

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE PRODUÇÃO E CONTROLE DE MEDICAMENTOS
DISCIPLINA DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA

ANÁLISE QUANTITATIVA DE DULOXETINA E 1-NAFTOL POR
CROMATOLOGRAFIA ELETROKINÉTICA MICELAR
(Quantitative Analysis of Duloxetine and 1-Naphthol by Micellar Electrokinetic
Chromatography)

Nathalie Ribeiro Wingert

Porto Alegre, julho de 2010.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE PRODUÇÃO E CONTROLE DE MEDICAMENTOS
DISCIPLINA DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA

ANÁLISE QUANTITATIVA DE DULOXETINA E 1-NAFTOL POR
CROMATOGRAFIA ELETROKINÉTICA MICELAR
(Quantitative Analysis of Duloxetine and 1-Naphthol by Micellar Electrokinetic
Chromatography)

Apresentado por Nathalie Ribeiro Wingert

Trabalho de Conclusão da Disciplina de Estágio Curricular em Farmácia

Orientador: Prof. Dr. Martin Steppe

Co-orientadora: MSc. Aline Barth

Porto Alegre, julho de 2010.

A formatação deste trabalho segue as normas estabelecidas pela revista a qual ele será submetido, o Journal of Separation Science.

Análise Quantitativa de Duloxetina e 1-Naftol por Cromatografia Eletrocinética Micelar
(Quantitative Analysis of Duloxetine and 1-Naphthol by Micellar Electrokinetic
Chromatography)

Nathalie Wingert^{1*}, Aline Barth^{1,2}, Patrícia Gomes³, Elfrides Shapoval^{1,2}, Martin Steppe^{1,2}.

1. Laboratório de Ensino e Pesquisa em Controle de Qualidade de Medicamentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.
2. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.
3. Curso de Farmácia, Centro Universitário Franciscano (UNIFRA), Santa Maria, RS, Brazil.

RESUMO

A duloxetine (DLX) é um inibidor seletivo da recaptação de serotonina e noradrenalina, usualmente utilizado no tratamento do transtorno depressivo maior. 1-Naftol (NPH) é uma impureza tóxica produzida quando o fármaco é exposto ao meio ácido e também procedente do material de síntese da DLX. Um método indicativo de estabilidade foi desenvolvido e validado por cromatografia eletrocínética micelar para determinação simultânea de DLX e NPH, utilizando cimetidina como padrão interno. As análises foram feitas em capilar de sílica fundida (40 cm comprimento efetivo). Os melhores resultados foram encontrados com um eletrólito composto por Tris e SDS, pH ajustado em 10,6, temperatura do capilar de 25 °C e voltagem aplicada de 25 kV. As amostras injetadas por força hidrodinâmica de 50 mbar durante 5 s, as detecções foram realizadas por detector de fotodiodo ajustado em 231 nm. O método demonstrou-se linear, com $r=0.9999$ para DLX e NPH. A seletividade do método foi determinada pela análise do placebo da DLX e de sua exposição a meios de degradação. Nenhuma interferência foi verificada. O método proposto foi desenvolvido e validado com sucesso para a análise quantitativa de DLX e NPH, sendo sensível, preciso, exato e robusto, podendo assim ser aplicado no controle de qualidade da DLX e para assegurar que o NPH não ultrapasse as quantidades limites.

ABSTRACT

Duloxetine (DLX) is a selective orally administered serotonin and norepinephrine reuptake inhibitor usually used in the treatment of major depressive disorder. 1-Naphthol (NPH) is a toxic impurity produced when the drug is exposed to acid medium and also it proceeds from the synthesis material. A simple and rapid stability indicating micellar electrokinetic chromatography method was developed and validated for the simultaneous determination of DLX and NPH, using cimetidine as internal standard. The method was performed with a fused-silica capillary (effective length: 40 cm). Optimum results were obtained with Tris and SDS background electrolyte at pH 10.6, capillary temperature of 25 °C and applied voltage of 25 kV. The samples were injected hydrodynamically for 5 s at 50 mbar and detections were done by photodiode array detector set at 231 nm. The selectivity was performed through the analysis of the DLX placebo solution and the exposition to degradation media. No interference in the DLX migration was verified. The linearity of the method obtained $r=0.9999$ for both molecules. Also, adequate results for accuracy, limits of detection and quantification, precision and robustness were obtained. The proposed method was successfully applied for the quantitative analysis of DLX and NPH. The developed method can be applied to routine quality control of DLX and to assure that the NPH do not exceed the allowed amounts.

