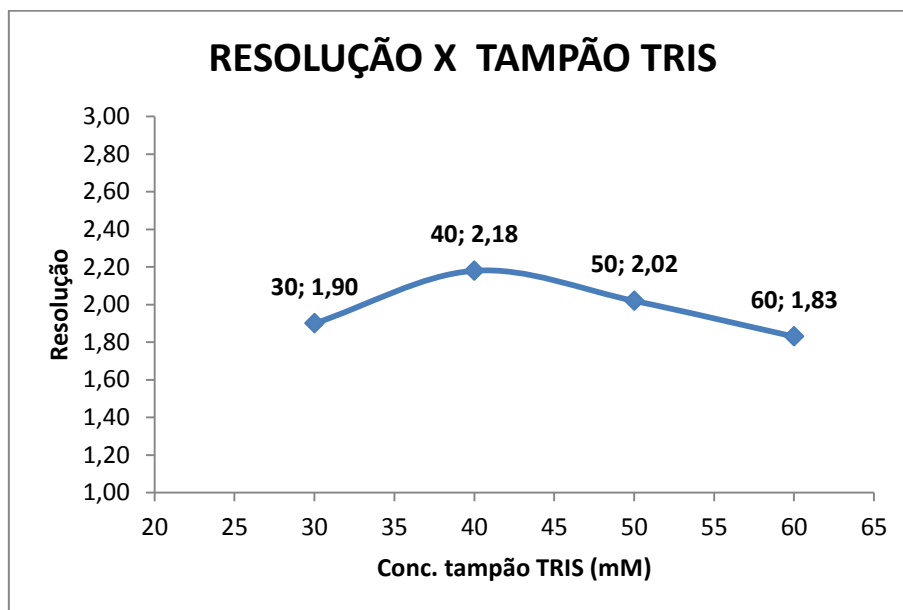


Figura 23. Efeito da concentração de tampão TRIS sobre a resolução dos enantiômeros da duloxetine (Condição: HP β CD 5 mM, pH 2,5, Voltagem 20 kV, temperatura 25 °C).

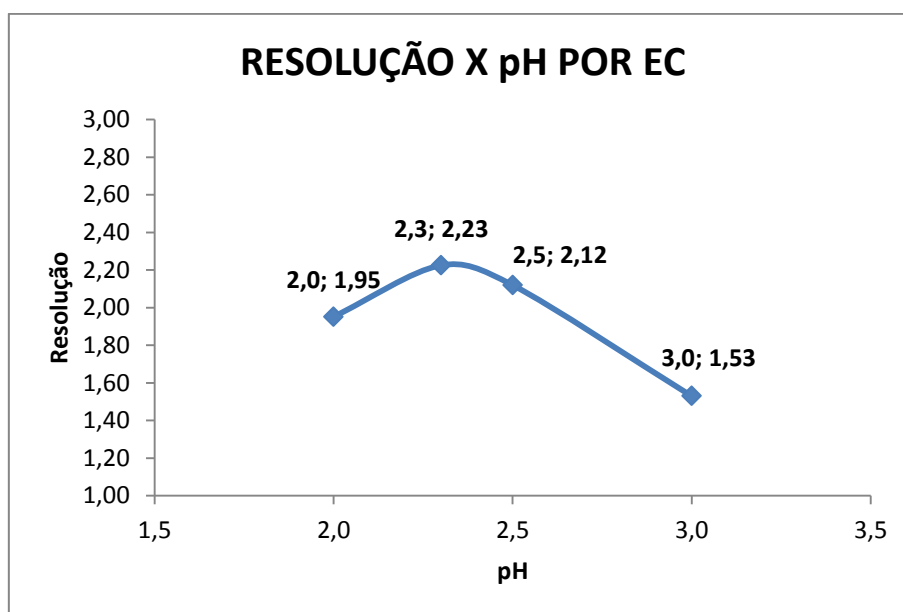


Figura 24. Efeito do pH sobre a resolução dos enantiômeros da duloxetine (Condição: TRIS 40 mM, HP β CD 5 mM, voltagem 20 kV, temperatura 25 °C).

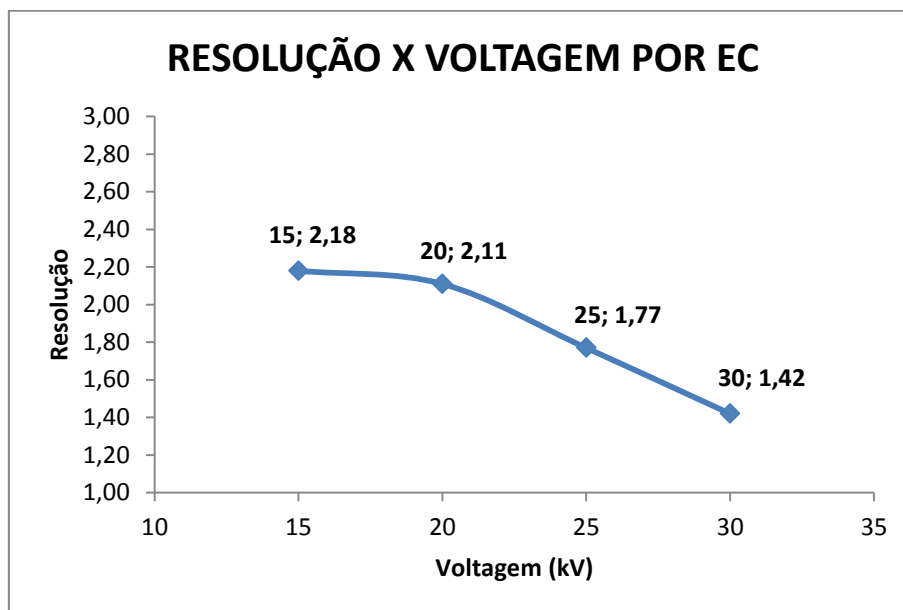


Figura 25. Efeito da voltagem aplicada sobre a resolução dos enantiômeros da duloxetina (Condição: TRIS 40 mM pH 2,5, HP β CD 5 mM, temperatura do 25 °C).

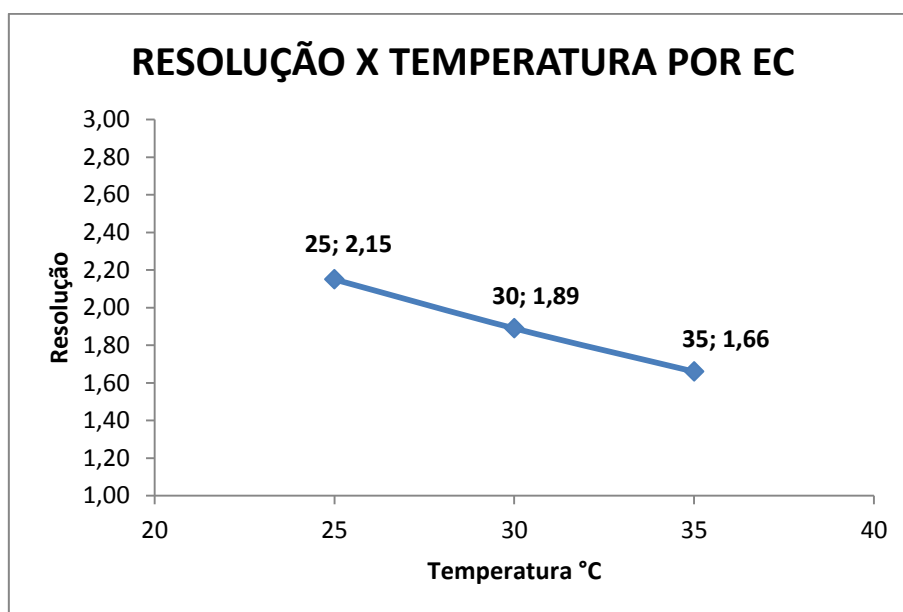


Figura 26. Efeito da temperatura do cassete sobre a resolução dos enantiômeros da duloxetina (Condição: TRIS 40 mM pH 2,5, HP β CD 5 mM, 25 °C, voltagem 20 kV).

