

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

Determinação de pureza de fármacos por meio de
métodos diretos e indiretos: vantagens e desvantagens

CÉSAR ALEXANDRE JUNQUEIRA

PORTO ALEGRE, 2012

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

Determinação de pureza de fármacos por meio de métodos diretos e indiretos: vantagens e desvantagens

Dissertação apresentada por **César Alexandre Junqueira** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich

PORTO ALEGRE, 2012

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 26.03.2012, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr.: Andreas Sebastian Loureiro Mendez

Universidade: Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA

Prof. Dr.: Renata Pereira Limberger

Universidade: Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Prof. Dr.: Simone Cristina Baggio Gnoatto

Universidade: Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

CIP - Catalogação na Publicação

Junqueira, César Alexandre

Determinação de pureza de fármacos por meio de métodos diretos e indiretos: vantagens e desvantagens / César Alexandre Junqueira. -- 2012. 126 f.

Orientador: Pedro Eduardo Fröhlich.

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. Controle de qualidade. 2. Fármacos. 3. Impurezas. 4. Balanço de massas. 5. CAD. I. Fröhlich, Pedro Eduardo, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich agradeço pela orientação, paciência, amizade, dedicação, incentivo e pelo exemplo de pessoa e de profissional.

À Prof. Dr^a Ana Maria Bergold pelo incentivo, amizade e exemplo de conduta profissional e de figura humana.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Aos amigos, colegas e funcionários da Faculdade de Farmácia pelo convívio e amizade.

Aos amigos Leonardo Zanchetti Meneghini e Ana Paula Cappra Silva, pelo apoio e contribuição para o trabalho.

À minha família, pelo amor, carinho e apoio, fundamentais durante esse período e sempre.

À CAPES, pelo financiamento da bolsa de estudos.

RESUMO

Determinação de pureza de fármacos por meio de métodos diretos e indiretos: vantagens e desvantagens

Pureza é um dos principais atributos de qualidade de matérias-primas farmacêuticas, já que a identificação e determinação quantitativa de impurezas podem ajudar a controlar/minimizar o risco de efeitos adversos de medicamentos. O papel dos métodos de doseamento, tanto específicos como não específicos, em caracterizar a qualidade de matérias-primas farmacêuticas, tem sido questionado. Por outro lado, a abordagem do balanço de massas, que quantifica cada impureza orgânica bem como substâncias voláteis e cinzas, e então subtrai a soma destas impurezas de 100%, pode oferecer uma melhor maneira de determinar com exatidão se o fármaco atende aos critérios regulatórios de aceitação e de detectar com confiança mudanças não esperadas na qualidade do fármaco. O objetivo do estudo foi comparar métodos de doseamento compendiais com essa abordagem de balanço de massas na determinação do conteúdo de substância ativa e caracterização da qualidade de matérias-primas farmacêuticas. Os fármacos empregados neste estudo foram o nifedipino, o diazepam, a glibenclamida e a estavudina. A identificação e caracterização dos fármacos foram realizadas por meio de determinação do ponto de fusão e espectroscopia no infravermelho. Para a determinação quantitativa foram empregados os métodos presentes na Farmacopéia Brasileira, United States Pharmacopeia e British Pharmacopeia. O detector de aerossol carregado (CAD) foi acoplado ao sistema de cromatografia à líquido de alta eficiência para comparação das respostas com o detector ultravioleta. Os resultados demonstraram a viabilidade do método indireto, que oferece dados mais precisos que os do método direto, além de favorecer um controle de qualidade mais focado no perfil de impurezas.

Palavras-chave: impurezas, métodos de doseamento, balanço de massas

ABSTRACT

Quantification of drugs by means of direct and indirect methods: advantages and disadvantages

Purity is one of the main attributes of quality of bulk drug materials, since the identification and quantitative determination of impurities can help to avoid or at least control/minimize the risk of their contribution to the side effects profile of drug materials. The role of assay methods, either specific or non-specific, in characterizing the quality of bulk drug materials, has been questioned. On the other hand, the mass balance approach, which quantifies every organic impurity as well as volatile substances and ashes, and then subtracts the sum of these impurities from 100%, can provide a better way to accurately determine if the drug substance meets the regulatory acceptance criteria and to reliably detect unexpected changes in the quality of the drug substance. The objective of this study was to compare compendial assay methods with a mass balance approach in the determination of the active ingredient content and characterization of the quality of bulk drug materials. The identification and characterization of the drugs were accomplished through determination of melting point and infrared spectroscopy. The methods from the Farmacopeia Brasileira, United States Pharmacopeia and British Pharmacopoeia were used for the quantitative determination of the drugs. The drug related impurities were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) equipped with an ultraviolet (UV) detector and charged aerosol detector (CAD) in tandem. The results demonstrated the feasibility of the indirect method, which offers more precise data than those from the direct method, besides it enables the quality control to be focused on the impurity profile.

Key words: impurities, assay methods, mass balance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. CAD Adaptado de Dionex®	42
Figura 2. Fórmula estrutural do nifedipino	47
Figura 3. Fórmulas estruturais de duas impurezas do nifedipino	51
Figura 4. Cromatogramas sobrepostos de solução de adequabilidade do nifedipino (c) e de suas impurezas nitrofenilpiridina (a) e nitrosofenilpiridina (b) com detecção por UV e CAD.....	56
Figura 5. Cromatogramas sobrepostos de solução de amostra de nifedipino contaminada com duas impurezas com detecção por UV e CAD	56
Figura 6. Distribuição de resultados obtidos pelos diferentes métodos para o nifedipino.....	57
Figura 7. Fórmula estrutural do diazepam.....	63
Figura 8. Fórmulas estruturais de duas impurezas do diazepam	65
Figura 9. Espectro de infravermelho do diazepam	68
Figura 10. Cromatogramas sobrepostos de solução de amostra de diazepam contaminada com duas impurezas com detecção por UV e CAD	69
Figura 11. Cromatogramas sobrepostos de solução de adequabilidade do nifedipino e suas impurezas com detecção no UV e CAD.....	70
Figura 12. Distribuição de valores de quantificação para o fármaco diazepam pelos métodos direto e indireto	70
Figura 13. Fórmula estrutural do fármaco glibenclamida.....	75
Figura 14. Fórmulas estruturais de duas impurezas da glibenclamida.....	77
Figura 15. Espectro de infravermelho da glibenclamida.....	80
Figura 16. Cromatogramas sobrepostos de solução de glibenclamida contaminada com duas impurezas com detecção por UV e CAD	81
Figura 17. Diagrama de dispersão dos resultados de doseamento da glibenclamida com os diferentes métodos	82
Figura 18. Fórmula estrutural do fármaco estavudina	87
Figura 19. Fórmulas estruturais das impurezas (a) timina e (b) timidina	89
Figura 20. Espectro no infravermelho para amostra de estavudina	91
Figura 21. Espectro no infravermelho para a estavudina SQR	91

Figura 22. Cromatogramas sobrepostos de solução de adequabilidade do nifedipino e de suas impurezas com detecção no UV e CAD	92
Figura 23. Diagrama de dispersão contendo os valores de doseamento para a estavudina por meio dos métodos direto e indireto	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Limites de impurezas conforme Q3A(R2) do ICH	37
Tabela 2 - Valores de adequabilidade do sistema e linearidade para o ensaio de substâncias relacionadas do nifedipino por UV	Anexo
Tabela 3 - Valores de adequabilidade do sistema e linearidade para o ensaio de substâncias relacionadas do nifedipino por CAD	Anexo
Tabela 4 - Comparação da quantificação entre os diferentes métodos para o nifedipino	Anexo
Tabela 5 - Valores de adequabilidade do sistema e linearidade para o ensaio de substâncias relacionadas do diazepam por UV	Anexo
Tabela 6 - Valores de adequabilidade do sistema e linearidade para o ensaio de substâncias relacionadas do diazepam por CAD	Anexo
Tabela 7 - Comparação da quantificação entre os diferentes métodos para o diazepam	Anexo
Tabela 8 - Valores de adequabilidade do sistema e linearidade para o ensaio de substâncias relacionadas da glibenclamida por UV	Anexo
Tabela 9 - Valores de adequabilidade do sistema e linearidade para o ensaio de substâncias relacionadas da glibenclamida por CAD	Anexo
Tabela 10 - Comparação da quantificação entre os diferentes métodos para a glibenclamida	Anexo
Tabela 12 - Valores de adequabilidade do sistema e linearidade para o ensaio de substâncias relacionadas da estavudina por CAD	Anexo
Tabela 13 - Comparação da quantificação entre os diferentes métodos para a estavudina	Anexo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	23
2.1 Objetivos gerais.....	25
2.2 Objetivos específicos.....	25
3 REVISÃO	27
3.1 Métodos diretos e indiretos	29
3.2 Substâncias Químicas de Referência.....	30
3.3 Atributos de qualidade de fármacos	31
3.3.1 Identidade.....	32
3.3.2 Teor.....	32
3.3.3 Pureza.....	34
3.4 Tipos de Impurezas	35
3.5 Limites de Impurezas	36
3.6 Legislação	38
3.7 Métodos de Análise	38
3.8 Ensaio de pureza	39
3.8.1 Perda por dessecação.....	40
3.8.2 Cinzas sulfatadas	40
3.8.3 Substâncias relacionadas.....	40
3.9 Cromatografia a líquido de alta eficiência.....	40
3.9.1 Adequabilidade do Sistema.....	41
3.10 Detector CAD	41
4 NIFEDIPINO.....	45
4.1 Descrição	47
4.2 Material e Métodos.....	47
4.2.1 Material.....	47
4.2.2 Métodos	48

4.2.2.1 Identificação.....	48
4.2.2.1.1 Faixa de fusão	48
4.2.2.1.2 Cromatografia a líquido de alta eficiência	49
4.2.2.2 Pureza	49
4.2.2.2.1 Perda por dessecação	49
4.2.2.2.2 Cinzas sulfatadas.....	50
4.2.2.2.3 Substâncias relacionadas	51
4.2.2.2.3.1 Condições cromatográficas.....	51
4.2.2.2.3.2 Solução Amostra.....	52
4.2.2.2.3.3 Preparo das curvas de calibração.....	52
4.2.2.2.3.4 Adequabilidade do Sistema	52
4.2.2.3 Doseamento.....	53
4.2.2.3.1 Condições cromatográficas.....	53
4.2.2.3.2 Solução amostra	53
4.2.2.3.3 Solução SQR	53
4.2.2.3.4 Adequabilidade do sistema cromatográfico	54
4.2.2.4 Análise comparativa dos métodos direto e indireto	54
4.3 Resultados e Discussão	54
4.3.1 Identificação.....	54
4.3.1.1 Faixa de fusão	54
4.3.1.2 Cromatografia à líquido de alta eficiência	55
4.3.2 Pureza	55
4.3.2.1 Perda por dessecação	55
4.3.2.2 Cinzas sulfatadas.....	55
4.3.2.3 Substâncias relacionadas	55
4.3.3 Análise comparativa dos métodos direto e indireto.....	57
4.3.3.1 Indireto.....	57
4.3.3.1.1 Detecção por UV.....	57
4.3.3.1.2 Detecção por CAD	58
4.3.3.2 Direto	58
4.3.4 Fatores de resposta impurezas/fármaco.....	59

5 DIAZEPAM	61
5.1 Descrição	63
5.2 Material e Métodos.....	64
5.2.1 Material.....	64
5.2.2 Métodos	64
5.2.2.1 Identificação	64
5.2.2.1.1 Faixa de fusão.....	64
5.2.2.1.1 Espectrofotometria na região do infravermelho	64
5.2.2.2 Pureza	64
5.2.2.2.1 Perda por dessecação.....	64
5.2.2.2.2 Cinzas sulfatadas	65
5.2.2.2.3 Substâncias relacionadas.....	65
5.2.2.2.3.1 Reagentes	65
5.2.2.2.3.2 Condições cromatográficas	66
5.2.2.2.3.3 Solução Amostra	66
5.2.2.2.3.4 Preparo das curvas de calibração	66
5.2.2.2.3.5 Adequabilidade do Sistema	67
5.2.2.3 Doseamento	67
5.2.2.4. Análise comparativa dos métodos direto e indireto	67
5.3 Resultados e Discussão	67
5.3.1 Identificação	67
5.3.1.1 Infravermelho.....	67
5.3.1.2 Faixa de fusão.....	68
5.3.2 Pureza.....	68
5.3.2.1 Perda por dessecação.....	68
5.3.2.2 Cinzas sulfatadas	68
5.3.2.3 Substâncias relacionadas.....	69
5.3.3 Doseamento	69
5.3.4. Análise comparativa dos métodos direto e indireto	71
5.3.4.1 Método indireto.....	71
5.3.4.1.1 Detecção por UV	71
5.3.4.1.2 Detecção por CAD.....	72

5.3.4.2 Método Direto	72
5.3.5 Fatores de resposta impurezas/fármaco.....	72
6 GLIBENCLAMIDA.....	73
6.1 Descrição.....	75
6.2 Material e Métodos	75
6.2.1 Material	75
6.2.2 Métodos	76
6.2.2.1 Identificação.....	76
6.2.2.1.1 Faixa de fusão	76
6.2.2.1.2 Espectrofotometria na região do infravermelho	76
6.2.2.2 Pureza	76
6.2.2.2.1 Perda por dessecação	76
6.2.2.2.2 Cinzas sulfatadas.....	77
6.2.2.2.3 Substâncias relacionadas	77
6.2.2.2.3.1 Reagentes.....	77
6.2.2.2.3.2 Fase móvel	77
6.2.2.2.3.3 Sistema cromatográfico	78
6.2.2.2.3.4 Solução amostra	78
6.2.2.2.3.5 Preparo das curvas de calibração.....	78
6.2.2.2.3.6 Adequabilidade do sistema cromatográfico	79
6.2.2.3 Doseamento.....	79
6.3 Resultados e Discussão	79
6.3.1 Identificação.....	79
6.3.1.1 Faixa de fusão	79
6.3.1.2 Espectrofotometria no infravermelho	80
6.3.2 Pureza	80
6.3.2.1 Perda por dessecação	80
6.3.2.2 Cinzas sulfatadas.....	80
6.3.2.3 Substâncias relacionadas	81
6.3.3 Análise comparativa dos métodos direto e indireto.....	82
6.3.3.1 Método Indireto	82

6.3.3.1.1 Detecção por UV	82
6.3.3.1.2 Detecção por CAD.....	83
6.3.3.2. Método Direto.....	84
6.3.4 Fatores de resposta Impurezas/Fármaco	84
7 ESTAVUDINA	85
7.1 Descrição	87
7.2 Material e Métodos.....	87
7.2.1 Material.....	87
7.2.2 Métodos	88
7.2.2.1 Identificação	88
7.2.2.1.1 Espectroscopia no infravermelho	88
7.2.2.1.1 Cromatografia à líquido de alta eficiência.....	88
7.2.2.2 Pureza	88
7.2.2.2.1 Teor de umidade	88
7.2.2.2.2 Cinzas sulfatadas	89
7.2.2.2.3 Substâncias relacionadas.....	89
7.2.2.2.3.1 Condições cromatográficas	89
7.2.2.2.3.2 Solução Amostra	89
7.2.2.2.3.3 Preparo das curvas de calibração	89
7.2.2.2.3.4 Adequabilidade do Sistema	89
7.2.2.3 Doseamento	89
7.2.2.3.1 Solução amostra.....	89
7.2.2.3.2 Solução padrão	89
7.2.2.3.3 Fase móvel.....	89
7.2.2.3.4 Sistema cromatográfico	90
7.3 Resultados e Discussão	90
7.3.1 Identificação	90
7.3.1.1 Espectroscopia no infravermelho	90
7.3.1.2 Cromatografia a líquido de alta eficiência.....	90
7.3.2 Pureza	90
7.3.2.1 Cinzas sulfatadas	90

7.3.2.2 Umidade	92
7.3.2.3 Substâncias relacionadas	92
7.3.3 Análise comparativa dos métodos direto e indireto.....	93
7.3.3.1 Método indireto	93
7.3.3.1.1 Detecção por UV.....	93
7.3.3.1.2 Detecção por CAD.....	94
7.3.3.2 Método direto.....	95
7.3.4 Fatores de resposta impurezas/fármaco.....	95
8 CONCLUSÕES	97
9 REFERÊNCIAS	101
ANEXO	

1 INTRODUÇÃO

O papel dos ensaios de doseamento, tanto específicos como não específicos, na caracterização da qualidade de matérias-primas farmacêuticas é frequentemente questionado. Uma proposta alternativa considerada mais importante é o estabelecimento do perfil de impurezas, garantindo um controle de qualidade mais adequado de fármacos, com vistas a minimizar efeitos adversos (GÖRÖG, 2005).

Métodos não-seletivos são ainda amplamente empregados no doseamento de matérias-primas farmacêuticas. Visto que os resultados de tais testes não contribuem para o problema da segurança, alguns autores recomendam a omissão destes e substituição pelo conceito de balanço de massas (GÖRÖG, 2008). Além disso, a eficácia da substituição de métodos não-seletivos por seletivos na quantificação do ativo principal também é questionável. Devido à limitada precisão do ensaio por cromatografia à líquido de alta eficiência (CLAE), principal método seletivo utilizado, o conteúdo de fármaco obtido pelo balanço de massas pode ser considerado mais apropriado no controle em processo (HOFER *et al.*, 2007).

O balanço de massas é geralmente considerado exato, sendo recomendado para estabelecimento de substâncias químicas de referência. Contudo, poucos artigos discutem a aplicação do balanço de massas para a determinação de pureza, devido às dificuldades existentes para a realização do processo (KANG, 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Comparar métodos diretos com métodos indiretos na determinação da pureza de fármacos, avaliando suas vantagens e desvantagens.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os métodos vigentes utilizados na caracterização de qualidade de fármacos, tendo por base a legislação vigente;
- Comparar métodos diretos com métodos indiretos, avaliando criticamente as vantagens e desvantagens das diferentes abordagens na caracterização de qualidade de fármacos;
- Avaliar a aplicabilidade dos diferentes métodos analíticos no estabelecimento de pureza de Substâncias Químicas de Referência (SQR), de acordo com parâmetros metrológicos;
- Comparar métodos farmacopeicos oficiais específicos e não específicos quanto à sua aplicabilidade no controle de qualidade de fármacos, avaliando o emprego do detector de aerossol carregado (CAD).
- Acompanhar os estudos interlaboratoriais da Farmacopeia Brasileira de determinação de pureza de Substâncias Químicas de Referência, conduzindo simultaneamente um estudo alternativo, que permitirá a comparação de ambas as abordagens na caracterização de SQR.

3.1 Métodos diretos e indiretos

Segundo Görög (2005), considerando que:

$$Aic\% = Ans, \% \quad (1)$$

Sendo Aic,% o conteúdo real de substância ativa e Ans,% o resultado obtido pelo ensaio de doseamento compendial não específico, a equação (1) pode ser inválida.