INTRODUÇÃO

O cloridrato de duloxetine é um inibidor seletivo da recaptação de serotonina e noradrenalina no sistema nervoso central. É empregado na terapia atual para o tratamento do transtorno depressivo maior e da dor neuropática periférica diabética [1, 2]. A duloxetine (DLX) tem apresentado resultados promissores no tratamento auxiliar da fibromialgia [3] e da incontinência urinária de estresse [4]. DLX é comercializada como enantiômero puro (S)-DLX em cápsulas contendo 60 mg do fármaco em pellets com revestimento gastrorresistente. DLX (Figura 1a) é uma amina secundária de fórmula molecular $C_{18}H_{19}NO$ com pKa no valor de 9,6 [5].

A aplicação da eletroforese capilar (CE) na análise de medicamentos tem aumentado nos últimos anos e inclui análise de fármacos, separação quiral, análise de excipientes farmacêuticos e determinação de impurezas relacionadas a medicamentos [6]. Separações por CE são geralmente mais eficientes, podem ser realizadas em menor tempo e exigem volumes para injeção de amostra em nanolitros [7]. A necessidade de amostras em pequenas quantidades, o baixo consumo de reagentes e solventes orgânicos, além do reduzido custo das análises, fazem da CE uma técnica economicamente viável e promotora de menores danos ambientais.

Métodos cromatográficos têm sido relatados para a análise de DLX, alguns com estudos da matéria-prima e da forma farmacêutica [8, 9] e diversos com fluidos biológicos [10 - 16], empregando diferentes condições de análise. Uma publicação relevante na análise quiral de DLX pela CE foi feita pelo fabricante do medicamento [17]. A análise de DLX no plasma humano foi quantificada pela CE com detector de fluorescência [18]. No entanto, nenhuma análise de DLX por cromatografia eletrocínética capilar micelar (MEKC) foi publicada.

Considerando que a presença de impurezas nas formulações farmacêuticas pode conduzir a diversos efeitos adversos e até mesmo intoxicação, o controle sob a composição final dos medicamentos comercializados é um procedimento analítico decisivo. Os guias do ICH Q3A

[19] e Q3B [20] fornecem informações importantes com relação aos estudos e análises quantitativas necessárias para novos medicamentos. Para efeitos regulatórios, as impurezas são classificadas em diferentes grupos (impurezas orgânicas, impurezas inorgânicas e solventes residuais). As impurezas orgânicas podem surgir durante o processo de fabricação e/ou o armazenamento do medicamento. Matérias-primas e produtos de degradação são consideradas impurezas orgânicas que devem ser analisadas por procedimento analítico validado (a partir de 0,1% para dose diária máxima de 1,0 g).

O 1-naftol (NPH) (Figura 1b), um ácido fraco com pKa de 9,30 [21], apresenta efeito citotóxico para as células hepáticas, levando à morte dos hepatócitos através do esgotamento da glutathiona intracelular [22-25]. O NPH e seus metabólitos podem induzir atividade carcinogênica no tecido intestinal e nos linfócitos humanos [26, 27, 28]. Além de ser um produto de degradação por hidrólise ácida, NPH é também uma impureza do 1-fluoro naftaleno, um dos principais compostos de síntese da DLX [29], reforçando a necessidade de um método que quantifique o medicamento na presença de seu principal produto de degradação. A determinação das impurezas de síntese e dos produtos de degradação da DLX foi descrito através de cromatografia líquida de fase reversa (LC-RP) e espectrometria de massas, mas apenas alguns deles verificaram a presença de NPH dentre as impurezas analisados [29, 30, 31], em outros estudos a análise do NPH não foi realizada [32, 33, 34]. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi desenvolver e validar um método indicativo de estabilidade por MEKC para a DLX e o seu principal produto de degradação, garantindo a qualidade e segurança do produto final.

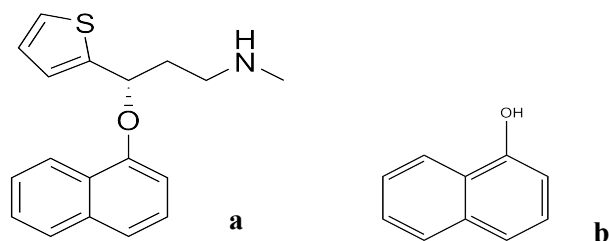


Figura 1. Estrutura química da duloxetina (a) e do 1-naftol (b).