De acordo com Liu e Nussbaum, 1999, o *screening* realizado com compostos básicos demonstrou a capacidade da HP β CD em separar diversos enantiômeros por EC. Os resultados obtidos experimentalmente corroboram a eficiência da HP β CD como seletor quiral para a avaliação dos enantiômeros da duloxetina. A avaliação da HP β CD demonstrou que a concentração ótima para a separação é 5 mM. Quanto ao tampão TRIS, a concentração de 40 mM foi a que apresentou melhores resultados. A partir do teste de pH, verificou-se que a melhor resolução foi alcançada quando em pH 2,3. No entanto, o pH de escolha foi o de 2,5 tendo em vista que a duloxetina é instável em pH inferior a 2,5 (WINGERT *et al.*, 2011).

Os efeitos da voltagem sobre o sistema eletroforéticos foram testados entre 15 e 30 kV e observou-se o menor tempo de migração associado à diminuição da migração com o aumento da voltagem. A voltagem escolhida foi a de 20 kV por apresentar boa separação associada a um tempo de retenção aceitável e corrente adequada. A influência da temperatura foi avaliada a 25, 30 e 35°C. A resolução enantiomérica e o tempo de migração aumentaram com a diminuição da temperatura, devido ao aumento da estabilidade dos complexos de inclusão formados entre a HP β CD e os enantiômeros da duloxetina. A temperatura que apresentou melhores resultados foi a de 25 °C.

Durante o desenvolvimento e otimização do sistema eletroforético testou-se o tempo de injeção da amostra. Soluções foram injetadas a 40 mbar durante 3 a 6 segundos. Os melhores valores de simetria e resolução foram obtidos com injeção de 3 segundos.

A utilização de padrão interno em métodos por EC é recomendada para que se aumente a precisão da injeção. Baseados nos resultados de Wingert e colaboradores (2011), que desenvolveram método aquiral para a avaliação da duloxetina, testou-se a utilização da cimetidina como padrão interno. Os resultados obtidos com esse composto foram satisfatórios, uma vez que ele apresentou absorvância apropriada no comprimento de onda selecionado e boa resolução com os demais analitos.

A condição final otimizada encontra-se detalhada no item 4.5. O eletroferograma representativo das condições finais definidas está demonstrado na Figura 27.

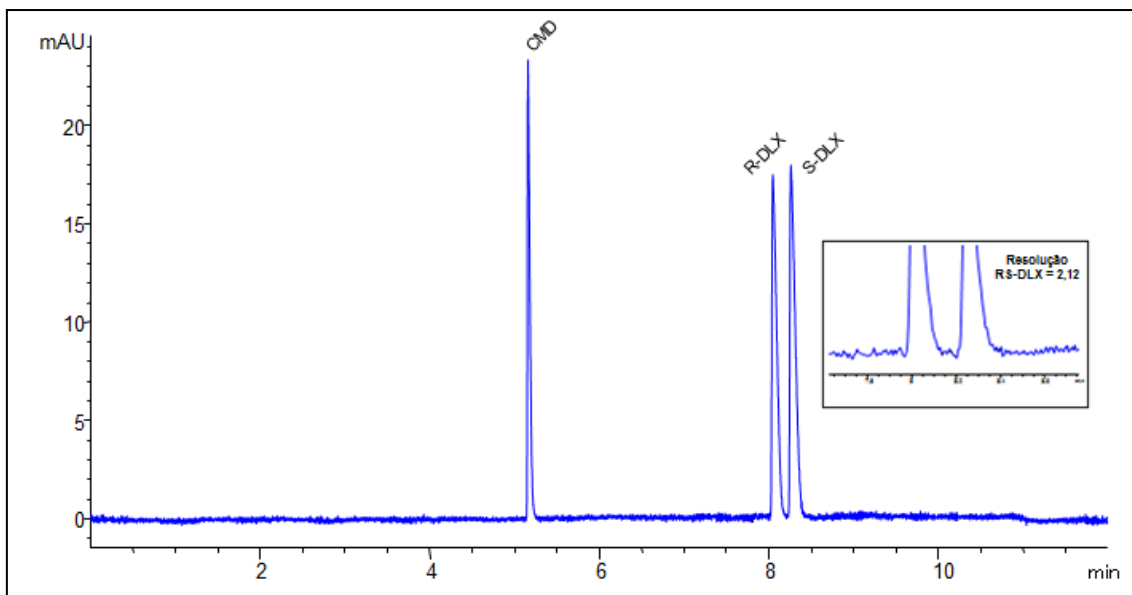


Figura 27. Eletroferograma nas condições otimizadas para análise dos enantiômeros da duloxetina (Tampão TRIS 40 mM pH 2,5, HP β CD 5mM, 20 kV e 25°C).

5.2.2 Especificidade por EC

A avaliação da especificidade do método analítico por EC foi realizada através da injeção do fármaco *S*-duloxetina, da impureza enantiomérica *R*-duloxetina e do produto de degradação majoritário 1-Naftol. Avaliou-se também amostra do produto Cymbalta[®], os excipientes simulados (placebo) juntamente com a solução diluente. A Figura 28 apresenta os eletroferogramas extraídos e sobrepostos da análise de especificidade.

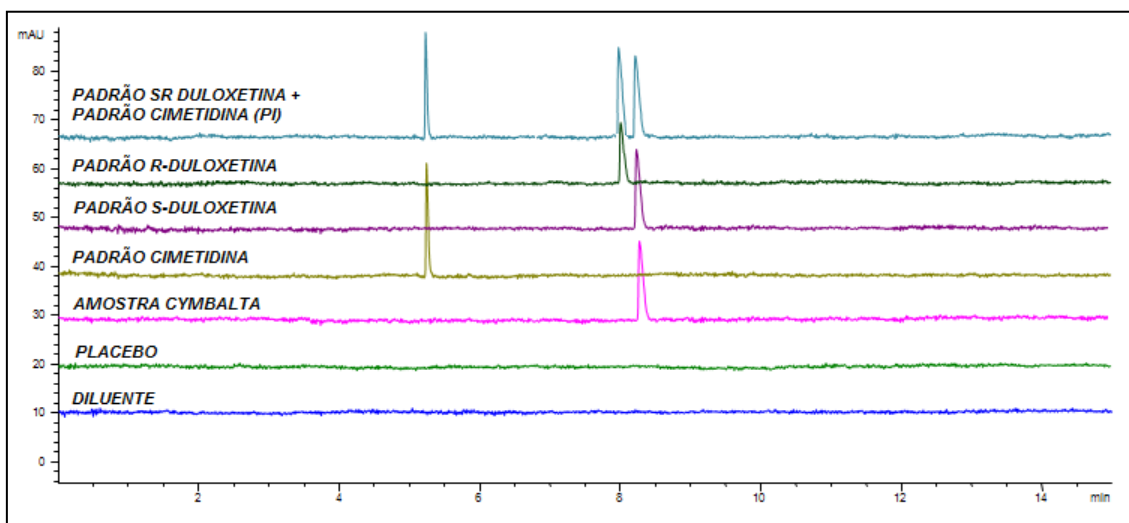


Figura 28. Eletroferogramas extraídos e sobrepostos da análise de especificidade por EC.

A partir dos resultados obtidos, pôde-se constatar a capacidade do método em separar os compostos estruturalmente semelhantes. A resolução entre os enantiômeros da duloxetina foi de 2,14. A análise do 1-naftol não foi demonstrada, pois o composto não apresentou resposta nas condições analisadas. Devido a sua característica ácida, no pH de 2,5 o 1-naftol se encontra protonado não apresentando mobilidade satisfatória. A mobilidade do analito é necessária para que ocorra a migração dos compostos quando se utiliza ciclodextrinas neutras (LIU e NUSSBAUM, 1998). Constatou-se também a não interferência do placebo e do diluente na análise, pois não se observou a presença de picos de absorção provenientes destas soluções nos tempos de retenção dos analitos de interesse.