O problema da não validade da equação (1) pode ser resolvido subtraindo-se a soma de impurezas orgânicas de Ans%, de acordo com a equação (2).

$$Aic\% = Ans, \% - \sum_{\text{impurezas orgânicas, \%}} \quad (2)$$

Se métodos cromatográficos específicos (principalmente CLAE) são usados no ensaio para chegar a As,%, a invalidade deixa de existir, conforme a equação (3):

$$Aic\% = As, \% \quad (3)$$

A equação (4) representa uma abordagem alternativa, que não se limita apenas às impurezas orgânicas:

$$Aic\% = 100 - \sum_{\text{impurezas, \%}} = 100 - \text{Impurezas voláteis, \%} - \text{Cinzas sulfatadas, \%} - \sum_{\text{impurezas orgânicas}} \quad (4)$$

Ainda de acordo com Görög (2005), como principal vantagem de se usar a equação (4) temos que seria desnecessário conduzir ensaios de doseamento. O tempo e energia assim poupados seriam gastos com determinação mais exata de impurezas orgânicas individuais, por exemplo, mudando os testes semi-quantitativos

presentemente existentes para sua determinação quantitativa. Devido ao valor limitado das informações obtidas com os ensaios de doseamento compendiais, a falta destes não comprometeria a segurança da terapia medicamentosa.

A exatidão de $A_{ic},\%$ obtida de (4) é maior do que aquela obtida de (2) ou (3) visto que a base de cálculo é $100 - 0,0\%$, enquanto aquela obtida no caso (2) e (3) é baseada em $A_{ns},\% \pm$ erro analítico e $A_s,\% \pm$ erro analítico, respectivamente.

As desvantagens de usar a Eq. (4) também são notáveis: impurezas que não são levadas em consideração podem estar presentes usando a equação (4). Como exemplos temos as impurezas que não absorvem no UV e, portanto, que não são detectáveis por CLAE-UV, método normalmente utilizado. Alguns sais de ácidos e bases orgânicos e inorgânicos, como acetato de amônio e sais de alquilamônio.

Na maioria dos casos, entretanto, estas impurezas são detectadas por outros testes nas monografias ou suas quantidades são desprezíveis ou pelo menos o erro causado por negligenciá-las é menor do que o valor do erro analítico em $A_{ns},\% \pm$ erro analítico e $A_s,\% \pm$ erro analítico.

Uma desvantagem mais importante é que a abordagem usando a expressão (4) é inconsistente com as análises farmacêuticas tradicionais por todo o mundo e com a metodologia atualmente proposta pelas farmacopeias, sendo por isso altamente improvável de ser aceita pelas agências de regulamentação sanitárias (GÖRÖG, 2005).

Deve-se notar que tal abordagem não é nova. O conceito utilizado na equação 4 é frequentemente usado nos casos em que uma SQR não é disponível ou para a caracterização de SQR propriamente ditas (GÖRÖG, 2005).

Consideram-se como métodos diretos aqueles em que se aplicam as equações (1), (2) e (3) e como método indireto aquele em que se aplica a equação (4) para obtenção de pureza de um fármaco.

3.2 Substâncias Químicas de Referência

SQR USP e amostras de fármacos e suas respectivas impurezas empregadas neste estudo fazem parte dos Estudos Interlaboratoriais desenvolvidos pela Farmacopéia Brasileira com vistas ao estabelecimento de SQR e monitoramento periódico dos lotes.

As SQR são materiais de referência certificados utilizados na avaliação da conformidade dos insumos farmacêuticos e dos medicamentos, requeridos nas diferentes farmacopeias e códigos farmacêuticos. No caso das produzidas pela Farmacopeia Brasileira, são reconhecidas pela ANVISA como referência de controle de qualidade nacional (BRASIL, 2012).

A ANVISA, em seu Guia para Doadores de Materiais Candidatos a Substância Química de Referência da Farmacopéia Brasileira (SQR-FB), solicita às indústrias que disponibilizem dados referentes ao teor das matérias-primas enviadas, considerando como valores mínimos desejáveis 99,5% para as SQR utilizadas em ensaios de doseamento e 98% para aquelas utilizadas em ensaios de pureza (BRASIL, 2010).

O doador deve obrigatoriamente indicar o método direto usado para determinação do teor, que pode ser um método farmacopeico ou desenvolvido pelo doador. A pureza também pode ser obtida por balanço de massas subtraindo de 100 a porcentagem de impurezas obtidas por perda por dessecação ou teor de água e solventes residuais, impurezas por CLAE (orgânicas) e resíduo por ignição (inorgânicas) (BRASIL, 2010).

3.3 Atributos de qualidade de fármacos

Autoridades regulatórias exigem testes de liberação de lotes de fármacos e produtos farmacêuticos para confirmar a qualidade dos mesmos. Testes recomendados incluem: (1) descrição do fármaco, (2) teste de identificação, (3) ensaio de doseamento e (4) teste de determinação de impurezas. Outros testes possíveis são testes para substâncias quirais, formas polimórficas e limites

microbianos. Os últimos testes não são sempre necessários, mas devem ser avaliados caso a caso (DEJAEGER *et al.*, 2006).

Dentre os atributos de qualidade de fármacos, a pureza é de importância proeminente: pela identificação e determinação quantitativa das impurezas e produtos de degradação, o risco de sua contribuição para o perfil de efeitos colaterais das matérias-primas farmacêuticas pode ser evitado ou ao menos controlado/minimizado (GÖRÖG, 1995, 2003, 2006). Contudo, deve-se ter em mente que a combinação de todos os resultados dos testes é que permite que a decisão seja tomada com relação à aceitabilidade do fármaco (KRSTULOVIC & LEE, 1997).

3.3.1 Identidade

Embora algumas farmacopeias favoreçam reações de cor que requerem poucos equipamentos, o ideal é aplicar toda a gama de técnicas cromatográficas e espectroscópicas disponíveis. Espectroscopia de infravermelho é a técnica de identificação mais útil e amplamente empregada, visto que além de fornecer informação estrutural e rigorosa prova de identidade, frequentemente detecta polimorfismo ou pseudo-polimorfismo (KRSTULOVIC & LEE, 1997).

Testes de identificação devem ser específicos para o fármaco, como é o caso da espectroscopia no infravermelho. Identificação somente por um tempo de retenção cromatográfico não é considerada específica. Entretanto, o uso de dois procedimentos cromatográficos, onde a separação é baseada em diferentes princípios ou uma combinação de testes em um único procedimento, tal como CLAE/UV-DAD, CLAE/EM, ou CG/EM é geralmente aceita (ICH, 2005).

3.3.2 Teor

Um procedimento indicativo de estabilidade e específico deve ser incluído para determinar o conteúdo do fármaco. Em muitos casos é possível empregar o

mesmo ensaio tanto para o doseamento do fármaco como para quantificação de impurezas. Em casos onde um ensaio não específico é justificado, outros procedimentos analíticos devem ser empregados para atingir especificidade. Por exemplo, quando volumetria é adotada para dosear o fármaco, a combinação do ensaio de doseamento e um teste para impurezas deve ser indicado (BRASIL, 2003, 2009; ICH, 2005).

O método volumétrico, apesar de ser menos específico do que o método cromatográfico, não depende de uma substância de referência e é frequentemente mais exato e preciso, apresentando um desvio padrão relativo geralmente inferior a 0,3% (KRSTULOVIC & LEE, 1997).

Os métodos não específicos, ainda que difundidos pelas farmacopeias americana, europeia e brasileira para ensaios de doseamento de matérias-primas farmacêuticas, possuem limitações evidentes.

Görög (2005) cita como exemplo a monografia do levonorgestrel. Na farmacopeia americana descreve-se um método espectrofotométrico, enquanto na europeia um método volumétrico. Das seis impurezas citadas para o levonorgestrel, todas contêm o grupo etinila usado na titulação e duas contêm o mesmo grupo cromóforo. Isto significa que os resultados obtidos para ambos os métodos não se referem ao conteúdo de substância ativa, mas à soma da substância ativa mais impurezas. Nesse caso, é possível que o resultado de um ensaio cujo conteúdo real de substância ativa seja de 96,2% e cuja soma de impurezas seja de 1,9% apresente um resultado teórico de 98,1%, dentro dos limites especificados (98,0-102,0% para conteúdo de substância ativa e <2,0% para impurezas totais).

O problema acima descrito poderia ser resolvido com o uso de um método específico, razão pela qual os métodos por CLAE estão progressivamente substituindo os métodos não específicos nas sucessivas revisões das farmacopeias, principalmente da americana.

No entanto, Görög (2005) questiona a utilidade de se empregar um método trabalhoso e dispendioso como CLAE para desenvolver um ensaio de doseamento. Além disso, considera a determinação do conteúdo de substância ativa insuficiente

para caracterização da qualidade da matéria-prima farmacêutica, mesmo que obtida com a exatidão proporcionada pelo método de CLAE.

O desenvolvimento de método de CLAE é difícil e consome muito tempo comparado aos métodos volumétricos. Além disso, a precisão do CLAE é geralmente pobre ($>0,5\%$ D.P.R.) comparada com os métodos de titulação, e por isso supõe-se que esses métodos sejam menos capazes de atender aos limites especificados. Para um fármaco de baixo peso molecular, os limites se situam entre 98-102% (DEJAEGER *et al.*, 2006).

Simulações demonstraram que a variabilidade esperada para um ensaio de doseamento por CLAE é grande em relação à faixa de especificação média, e por isso pouca clareza sobre pureza pode ser obtida pela comparação dos resultados de doseamento individuais (BUNNEL, 1997). Ermer e colaboradores (2005) encontraram valores de desvio padrão relativo de repetibilidade em estudos de estabilidade para doseamento de fármacos na faixa de 0,1-1,6%, com uma média de 0,64%. Para precisão intermediária, foi encontrado um resultado de 1,1%.

Görög (2008) sugere que ensaios de doseamento clássicos, incluindo CLAE, sejam empregados apenas em casos excepcionais e que o tempo e energia assim despendidos sejam empregados para problemas mais importantes relacionados a impurezas que contribuem diretamente para a segurança da terapia medicamentosa.

3.3.3 Pureza

Existe um grande interesse na determinação de impurezas em fármacos (BAERTSCHI, 2006). Como consequência do rápido desenvolvimento para identificação e determinação quantitativa de impurezas em matérias-primas farmacêuticas o ponto focal na caracterização da qualidade de fármacos mudou de ensaios de doseamento para ensaios de pureza (GÖRÖG, 2005).

Impurezas orgânicas em fármacos são medidas usando quase que exclusivamente procedimentos cromatográficos, os quais devem envolver um modo

de separação que permita a resolução das impurezas do fármaco e um modo de detecção que permita a medida exata das impurezas (NG *et al.*, 2007).

Quase todas as impurezas orgânicas são determinadas por CLAE. A maioria dos analistas usa o modo em fase reversa com detecção por UV. Esta técnica serve como padrão para comparação com outras técnicas (KRSTULOVIC & LEE, 1997).

3.4 Tipos de Impurezas

Durante o processo de manufatura de fármacos, seja por síntese química, extração, fermentação, recuperação a partir de fontes naturais, ou qualquer combinação desses processos, várias impurezas podem surgir. A compreensão da origem, controle e medida de impurezas é fundamental para a produção de fármacos de alta qualidade (NG *et al.*, 2007).

As impurezas são classificadas para propósitos regulatórios como orgânicas, inorgânicas e solventes residuais. Impurezas orgânicas podem ser originadas de impurezas contidas em materiais de partida (muito frequentemente impurezas isoméricas), intermediários sintéticos (reação incompleta ou excesso de reagente empregado) e produtos de degradação que podem variar dependendo das condições de reação, tais como temperatura, pH e condições de armazenagem (hidrólise, oxidação, abertura de anel, etc.). Para uma rota sintética idêntica, a escala pode ter influência sobre o perfil de impurezas (KRSTULOVIC & LEE, 1997).

Já as Impurezas inorgânicas podem resultar do processo de manufatura. São normalmente conhecidas e identificadas e incluem reagentes, ligantes e catalisadores, metais pesados ou outros metais residuais, sais inorgânicos e outros materiais (adjuvantes de filtração, carvão). Não são levados em consideração contaminantes externos resultantes da não obediência das Boas Práticas de Fabricação (BRASIL, 2005; ICH, 2006).

Os solventes orgânicos em geral desempenham um papel fundamental na manufatura de substâncias ativas e de excipientes (por exemplo; reação, separação e purificação). Remoção completa de níveis residuais de solventes é impraticável de

um ponto de vista da produção, então é inevitável que traços estejam presentes no produto final (CARAMASU *et al.*, 2006).

Uma diferença clara entre impurezas relacionadas ao processo e produtos de degradação nem sempre é possível. Entretanto, a maioria das impurezas são características da rota sintética do processo de manufatura. Visto que há várias formas de se sintetizar um fármaco, é possível que o mesmo fármaco obtido de diferentes fontes possa apresentar diferentes impurezas (NAGESWARA RAO & NAGARAJU, 2003).

3.5 Limites de Impurezas

Ao contrário do que acontece com impurezas inorgânicas e solventes residuais, os efeitos fisiológicos e toxicidade das impurezas orgânicas não são bem conhecidos. Em casos de fármacos preparados por várias etapas de síntese, o número de estruturas é quase ilimitado e altamente dependente da rota e condições de reação, além de vários outros fatores tais como pureza do material de partida, método de isolamento, purificação, condições de armazenagem, entre outros (GÖRÖG, 2003).

As informações de validação de métodos devem incluir cálculos para demonstrar como as impurezas em fármacos são calculadas, informações sobre estudos de estresse, impurezas rotuladas com seus nomes e tempo de retenção relativo, uma discussão sobre possível formação e controle de polimorfos e enantiômeros, identificação e caracterização de cada impureza orgânica. Impurezas inorgânicas e solventes residuais também devem ser considerados e quantificados (BRASIL, 2009).

As características de validação para testes quantitativos de impureza incluem exatidão, precisão, especificidade, limite de detecção em alguns casos, limite de quantificação, linearidade, faixa e robustez (BRASIL, 2003). A diretriz ICH Q2(R1) (2005) discute os aspectos a serem considerados na validação dos diferentes procedimentos analíticos, a saber, testes de identificação, testes quantitativos e

ensaios limite para controle de impurezas, e testes quantitativos para conteúdo de substância ativa na matéria-prima ou formulação farmacêutica.

Ordinariamente, impurezas em fármacos devem estar abaixo do valor arbitrário de 0,1%, embora limites inferiores possam ser estabelecidos para impurezas particularmente tóxicas. Acima deste nível todas as impurezas devem ser identificadas (ICH, 2006; KRSTULOVIC & LEE, 1997).

A guia Q3A(R2) (2006) do ICH define limites de impurezas que norteiam a validação dos métodos analíticos. O limite de quantificação para o procedimento analítico não deve ser maior do que o limiar de notificação (ou seja, 0,05% ou 0,03%, dependendo da dose máxima diária) (Tabela 1).

Tabela 1 - Limites de impurezas conforme Q3A(R2) do ICH

Dose diária máxima	Limiar de notificação	Limiar de identificação	Limiar de qualificação
≤ 2 g/dia	0,05%	0,1% ou 1 mg/dia	0,15% ou 1 mg/dia
> 2 g/dia	0,03%	0,05%	0,05%

Os resultados quantitativos devem ser apresentados numericamente, e não em termos gerais como “de acordo”, “atende aos limites” etc. Qualquer impureza acima do limiar de notificação deve ser relatada com o método analítico indicado. Todas as impurezas que estiverem acima do limiar de notificação devem ser somadas e reportadas como impurezas totais.

O critério de aceitação deve ser coerente com o processo de síntese e capacidade analítica, baseado nos dados dos lotes do fármaco sintetizado pelo processo comercial proposto, e não pode estar ao acima do nível justificado por dados de segurança. Quando o processo de manufatura não é controlado e validado de forma adequada, podem ocorrer, entre os lotes, variações significativas nos níveis das impurezas (ICH, Q3A(R2), 2006).

Qualificação é o processo de adquirir e avaliar informações que estabelecem a segurança biológica de uma impureza individual ou um dado perfil de impurezas no nível especificado. O nível de uma impureza presente num fármaco submetido a estudos clínicos e de segurança é considerado aceitável. Um nível de impureza acima daquele presente em um novo fármaco também pode ser justificado com base

em uma análise da quantidade de impureza administrada em estudos de segurança prévios (ICH, Q3A(R2), 2006).

3.6 Legislação

A ANVISA, na RDC 57 (BRASIL, 2009), determina que a documentação para registro de insumo farmacêutico ativo deve conter, entre outras informações, a perda por secagem, características físicas (amorfa, cristalina, tamanho de partícula, solvatação), fluxograma do processo produtivo com indicação da formação de intermediários e de possíveis impurezas, com elucidação das respectivas estruturas químicas.

No registro do novo fármaco o fabricante deve incluir documentação evidenciando que os procedimentos analíticos são validados e adequados para a detecção e quantificação das impurezas (ICH - Q2(R1), 2006).

3.7 Métodos de Análise

Precisão e exatidão constituem exigências fundamentais de uma análise. Presume-se, embora não se possa provar, que uma série de medidas da mesma amostra seja normalmente distribuída em torno de uma média, ou seja, conforme um padrão gaussiano (WATSON, 2003).

De acordo com a RE 899 (BRASIL, 2003), uma metodologia para determinação da exatidão de um método, levando em conta a quantificação de impurezas, consiste na análise pelo método de adição de padrão, no qual se adiciona quantidades conhecidas de impurezas e/ou produtos de degradação ao fármaco. No caso da indisponibilidade de amostras de certas impurezas e/ou produtos de degradação, se aceita a comparação dos resultados obtidos com um método bem caracterizado (metodologia farmacopeica ou outro procedimento analítico validado). A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da

quantidade conhecida da impureza adicionada à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança.

Os resultados de doseamentos por CLAE são no mínimo questionáveis para se determinar a aceitabilidade do lote de um fármaco. Em um estudo, dados de doseamento por CLAE de mais de 100 lotes de cada um de oito fármacos foram comparados com resultados de uma abordagem por balanço de massas (100 – impurezas%). A variabilidade dos doseamentos por CLAE foi de 0,6 a 1,1% DPR. Essa variabilidade é uma porção apreciável de uma faixa de aceitação típica (por exemplo, 98.0-102.0%). A baixa precisão do método direto dificultou a detecção de mudanças significativas nas médias do processo e/ou degradação durante um estudo de estabilidade (HOFER *et al.*, 2007).

O uso da abordagem do balanço de massas para doseamento reteve essencialmente os mesmos resultados médios que os doseamentos por CLAE, mas forneceu desvios padrões até 10 vezes menores. O doseamento por balanço de massas permitiu o monitoramento mais preciso de processo e estabilidade e facilitou identificação mais rápida e exata das mudanças do processo (HOFER *et al.*, 2007).