2. Metodologia

2.1 Reagentes e Substâncias Químicas

A substância química de referência (SQR) da duloxetina (98,5%) foi obtida pela EcoChem Internacional (Copenhague, Dinamarca), a SQR da cimetidina, aplicada como padrão interno (PI), foi fornecida pela USP (Rockville, EUA). Cymbalta[®] (Eli Lilly and Company, Indianapolis, EUA) contendo cápsulas de 60 mg de duloxetina por dose, foram obtidas de fontes comerciais. Os excipientes contidos na forma farmacêutica (hipromelose, acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulose, sacarose, talco, dióxido de titânio e citrato de trietila) foram todos de grau farmacêutico e adquiridos de distribuidores diferentes. (Hidroximetil) aminometano (Tris) e NPH foram comprados da Nuclear (São Paulo, Brasil). A acetonitrila (ACN) e o metanol (MET) de grau HPLC utilizados procediam da Merck (Darmstadt, Alemanha). Dodecilsulfato de sódio (SDS) foi adquirido da Synth (São Paulo, Brasil). A água foi purificada através do sistema Milli-Q (Millipore, Bradford, E.U.A.).

2.2 Equipamentos

Os experimentos foram realizados em um aparelho da Agilent^{3D}CE system (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha), equipado com um detector de arranjo de diodos (DAD), injetor de amostra automática, sistema de controle de temperatura (4-60 ° C) e fonte de alimentação capaz de fornecer até 30 kV. A aquisição e análise de dados foi feita pelo *software* ChemStation CE (Agilent Technologies).

Para medições de pH, o medidor de pH Digimed DM 20 (São Paulo, Brasil) foi empregado. O eletrólito e as amostras foram filtrados através de filtros de 0,45 µm da Millex HV (Millipore, Bradford, USA).

2.3 Soluções

2.3.1 Preparação das soluções de estoque

Soluções padrão de estoque de DLX (2,50 mg/mL) foram preparadas em ACN. Estas soluções foram transferidas para balões volumétricos âmbar, a fim de proteger da luz. Após a dissolução, as soluções foram filtradas através de um filtro com membrana de 0,45 µm e mantidos sob refrigeração. Soluções estoque de cimetidina (PI) (2,0 mg/mL) eram preparadas diariamente em MET seguindo os mesmos procedimentos descritos acima (exceto pela refrigeração). NPH solução estoque foi dissolvido com MET até uma concentração de 100 µg/mL. Para as análises, alíquotas das soluções estoque de DLX, adicionada de NPH e PI eram diluídos em água.

2.3.2 Preparação das soluções amostra

Para preparar as soluções amostra de DLX (2,5 mg/mL), pellets com revestimento gastrorresistente contendo cloridrato de duloxetina (correspondente a 60 mg de duloxetina) foram pesados e triturados até pó fino. Quantidades adequadas transferidas para balões volumétricos âmbar e diluídas com o ACN. As suspensões resultantes eram filtradas para remover os excipientes insolúveis e uma segunda filtração realizada através de filtro com membrana de 0,45 µm. Para as análises, alíquotas adequadas das soluções amostra de DLX, adicionadas de NPH e PI eram diluídas em água.

2.3.3 Preparação do eletrólito

O eletrólito otimizado foi preparado pesando-se separadamente quantidades de Tris e SDS seguido pela dissolução em água ultrapura. O pH foi ajustado para 10,6 por adição de NaOH 0,1 M. O eletrólito era preparado diariamente e filtrado através de membrana de 0,45 µm.

2.4 Procedimento eletroforético

Os experimentos foram realizados com um capilar de sílica fundida (Agilent Technologies, Alemanha) de 50 µm de diâmetro interno e 48,5 cm de comprimento total (40 cm de comprimento efetivo). Antes da primeira utilização, o capilar foi condicionado por uma lavagem com NaOH 1,0 M durante 45 min, em seguida, com água por 15 min. No início de cada dia de trabalho o capilar era lavado com NaOH 0,1 M por 15 min, água por 10 minutos e depois ambientado com o eletrólito por 10 min. Para evitar alterações no fluxo eletro-osmótico (EOF) e, conseqüentemente, no tempo de migração, na eficiência e na seletividade [35], após cada três injeções o capilar era recondicionado com NaOH 0,1 M por 7 min e água por 5 min, o eletrólito substituído por uma nova solução. As amostras foram injetadas utilizando pressão hidrodinâmica de 50 mbar por 5 s. As detecções por UV eram realizadas em 231 nm. A temperatura do capilar foi mantida em 25 ° C e a tensão aplicada de 25 kV.