Com o objetivo de certificar que o método é específico, foram observados os gráficos de pureza de cada pico, utilizando detector de arranjo de diodos, com cálculos realizados pelo software *ChemStation*. Todos os picos analisados apresentaram pureza de pico superior a 0,99, sem detecção de impureza, indicando a não contaminação dos picos eletroforéticos. A Figura 29 demonstra a pureza de pico dos enantiômeros da duloxetina e o espectro de absorção no UV oriundo da análise por PDA .

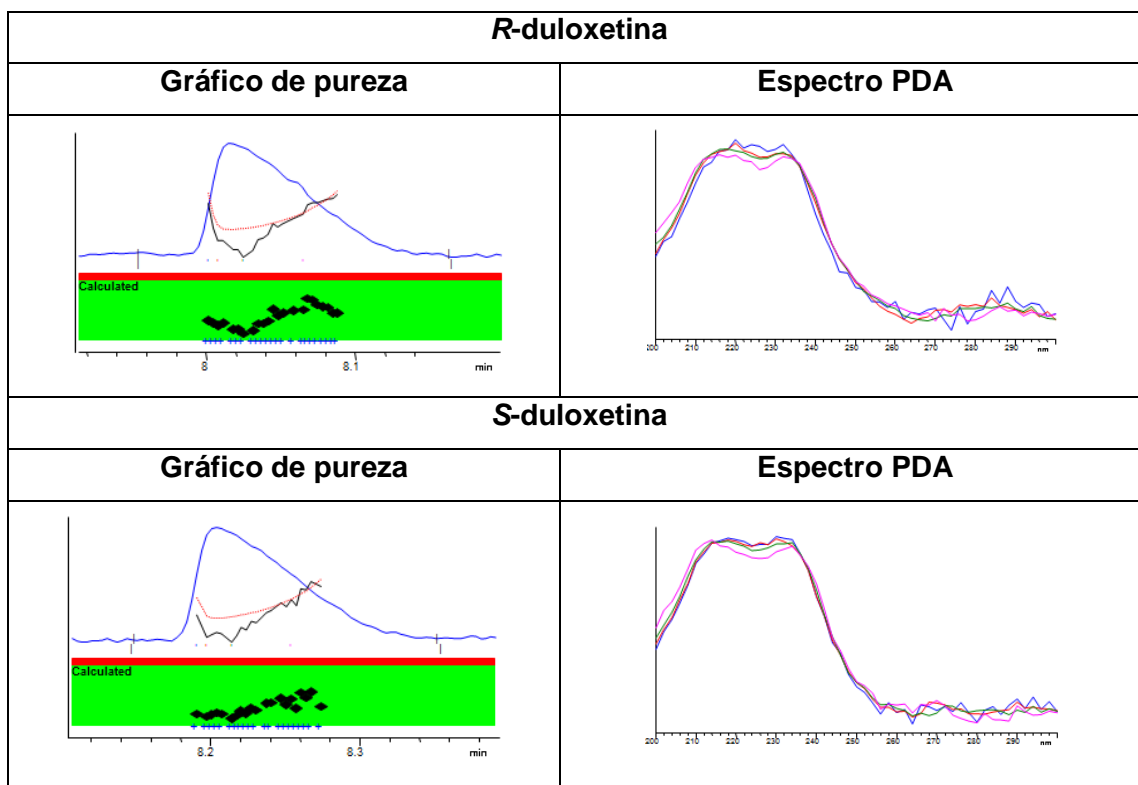


Figura 29. Gráfico de pureza e espectro UV dos picos referentes aos enantiômeros da duloxetina por EC.

5.2.3 Linearidade por EC

As Tabelas 35 e 36 apresentam às áreas correspondentes à média de cada concentração de S-duloxetina e R-duloxetina, dados estes utilizados para a confecção das curvas padrão dos compostos.

Tabela 35. Dados analíticos utilizados na curva de linearidade da S-duloxetina por EC.

Concentração (µg/mL)	Área Média PI	Área Média S-DLX	Razão	DPR (%)
50,00	44,43	30,17	0,69	0,81
80,00	46,43	53,43	1,15	0,73
90,00	45,57	58,20	1,28	0,25
100,00	45,00	64,33	1,43	0,03
110,00	45,13	70,83	1,57	0,95
120,00	44,67	76,17	1,70	0,97
150,00	45,90	98,77	2,15	0,95

Tabela 36. Dados analíticos utilizados na curva de linearidade da *R*-duloxetina por EC.

Concentração (µg/mL)	Área Média PI	Área Média R-DLX	Razão	DPR (%)
50,00	44,47	31,83	0,72	1,87
80,00	44,63	52,80	1,18	1,18
90,00	44,77	58,60	1,31	1,80
100,00	45,57	66,90	1,47	1,00
110,00	43,53	70,07	1,61	0,79
120,00	46,60	80,10	1,72	0,43
150,00	45,40	98,13	2,16	1,61

A representação gráfica das curvas obtidas para os enantiômeros da duloxetina encontram-se nas Figuras 30 e 31.

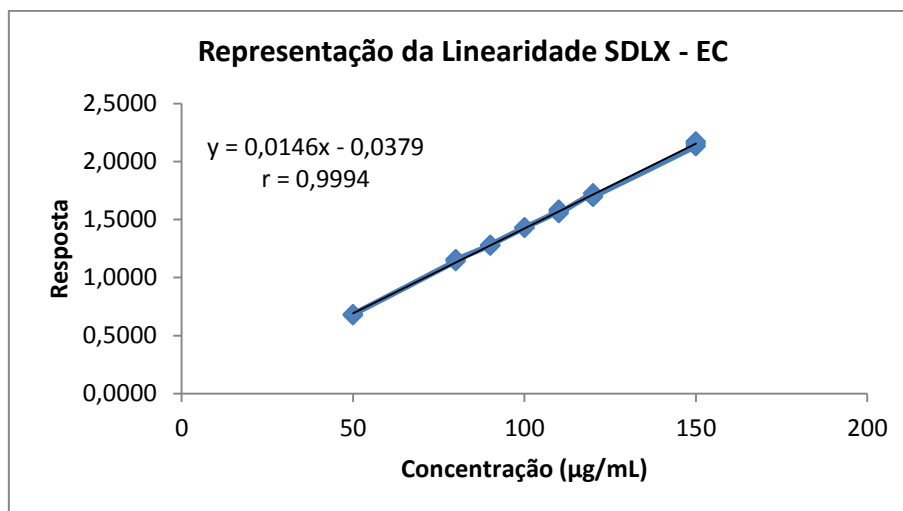


Figura 30. Representação gráfica da curva padrão de S-duloxetina por EC.

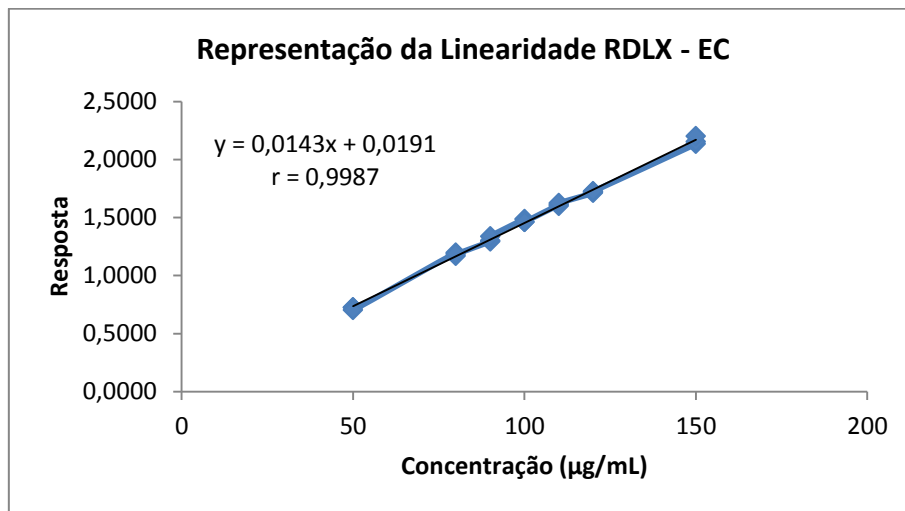


Figura 31. Representação gráfica da curva padrão de *R*-duloxetina por EC.