Em outro trabalho, doseamentos por CLAE foram comparados com métodos volumétricos. As investigações demonstraram que foi possível definir o método por CLAE com uma capacidade similar ao método volumétrico. Os fatores mais importantes para aumentar a precisão do método por CLAE foram maiores massas de amostra e de materiais de referência. Quando baixas massas são usadas, deve-se aumentar o número de preparações de amostra e o número de soluções de referência (DEJAEGER *et al.*, 2006).

3.8 Ensaio de pureza

3.8.1 Perda por dessecação

Esse ensaio se destina a determinar a quantidade de substância volátil de qualquer natureza eliminada nas condições especificadas na monografia (FB V, 2010).

3.8.2 Cinzas sulfatadas

Cinzas sulfatadas compreendem o resíduo não-volátil à incineração na presença de ácido sulfúrico. Em geral, o ensaio visa a determinar o teor de constituintes ou impurezas inorgânicas contidos em substâncias orgânicas (FB V, 2010).

3.8.3 Substâncias relacionadas

Os níveis de impurezas orgânicas podem ser medidos comparando-se a resposta da impureza com a de um padrão de referência ou com a do próprio fármaco. Nos casos em que os fatores de resposta do fármaco e da impureza não são aproximados, é possível usar um fator de correção. Também é possível estimar o teor de impurezas com base em pressuposições analíticas, por exemplo, resposta equivalente do detector (ICH, Q3A(R2), 2006).

3.9 Cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE)

Amplamente empregada em análises de rotina na indústria farmacêutica, a CLAE é uma técnica de separação fundamentada na distribuição dos componentes de uma mistura entre duas fases imiscíveis, a fase móvel, líquida, e a fase estacionária sólida, contida em uma coluna cilíndrica (FB V, 2010).

3.9.1 Adequabilidade do Sistema

Considerados como parte integrante dos métodos de cromatografia líquida, os testes de adequabilidade do sistema são aplicados com a finalidade de verificar se o sistema cromatográfico possui resolução e reprodutibilidade adequadas para as análises a serem realizadas (FB V, 2010).

3.10 Detector CAD

Uma alternativa para se determinar fatores de resposta relativos para UV é empregar dois detectores em linha: um detector por UV e um detector universal. O detector universal ideal deve fornecer uma relação consistente entre a magnitude de resposta e a quantidade de composto injetado, independente da identidade do composto (SUN *et al.*, 2008).

O detector CAD exibe atributos de um detector universal para compostos não-voláteis e tem demonstrado fornecer fatores de resposta relativos uniformes sob condições isocráticas, apresentando detecção não-linear em faixa de quatro ordens de magnitude; limites de detecção abaixo de ng; variabilidade de resposta tipicamente abaixo de 2% (DPR); magnitude de resposta minimamente dependente das propriedades químicas do analito; compatibilidade isocrática e gradiente; ampla aplicabilidade. (VEHOVEC, 2010).

Esse detector é composto de um nebulizador, que converte o eluente da coluna do CLAE em um aerossol, um tubo de secagem, que remove as moléculas de solvente do aerossol para formar partículas, uma câmara Corona[®], que carrega as partículas do soluto, um eletrômetro, que acumula e mede a carga que foi colocada nas moléculas de soluto à medida que elas passam pelo detector, e um módulo de gás (**Figura**) (VEHOVEC, 2010).

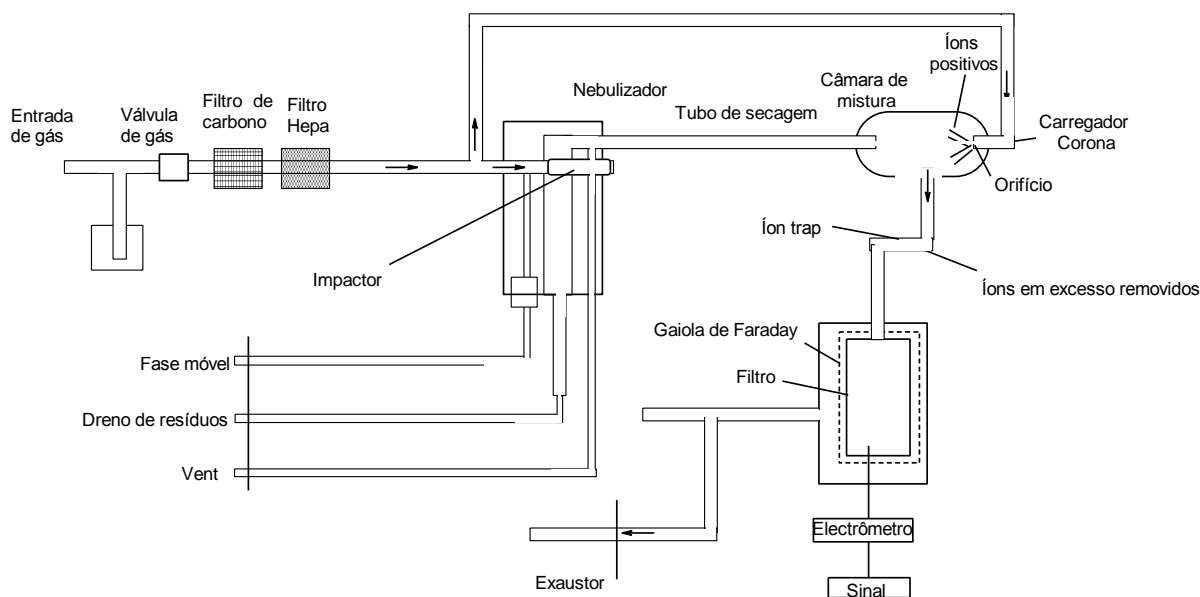


Figura 1. CAD Adaptado de Dionex®.

Os fatores de resposta não são consistentes para o mesmo composto em diferentes faixas de concentração porque a resposta do CAD é não-linear. É necessário calcular as concentrações usando um modelo quadrático (Dionex®). Além disso, sob condições de eluição gradiente, perde-se a uniformidade das respostas devido a mudanças na distribuição dos tamanhos das gotas durante a nebulização e diferentes taxas de evaporação, causando mudanças nas eficiências de transporte dentro do detector, resultando em diferentes proporções de solventes orgânicos na fase móvel (HUTCHINSON *et al.*, 2010).

O carregamento das partículas de aerossol envolve a colisão com íons de gás reagente (nitrogênio) e esse processo não é significativamente dependente da polaridade do analito, características ácido-base ou pH do eluente. Isso é melhor demonstrado pelo fato de que se pode medir ânions inorgânicos por meio de medidas de carga positiva com CAD. A carga é proporcional ao diâmetro de partícula que por sua vez é proporcional à concentração do pico (VEHOVEC, 2010).

Peso molecular, ponto de fusão e ponto de ebulição não predizem com exatidão a volatilidade de um composto. Por exemplo, compostos com pesos moleculares semelhantes podem apresentar volatilidades diferentes devido à

polaridade e à ligações de hidrogênio. Talvez um melhor indicador de volatilidade seja a pressão de vapor. Compostos com pressão de vapor de acima de $1,2 \times 10^{-6}$ Torr são suscetíveis à evaporação a 29 °C e podem ser problemáticos para detecção pelo Corona CAD (VEHOVEC, 2010).

Assim, o detector CAD constitui uma alternativa para a detecção de analitos desprovidos de grupamentos cromóforos, embora apresente restrições, como alteração da resposta com eluição gradiente e a impossibilidade da utilização de determinadas fases móveis. Além disso, a detecção universal aplica-se apenas para os compostos não-voláteis, enquanto os compostos semi-voláteis e voláteis apresentam resposta diminuída ou nula, respectivamente.

4 NIFEDIPINO

4.1 Descrição

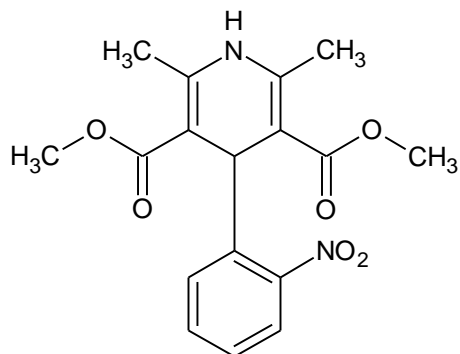


Figura 2. Fórmula estrutural do nifedipino

Fórmula molecular: C₁₇H₁₈N₂O₆

Massa molecular: 346,34

Nome químico: éster 3,5-dimetílico do ácido 1,4-diidro-2,6-dimetil-4-(2-nitrofenil)-3,5-piridinadicarboxílico

CAS: 21829-25-4

Apresenta-se como cristais amarelos, inodoros e insípidos. É praticamente insolúvel em água, solúvel em acetato de etila, ligeiramente solúvel em etanol, muito pouco solúvel em clorofórmio e acetona (FB V).

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Material

Tanto as amostras de matéria-prima como os padrões de nifedipino foram cedidos pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) para estudos interlaboratoriais de monitoramento de SQR. Foram utilizados os padrões nifedipino USP, lote I-1, as impurezas nitrosofenilpiridina USP, lote K e nitrofenilpiridina, lote K,, Foram utilizados os reagentes acetonitrila (ACN) Merck[®], metanol (MeOH) Sigma-Aldrich[®], e água, obtida por sistema MILLI-Q PLUS (Millipore[®]).

4.2.2 Métodos

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido Shimadzu[®] LC-10AD VP, detector de UV-VIS SPD-10AV VP, central de controle SCL-10A VP, degaseificador DGU-14A. A pureza dos picos foi determinada em detector com arranjo de fotodiodos.

A detecção por CAD foi desenvolvida por meio do detector Corona CAD (ESABioscience). Os seguintes parâmetros para o CAD foram estabelecidos: pressão do gás nitrogênio na entrada do detector foi estabelecida para 35 psi, a faixa de resposta do detector foi 100 pA, e o filtro foi estabelecido para "None." Nitrogênio com uma pureza de 99,99% foi usado como gás nebulizador.

4.2.2.1 Identificação

Para identificação do fármaco nifedipino foram empregados os métodos descritos em 4.2.2.1.1 e 4.2.2.1.2 (FB V).

4.2.2.1.1 Faixa de fusão

Os pontos de fusão da amostra e SQR de nifedipino foram determinados em aparelho automático Mettler Toledo, modelo FP90.

4.2.2.1.2 Cromatografia a líquido de alta eficiência

A identificação do nifedipino matéria-prima também foi determinada pelo seu tempo de retenção, comparado com o tempo de retenção do nifedipino SQR, utilizando o método descrito em 4.2.2.3.

4.2.2.2 Pureza

Procedeu-se aos ensaios de pureza substâncias relacionadas, perda por dessecação e cinzas sulfatadas. A soma dessas impurezas foi subtraída de 100% para obtenção do teor do fármaco pelo método indireto.

4.2.2.2.1 Perda por dessecação

Foi pesado, exatamente, cerca de 1 g e transferidos para pesa-filtro previamente dessecado durante 30 minutos. Após o resfriamento em dessecador, o pesa-filtro contendo a amostra foi colocado na estufa, sendo a tampa retirada e também deixada na estufa. As amostras foram dessecadas nas condições especificadas nas monografias, esfriadas até temperatura ambiente em dessecador e pesadas, sendo a operação repetida até peso constante.

A porcentagem da perda por dessecação foi dada pela equação:

$$\frac{Pu - Ps}{Pa} \times 100$$

em que:

Pa = peso da amostra não dessecada,

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

Ps = peso do pesa-filtro contendo a amostra após a dessecação (FB V).

4.2.2.2 Cinzas sulfatadas

Foi pesada, exatamente, cerca de 1 g de amostra e transferida para cadinho previamente calcinado, esfriado em dessecador e tarado, sendo adicionado cerca de 1 mL de ácido sulfúrico R. Então foram aquecidas brandamente até carbonização em temperatura não superior a $600\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, e após foi adicionado lentamente cerca de 1 mL de ácido sulfúrico para umedecer o resíduo. Em seguida foram novamente carbonizadas e incineradas com aquecimento gradativo até $600\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, novamente esfriadas, pesadas e incineradas por mais 30 minutos. Este procedimento foi repetido até que a diferença entre duas pesagens sucessivas não fosse maior do que 0,5 mg. A porcentagem de cinzas sulfatadas em relação à substância sob ensaio foi obtida utilizando o seguinte cálculo:

$$\text{Cinzassulfatadas (\%)} = \frac{P_2 - P_1}{P_3} \times 100$$

em que:

P1 = Peso do cadinho após a calcinação e esfriamento (tara do cadinho);

P2 = Peso do cadinho com amostra após a calcinação e esfriamento em dessecador;

P3 = Peso da amostra inicial

100 = Fator de porcentagem.

4.2.2.2.3 Substâncias relacionadas

As fórmulas estruturais das duas impurezas do nifedipino estão representadas na Figura 3.

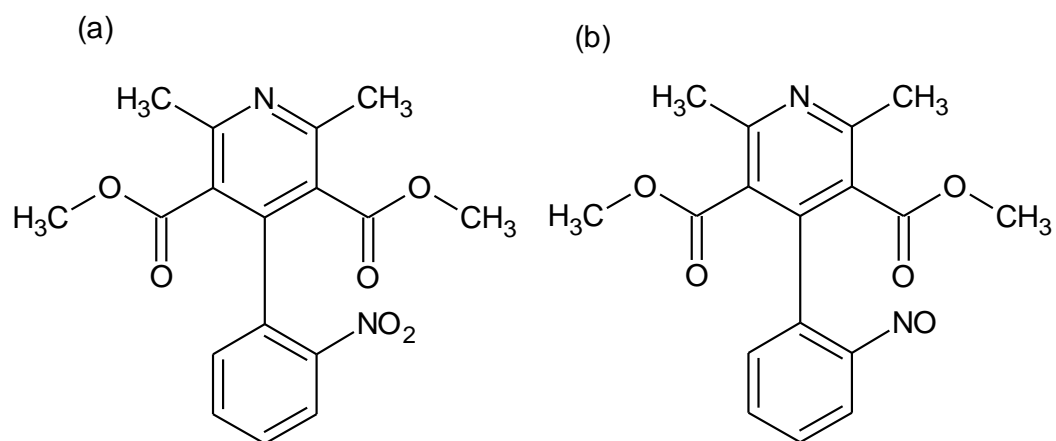


Figura 3. Fórmulas estruturais de duas impurezas do nifedipino: (a) dimetil 2,6-dimetil-4-(2-nitrofenil)piridina-3,5-dicarboxilato (análogo nitrofenilpiridina) e (b) dimetil 2,6-dimetil-4-(2-nitrosofenil)piridina-3,5-dicarboxilato (análogo nitrosofenilpiridina)

As impurezas nitrofenilpiridina e nitrosofenilpiridina foram quantificadas pelo ensaio de substâncias relacionadas descrito na BP 2011.

4.2.2.2.3.1 Condições cromatográficas

Foi empregada coluna cromatográfica Merck® de 150 mm x 4,6 mm, empacotada com sílica ligada a grupo octadecilsilano, diâmetro de poro 5 µm, fase móvel acetonitrila:metanol:água (9:36:55 V/V/V), fluxo de 1,0 mL/min, detecção em 235 nm, volume de injeção de 20 µL.

4.2.2.2.3.2 Solução Amostra

Foram transferidos, exatamente, cerca de 10 mg de amostra para balão volumétrico de 10 mL, dissolvido em 5 mL de metanol, completado com fase móvel e misturado de modo a obter concentração final de 1000 µg/mL.

4.2.2.2.3.3 Preparo das curvas de calibração

Foram construídas curvas de calibração do fármaco nifedipino e das impurezas A e B, com seis pontos de concentração compreendendo uma faixa de 0,1 µg/mL a 20 µg/mL, e correspondendo a um teor de 0,01 a 2% de impurezas na amostra. Foram pesados 5 mg de padrão de cada impureza e 5 mg do padrão do fármaco, diluídos em balão volumétrico de 50 mL, e com auxílio de bureta foram transferidas alíquotas de 0,5, 1, 5, 10 e 20 mL para balões volumétricos de 100 mL e completados com metanol. Da solução de 1 µg/mL foi retirada alíquota de 5 mL e transferida para balão volumétrico de 50 mL, e completado com metanol, obtendo-se concentração de 0,1 µg/mL. Com isso foram geradas soluções com as concentrações de 0,1, 0,5, 1, 5, 10 e 20 µg/mL.

4.2.2.2.3.4 Adequabilidade do Sistema

Tendo em vista que os métodos empregados nos ensaios são provenientes de compêndios oficiais, são considerados validados (ICH, Q2 R1, 1996). No entanto, visando a assegurar a confiabilidade dos resultados, procedeu-se a testes de adequabilidade do sistema.

Foram avaliados os parâmetros de pratos teóricos (N), assimetria (A) e resolução (R) entre os picos de uma solução de 0,1 µg/mL preparada conforme item 4.2.2.2.3.6. Os testes de adequabilidade do sistema cromatográfico foram efetuados

com seis replicatas de injeções. Foram calculados os DPRs dos tempos de retenção e das áreas absolutas dos cromatogramas, para o nifedipino e suas impurezas.

4.2.2.3 Doseamento

Procedeu-se ao ensaio de doseamento por CLAE presente na FB V, em que o teor de fármaco na amostra é determinado contra um padrão de referência de pureza conhecida.

4.2.2.3.1 Condições cromatográficas

Além da detecção no UV ($\lambda=235$ nm), o sistema foi acoplado também ao detector CAD. Foi utilizada coluna de 150 mm de comprimento e 4,0 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (5 μ m), mantida à 30 °C, fluxo da fase móvel 1,0 mL por minuto.

4.2.2.3.2 Solução amostra

Foi transferido cerca de 10 mg de amostra, exatamente pesada, para balão volumétrico de 100 mL, dissolvido em 20 mL de metanol, completado com fase móvel e misturado de modo a obter concentração final de 100 μ g/mL.

4.2.2.3.3 Solução SQR

Foi transferido cerca de 10 mg de nifedipino SQR, exatamente pesada, em fase móvel de modo a obter concentração conhecida de 100 μ g/mL.

4.2.2.3.4 Adequabilidade do sistema cromatográfico

Foram avaliados os parâmetros número de pratos teóricos (N), fator de cauda (A) e desvio padrão da resposta do pico principal. Os testes de adequabilidade do sistema cromatográfico foram efetuados com seis replicatas de injeções de solução padrão. Os critérios para aceitação dos resultados obtidos nos ensaios para adequabilidade do sistema cromatográfico foram os constantes na monografia do nifedipino.

4.2.2.4 Análise comparativa dos métodos direto e indireto

Os métodos direto e indireto de quantificação das matérias-primas farmacêuticas foram comparados estatisticamente por meio de análise de variância (ANOVA).

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Identificação

4.3.1.1 Faixa de fusão

A faixa de fusão apresentou resultados entre $172,7 \pm 0,15$ °C e $174,8 \pm 0,03$ °C (média \pm DP) para três determinações da amostra e SQR, respectivamente, dentro dos limites especificados na monografia da Farmacopeia Brasileira.

4.3.1.2 Cromatografia a líquido de alta eficiência

Os tempos de retenção SQR e amostra foram comparados e permitiram confirmar a identidade do fármaco ($t_r \approx 11,35$ min).

4.3.2 Pureza

4.3.2.1 Perda por dessecação

O resultado médio de três determinações para perda por dessecação foi de $0,73 \pm 0,03$ %, dentro do limite de 1,0 % aceito pela FB V.

4.3.2.2 Cinzas sulfatadas

O resultado médio de três determinações para cinzas sulfatadas foi de $0,01 \pm 0,01$ %, estando dentro do limite especificado de 0,1 % aceito pela FB V.

4.3.2.3 Substâncias relacionadas

O resultado médio de nove determinações encontrado para a nitrofenilpiridina foi de $0,14 \pm 0,01$ %, considerando detecção por UV. A nitrosofenilpiridina não foi detectada na amostra.

A Figura 4 apresenta cromatogramas por UV e CAD sobrepostos de solução de adequabilidade do fármaco nifedipino e suas impurezas. Pode-se perceber que as respostas são diferentes para os dois detectores. Observou-se que a impureza nitrosofenilpiridina apresenta uma resposta reduzida para o CAD, o que decorre do fato de a mesma apresentar baixa pressão de vapor, ou seja, pode ser considerada

um analito semi-volátil. Nesse caso, o detector CAD não oferece vantagem com relação ao UV, pois não há melhora na uniformidade de resposta entre os analitos.

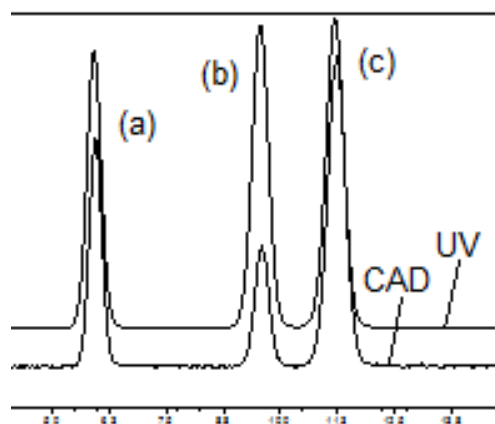


Figura 4. Cromatogramas sobrepostos de solução de adequabilidade do nifedipino (c) e de suas impurezas nitrofenilpiridina (a) e nitrosofenilpiridina (b) com detecção por UV e CAD. Condições cromatográficas: Coluna C-18, 5 μ m, 150mm; detecção em 235 nm, fluxo 0,8 mL/min, volume de injeção 20 μ L. Fase móvel água:metanol:acetonitrila (45:36:9).

Os resultados de adequabilidade do sistema e linearidade estão descritos na Tabela 2 para a detecção por UV e na Tabela 3 para detecção por CAD. A Figura 5 apresenta os cromatogramas representativos do ensaio de substâncias relacionadas. Na Tabela 4 são apresentados os resultados de quantificação dos diferentes métodos e a comparação estatística entre os mesmos. Todas as tabelas se encontram em ANEXO.

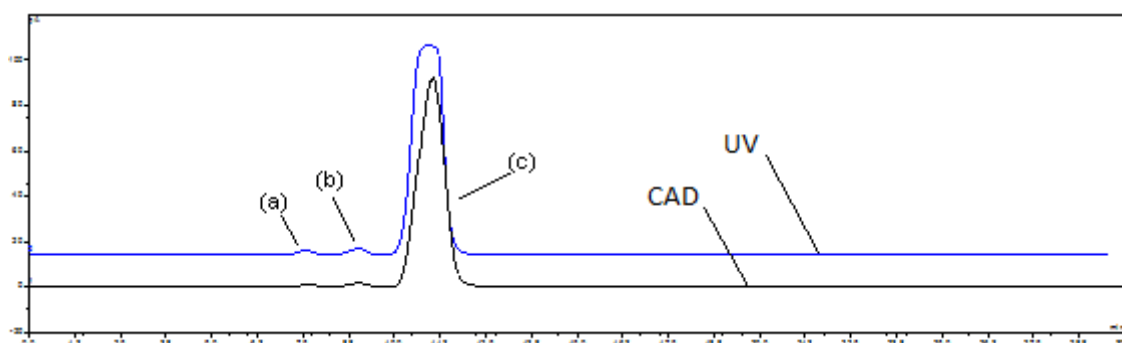


Figura 5. Cromatogramas sobrepostos de solução de amostra de nifedipino (c) contaminada com suas impurezas nitrofenilpiridina (a) e nitrosofenilpiridina (b) com detecção por UV e CAD.

$$\text{Teor (\%)} = 100 - (0,01 \pm 0,01) - (0,14 \pm 0,01) = \mathbf{(99,85 \pm 0,01)}$$

4.3.3.1.2 Detecção por CAD

Considerando a água presente na amostra, o teor médio encontrado foi:

$$\text{Teor (\%)} = 100 - (0,73 \pm 0,03) - (0,01 \pm 0,01) - (0,10 \pm 0,01) = \mathbf{(99,16 \pm 0,03)}$$

Ao se expressar o resultado como base anidra, tem-se:

$$\text{Teor (\%)} = 100 - (0,01 \pm 0,01) - (0,10 \pm 0,01) = \mathbf{(99,89 \pm 0,01)}$$

4.3.3.2 Direto

O resultado médio encontrado para o teor do fármaco nifedipino pelo método direto de doseamento foi:

$$\text{Teor (\%)} = \mathbf{(99,26 \pm 0,35)}$$

Ao se expressar o resultado como base anidra, tem-se:

$$\text{Teor (\%)} = \mathbf{(99,99 \pm 0,35)}$$

Pode-se observar que a dispersão dos resultados para o método direto é maior do que aquela observada para o método indireto, sendo a incerteza, expressa em desvios padrões, maior para o método direto do que para o método indireto.

4.3.3 Fatores de resposta Impurezas/Fármaco

Os fatores de resposta das impurezas com relação ao fármaco foram calculados pela relação das áreas entre impureza e fármacos na mesma concentração (2µg/mL).

Nitrofenilpiridina/Nifedipino: 0,87 para o CAD e 0,96 para o UV. Ou seja, UV apresenta resposta mais uniforme do que o CAD.

Nitrosufenilpiridina/Nifedipino: 0,34 para o CAD e 0,92 para o UV. Também nesse caso o UV apresentou resposta mais aproximada entre fármaco e impureza.

Para justificar a menor intensidade de resposta do detector CAD para as impurezas, pode-se aventar duas possíveis razões: volatilidade acima daquela da fase móvel ou formação incompleta de partículas (HUTCHINSON et al, 2010).

Idealmente, um detector universal deveria detectar qualquer analito, independentemente de sua estrutura química, fornecendo fatores de resposta uniformes com o emprego de distintas fases móveis. (HUTCHINSON et al, 2010). Ademais, divulga-se a noção de que o detector CAD apresenta uma resposta uniforme entre diferentes analitos, porém os resultados observados não se enquadraram nessa proposta.

5 DIAZEPAM

5.1 Descrição

A fórmula estrutural do diazepam está representada na Figura 8.

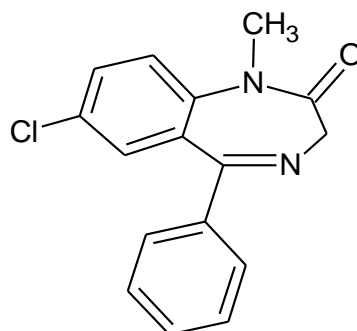


Figura 7. Fórmula estrutural do diazepam

Fórmula molecular: C₁₆H₁₃ClN₂O

Massa molecular: 284,75

Nome químico: 7-cloro-1,3-diidro-1-metil-5-fenil-2H-1,4-Benzodiazepin-2-ona

CAS: 439-14-5

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Material

Foram empregadas as SQR diazepam CIV, NDC #00216-0404-03, lote JOJ208, substância relacionada A (2-metilamino-5-clorobenzofenona), lote JOH438, e substância relacionada B (3-amino-6-cloro-1-metil-4-fenilcarbostiril), lote KOH414.

5.2.2 Métodos

Conforme item 4.2.2.

5.2.2.1 Identificação

5.2.2.1.1 Faixa de fusão

As faixas de fusão da amostra e SQR de diazepam foram determinadas em aparelho automático Mettler Toledo modelo FP90.

5.2.2.1.2 Espectrofotometria na região do infravermelho

Pesaram-se 150 mg de brometo de potássio (KBr) e 1,5 mg da amostra de diazepam. A amostra e o brometo de potássio foram misturados e triturados em gral de ágata; o pó foi transferido para pastilhador e a pastilha obtida analisada em espectrofotômetro de infravermelho Shimadzu FTIR – 8101.

5.2.2.2 Pureza

5.2.2.2.1 Perda por dessecação

Foi pesada, exatamente, cerca de 1 g de amostra e secada sob vácuo durante 4 horas em estufa a 60 °C. No máximo 0,5% (BP 2011). O procedimento foi repetido três dias.

5.2.2.2.2 Cinzas sulfatadas

A amostra foi submetida ao ensaio de cinzas sulfatadas conforme item 4.2.2.2.2. O procedimento foi repetido em três dias diferentes para exatamente, cerca de 1 g de amostra de diazepam.

5.2.2.2.3 Substâncias relacionadas

As fórmulas estruturais das duas impurezas do diazepam estão representadas na figura 8.

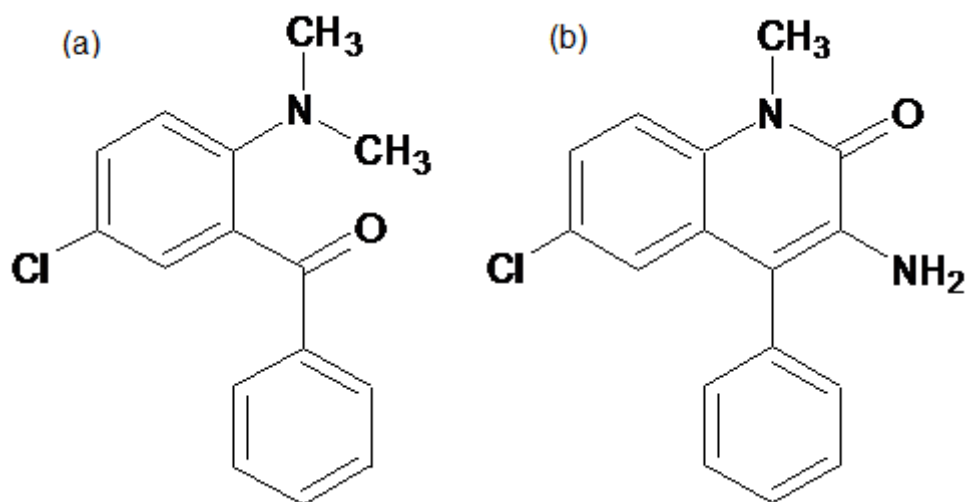


Figura 8. Impurezas do diazepam: (a) 2-metilamino-5-clorobenzofenona, e (b) 3-amino-6-cloro-1-metil-4-fenilcarbostiril.

5.2.2.2.3.1 Reagentes

Todos os reagentes empregados foram de grau analítico. A água milliQ foi obtida por meio do sistema de filtração Millipore®.

5.2.2.2.3.2 Condições Cromatográficas

A fase móvel foi consistida de uma mistura acetonitrila:metanol:água (2:1:2). Foi empregada coluna de 250 mm x 4,6mm, empacotada com sílica ligada a grupo octadecilsilano, diâmetro de partícula 5 µm, fluxo de 1,0 mL/min, detecção em 254 nm, volume de injeção de 20 µL (USP 34).

5.2.2.2.3.3 Solução Amostra

Foram pesados exatamente, cerca de 10 mg de amostra de diazepam em balão volumétrico de 10 mL, obtendo-se uma concentração de 1000 µg/mL de diazepam em metanol.

5.2.2.2.3.4 Preparo das curvas de calibração

Foram construídas curvas de calibração do fármaco diazepam e das impurezas A e B, com seis pontos de concentração compreendendo uma faixa de 0,1 µg/mL a 20 µg/mL, e correspondendo a um teor de 0,01 a 2% de impurezas na amostra. Foram pesados 5 mg de padrão de cada impureza e 5 mg do padrão do fármaco, diluídos em balão volumétrico de 50 mL, e com auxílio de bureta foram transferidas alíquotas de 0,5, 1, 5, 10 e 20 mL para balões volumétricos de 100 mL e completados com metanol. Da solução de 1 µg/mL foi retirada alíquota de 10 mL e transferida para balão volumétrico de 100 mL, e completado com metanol, obtendo-

se concentração de 0,1 µg/mL. Com isso foram geradas soluções com as concentrações de 0,1, 0,5, 1, 5, 10 e 20 µg/mL.

5.2.2.2.3.5 Adequabilidade do Sistema

Foram avaliados os parâmetros assimetria, resolução mínima entre os picos de diazepam e impurezas e repetibilidade das áreas dos picos de seis injeções de uma solução de adequabilidade contendo fármaco e impurezas.

5.2.2.3 Doseamento

O doseamento empregado para o diazepam foi o método presente na BP 2011, por volumetria em meio não-aquoso (VMNA).

Foram transferidos para erlenmeyer, exatamente, cerca de 200 mg de amostra de diazepam previamente dessecada. A amostra foi solubilizada com 50 mL de anidrido acético. Titulou-se a amostra com ácido perclórico 0,1 M SV.

O ponto final da reação foi determinado potenciométricamente pelo uso de potenciômetro Digimed DMPH-2 e eletrodo de vidro calomelano.

Os ensaios foram realizados com nove repetições e os desvios padrões relativos foram calculados.

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1 Identificação

5.3.1.1 Infravermelho

A comparação entre os espectros de infravermelho de amostra e padrão permitiu confirmar a identidade do fármaco. O espectro exibe uma banda na região de 1680 cm^{-1} , característica de duplas ligações entre átomos de carbono pertencentes a anel aromático.

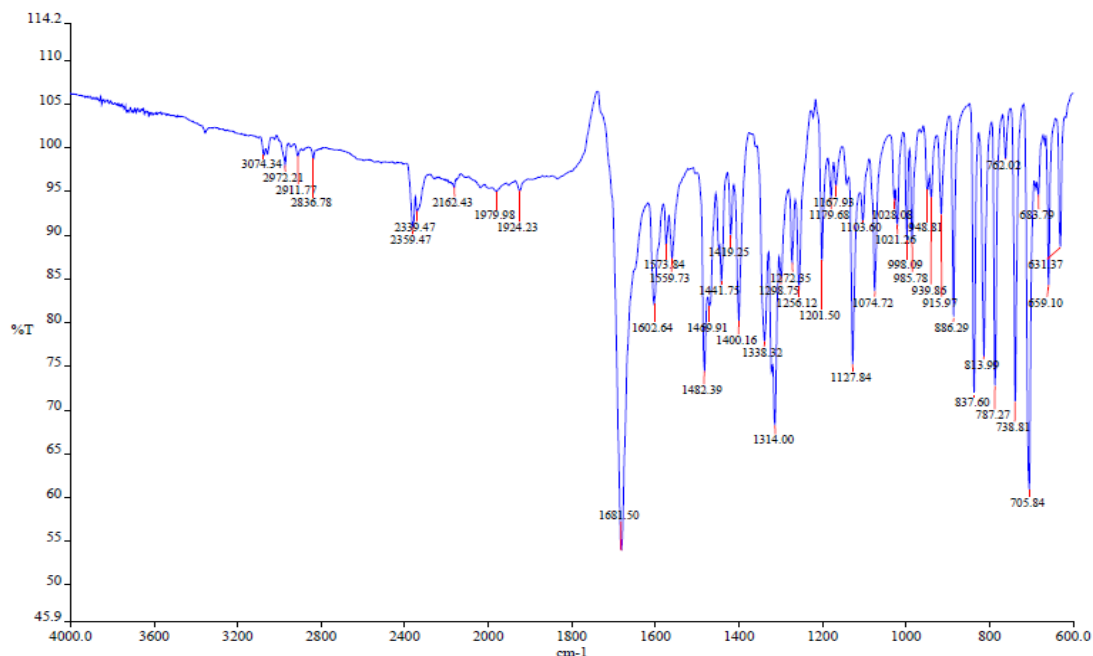


Figura 9. Espectro de infravermelho do diazepam

5.3.1.2 Faixa de fusão

A faixa de fusão foi de $132,3 \pm 0,30$ a $134,5 \pm 0,06$, para amostra e SQR, respectivamente, dentro da faixa especificada na USP 34.

5.3.2 Pureza

5.3.2.1 Perda por dessecação

Foi encontrado um resultado médio de três determinações de $(0,01 \pm 0,01)\%$.

5.3.2.2 Cinzas sulfatadas

Foi encontrado o seguinte resultado para o ensaio de cinzas sulfatadas ($0,01 \pm 0,01$)%.

5.3.2.3 Substâncias relacionadas

Não foram detectadas substâncias relacionadas na amostra de diazepam.

5.3.3 Doseamento

A Figura 10 apresenta cromatogramas por UV e CAD sobrepostos de solução de amostra de diazepam contaminada com impurezas, representativo do ensaio de substâncias relacionadas. Na Figura 11 estão os cromatogramas representativos de adequabilidade do sistema. Pode-se perceber que as respostas são diferentes para os dois detectores. Observou-se que a impureza B não apresenta resposta no CAD, o que decorre do fato de a mesma constituir um analito volátil. Nesse caso, o detector CAD não oferece vantagem com relação ao UV, pois na há melhora na uniformidade de resposta entre os analitos.

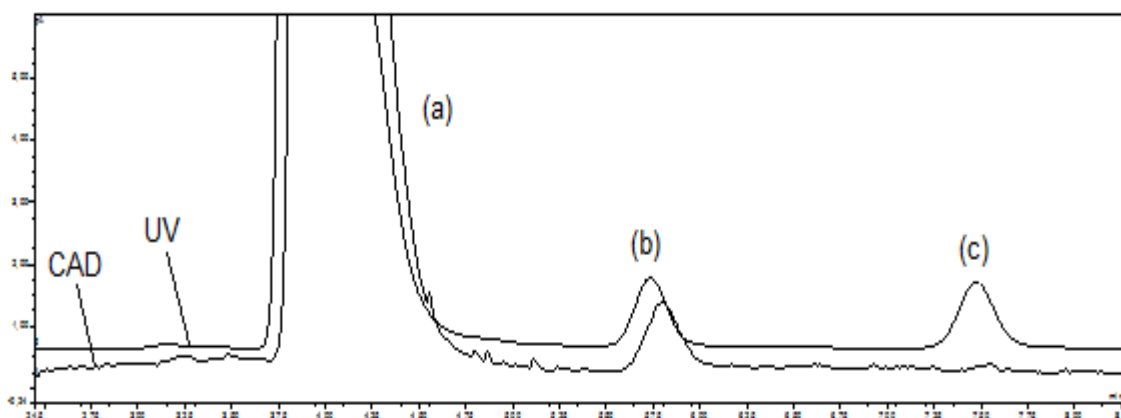


Figura 10. Cromatogramas sobrepostos de solução de amostra de diazepam contaminada com duas impurezas com detecção por UV e CAD. (a)Diazepam, (b) impureza A, (c) impureza B.