As representações gráficas dos resíduos obtidos com as curvas dos enantiômeros da duloxetina são apresentadas nas Figuras 32 e 33.

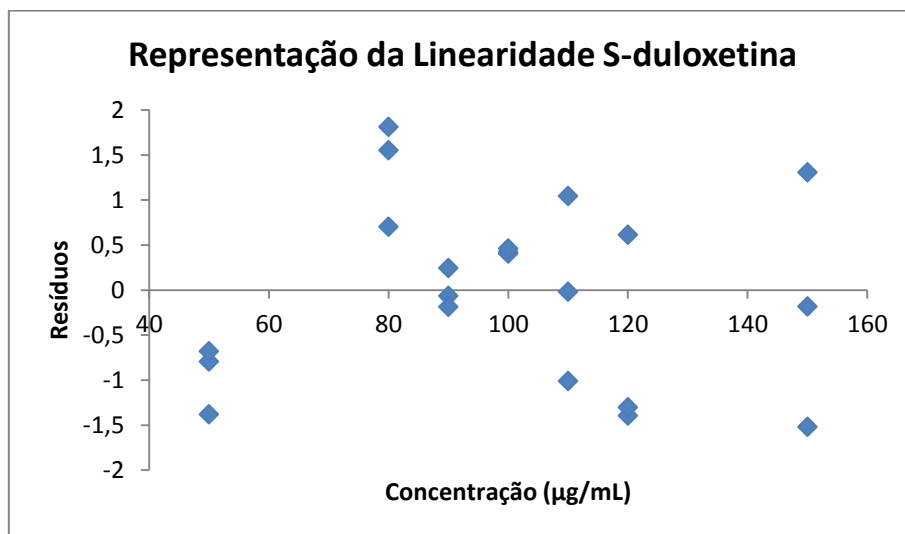


Figura 32. Resíduos padronizados provenientes da curva da *S*-duloxetina por EC.

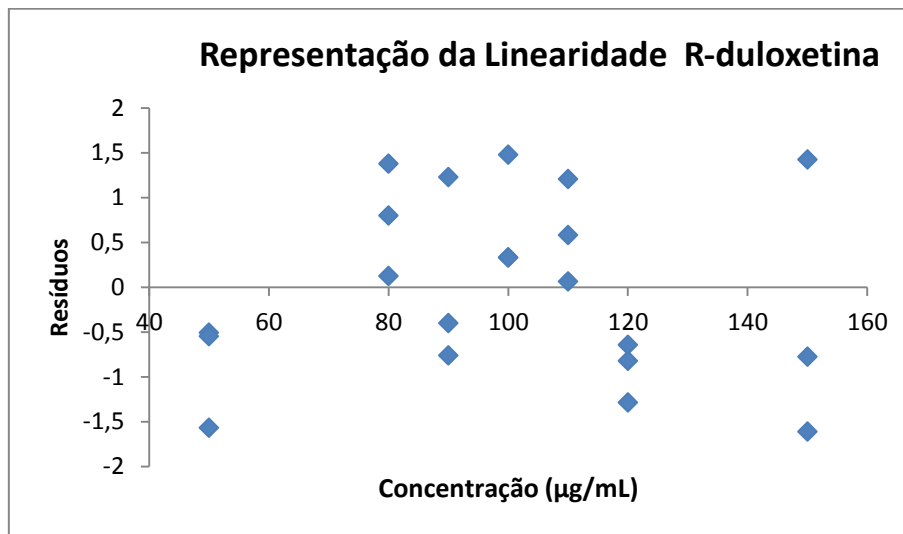


Figura 33. Resíduos padronizados provenientes da curva da *R*-duloxetina por EC.

A análise estatística através de ANOVA para verificar a linearidade do método por EC está demonstrada nas Tabelas 37 e 38.

Tabela 37. ANOVA das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão de *S*-duloxetina por EC.

Fontes de Variação	gl	SQ	Variância	Fcal
Entre doses	6	3,85	$6,41 \cdot 10^{-1}$	4370,9
Regressão linear	1	3,85	3,85	26210,66
Desvio linearidade	5	$2,17 \cdot 10^{-3}$	$4,34 \cdot 10^{-4}$	2,96
Dentro	14	$2,05 \cdot 10^{-3}$	$1,46 \cdot 10^{-4}$	
total	20	3,85		

Tabela 38. ANOVA das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão de *R*-duloxetina por EC.

Fontes de Variação	gl	SQ	Variância	Fcal
Entre doses	6	3,70	$6,17 \cdot 10^{-1}$	1674,09
Regressão linear	1	3,70	3,70	10031,70
Desvio linearidade	5	$4,74 \cdot 10^{-3}$	$9,48 \cdot 10^{-4}$	2,57
Dentro	14	$5,16 \cdot 10^{-3}$	$3,68 \cdot 10^{-4}$	
total	20	3,71		

Os resultados obtidos na análise da linearidade apresentaram-se satisfatórios para ambos os compostos. O coeficiente de correlação linear (r) obtido para *S*-duloxetina foi de 0,9994 e para a *R*-duloxetina de 0,9987, estando os dois, dentro do esperado. A análise de ANOVA efetuada demonstra regressão linear significativa para ambos os compostos, não havendo desvio da linearidade para um nível de significância de 5%. Os gráficos dos resíduos não apresentaram indicadores de variância não constante, pois se obtiveram resíduos homocedásticos e aleatoriamente distribuídos com ausência de amostras atípicas, comprovando a validade do método em relação à linearidade.

5.2.4 Limite de Quantificação e Detecção por EC

O LQ e o LD foram calculados para a impureza *R*-duloxetina baseados no desvio padrão do intercepto e na inclinação, a partir das curvas padrão da linearidade. A Tabela 39 apresenta os resultados de LQ e LD para a impureza *R*-duloxetina.

Tabela 39. Limite de detecção e quantificação para *R*-duloxetina por EC.

Composto	LD ($\mu\text{g/mL}$)	LQ ($\mu\text{g/mL}$)
<i>R</i> -duloxetina	4,37	13,24

Baseado nos limites obtidos avaliou-se a precisão do método no LQ a partir do preparo de padrão na concentração próxima ao LQ. Na Tabela 40 podem-se observar os resultados da precisão no LQ.

Tabela 40. Resultados da precisão no LQ para *R*-duloxetina por EC.

Injeção	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Área PI	Área R-DLX	Razão	DPR (%)
1	10,00	45,8	7,7	0,17	6,64
2		46,7	8,3	0,18	
3		43,2	7,4	0,17	
4		45,1	8,2	0,18	
5		47,5	8,7	0,18	
6		45,3	6,9	0,15	

A avaliação da precisão na concentração do LQ demonstram que o método é preciso no limite proposto, no entanto, o mesmo se mostrou pouco sensível para detectar a impureza *R*-duloxetina em baixas concentrações.

5.2.5 Precisão por EC

A precisão do método foi demonstrada pela repetibilidade (intradia) e precisão intermediária (interdia), sendo expresso pelo DPR de uma série de leituras. Os valores experimentais obtidos na avaliação da precisão intra e interdia para os enantiômeros da duloxetina estão demonstrados nas Tabelas 41 e 42.

Tabela 41. Valores experimentais referentes à determinação de *S*-duloxetina para avaliação da precisão por EC.

Amostras	Avaliação intradia		
	1° dia (%)	2° dia (%)	3° dia (%)
1	101,02	100,01	100,30
2	100,40	101,28	99,15
3	102,39	102,21	102,46
4	99,16	100,93	102,45
5	100,70	102,14	100,89
6	99,58	99,76	101,02
Média	100,54	101,06	101,05
DPR (%)	1,14	1,02	1,26
	Avaliação interdia		
Média (%)	100,88		
DPR (%)	1,10		

Tabela 42. Valores experimentais referentes à determinação de *R*-duloxetina para avaliação da precisão por EC.