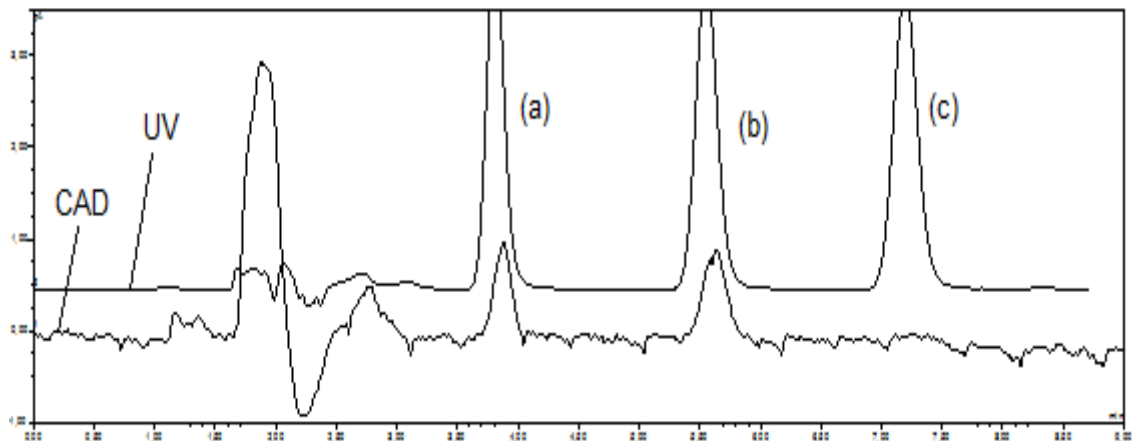


Figura 11. Cromatogramas sobrepostos de solução de adequabilidade do diazepam e suas impurezas com detecção no UV e CAD. (a) Diazepam, (b) impureza A, (c) impureza B.

As Tabelas 5 e 6 contêm os dados de adequabilidade e linearidade dos padrões de diazepam e impurezas para UV e CAD, respectivamente. Na Tabela 7 são apresentados os resultados de quantificação dos diferentes métodos e a comparação estatística entre os mesmos.

5.3.4 Análise comparativa dos métodos direto e indireto

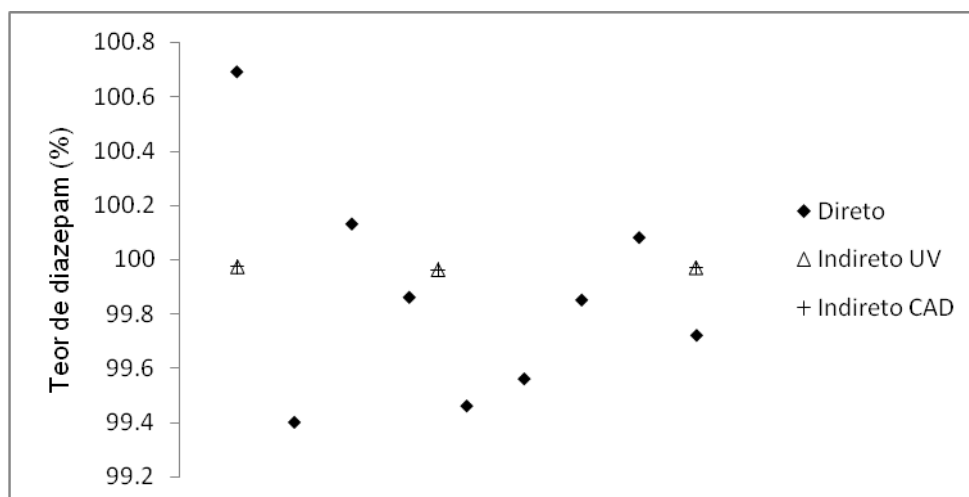


Figura 12. Distribuição de valores de quantificação para o fármaco diazepam pelos métodos direto e indireto

Pelo diagrama de distribuição dos resultados, representados na Figura 12, percebe-se a menor variação de resultados com o emprego do método indireto.

5.3.4.1 Método indireto:

5.3.4.1.1 Detecção por UV

Considerando a água presente na amostra, o teor médio encontrado foi:

$$\begin{aligned}\text{Teor}(\%) &= 100 - (0,01 \pm 0,01) - (0,02 \pm 0,01) \\ &= \mathbf{(99,97 \pm 0,01)}\end{aligned}$$

Ao se expressar o resultado como base anidra, tem-se:

$$\begin{aligned}\text{Teor}(\%) &= 100 - (0,01 \pm 0,00) \\ &= \mathbf{(99,98 \pm 0,01)}\end{aligned}$$

5.3.4.1.2 Detecção por CAD

Como a análise da amostra por CLAE não detectou impurezas orgânicas, subtraiu-se de 100 apenas o teor de voláteis e impurezas inorgânicas. O resultado para detecção por CAD é o mesmo que para o UV:

$$\begin{aligned}\text{Teor}(\%) &= 100 - (0,01 \pm 0,01) - (0,02 \pm 0,01) \\ &= \mathbf{(99,97 \pm 0,01)}\end{aligned}$$

O mesmo acontece com o resultado como base anidra:

$$\begin{aligned}\text{Teor (\%)} &= 100 - (0,01 \pm 0,00) \\ &= \mathbf{(99,98 \pm 0,01)}\end{aligned}$$

5.3.4.2 Método Direto

O resultado médio encontrado para o teor do fármaco diazepam pelo método volumétrico de doseamento foi:

$$\text{Teor (\%)} = \mathbf{(99,86 \pm 0,40)}$$

Ao se expressar o resultado como base anidra, tem-se:

$$\text{Teor (\%)} = \mathbf{(99,87 \pm 0,40)}$$

5.3.5 Fatores de resposta Impurezas/Fármaco

Os fatores de resposta das impurezas com relação ao fármaco foram calculados pela relação das áreas entre impureza e fármacos na mesma concentração (3 µg/mL).

Impureza A/Diazepam: 1,06 para o CAD e 1,05 para o UV. Ou seja, UV apresenta resposta relativa entre diazepam e impureza A semelhante à apresentada pelo CAD.

Impureza B/Diazepam: a impureza B não foi detectada pelo CAD. A relação das respostas entre impureza B e diazepam foi de 1,09 para o UV. Nesse caso o detector CAD não ofereceu vantagem sobre o detector UV.

6 GLIBENCLAMIDA

6.1 Descrição

A fórmula estrutural da glibenclamida está representada na Figura 12.

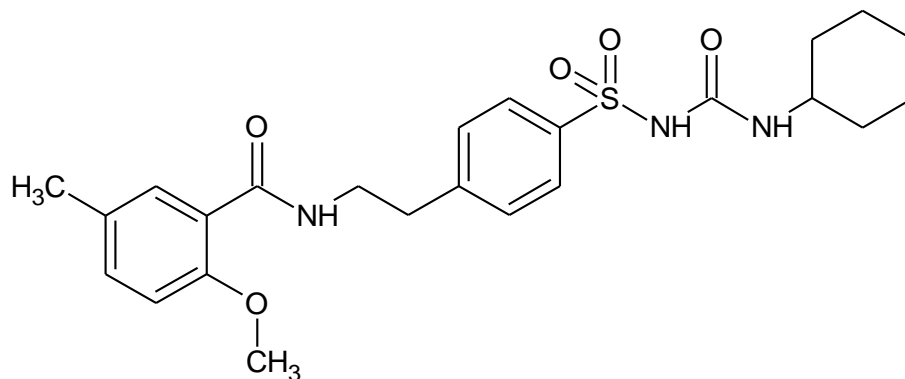


Figura 13. Fórmula estrutural do fármaco glibenclamida

Fórmula molecular: C₂₈H₂₇ClN₃O₅S

Massa molecular: 494,00

Nome químico: 5-Cloro-N-[2-[4-[[[(cicloexilamino)carbonil]amino]sulfonil]fenil]etil]-2-metoxibenzamida

CAS: 10238-21-8

Apresenta-se como pó cristalino, branco ou quase branco, inodoro ou quase inodoro. É praticamente insolúvel em água, pouco solúvel em etanol, metanol e clorofórmio e praticamente insolúvel em éter etílico.

6.2 Material e Métodos

6.2.1 Material

Como SQR foram empregados glibenclamida USP, glibenclamida substância relacionada A (5-cloro-2-metóxi-N-[2-(4-sulfamoilfenil)etil]benzamida, lote FOE224 e glibenclamida substância relacionada B (metil-[[4-[2-(5-cloro-2-metóxibenzoil)-amino]etil]fenil]sulfonil]carbamato] (Figura 14).

6.2.2 Métodos

6.2.2.1 Identificação

6.2.2.1.1 Faixa de fusão

A faixa de fusão da amostra de glibenclamida foi determinada em aparelho automático Mettler Toledo modelo FP90.

6.2.2.1.2 Espectrofotometria na região do infravermelho

Pesaram-se 150 mg de brometo de potássio (KBr) e 1,5 mg da amostra de glibenclamida, bem como da SQR. A amostra e o brometo de potássio foram misturados e triturados em gral de ágata; o pó foi transferido para pastilhador e a pastilha obtida analisada em espectrofotômetro de infravermelho Shimadzu FTIR – 8101.

6.2.2.2 Pureza

6.2.2.2.1 Perda por dessecação

A amostra foi dessecada em estufa a 105 °C, por 6 horas.

6.2.2.2.2 Cinzas sulfatadas

O teor de cinzas sulfatadas foi determinado em exatamente, cerca de 1 g da amostra, conforme item 4.2.2.2.2.

6.2.2.2.3 Substâncias relacionadas

As impurezas da glibenclamida apresentam fórmula molecular semelhante, diferindo em apenas um radical, como ilustrado na Figura 14 **Erro! Fonte de referência não encontrada.**

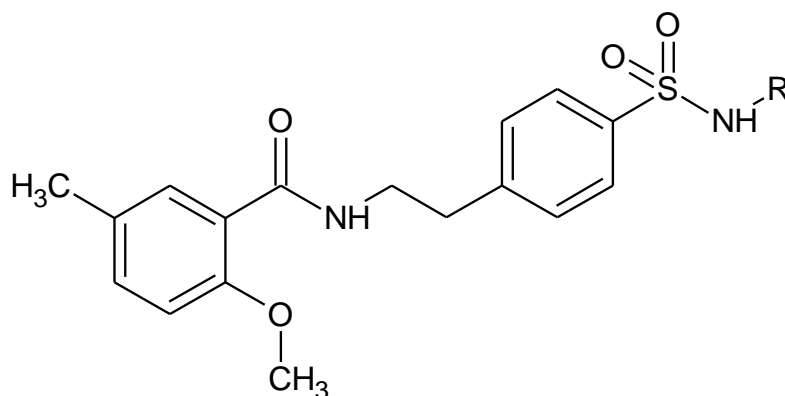


Figura 14. Impurezas da glibenclamida. A. R = H: 5-cloro-2-metóxi-N-[2-(4-sulfamoilfenil)etil]benzamida, B. R = CO-OCH₃: metil[[4-[2-[(5-cloro-2-metóxi)benzoil)amino]etil]fenil]sulfonil]carbamato

6.2.2.2.3.1 Reagentes

Foram empregados reagentes grau CLAE e água ultrapura foi obtida por sistema de filtração Millipore[®].

6.2.2.2.3.2 Fase móvel

Foi empregada uma mistura de acetonitrila e ácido acético ajustado a pH 3,0 (60:40).

6.2.2.2.3.3 Sistema cromatográfico

O doseamento foi efetuado utilizando cromatógrafo provido de detector 254 nm acoplado a detector CAD, coluna de 250 mm de comprimento e 4,0 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (5 µm), mantida à 30 °C, fluxo da fase móvel 1,0 mL por minuto.

6.2.2.2.3.4 Solução amostra

Foram transferidos, exatamente, cerca de 10 mg de amostra de glibenclamida para balão volumétrico de 10 mL, dissolvido em 5 mL de acetonitrila, completado com fase móvel e misturado de modo a obter concentração final de 1000 µg/mL.

6.2.2.2.3.5 Preparo das curvas de calibração

Foram construídas curvas de calibração do fármaco glibenclamida e das impurezas A e B, com seis pontos de concentração compreendendo uma faixa de 0,1 µg/mL a 20 µg/mL, e correspondendo a um teor de 0,01 a 2% de impurezas na amostra. Foram pesados 5 mg de padrão de cada impureza e 5 mg do padrão do fármaco, diluídos em balão volumétrico de 50 mL, e com auxílio de bureta foram transferidas alíquotas de 0,5, 1,0, 5,0, 10,0 e 20,0 mL para balões volumétricos de 100 mL e completados com metanol. Da solução de 1 µg/mL foi retirada alíquota de 5 mL e transferida para balão volumétrico de 50 mL, e completado com metanol, obtendo-se concentração de 0,1 µg/mL. Com isso foram geradas soluções com as concentrações de 0,1, 0,5, 1,0, 5,0, 10,0 e 20,0 µg/mL.

6.2.2.2.3.6 Adequabilidade do sistema cromatográfico

Foram avaliados os parâmetros de pratos teóricos (N), fator de cauda (A), DPR dos tempos de retenção e das áreas e resolução entre picos. Os testes de adequabilidade do sistema cromatográfico foram efetuados com seis replicatas de injeções de solução padrão.

6.2.2.3 Doseamento

O doseamento empregado para a glibenclamida foi o método presente na FB V, por volumetria em meio aquoso.

Foram transferidos para erlenmeyer, exatamente, cerca de 500 mg de amostra de glibenclamida. A amostra foi solubilizada com 100 mL de etanol aquecido. Titulou-se a amostra com hidróxido de sódio 0,1 M SV, utilizando fenolftaleína como indicador.

Os ensaios foram realizados com três repetições e os desvios padrões relativos foram calculados.

6.3 Resultados e Discussão

6.3.1 Identificação

6.3.1.1 Faixa de fusão

A faixa de fusão encontrada para a amostra ficou entre 169,2 °C e 171,5 °C, de acordo com as especificações da FB V.

6.3.1.2 Espectrofotometria no infravermelho

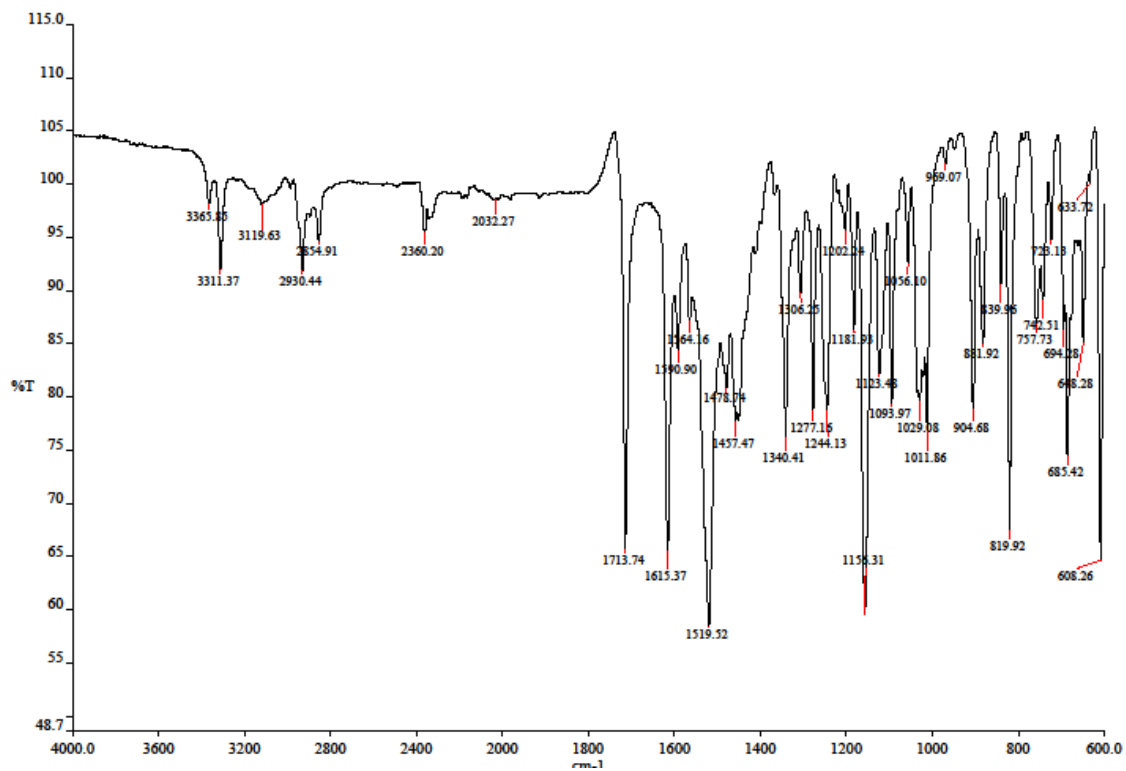


Figura 15. Espectro de infravermelho da glibenclamida

6.3.2 Pureza

6.3.2.1 Perda por dessecação

O resultado médio de três determinações encontrado para perda por dessecação na amostra de glibenclamida foi de $(0,35 \pm 0,02)\%$.

6.3.2.2 Cinzas sulfatadas

O resultado médio de três determinações encontrado para o ensaio de cinzas sulfatadas na amostra de glibenclamida foi de $(0,01 \pm 0,00)\%$.

6.3.2.3 Substâncias relacionadas

O resultados médios de nove determinações encontrados para o ensaio de substâncias relacionadas da amostra de glibenclamida foram de $(0,51 \pm 0,03)\%$ para a impureza A e de $(0,26 \pm 0,04)\%$ para a impureza B, considerando detecção por UV.

Para detecção por CAD, os resultados médios de nove determinações encontrados para o ensaio de substâncias relacionadas da amostra de glibenclamida foram de $(0,48 \pm 0,02)\%$ para a impureza A e de $(0,27 \pm 0,01)\%$ para a impureza B e $(0,06 \pm 0,01)\%$ para uma impureza desconhecida.

A Figura 16 apresenta cromatogramas por UV e CAD sobrepostos de solução de amostra de glibenclamida, representativo do ensaio de substâncias relacionadas. Pode-se perceber que o detector CAD exibe uma impureza não detectada pelo UV. Nesse caso, supõe-se que tal impureza não apresente grupo cromóforo e seja não-volátil. Embora seja uma impureza desconhecida, pode ser quantificada contra o padrão do fármaco, admitindo-se a resposta uniforme entre os analitos, proporcional à massa.

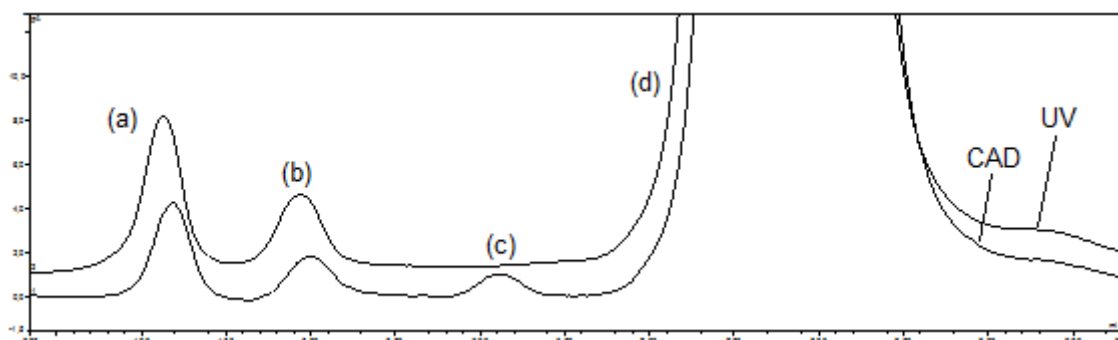


Figura 16. Cromatogramas sobrepostos de solução de amostra de glibenclamida contaminada com duas impurezas com detecção por UV e CAD. Condições cromatográficas: Coluna C-8 MN, fase móvel acetonitrila:ácido acético(50:50), detecção em 230nm. (a) Impureza A, (b) impureza B, (c) impureza desconhecida, (d) glibenclamida.

As tabelas 8 e 9 contêm os dados de adequabilidade e linearidade dos padrões de glibenclamida e impurezas para UV e CAD, respectivamente. Na Tabela 10 são apresentados os resultados de quantificação dos diferentes métodos e a comparação estatística entre os mesmos.

6.3.3 Análise comparativa dos métodos direto e indireto

Pelo diagrama de distribuição dos resultados, representados na Figura 17, percebe-se a menor variação de resultados com o emprego do método indireto.

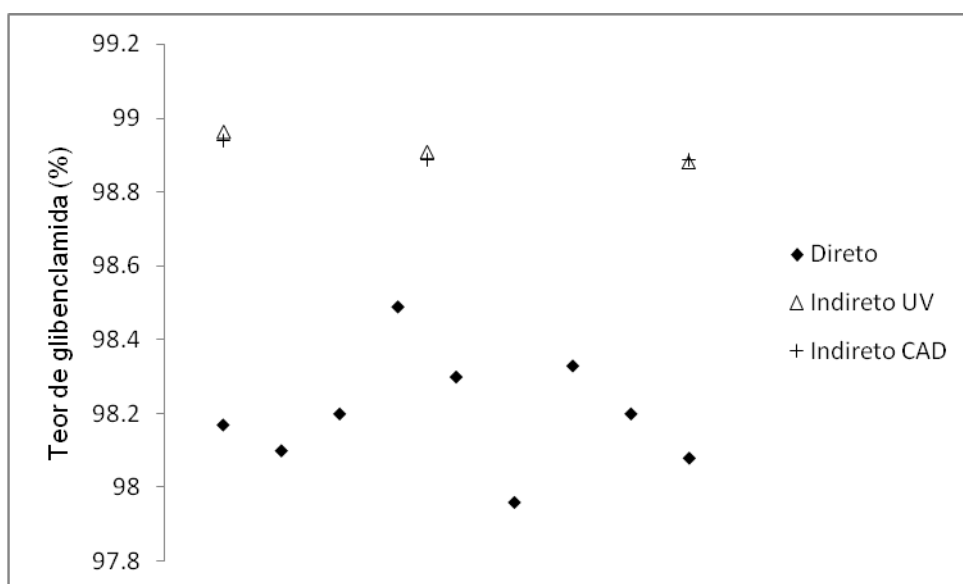


Figura 17. Diagrama de dispersão dos resultados de doseamento da glibenclamida com os diferentes métodos

6.3.3.1 Método indireto

6.3.3.1.1 Detecção por UV

Considerando a água presente na amostra, o teor médio encontrado foi:

$$\begin{aligned} \text{Teor (\%)} &= 100 - (0,26 \pm 0,02)\% - (0,01 \pm 0,01)\% - (0,51 \pm 0,03) - (0,26 \pm \\ &0,04)\% \\ &= \mathbf{(98,96 \pm 0,05)\%} \end{aligned}$$

Ao se expressar o resultado como base anidra, tem-se:

$$\begin{aligned} \text{Teor (\%)} &= 100 - (0,01 \pm 0,01)\% - (0,51 \pm 0,03) - (0,26 \pm 0,04)\% \\ &= \mathbf{(99,22 \pm 0,05)\%} \end{aligned}$$

6.3.3.1.2 Detecção por CAD

Considerando a água presente na amostra, o teor médio encontrado foi:

$$\begin{aligned} \text{Teor (\%)} &= 100 - (0,26 \pm 0,02)\% - (0,01 \pm 0,01)\% - (0,48 \pm 0,03) - (0,25 \pm \\ &0,04) - (0,06 \pm 0,01)\% \\ &= \mathbf{(98,94 \pm 0,05)\%} \end{aligned}$$

Ao se expressar o resultado como base anidra, tem-se:

$$\begin{aligned} \text{Teor (\%)} &= 100 - (0,01 \pm 0,01)\% - (0,48 \pm 0,03) - (0,25 \pm 0,04) - (0,06 \pm \\ &0,01)\% \\ &= \mathbf{(99,20 \pm 0,05)\%} \end{aligned}$$

6.3.3.2 Método direto

O resultado médio encontrado para o teor do fármaco glibenclamida pelo método volumétrico de doseamento foi de

Teor: **(98,20 ± 0,16)%**

Ao se expressar o resultado como base anidra, tem-se:

Teor: **(98,55 ± 0,16)%**

6.3.4 Fatores de resposta Impurezas/Fármaco

Os fatores de resposta das impurezas com relação à glibenclamida foram calculados pela relação das áreas entre impureza e glibenclamida na mesma concentração (2µg/mL).

Impureza A/glibenclamida: 0,72 para o CAD e 0,86 para o UV. Ou seja, UV apresenta resposta relativa entre glibenclamida e impureza A semelhante à apresentada pelo CAD.

Impureza B/Glibenclamida: a relação das respostas da impureza B/glibenclamida foi de 0,82 para o CAD e de 1,14 para o UV. Ou seja, não houve diferença importante entre os fatores de resposta entre os detectores CAD e UV.

Nesse caso, a vantagem da aplicação do detector CAD consiste na detecção da impureza C, não detectada pelo UV (Figura 15).

7.1 Descrição

A fórmula estrutural da estavudina está representada na Figura 17.

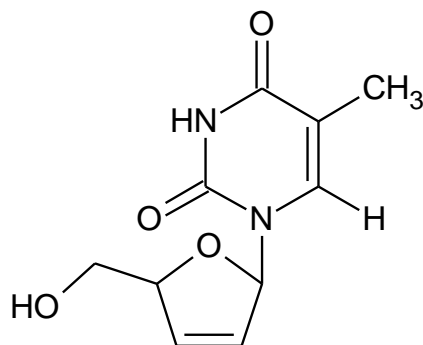


Figura 18. Fórmula estrutural do fármaco estavudina

Fórmula molecular: C₁₀H₁₂N₂O₄

Massa molecular: 224,21

Nome químico: 1-(2,3-Dideoxi-D-glicero-pent-2-enofuranosil)-5-metilpirimidina-2,4(1H,3H)-diona

CAS: 3056-17-5

7.2 Material e Métodos

7.2.1 Material

A SQR estavudina e as impurezas timidina, Sigma, lote 126k0678 e timina, Sigma, lote 057k1064 foram gentilmente cedidas pelo INCQS.

7.2.2 Métodos

7.2.2.1 Identificação

7.2.2.1.1 Espectroscopia no infravermelho

Pesaram-se 150 mg de brometo de potássio (KBr) e 1,5 mg da amostra de estavudina, bem como da SQR. A amostra e o brometo de potássio foram misturados e triturados em gral de ágata; o pó foi transferido para pastilhador e a pastilha obtida analisada em espectrofotômetro de infravermelho Shimadzu FTIR – 8101.

7.2.2.1.2 Cromatografia a líquido de alta eficiência

Foram comparados os tempos de retenção do pico principal da solução da amostra com o tempo de retenção do pico principal da solução padrão.

7.2.2.2 Pureza

7.2.2.2.1 Teor de umidade

O teor de umidade foi determinado pelo método de Karl Fisher. O equipamento empregado foi um titulador Schott Titroline KF. Foi empregada solução titulante de Karl Fisher da marca Vetec, lote 0700637/20, e álcool metílico PA da marca Nuclear, lote 10080944/2015.

7.2.2.2.2 Cinzas sulfatadas

O teor de cinzas sulfatadas foi determinado em exatamente, cerca de 1 g da amostra, conforme item 4.2.2.2.2.

7.2.2.2.3 Substâncias relacionadas.

As fórmulas moleculares das impurezas timina e timidina estão representadas na Figura 20.

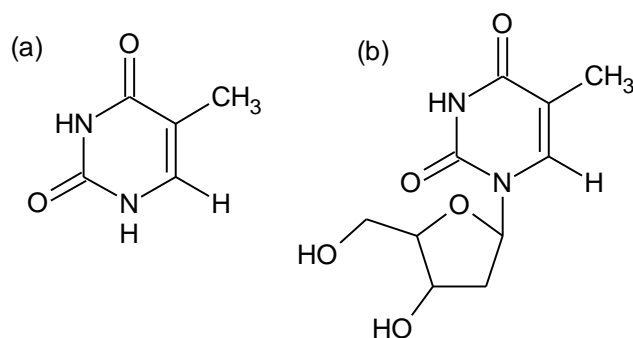


Figura 19. Fórmulas estruturais das impurezas (a) timina e (b) timidina.

7.2.2.3 Doseamento

O teor do fármaco foi determinado pelo método cromatográfico descrito na USP 34.

7.2.2.3.1 Solução amostra

Foram pesados, exatamente, cerca de 10 mg de estavudina matéria-prima em balão volumétrico de 50 mL, do qual foi retirada alíquota de 10 mL e transferida para

balão volumétrico de 100 mL, completado com água, obtendo-se concentração de 20 µg/mL.

7.2.2.3.2 Solução padrão

Foram pesados, exatamente, cerca de 10 mg de estavudina SQR em balão volumétrico de 50 mL, do qual foi retirada alíquota de 10 mL e transferida para balão volumétrico de 100 mL, completado com água, obtendo-se concentração de 20 µg/mL.

7.2.2.3.3 Fase móvel

A fase móvel foi consistida de acetonitrila:solução de acetato de amônio 0,77 mg/mL (5:95).

7.2.2.3.4 Sistema cromatográfico

Foi empregada coluna de 150 mm x 4,6mm, empacotada com sílica ligada a grupo octadecilsilano, diâmetro de poro 5 µm, fluxo de 0,7 ml/min, detecção em 254nm, volume de injeção de 20 µL.

7.3 Resultados e Discussão

7.3.1 Identificação

7.3.1.1 Espectroscopia no infravermelho

A comparação dos espectros de absorção no infravermelho de SQR e amostra permitiu admitir um resultado positivo para o teste de identificação.

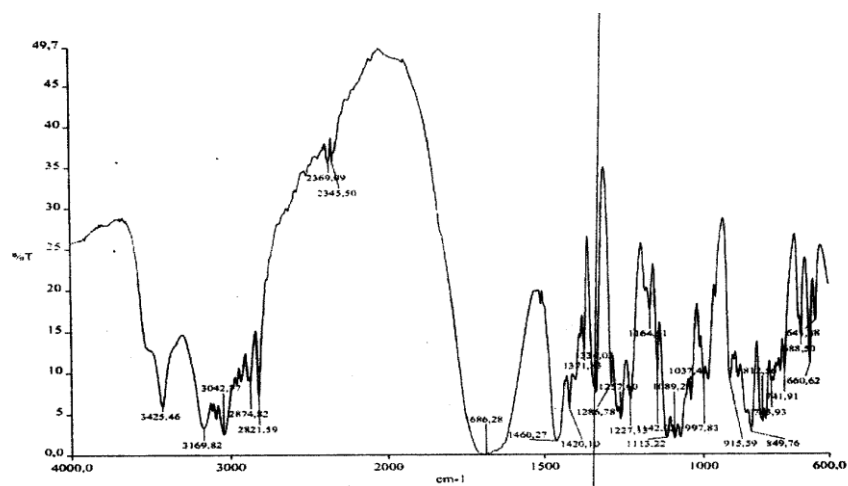


Figura 20 - Espectro no infravermelho para amostra de estavudina

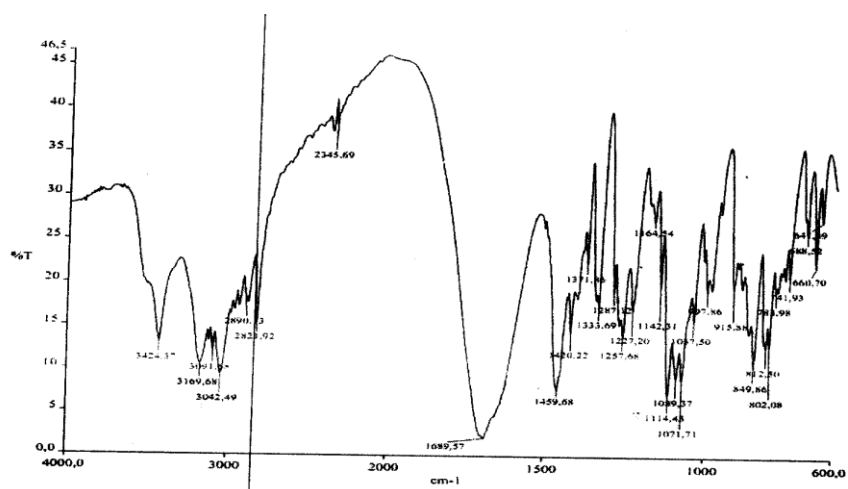


Figura 21 - Espectro no infravermelho para a estavudina SQR

7.3.2 Pureza

7.3.2.1 Cinzas sulfatadas

O teor de cinzas sulfatadas encontrado para a matéria-prima estavudina foi de $(0,03 \pm 0,01)\%$.

7.3.2.2 Umidade

O teor de umidade encontrado para a matéria-prima estavudina foi de $(0,36 \pm 0,02)\%$.

7.3.2.3 Substâncias relacionadas

O teor encontrado para a impureza timina foi de $(0,10 \pm 0,01)\%$ para detecção por UV e de $(0,07 \pm 0,02)\%$ para detecção pelo CAD.

A Figura 22 apresenta cromatogramas por UV e CAD sobrepostos de solução de amostra de estavudina contaminada com impurezas, representativo do ensaio de substâncias relacionadas. Pode-se perceber que as respostas são semelhantes para ambos os detectores. Nesse caso, o detector CAD não oferece vantagem com relação ao UV, pois na há melhora na resposta entre os analitos.

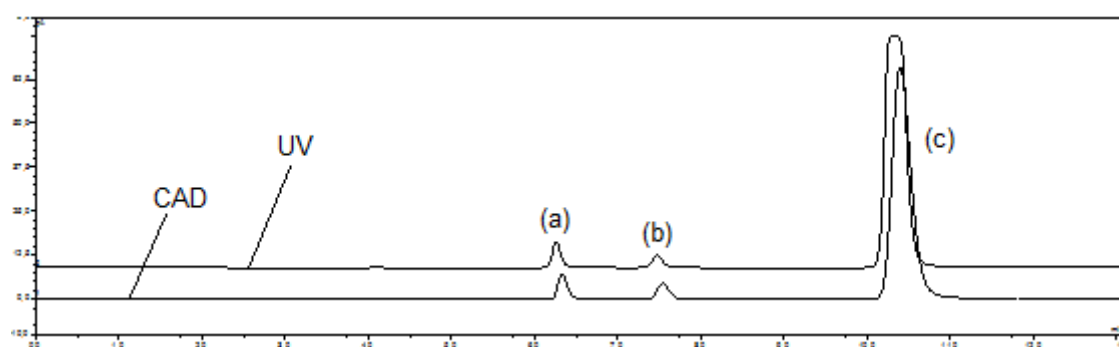


Figura 22. Cromatogramas sobrepostos de solução de adequabilidade da estavudina e de suas impurezas com detecção no UV e CAD. (a) Impureza A, impureza B e (c) estavudina.

As Tabelas 11 e 12 contêm os dados de adequabilidade e linearidade dos padrões de estavudina e impurezas para UV e CAD, respectivamente. Na Tabela 13

são apresentados os resultados de quantificação dos diferentes métodos e a comparação estatística entre os mesmos.

7.3.3 Análise comparativa dos métodos direto e indireto

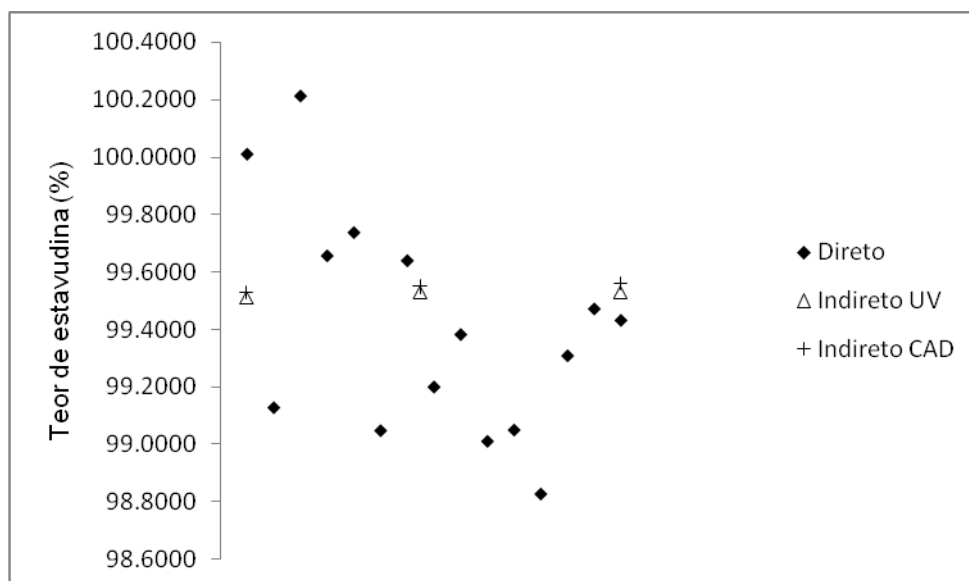


Figura 23. Diagrama de dispersão contendo os valores de doseamento para a estavudina por meio dos métodos direto e indireto

Os resultados encontrados atendem aos limites preconizados pela USP 34. Apesar disso, como demonstrado no diagrama de dispersão (Figura 23), percebe-se a maior variabilidade com o emprego do método direto, aumentando a probabilidade de obtenção de resultados fora da especificação.