Amostras	Avaliação intradia		
	1° dia (%)	2° dia (%)	3° dia (%)
1	101,02	100,01	100,30
2	100,40	101,28	99,15
3	102,39	102,21	102,46
4	99,16	100,93	102,45
5	100,70	102,14	100,89
6	99,58	99,76	101,18
Média	100,54	101,05	101,07
DPR (%)	2,67	1,38	1,10
	Avaliação interdia		
Média (%)		101,41	
DPR (%)		1,80	

A precisão do método para a determinação dos enantiômeros da duloxetina em cápsulas foi investigada através da repetibilidade e da precisão intermediária. Os valores percentuais médios encontrados no doseamento das amostras intra e interdias foram satisfatórios. Os baixos valores de DPR obtidos neste estudo caracterizam a precisão do método.

5.2.6 Exatidão por EC

As porcentagens de recuperação obtidas a partir do teste de exatidão para os enantiômeros da duloxetina, na avaliação da exatidão, estão apresentadas nas Tabelas 43 e 44.

Tabela 43. Resultados do teste de recuperação por EC para a determinação de S-duloxetina.

	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)		Recuperação (%)	Média (%)	DPR (%)
	Adicionada	Recuperada ¹			
Baixa	50	50,86	101,72		
Média	100	98,63	98,63	100,67	1,76
Alta	150	152,50	101,67		

1 – Cada valor representa a média de três determinações

Tabela 44. Resultados do teste de recuperação por EC para a determinação de R-duloxetina.

	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)		Recuperação (%)	Média (%)	DPR (%)
	Adicionada	Recuperada ¹			
Baixa	50	49,87	99,74		
Média	100	100,52	100,52	100,44	0,66
Alta	150	151,60	101,07		

1 – Cada valor representa a média de três determinações

A exatidão do método proposto foi determinada através do teste de recuperação dos enantiômero da duloxetina. O método desenvolvido demonstrou exatidão através dos resultados obtidos, exibindo porcentagem de recuperação média de 100,67% para o S-duloxetina e 100,44% para R-duloxetina.

5.2.7 Robustez por EC

Para avaliação da robustez, verificou-se o efeito das variações frente ao teor, e a resolução entre os enantiômeros, o fator de capacidade a simetria da R-duloxetina. Os resultados obtidos na determinação dos enantiômeros da duloxetina através de pequenas alterações nas condições cromatográficas estão demonstrados nas Figuras 34 a 37.

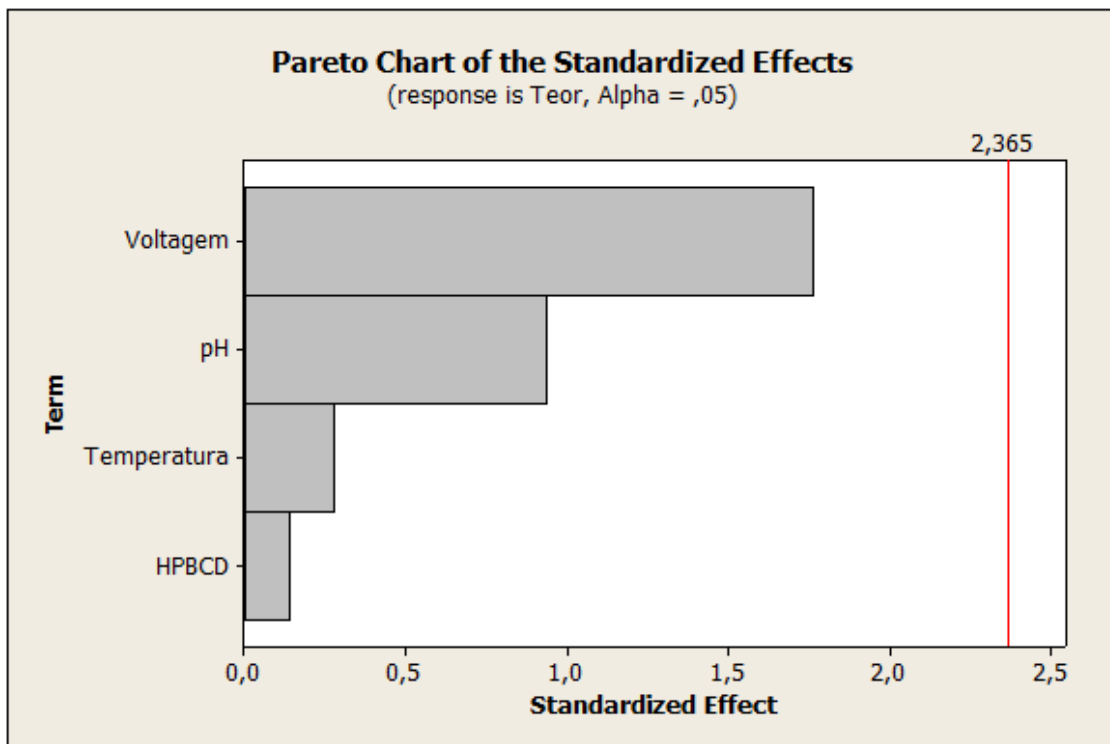


Figura 34. Efeitos das alterações sobre o teor.

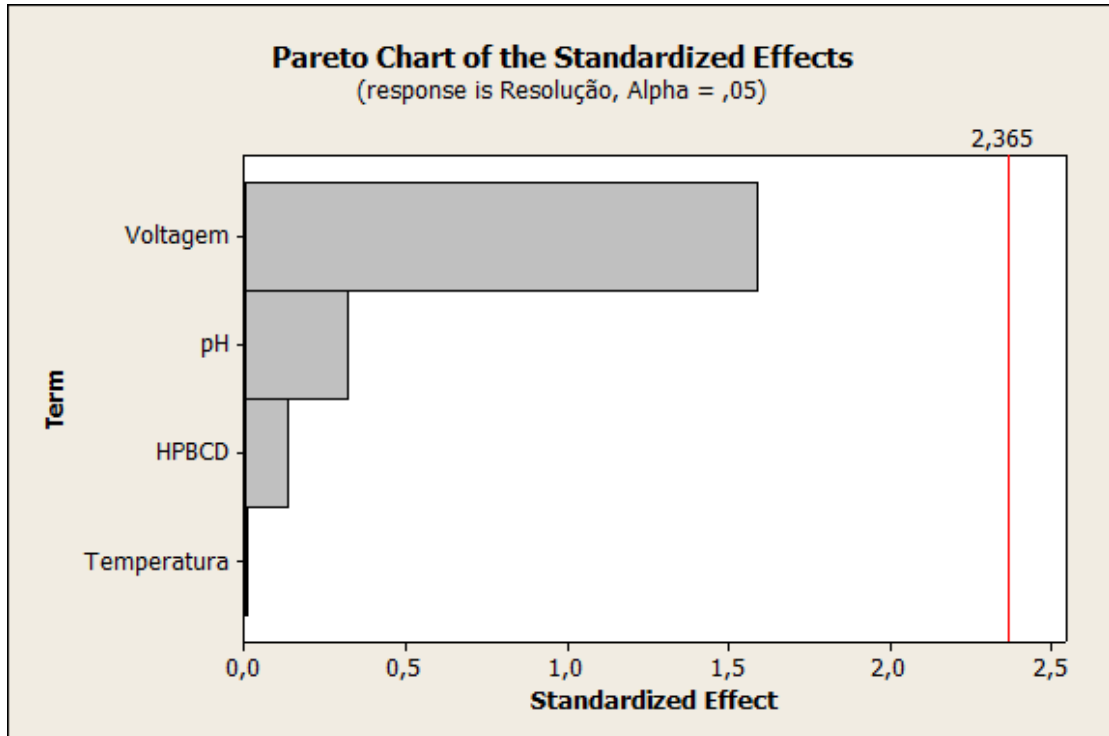


Figura 35. Efeitos das alterações sobre a resolução.

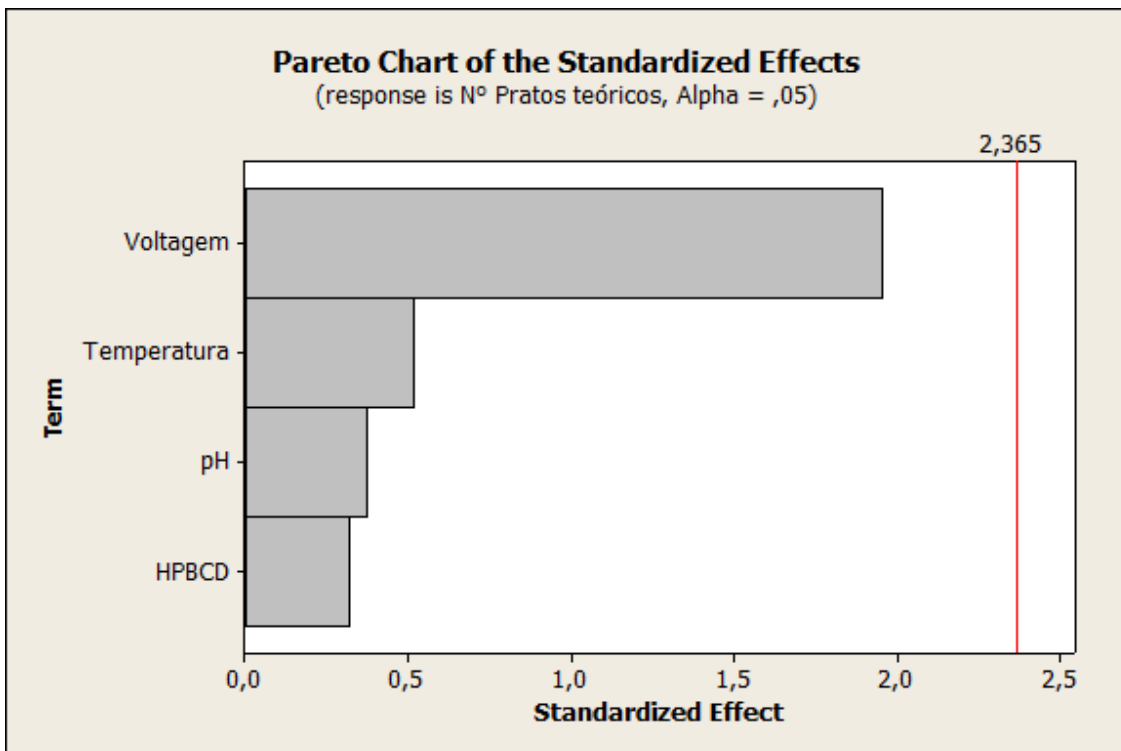


Figura 36. Efeitos das alterações sobre o número de pratos teóricos referentes à S-duloxetina.

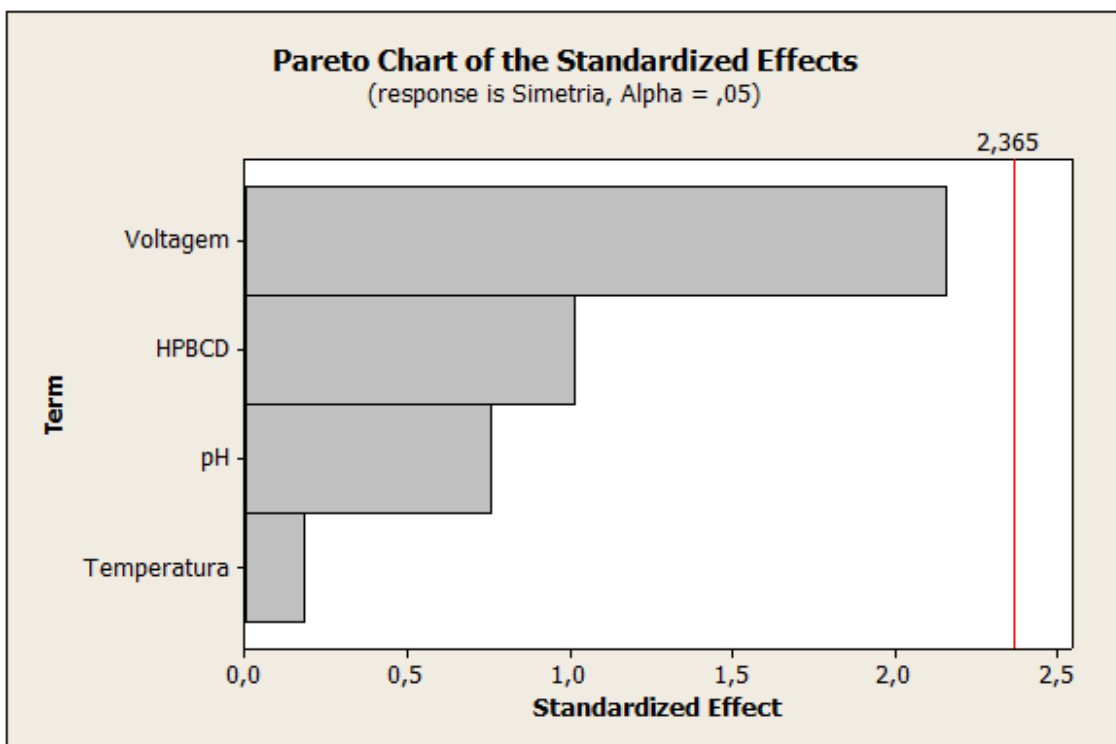


Figura 37. Efeitos das alterações sobre a simetria do pico da S-duloxetina.

Com os resultados obtidos, calculados pelo *software* Minitab, pode-se observar nenhum efeito foi maior que o efeito crítico, em um nível de confiança de 95%, ou seja, o efeito entre os fatores não foi significativo.

Com base na avaliação dos resultados obtidos através dos parâmetros analíticos verificados no método por EC, pode-se afirmar que o método foi validado de maneira satisfatória e, portanto, é adequado para o controle de qualidade do medicamento em questão.

5.2.8 Estabilidade das soluções por EC

Na Tabela 45 estão demonstrados os valores experimentais obtidos por EC de soluções de S-duloxetina, preparadas na concentração de 100 µg/mL, armazenadas a temperatura de 2 a 8 °C por 168 horas.

Tabela 45. Valores experimentais obtidos a partir de soluções de S-duloxetina SQR em 168 horas.

Tempo (h)	Área PI	Área S-DLX	Razão	Variação (%)
0	44,2	65,7	1,4864	-
12	45,5	67,2	1,4769	-0,64
24	44,1	65,8	1,4921	0,38
168	46,1	68,9	1,4946	0,55

Com base nos resultados obtidos pode-se constatar que a solução de SQR de S-duloxetina é considerada estável por pelo menos 168 horas quando em temperatura de 2 a 8 °C. Observou-se também um pequeno aumento na área quando injetada em 168 horas, relacionada provavelmente à evaporação do diluente.

5.3 Análise comparativa dos métodos analíticos

A análise de variância (ANOVA) foi o tratamento estatístico aplicado para a comparação entre os resultados obtidos pelos métodos analíticos validados neste trabalho. Para este teste foram utilizados os valores médios obtidos na precisão por CLAE e EC.

A Tabela 46 apresenta os resultados obtidos na determinação quantitativa de *S*-duloxetina em cápsulas de Cymbalta[®] pelos métodos analíticos validados neste trabalho.

Tabela 46. Resultados obtidos na determinação de *S*-duloxetina em cápsulas de Cymbalta[®] por CLAE e EC.

	CLAE	EC
Teor (%) ¹	100,38	100,88
DPR	0,93	1,10

1 – Média de dezoito determinações.

O tratamento estatístico dos valores obtidos pelos diferentes métodos quantitativos propostos está demonstrado na Tabela 47.

Tabela 47. ANOVA de valores obtidos na determinação de *S*-duloxetina em cápsulas de Cymbalta[®] por CLAE e EC.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F calc.	valor-P	F crítico
Entre	2,31	1	2,32	2,1963	0,1475	4,1300
Dentro	35,85	34	1,05			
Total	38,16	35				

O resultado da ANOVA demonstrou que não há diferença significativa entre os métodos desenvolvidos, em um nível de significância de 5%, conforme apresentado na Tabela 47. Estes resultados comprovam que os métodos desenvolvidos são intercambiáveis, sendo adequados para a determinação quantitativa de *S*-duloxetina na forma farmacêutica. Cabe ressaltar que não se comparou estatisticamente a determinação da impureza *R*-duloxetina, tendo em vista a grande diferença de sensibilidade apresentada pelos métodos validados.