7.3.3.1 Método indireto

7.3.3.1.1 Detecção por UV

Considerando a água presente na amostra, o teor médio encontrado foi:

$$100 - (0,35 \pm 0,02)\% - (0,03 \pm 0,01)\% - (0,1 \pm 0,01)\% =$$

$$\text{Teor: } \mathbf{(99,52 \pm 0,02)\%}$$

Ao se expressar o resultado como base anidra, tem-se:

$$100 - (0,03 \pm 0,01)\% - (0,1 \pm 0,01)\% =$$

$$\text{Teor: } \mathbf{(99,87 \pm 0,01)\%}$$

7.3.3.1.2 Detecção por CAD

Considerando a água presente na amostra, o teor médio encontrado foi:

$$100 - (0,36 \pm 0,02)\% - (0,03 \pm 0,01)\% - (0,07 \pm 0,01)\% -$$

$$= \mathbf{(99,55 \pm 0,02)\%}$$

Ao se expressar o resultado como base anidra, tem-se:

$$100 - (0,03 \pm 0,01)\% - (0,07 \pm 0,01)\%$$

$$= \mathbf{(99,90 \pm 0,01)\%}$$

7.3.3.2 Método direto

O resultado médio encontrado para o teor do fármaco estavudina pelo método direto de doseamento foi de:

(99,41 ± 0,39)%

Ao se expressar o resultado como base anidra, tem-se:

(99,77 ± 0,39)%

7.3.4 Fatores de resposta relativos impurezas/fármaco

Os fatores de resposta das impurezas com relação à estavudina foram calculados pela relação das áreas entre impureza e estavudina na mesma concentração (2µg/mL).

Timina/Estavudina: 0,81 para o CAD e 0,70 para o UV. Ou seja, UV apresenta resposta relativa entre estavudina e timina semelhante à apresentada pelo CAD.

Timidina/Estavudina: A relação das respostas da timidina/estavudina foi de 1,13 para o CAD e de 0,97 para o UV. Nesse caso, o detector CAD não ofereceu vantagem sobre o detector UV, já que não há diferença significativa entre as respostas de ambos os detectores para os diferentes analitos.

Logo, recomenda-se o método indireto a fim de se detectar uma variação no teor de diferentes lotes de fármaco, como por exemplo, nas mudanças dos fornecedores ou da via de síntese; e de pequenas alterações no rendimento do processo.

Além disso, o método indireto favorece o controle de qualidade focado na quantificação de impurezas, aumentando o número de informações sobre a matéria-

prima e controlando os efeitos adversos, que de outra forma, adviriam de níveis não adequados de impureza. Outra vantagem desse método é a de reduzir o número de resultados fora da especificação, pois o erro dos ensaios diretos representa uma grande porcentagem das especificações encontradas nas farmacopeias.

Por outro lado, quando é necessário agilidade na liberação de lotes nas análises de rotina, os ensaios de doseamento permanecem como alternativas mais adequadas, mesmo que os resultados individuais dos doseamentos diretos não representem uma informação definitiva sobre a qualidade das matérias-primas farmacêuticas.

8 CONCLUSÕES

Para as quatro substâncias analisadas, o método de balanço de massas apresentou resultados mais precisos do que o doseamento direto, o que o torna vantajoso para a quantificação dos fármacos.

Em relação ao fármaco nifedipino, o detector CAD não apresentou vantagens sobre o detector UV, tendo em vista que as impurezas apresentaram menores respostas em comparação com aquela do fármaco.

O detector CAD não detectou uma das impurezas do diazepam, de modo que seu uso não traz vantagens com relação ao do detector UV para a quantificação desse fármaco pelo método indireto.

O fármaco glibenclamida e suas impurezas foram detectadas por ambos os detectores, com uniformidades de respostas semelhantes. No entanto, o CAD permitiu a detecção de uma impureza não detectada pelo UV, o que torna seu uso vantajoso na quantificação do fármaco pelo método indireto.

Para a estavudina, o detector CAD não apresentou melhora de uniformidade entre as respostas do fármaco e de suas impurezas, de modo que seu uso não traz vantagens para a determinação do fármaco pelo método indireto.

O uso do CAD acoplado ao detector UV preenche uma importante lacuna na detecção de impurezas não-voláteis desprovidas de grupos cromóforos, além de representar uma ferramenta adicional ao estabelecimento do perfil de impurezas de fármacos.

BAERTSCHI, S.W. Analytical methodologies for discovering and profiling degradation-related impurities. *Trends in analytical chemistry*, v. 25, p. 758-767, 2006.

BAKSHI, M; SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods – critical review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 28, p. 1011-1040, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 29 de maio de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 57. Dispõe sobre o registro de insumos farmacêuticos ativos (IFA) e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, de 17 de novembro de 2009.

BRASIL. Farmacopéia Brasileira, 5ª Ed., volume 2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária: ANVISA, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para doadores de materiais candidatos a substância química de referência da Farmacopéia Brasileira (SQR-FB). Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeia/sqr.htm>>. Acesso em: julho de 2010.

BRASIL. Farmacopéia Brasileira. Comitês Técnicos Temáticos. Material de Referência – SQR. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/farmacopeiabrasileira/comites.htm>> Acesso em fevereiro de 2012.

BRITISH Pharmacopoeia 2011. London: The Stationery Office, 2011. v1.

BUNNEL, R.D. Using computer simulated results of a drug substance assay to determine acceptance criteria for method validation. *Pharmaceutical Research*, v. 14, p. 156-163, 1997.

CARAMASU, C.; MADICHIE, C.; WILLIAMS, R. Recent progress in the determination of volatile impurities in pharmaceuticals. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 25, p. 768-777, 2006.

DEJAEGHER, B; JIMIDAR, M.; DE SMET, M.; COCKAERTS, P.; SMEYERS-VERBEKE, J.; VANDER HEYDEN, Y. Improving method capability of a drug

substance HPLC assay. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 42, p. 155-170, 2006.

DIONEX, ESA. Corona Charged Aerosol Detector. Disponível em: <<http://www.dionex.com/en-us/webdocs/88700-Bro-Corona-CAD-Brochure-21Oct10-LPN2633.pdf>>. Acesso em março, 2012.

ERMER, J.; ARTH, C.; DE RAEVE, P.; DILL, D.; FRIEDEL, H.D.; HÖWERFRITZEN, H.; KLEINSCHMIDT, G.; KÖLLER, G.; KÖPPEL, H.; KRAMER, M.; MAEGERLEIN, M.; SCHEPERS, U.; WÄTZIG, H. Precision from drug stabilities studies. Investigation of reliable repeatability and intermediate precision of HPLC assay procedures. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 38, p. 653-666, 2005.

ERMER, J.; PLOSS, H.J.; Validation in pharmaceutical analysis. Part II: central importance of precision to establish acceptance criteria and for verifying and improving the quality of analytical data. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 37, p. 859-870, 2005.

GÖRÖG, S.; BIHARI, M.; CSIZÉR, É.; DRAVETZ, F.; GAZDAG, M.; HERÉNYI, B. Estimation of impurity profiles of drugs and related materials. Part 14: The role of HPLC/diode-array UV spectroscopy in the identification of minor components (impurities, degradation products, metabolites) in various matrices. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 14, p. 85-92, 1995.

GÖRÖG, S. Chemical and analytical characterization of related organic impurities in drugs. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 377, p. 852-862, 2003.

GÖRÖG, S. The sacred cow: the questionable role of assay methods in characterizing the quality of bulk pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 36, p. 931-937, 2005.

GÖRÖG, S. The importance and the challenges of impurity profiling in modern pharmaceutical analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 25, p. 755-757, 2006.

GÖRÖG, S. Drug safety, drug quality, drug analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 48, p. 247-253, 2008.

HOFER, J.D.; OLSEN, B. A.; RICKARD, E. C. Is HPLC assay for drug substance a useful quality control attribute? *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 44, p. 906-913, 2007).

HUTCHINSON, J.P.; JIANFENG, L.; FARREL, W.; GROEBER, E.; SZUCS, R.; DICINOSKI, G.; HADDAD, P.R. Universal response model for a corona charged aerosol detector. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, p.7418-7427, 2010.

ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Q2(R1). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005. Disponível em: <<http://www.ich.org/products/guidelines.html>>. Acesso em: fevereiro de 2012.

ICH Harmonised Tripartite Guideline. Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances. Q6A. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005. Disponível em: <<http://www.ich.org/products/guidelines.html>>. Acesso em: fevereiro de 2012.

ICH Harmonised Tripartite Guideline. Impurities in New Drug Substances. Q3A (R2). International Conference on Harmonisation, IFPMA, Geneva, 2006. Disponível em: <<http://www.ich.org/products/guidelines.html>>. Acesso em: fevereiro de 2012.

KRSTULOVIC, A. M.; LEE, C. R. Defining drug purity through chromatographic and related methods: current status and perspectives. *Journal of Chromatography B*, v. 689, p. 137-153, 1997.

NG, L.; LUNN, G.; FAUSTINO, P. Organic impurities in drug substance: origin, control, and measurement. In: SMITH, R.; WEBB, M. L. (Eds.). *Analysis of drug impurities*, ed. Oxford: Blackwell Publishing, p. 1-20, 2007.

OLSEN, B. A.; CASTLE, B. C.; MYERS, D. P. Advances in HPLC technology for the determination of drug impurities. *Trends in Analytical Chemistry*, v.25, p. 796-805, 2006.

NAGESWARA RAO, R.; NAGARAJU, V. An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 33, p. 335-377, 2003.

RENGER, B. System performance and variability of chromatographic techniques used in pharmaceutical quality control. *Journal of Chromatography B*, v. 745, p. 167-176, 2000.

SUN, P.; WANG, X.; ALQUIER, L.; MARYANOFF, C. A. Determination of relative response factors of impurities in paclitaxel with high performance liquid chromatography equipped with ultraviolet and charged aerosol detectors, v. 1177, p. 87-91, 2008.

USP 34. The United States Pharmacopeia. 34th ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2011.

VEHOVEC, T.; OBREZA, A. Review of operating principle and applications of the charged aerosol detector. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, p. 1549-1566, 2010.

WATSON, D. G. Control of the quality of analytical methods. In: WATSON, D. G. *Pharmaceutical Analysis. A textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists*, ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, p. 1-15, 2003.

Tabela 2 - Valores de adequabilidade do sistema e linearidade para o ensaio de substâncias relacionadas do nifedipino por UV

	Área	Tr ¹	A ²	N ³	R ⁴
Nifedipino					
Valor	8.167	12,33	1,06	3.936	-
DPR	0,67	0,23	0,27	1,13	-
Nitrofenilpiridina					
Valor	6.013	8,12	1,09	3.876	2,87
DPR	0,94	0,78	0,27	0,65	0,12
Nitrosofenilpiridina					
Valor	8.196	8,07	1,08	4.175	3,76
DPR	0,63	0,44	0,54	0,74	0,80
Linearidade do nifedipino					
Parâmetro	Valor		Valor do teste ⁵		
R ²	0,9997		-		
a ⁶	8,3668		<0,001		
b ⁷	0,06067		0,097		
Tratamentos ⁸	-		4359		
Regressão ⁹	-		2898		
Desvio da linearidade ¹⁰	-		0,09		
Independência ¹¹	-		1,588		
Homocedasticidade ¹²	-		0,41		
LQ ¹³	0,25		-		
LD ¹⁴	0,08		-		
Linearidade da Nitrofenilpiridina.					
Parâmetro	Valor		Valor do teste ⁵		
R ²	0,9995		-		
a ⁶	4,8493		<0,001		
b ⁷	0,5952		0,07		
Tratamentos ⁸	-		5.214		
Regressão ⁹	-		3.120		
Desvio da linearidade ¹⁰	-		1,26		
Independência ¹¹	-		1,396		
Homocedasticidade ¹²	-		0,23		
LQ ¹³	0,4		-		
LD ¹⁴	0,132		-		
Linearidade da Nitrosofenilpiridina.					
Parâmetro	Valor		Valor do teste ⁵		
R ²	0,9991		-		
a ⁶	5,7096		<0,001		
b ⁷	0,4422		0,09		
Tratamentos ⁸	-		5.439		
Regressão ⁹	-		2.470		
Desvio da linearidade ¹⁰	-		1,59		
Independência ¹¹	-		1,421		
Homocedasticidade ¹²	-		0,13		
LQ ¹³	0,33		-		
LD ¹⁴	0,11		-		

¹Tempo de retenção em minutos; ²Área; ³Número de pratos teóricos; ⁴Resolução; ⁵teste estatístico; ⁶coeficiente angular da equação da reta dada por $y = ax + b$, em μg ; ⁷intercepto da equação da reta; ⁸Valor de F calculado considerando-se $F_{tab(4/10)}=3,48$ para $p>0,05$; ⁹Valor de F calculado considerando-se $F_{tab(1/10)}=4,96$ para $p>0,05$; ¹⁰Valor de F calculado considerando-se $F_{tab(3/10)}=3,71$ para $p>0,05$; ¹¹Valor calculado de Durbin-Watson (d) onde $dL=1,077$ e $dU = 1,361$; ¹²Valor de p para o teste de Levene considerando $p>0,05$; ¹³Limite de quantificação em $\mu\text{g/mL}$; ¹⁴Limite de detecção em $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 3 - Valores de adequabilidade do sistema e linearidade para o ensaio de substâncias relacionadas do nifedipino por CAD

	Área	Tr ¹	A ²	N ³	R ⁴
Nifedipino					
Valor	0,314	12,40	1,09	4.401	-
DPR	0,69	0,51	0,33	0,13	-
Nitrofenilpiridina					
Valor	0,112	8,17	1,21	4.665	3,61
DPR	0,48	0,57	0,88	0,77	0,72
Nitrosofenilpiridina					
Valor	0,054	9,81	0,94	8.210	4,39
DPR	0,42	0,12	0,13	0,56	0,45
Linearidade do nifedipino					
Parâmetro	Valor		Valor do teste ⁵		
R ²	0,9994		-		
a ⁶	0,0104		<0,001		
b ⁷	-0,0476		0,074		
Tratamentos ⁸	-		4.203		
Regressão ⁹	-		2.966		
Desvio da linearidade ¹⁰	-		0,64		
Independência ¹¹	-		1,547		
Homocedasticidade ¹²	-		0,55		
LQ ¹³	5,8		-		
LD ¹⁴	2,3		-		
Linearidade da nitrofenilpiridina					
Parâmetro	Valor		Valor do teste ⁵		
R ²	0,9989		-		
a ⁶	0,0026		<0,001		
b ⁷	-0,0449		0,09		
Tratamentos ⁸	-		5.601		
Regressão ⁹	-		3.520		
Desvio da linearidade ¹⁰	-		1,22		
Independência ¹¹	-		1,390		
Homocedasticidade ¹²	-		0,44		
LQ ¹³	1,24		-		
LD ¹⁴	0,26		-		
Linearidade da nitrosofenilpiridina					
Parâmetro	Valor		Valor do teste ⁵		
R ²	0,9980		-		
a ⁶	0,0015		<0,001		
b ⁷	-0,0346		0,16		
Tratamentos ⁸	-		4.793		
Regressão ⁹	-		2.801		
Desvio da linearidade ¹⁰	-		1,44		
Independência ¹¹	-		1,391		
Homocedasticidade ¹²	-		0,26		
LQ ¹³	3,62		-		
LD ¹⁴	1,34		-		

¹Tempo de retenção em minutos; ²Área; ³Número de pratos teóricos; ⁴Resolução; ⁵teste estatístico; ⁶coeficiente angular da equação da reta dada por $y = ax + b$, em μg ; ⁷intercepto da equação da reta; ⁸Valor de F calculado considerando-se $F_{\text{tab}(4/10)}=3,48$ para $p>0,05$; ⁹Valor de F calculado considerando-se $F_{\text{tab}(1/10)}=4,96$ para $p>0,05$; ¹⁰Valor de F calculado considerando-se $F_{\text{tab}(3/10)}=3,71$ para $p>0,05$; ¹¹Valor calculado de Durbin-Watson (d) onde $dL=1,077$ e $dU = 1,361$; ¹²Valor de p para o teste de Levene considerando $p>0,05$; ¹³Limite de quantificação em ng; ¹⁴Limite de detecção em ng.