O controle da impureza *R*-duloxetina, no produto farmacêutico Cymbalta[®] foi realizada por CLAE, conforme o apresentado na Tabela 48 e Figura 38.

Tabela 48. Resultados obtidos na determinação da impureza *R*-duloxetina em cápsulas de Cymbalta[®] por CLAE.

	Teor (%)	Média (%)	DPR
Amostra 1	0,0885		
Amostra 2	0,0856	0,0868	1,76
Amostra 3	0,0862		

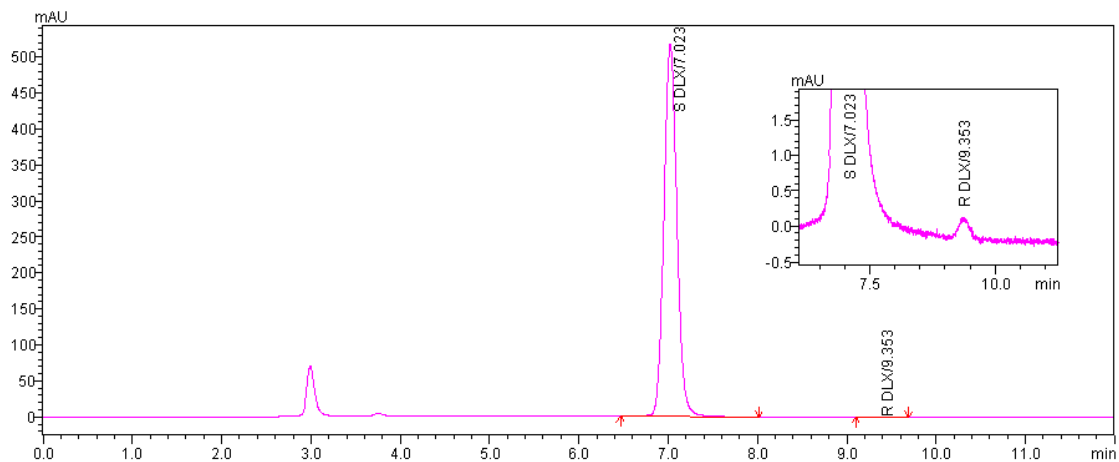


Figura 38. Cromatograma representativo obtido na determinação da impureza *R*-duloxetina em cápsulas de Cymbalta[®] por CLAE.

A partir dos resultados demonstrados na Tabela 48 e Figura 38 pode-se constatar a capacidade de o método desenvolvido por CLAE quantificar a impureza *R*-duloxetina, apresentando resultados dentro do limite de quantificação e com baixo DPR relacionado no que se refere à impureza *R*-duloxetina.

6. CONCLUSÕES

- O método desenvolvido por CLAE, utilizando fase estacionária quiral de celulose demonstrou especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez para a quantificação da *S*-duloxetina e de sua impureza enantiomérica *R*-duloxetina;
- O método desenvolvido por EC, utilizando HP β CD como seletor quiral demonstrou especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez para a quantificação da *S*-duloxetina e de sua impureza enantiomérica *R*-duloxetina;
- No que se refere a tempo de análise, os métodos propostos apresentaram-se semelhantes, com tempo de corrida de 15 minutos.
- O método por EC mostrou-se menos sensível para a determinação da impureza *R*-duloxetina, tendo em vista o alto limite de quantificação apresentado;
- A EC mostrou-se como uma técnica extremamente versátil e mais econômica quando comparada com CLAE. Isto se deve a simplicidade instrumental, a utilização de seletores quirais menos dispendiosos e ao baixo consumo de reagentes;
- A análise comparativa entre os métodos propostos para a determinação quantitativa da *S*-duloxetina em cápsulas contendo *pellets* de duloxetina demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa entre eles, sendo caracterizada a intercambialidade dos mesmos para a quantificação da *S*-duloxetina.

7. REFERÊNCIAS

ABOUL-ENEIN, H.Y.; BASHA, L.I.A. Chirality and drug hazards. In: ABOUL-ENEIN, H.Y.; WAINER. eds. **The impact of stereochemistry on drug development and use**. New York: John Wiley. v. 142, p. 1-19, 1997.

ABOUL-ENEIN, H. Y.; ALI, I. **Chiral separations by liquid chromatography and related Technologies**. New York: Marcel Dekker, 2003.

AGRANAT, I.; CANER, H. Intellectual property and chirality of drugs. **Drug discovery Thecnologies**, v. 4, n. 7, p. 313-321, 1999.

BAILEY, J. Chirality and the origin of life. **Acta Astronautica**, v.46, n.10, p.627-631, 2000.

BAKER, R D. **Capillary electrophoresis**.1 ed. New York: John Wiley & Sons, Inc. 1995.

BARREIRO, E.J.; FERREIRA, V.F.; COSTA, P.R.R. Substâncias enantiomericamente puras (SEP): a questão dos fármacos quirais. **Química Nova**, v.20, n.6, 1997.

BLANCO, M.; VALVERDE, I. Choice of chiral selector for enantioseparation by capillary electrophoresis. **Trends Analytical Chemistry**, v.22, p. 428-439, 2003.

BONATO, S.P.; JABOR, V.A.P.J; GAITANI, C.M. Enantioselective analysis of drugs: contributions of high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. **Química Nova**, vol.28, n.4, p. 683-691, 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n.899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n.15, de 01 de março de 2007. Determina a lista de medicamentos controlados. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2007.

BRITO, M.A.F.O.; NASCIMENTO, C.S.; SANTOS, H.F. Análise estrutural de ciclodextrinas. Um estudo comparativo entre métodos teóricos clássicos e quânticos. **Química nova**, v.27, p. 882-888, 2004.

BYMASTER, F.P.; BEEDLE, E.E.; FINDLAY J.; GALLAGHER, P.T.; KRUSHINSKI, J.H.; MITCHELL, S.; ROBERTSON, D.C.; THOMPSON, D.C.; WALLACEB, L.; WONGA, D.T. Duloxetine (Cymbalta™), a Dual Inhibitor of Serotonin and Norepinephrine Reuptake. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.13, p. 4477–4480, 2003.

CANADA. Health Canada. Guidance for industry: Stereochemical issues in chiral drug development. 1998. Disponível em: http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/alt_formats/hpfb-dgpsa/pdf/prodpharma/stereo-eng.pdf. Acesso em: 01/12/2011.

CANER, H.; GRONER, E.; LEVY, L. Trends in the development of chiral drugs. **Drug Discovery Today**, v.9, n.3, p. 105-110, 2004.

CHEN, B.; DU, Y.X.; WANG, H. Study on enantiomeric separation of basic drugs by NACE in methanol-based medium using erythromycin lactobionate as a chiral selector. **Electrophoresis**, v.31, p. 371-377, 2010.

CLARKES. **Analysis of Drugs and Poisons in Pharmaceuticals Body fluids and Postmortemateria**, 3ª ed. Volume 1. Londres, p. 500-534, 2004.

DAVANDRA, P.M.; PATEL, S.J.; JAIN, M.R.; PATEL, P.R.; JOSHI, H.S.; BAPODRA, A.H. A validated chiral RP-HPLC method for the enantiomeric separation of duloxetine hydrochloride using chiral-AGP as the stationary phase. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.34, p. 1699-1711, 2011.

DEJAEGHER, B.; VANDER HEYDEN, Y. Ruggedness and robustness testing. **Journal of Chromatography, A**, v.1158, p138-157, 2007.

DRUGS INFORMATION ON LINE. Top 200 Drugs for 2010 by Sales. Disponível em: <http://www.drugs.com/top200.html> Acesso em: 05/03/2012.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Committee for Medicinal Products for Human Use. **Investigation of Chiral Active Substances**. 1993. Disponível

em: <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/qwp/3cc29aen.pdf>. Acesso em: 01/12/2011.

EMA. European Medicines Agency. **Scientific discussion**. 2005. Disponível em: www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Scientific_Discussion/human/000572/WC500036776.pdf. Acesso em: 22/01/2012.