Tabela 4 - Comparação da quantificação entre os diferentes métodos para o nifedipino

LC-UV/direto				
		Média ¹		DPR ²
Dia 1		99,33		0,28
Dia 2		99,22		0,37
Dia 3		99,23		0,47
Média ³		99,26		
DPR ⁴		0,36		
LC-UV/indireto				
		Média ¹		DPR ²
Dia 1		99,1187		0,09
Dia 2		99,1482		0,03
Dia 3		99,1018		0,03
Média ³		99,1229		
DPR ⁴		0,06		
LC-CAD/indireto				
		Média ¹		DPR ²
Dia 1		99,1920		0,069
Dia 2		99,2535		0,12
Dia 3		99,2032		0,10
Média ³		99,2163		
DPR ⁴		0,09		
ANOVA ⁵				
Fonte de variação	SQ ⁶	gl ⁷	QM ⁸	p ⁹
Entre grupos	0,1120	2	0,0560	0,4586
Dentro dos grupos	2,3155	33	0,0702	
Total	2,4275	35		

Tabela 5 - Valores de adequabilidade do sistema e linearidade para o ensaio de substâncias relacionadas do diazepam por UV

	Área	Tr ¹	A ²	N ³	R ⁴
Diazepam					
Valor	3,500	3,81	1,11	3.032	5,71
DPR	0,52	0,67	0,34	0,14	0,84
Impureza 1					
Valor	3,907	5,55	1,09	4.393	4,65
DPR	0,26	0,25	0,63	0,48	0,55
Impureza 2					
Valor	4,126	7,20	1,08	5.954	-
DPR	0,89	0,74	0,57	0,94	-
Linearidade do diazepam					
Parâmetro	Valor		Valor do teste ⁵		
R ²	0,9980		-		
a ⁶	1,5748		<0,001		
b ⁷	0,1617		0,095		
Tratamentos ⁸	-		4.022		
Regressão ⁹	-		2.545		
Desvio da linearidade ¹⁰	-		0,59		
Independência ¹¹	-		1,522		
Homocedasticidade ¹²	-		0,29		
LQ ¹³	0,13		-		
LD ¹⁴	0,05		-		
Linearidade da impureza A					
Parâmetro	Valor		Valor do teste ⁵		
R ²	0,9999		-		
a ⁶	1,094		<0,001		
b ⁷	-0,0104		0,33		
Tratamentos ⁸	-		5.103		
Regressão ⁹	-		3.158		
Desvio da linearidade ¹⁰	-		0,12		
Independência ¹¹	-		1,396		
Homocedasticidade ¹²	-		0,24		
LQ ¹³	0,20		-		
LD ¹⁴	0,06		-		
Linearidade da impureza B					
Parâmetro	Valor		Valor do teste ⁵		
R ²	0,9998		-		
a ⁶	1,0582		<0,001		
b ⁷	-0,0187		0,29		
Tratamentos ⁸	-		5.647		
Regressão ⁹	-		2.236		
Desvio da linearidade ¹⁰	-		0,85		
Independência ¹¹	-		1,499		
Homocedasticidade ¹²	-		0,36		
LQ ¹³	0,19		-		
LD ¹⁴	0,05		-		

¹Tempo de retenção em minutos; ²Área; ³Número de pratos teóricos; ⁴Resolução; ⁵teste estatístico; ⁶coeficiente angular da equação da reta dada por $y = ax + b$, em μg ; ⁷intercepto da equação da reta; ⁸Valor de F calculado considerando-se $F_{\text{tab}(4/10)}=3,48$ para $p>0,05$; ⁹Valor de F calculado considerando-se $F_{\text{tab}(1/10)}=4,96$ para $p>0,05$; ¹⁰Valor de F calculado considerando-se $F_{\text{tab}(3/10)}=3,71$ para $p>0,05$; ¹¹Valor calculado de Durbin-Watson (d) onde $dL=1,077$ e $dU = 1,361$; ¹²Valor de p para o teste de Levene considerando $p>0,05$; ¹³Limite de quantificação em $\mu\text{g/mL}$; ¹⁴Limite de detecção em $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 6 - Valores de adequabilidade do sistema e linearidade para o ensaio de substâncias relacionadas do diazepam por CAD

	Área	Tr ¹	A ²	N ³	R ⁴
Diazepam					
Valor	0,176	3,88	0,96	3.207	5,74
DPR	0,20	0,31	0,66	0,43	0,75
Impureza 1					
Valor	0,110	5,63	0,96	4.447	-
DPR	0,99	0,56	0,47	0,72	-
Impureza 2					
Valor	-	-	-	-	-
DPR	-	-	-	-	-
Linearidade do diazepam					
Parâmetro	Valor		Valor do teste ⁵		
R ²	0,9989		-		
a ⁶	0,0062		<0,001		
b ⁷	0,0164		0,099		
Tratamentos ⁸	-		6.014		
Regressão ⁹	-		3.496		
Desvio da linearidade ¹⁰	-		0,11		
Independência ¹¹	-		1,402		
Homocedasticidade ¹²	-		0,26		
LQ ¹³	3,40		-		
LD ¹⁴	1,15		-		
Linearidade da impureza 1					
Parâmetro	Valor		Valor do teste ⁵		
R ²	0,9997		-		
a ⁶	0,0045		<0,001		
b ⁷	0,0059		0,16		
Tratamentos ⁸	-		5.480		
Regressão ⁹	-		3.700		
Desvio da linearidade ¹⁰	-		0,69		
Independência ¹¹	-		1,590		
Homocedasticidade ¹²	-		0,44		
LQ ¹³	4,3		-		
LD ¹⁴	1,5		-		

¹Tempo de retenção em minutos; ²Área; ³Número de pratos teóricos; ⁴Resolução; ⁵teste estatístico; ⁶coeficiente angular da equação da reta dada por $y = ax + b$, em μg ; ⁷intercepto da equação da reta; ⁸Valor de F calculado considerando-se $F_{tab(4/10)}=3,48$ para $p>0,05$; ⁹Valor de F calculado considerando-se $F_{tab(1/10)}=4,96$ para $p>0,05$; ¹⁰Valor de F calculado considerando-se $F_{tab(3/10)}=3,71$ para $p>0,05$; ¹¹Valor calculado de Durbin-Watson (d) onde $dL=1,077$ e $dU = 1,361$; ¹²Valor de p para o teste de Levene considerando $p>0,05$; ¹³Limite de quantificação em ng; ¹⁴Limite de detecção em ng.

Tabela 7 - Comparação da quantificação entre os diferentes métodos para o diazepam

Volumetria/direto				
		Média ¹		DPR ²
Dia 1		100,07		0,65
Dia 2		99,63		0,21
Dia 3		99,88		0,18
Média ³		99,79		
DPR ⁴		0,22		
Indireto				
		Média ¹		DPR ²
Dia 1		99,97		-
Dia 2		99,96		-
Dia 3		99,97		-
Média ³		99,97		
DPR ⁴		0,01		
ANOVA ⁵				
Fonte de variação	SQ ⁶	gl ⁷	QM ⁸	p ⁹
Entre grupos	0,0259	1	0,025883	0,6639
Dentro dos grupos	1,2916	10	0,129155	
Total	1,3174	11		

Tabela 8 - Valores de adequabilidade do sistema e linearidade para o ensaio de substâncias relacionadas da glibenclamida por UV

	Área	Tr ¹	A ²	N ³	R ⁴
Glibenclamida					
Valor	6,084	8,85	1,04	2.084	3,55
DPR	0,65	0,59	0,14	0,64	0,74
Impureza 1					
Valor	3,742	4,68	0,85	2.894	1,67
DPR	0,83	0,57	0,27	0,78	0,96
Impureza 2					
Valor	2,918	5,19	0,99	2.444	3,89
DPR	0,41	0,80	0,75	0,96	0,98
Linearidade da glibenclamida					
Parâmetro	Valor		Valor do teste ⁵		
R ²	0,9928		-		
a ⁶	1,0985		<0,001		
b ⁷	0,1187		0,096		
Tratamentos ⁸	-		4.558		
Regressão ⁹	-		2.269		
Desvio da linearidade ¹⁰	-		1,09		
Independência ¹¹	-		1,280		
Homocedasticidade ¹²	-		0,56		
LQ ¹³	0,18		-		
LD ¹⁴	0,06		-		
Linearidade da impureza 1					
Parâmetro	Valor		Valor do teste ⁵		
R ²	0,9949		-		
a ⁶	0,9943		<0,001		
b ⁷	-0,0609		0,10		
Tratamentos ⁸	-		5.241		
Regressão ⁹	-		3.449		
Desvio da linearidade ¹⁰	-		0,12		
Independência ¹¹	-		1,396		
Homocedasticidade ¹²	-		0,32		
LQ ¹³	0,22		-		
LD ¹⁴	0,07		-		
Linearidade da impureza 2					
Parâmetro	Valor		Valor do teste ⁵		
R ²	0,991		-		
a ⁶	1,2505		<0,001		
b ⁷	0,0296		0,19		
Tratamentos ⁸	-		6.258		
Regressão ⁹	-		3.960		
Desvio da linearidade ¹⁰	-		0,14		
Independência ¹¹	-		1,471		
Homocedasticidade ¹²	-		0,10		
LQ ¹³	0,20		-		
LD ¹⁴	0,07		-		

¹Tempo de retenção em minutos; ²Área; ³Número de pratos teóricos; ⁴Resolução; ⁵teste estatístico; ⁶coeficiente angular da equação da reta dada por $y = ax + b$, em μg ; ⁷intercepto da equação da reta; ⁸Valor de F calculado considerando-se $F_{tab(4/10)}=3,48$ para $p>0,05$; ⁹Valor de F calculado considerando-se $F_{tab(1/10)}=4,96$ para $p>0,05$; ¹⁰Valor de F calculado considerando-se $F_{tab(3/10)}=3,71$ para $p>0,05$; ¹¹Valor calculado de Durbin-Watson (d) onde $dL=1,077$ e $dU = 1,361$; ¹²Valor de p para o teste de Levene considerando $p>0,05$; ¹³Limite de quantificação em $\mu\text{g/mL}$; ¹⁴Limite de detecção em $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 9 - Valores de adequabilidade do sistema e linearidade para o ensaio de substâncias relacionadas da glibenclamida por CAD

	Área	Tr ¹	A ²	N ³	R ⁴
Glibenclamida					
Valor	0,410	8,90	0,98	2.153	-
DPR	0,71	0,44	0,57	0,88	-
Impureza 1					
Valor	0,357	4,74	0,96	2.359	1,43
DPR	0,68	0,75	0,19	0,63	0,67
Impureza 2					
Valor	0,251	5,24	0,99	1.856	3,69
DPR	0,59	0,74	0,92	0,47	0,60
Linearidade da glibenclamida					
Parâmetro	Valor		Valor do teste ⁵		
R ²	0,9996		-		
a ⁶	0,0062		<0,001		
b ⁷	0,0164		0,072		
Tratamentos ⁸	-		5.210		
Regressão ⁹	-		3.109		
Desvio da linearidade ¹⁰	-		0,75		
Independência ¹¹	-		1,430		
Homocedasticidade ¹²	-		0,51		
LQ ¹³	20,9		-		
LD ¹⁴	6,93		-		
Linearidade da impureza 1					
Parâmetro	Valor		Valor do teste ⁵		
R ²	0,9971		-		
a ⁶	0,0045		<0,001		
b ⁷	0,0059		0,4484		
Tratamentos ⁸	-		5.373		
Regressão ⁹	-		2.796		
Desvio da linearidade ¹⁰	-		0,54		
Independência ¹¹	-		1,403		
Homocedasticidade ¹²	-		0,32		
LQ ¹³	22,1		-		
LD ¹⁴	7,6		-		
Linearidade da impureza 2					
Parâmetro	Valor		Valor do teste ⁵		
R ²	0,9982		-		
a ⁶	0,004		<0,001		
b ⁷	- 0,0139		0,12		
Tratamentos ⁸	-		6.470		
Regressão ⁹	-		2.879		
Desvio da linearidade ¹⁰	-		0,23		
Independência ¹¹	-		1,7903		
Homocedasticidade ¹²	-		0,27		
LQ ¹³	21,8		-		
LD ¹⁴	7,3		-		

¹Tempo de retenção em minutos; ²Área; ³Número de pratos teóricos; ⁴Resolução; ⁵teste estatístico; ⁶coeficiente angular da equação da reta dada por $y = ax + b$, em μg ; ⁷intercepto da equação da reta; ⁸Valor de F calculado considerando-se $F_{tab(4/10)}=3,48$ para $p>0,05$; ⁹Valor de F calculado considerando-se $F_{tab(1/10)}=4,96$ para $p>0,05$; ¹⁰Valor de F calculado considerando-se $F_{tab(3/10)}=3,71$ para $p>0,05$; ¹¹Valor calculado de Durbin-Watson (d) onde $dL=1,077$ e $dU = 1,361$; ¹²Valor de p para o teste de Levene considerando $p>0,05$; ¹³Limite de quantificação em ng; ¹⁴Limite de detecção em ng.

Tabela 10 - Comparação da quantificação entre os diferentes métodos para a glibenclamida

Volumetria/direto				
		Média		DPR ²
Dia 1		98,16		0,05
Dia 2		98,25		0,27
Dia 3		98,09		0,31
Média ³		98,17		
DPR ⁴		0,03		
LC-UV/indireto				
		Média ¹		DPR ²
Dia 1		98,96		0,11
Dia 2		98,91		0,04
Dia 3		98,88		0,06
Média ³		98,92		
DPR ⁴		0,04		
LC-CAD/indireto				
		Média ¹		DPR ²
Dia 1		98,94		0,11
Dia 2		98,89		0,11
Dia 3		98,89		0,05
Média ³		98,90		
DPR ⁴		0,03		
ANOVA ⁵				
Fonte de variação	SQ ⁶	gl ⁷	QM ⁸	p ⁹
Entre grupos	1,8064	2	0,9032	0,0000
Dentro dos grupos	0,1987	12	0,0166	
Total	2,0051	14		

Tabela 11 - Valores de adequabilidade do sistema e linearidade para o ensaio de substâncias relacionadas da estavudina por UV

	Área	Tr ¹	A ²	N ³	R ⁴
Estavudina					
Valor	0,480	10,67	1,07	18.798	--
DPR	0,77	0,34	0,25	0,46	--
Timina					
Valor	0,768	6,39	1,18	18.030	5,84
DPR	0,54	0,95	0,58	0,97	0,83
Timidina					
Valor	0,472	7,64	1,12	16.482	10,99
DPR	0,29	0,82	0,61	0,74	0,88
Linearidade da estavudina					
Parâmetro	Valor		Valor do teste ⁵		
R ²	0,9992		-		
a ⁶	1,0985		<0,001		
b ⁷	0,1187		0,15		
Tratamentos ⁸	-		5.072		
Regressão ⁹	-		2.988		
Desvio da linearidade ¹⁰	-		0,26		
Independência ¹¹	-		1,400		
Homocedasticidade ¹²	-		0,191		
LQ ¹³	0,18		-		
LD ¹⁴	0,06		-		
Linearidade da impureza 1					
Parâmetro	Valor		Valor do teste ⁵		
R ²	0,9984		-		
a ⁶	0,9943		<0,001		
b ⁷	-0,0609		0,78		
Tratamentos ⁸	-		5.203		
Regressão ⁹	-		2.592		
Desvio da linearidade ¹⁰	-		0,36		
Independência ¹¹	-		1,687		
Homocedasticidade ¹²	-		0,163		
LQ ¹³	0,18		-		
LD ¹⁴	0,06		-		
Linearidade da impureza 2					
Parâmetro	Valor		Valor do teste ⁵		
R ²	0,9991		-		
a ⁶	1,2505		<0,001		
b ⁷	0,0296		0,13		
Tratamentos ⁸	-		5.310		
Regressão ⁹	-		2.930		
Desvio da linearidade ¹⁰	-		0,65		
Independência ¹¹	-		1,499		
Homocedasticidade ¹²	-		0,36		
LQ ¹³	0,20		-		
LD ¹⁴	0,07		-		

¹Tempo de retenção em minutos; ²Área; ³Número de pratos teóricos; ⁴Resolução; ⁵teste estatístico; ⁶coeficiente angular da equação da reta dada por $y = ax + b$, em μg ; ⁷intercepto da equação da reta; ⁸Valor de F calculado considerando-se $F_{\text{tab}(4/10)}=3,48$ para $p>0,05$; ⁹Valor de F calculado considerando-se $F_{\text{tab}(1/10)}=4,96$ para $p>0,05$; ¹⁰Valor de F calculado considerando-se $F_{\text{tab}(3/10)}=3,71$ para $p>0,05$; ¹¹Valor calculado de Durbin-Watson (d) onde $dL=1,077$ e $dU = 1,361$; ¹²Valor de p para o teste de Levene considerando $p>0,05$; ¹³Limite de quantificação em $\mu\text{g/mL}$; ¹⁴Limite de detecção em $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 12 - Valores de adequabilidade do sistema e linearidade para o ensaio de substâncias relacionadas da estavudina por CAD

	Área	Tr ¹	A ²	N ³	R ⁴
Estavudina					
Valor	0,008	10,75	0,90	32.412	-
DPR	0,96	0,74	0,54	0,85	-
Timina					
Valor	0,013	6,46	1,11	20.016	6,46
DPR	0,23	0,81	0,39	0,98	0,66
Timidina					
Valor	0,009	7,71	0,99	22.617	10,45
DPR	0,71	0,97	0,44	1,12	0,69
Linearidade da estavudina					
Parâmetro					
R ²		0,9936		-	
a ⁶		0,0062		<0,001	
b ⁷		0,0164		0,077	
Tratamentos ⁸		-		4.985	
Regressão ⁹				3.112	
Desvio da linearidade ¹⁰		-		0,39	
Independência ¹¹		-		1,431	
Homocedasticidade ¹²		2,89		0,89	
LQ ¹³		0,70		-	
LD ¹⁴		0,9936		-	
Linearidade da impureza 1					
Parâmetro		Valor		Valor do teste ⁵	
R ²		0,9997		-	
a ⁶		0,0045		<0,001	
b ⁷		0,0059		0,59	
Tratamentos ⁸				5.502	
Regressão ⁹				3.421	
Desvio da linearidade ¹⁰				0,81	
Independência ¹¹				1,580	
Homocedasticidade ¹²				0,40	
LQ ¹³		4,31		-	
LD ¹⁴		1,56		-	
Linearidade da impureza 2					
Parâmetro		Valor		Valor do teste ⁵	
R ²		0,9990		-	
a ⁶		0,004		<0,001	
b ⁷		-0,0139		0,49	
Tratamentos ⁸				4.883	
Regressão ⁹				3.207	
Desvio da linearidade ¹⁰				0,93	
Independência ¹¹				1,695	
Homocedasticidade ¹²				0,18	
LQ ¹³		3,69		-	
LD ¹⁴		1,23		-	

¹Tempo de retenção em minutos; ²Área; ³Número de pratos teóricos; ⁴Resolução; ⁵teste estatístico; ⁶coeficiente angular da equação da reta dada por $y = ax + b$, em μg ; ⁷intercepto da equação da reta; ⁸Valor de F calculado considerando-se $F_{tab(4/10)}=3,48$ para $p>0,05$; ⁹Valor de F calculado considerando-se $F_{tab(1/10)}=4,96$ para $p>0,05$; ¹⁰Valor de F calculado considerando-se $F_{tab(3/10)}=3,71$ para $p>0,05$; ¹¹Valor calculado de Durbin-Watson (d) onde $dL=1,077$ e $dU = 1,361$; ¹²Valor de p para o teste de Levene considerando $p>0,05$; ¹³Limite de quantificação em ng; ¹⁴Limite de detecção em ng.

Tabela 13 - Comparação da quantificação entre os diferentes métodos para a estavudina

LC-UV/direto				
		Média ¹		DPR ²
Dia 1		99,75		0,41
Dia 2		99,26		0,26
Dia 3		99,22		0,28
Média ³		99,41		
DPR ⁴		0,39		
LC-UV/indireto				
		Média ¹		DPR ²
Dia 1		99,51		0,0426
Dia 2		99,53		0,0289
Dia 3		99,53		0,0922
Média ³		99,52		
DPR ⁴		0,01		
LC-CAD/indireto				
		Média ¹		DPR ²
Dia 1		99,53		0,0511
Dia 2		99,55		0,0890
Dia 3		99,56		0,0866
Média ³		99,55		
DPR ⁴		0,02		
ANOVA ⁵				
Fonte de variação	SQ ⁶	gl ⁷	QM ⁸	p ⁹
Entre grupos	0,0703	2	0,0352	0,7460
Dentro dos grupos	2,1260	18	0,01181	
Total	2,1964	20		