GAITANI, C. M.; MARTINEZ, A. S.; BONATO, P. S.; Study on thioridazine 5-sulfoxide epimerization and degradation by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v.24, p.2723-2730, 2003.

FANALI, S. Enantioselective determination by capillary electrophoresis with cyclodextrins as chiral selectors. **Journal of Chromatography A**, v.875, n.1, p. 89-122, 2000.

HIRCHFELD, R. M. History and evolution of monoamine hypothesis of depression. **Journal Clinical Psychiatry**, n.61, p.4-6, 2000.

HOLZGRABE, U.; BRINZ, D.; KOPEC, S.; WEBER, C.; BITAR, Y. Why not using capillary electrophoresis in drug analysis? **Electrophoresis**, v.27, n.12, p.2283-2292, 2006.

HEBER, L. A primer good laboratory practice and current good manufacturing practice. Waldbronn: **Agilent Technologies**, 2002.

HUTT, A. J.; VALENTOVÁ, J. The chiral switch: the development of single enantiomer drugs from racemates. **Acta Facultatis Pharmaceuticae. Univ. Comeniana** Tomus L. p. 7-23, 2003.

ICH - Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products, Q6A, In: International Conference on Harmonization, 1999.

KIBBE, A. H. (Ed.) **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. Washington: American Pharmaceutical Association, 2000.

KWATERCZAK, A.; DUSZCZYK, K.; BIELEJEWSKA, B. Comparison of chiral electrophoresis and liquid chromatography using neutral and negatively charged cyclodextrin. **Analytica Chimica Acta**, v. 645, p. 98-104, 2009.

LIN, G.Q.; YOU, Q.D.; CHENG, J.F. **Chiral Drugs, Chemistry and Biological Action**. New York: John Wiley, p. 1-25, 2011

LIU, L.; NUSSBAUM, A. Systematic screening approach for chiral separations of basic compounds by capillary electrophoresis with modified cyclodextrins. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 19, p. 679-694, 1999.

LOURENÇO, T.C., CASSIANO, N.M., CASS, Q. B. Fases estacionárias quirais para cromatografia líquida de alta eficiência. **Química nova**, v.33, p. 4363-4372, 2010.

MAIER, N.M.; FRANCO, P.; LINDNER, W. Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives. **Journal of Chromatography Analysis**, v. 906. p. 3-33. 2001.

MASON, J.P.; HUTT, A.J. Stereochemical aspects of drug metabolism. In: ABOUL-ENEIN, H.Y.; WAINER., eds. **The impact of stereochemistry on drug development and use**. New York: John Wiley, v. 142, p. 45-105, 1997.

MOSS, G.P. Basic terminology of stereochemistry (IUPAC Recommendations). **Pure and Applied Chemistry**, v.68, n.12, p.2193-2222, 1996.

NISH, H. Enantiomer separation of drugs by electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.735, n.1, p. 57-76, 1996.

RANE, V.P.; SHINDE, D.B. Development and validation of chiral LC method for the enantiomeric separation of duloxetine on amylose based stationary phase. **Journal of Chromatography Science**. v.46, p.772-776, 2008.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; CAROL H. COLLINS; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, p.771-780, 2004.

RIBEIRO, A.L.R.; FERREIRA, M.M.C.; MORANO, S.C.; SILVA, L.R.; SCHNEIDER, R.P. Planilha de validação: Uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos. **Química Nova**, v.31, p.164-167, 2008.

RUDAZ, S.; CALLERI, E.; GEISER, E.; CHERKAOUI, S.; PRAT, J.; VEUTHEY. Infinite enantiomeric resolution of basic compounds using highly sulfated cyclodextrin as chiral selector in capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v.24, p. 2633-2641, 2003.

SANTORO, M.I.R.M. Cromatografia líquida em fase quiral: novos rumos no controle de qualidade de medicamentos. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v.28, p.1-29, 1992.

SANTORO, M. I. R. M.; SINGH, A. K. Development and regulation of chiral drug substances: an overview on worldwide pharmaceutical guidelines. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 259-268, 2001.

SHIN-ETSU, AQUOAT[®]. **Hypromellose acetate succinate**. Disponível em: <http://www.metolose.jp/e/pharmaceutical/aqoat.shtml>. Acesso em: 15/10/2011.

SINGH, A.K.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M.; SANTORO, M.I.R.M. Development and validation of a chiral liquid chromatographic method for the determination of atenolol and metoprolol enantiomers in tablet preparations. **Journal of AOAC International**, v.84, p.1724-1729, 2001.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L.; KERN, J.; KIRKLAND, K. Chiral separations. **Practical HPLC method development**, 2 ed. New York. John Wiley, 1997.

SOLOMONS, T.W.G. **Química orgânica**, 6.ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1996.

SONI, P.; BANERJEE, U.C. Biotransformations for the production of chiral drug (S)-Duloxetine catalyzed by a novel isolate of *Candida tropicalis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.67, p.771-777, 2005.

SRINIVAS, N. R.; BARBHAIYA, R.H.; MIDHA, K.K. Enantiomeric drug development issues: issues, considerations and regulatory requirements. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.90, n.9, p.1205-1215, 2001.

STAHL, S.M. The psychopharmacology of painful physical symptoms in depression. **Journal Clinical Psychiatry**, V.60, n.5, p.382-383, 2002.

STRONG, M. FDA policy and regulation of stereoisomers: paradigm shift and the future of safer, more effective drugs. **Food and Drug Law Journal**, v.54, n.3, p.463-487, 1999.

THALL, E. When drug molecules look in the mirror. **Journal of Chemical Education**, v.73, n.6, p. 481, 1996.

TUCKER, G.T.; Chiral switches. **The Lancet**. v. 355, p.1085-1087, 2000.

THOMPSON, R. A practical guide to HPLC enantioseparations for pharmaceutical compounds. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.28, n.7, p.1215-1231, 2005.

TRAFF, A.; LIHAMMAR, R.; BACKVALL, J. A chemoenzymatic dynamic Kinect resolution approach to enantiomerically pure (R)- and (S)-Duloxetine. **The Journal of Organic Chemistry**. v. 76, p. 3917-3921, 2011.

UNITED STATES. Food and Drug Administration. Department of Health and Human service. Center for Drug Evaluation and Research. FDA's Policy Statement for the development of New Stereoisomeric Drugs. 1992. Disponível em:

<http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidance/ucm122883.htm>. Acesso em: 01/12/2011.

WARD, T.J.; BAKER, B.A.. Chiral separations. **Analytical Chemistry**, v. 80, p. 4363-4372, 2008.

WECKER, L.; CATALANO, G. Tratamento dos transtornos afetivos. In: MINNEMAN, K. P. (Ed.); WECKER, L. (Ed.); LARNER, J. BRODY, T.M. **Brody: Farmacologia Humana**, 4. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

WINGERT, A.R.; BARTH, A.B.; GOMES, P.; SHAPOVAL, E.S.; STEPPE, M. Quantitative analysis of duloxetine and 1 naphthol by capillary micellar electrokinetic chromatography. **Current Analytical Chemistry**. v. 7, p. 184-193, 2011.

WONG, D.T.; ROBERTSON D.W.; BYMASTER, F.P.; KRUSHINSKI, J.H.; REID, L.R. LY227942, an inhibitor of serotonin and norepinephrine uptake:

biochemical pharmacology of a potential antidepressant drug. **Life Science**, v.43, p.2049–57, 1988.

YANG, J.; LU, X.; BI, Y.; LI, F. Chiral Separation of Duloxetine and Its R-Enantiomer by LC. **Chromatographia**, v. 66, p. 389-393, 2007.

ZHANG, Y.; WU, D.R.; WANG-IVERSON, D.B.; TYMIAK, A.A. Enantioselective chromatography in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v.10, n.8, p. 571-577, 2005.

ZHU, F.X.; DU, Y.X.; CHEN, J.Q.; YU, T.; ZHOU, Y.; CHEN, W.L.; SUN, H.S.; DU, F. Enantioseparation of Duloxetine Hydrochloride by Capillary Electrophoresis with Glycogen as Chiral Selector and Its Separation Mechanism. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**. v.37, p. 915-918, 2009.