2.5 Validação do método

A validação do método proposto foi realizada seguindo os parâmetros analíticos: seletividade, linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), precisão, exatidão e robustez para DLX e NPH, quando apropriado, de acordo com as diretrizes do ICH [36, 37].

2.5.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada por dois tipos de experimentos. O primeiro foi realizado para avaliar a interferência dos excipientes contidos no produto farmacêutico nas migrações da DLX, do NPH e do PI. A mistura dos excipientes foi produzida conforme as concentrações usuais [38]. A solução dos excipientes foi preparada segundo o mesmo procedimento para amostra de DLX, descrito em 2.3.2.

No segundo experimento, os protocolos de degradação forçada foram realizados para avaliar as condições de análise para estudo de estabilidade de DLX e garantir que os produtos

gerados não interferem no tempo de migração da DLX. Soluções estoque contendo 1,0 mg/mL do fármaco foram preparadas em ACN para os estudos de degradação. Aliquotas apropriadas foram diluídas nos meios de degradação, HCl 0,1 M, NaOH 1 M e H₂O₂ 6% de acordo com o estudo, até uma concentração final de 500 µg/mL. Estas soluções foram submetidas a aquecimento a 70 °C. Os estudos de hidrólise foram realizadas em NaOH 1 M por 120 min e em HCl 0,1 M por 60 min. Depois de intervalos de tempo pré-determinados, alíquotas das soluções eram retiradas e neutralizado com HCl e NaOH, respectivamente. A degradação por oxidação foi realizada em H₂O₂ 6% por 60 min. Para as análises por MEKC, alíquotas adequadas das soluções acima foram misturadas com 50 µL de solução de PI (2,0 mg/mL) e diluídas com água até uma concentração teórica de DLX de 250 µg/mL.

No estudo de degradação por radiação UV-C direta (254 nm) foi realizada a exposição da solução de DLX em ACN (2,5 mg/mL) por até 120 minutos, em temperatura ambiente, em uma câmara de fotoestabilidade (1,0 x 0,12 x 0,17 m) com espelhos e equipada com lâmpadas UV-C (Ecolume ZW ®, 254 nm, 15 W). Solução aquosa de DLX SQR (2,5 mg/mL) foi utilizada no estudo de degradação térmica. A solução foi exposta a 60 °C, em estufa com temperatura controlada, por até 72 horas. Para as análises em MEKC, 100 µL das soluções de DLX citadas acima foram adicionadas de 50 µL de PI (2,0 mg/ml) e diluídas com água até 250 µg/mL (teórica) e 100 µg/mL, respectivamente.

A pureza dos picos de DLX e dos produtos de degradação detectados nos eletroferogramas foi determinada pelas ferramentas do *software* Agilent Chemstation.

2.5.2 LOD e LOQ

Os limites de detecção e de quantificação foram obtidos a partir da técnica do sinal-ruído, sendo o ruído de fundo obtido após a injeção da solução branco. Os valores de LOD e LOQ foram determinados experimentalmente com seis repetições, utilizando a relação sinal-ruído de 3:1 e 10:1, respectivamente.

2.5.3 Linearidade

A linearidade foi avaliada pela análise da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e pela análise da variância (ANOVA) ($\alpha = 0,05$). Para o cumprimento do modelo linear, foram construídas três retas, com sete concentrações cada.

2.5.4 Precisão

A precisão do método para a determinação de DLX e NPH foi verificado através das análises de repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (inter-dia). Os resultados foram expressos como desvio padrão relativos (DPR). A repetibilidade do método foi verificada através da análise de seis preparações independentes da amostra no mesmo dia, nas mesmas condições experimentais. A precisão intermediária do método foi avaliada através da realização da análise em três dias diferentes (inter-dia) sendo uma delas feita por outro analista, no mesmo laboratório. As amostras foram preparadas a partir de soluções estoque de DLX (2,5 mg/mL), NPH (100 µg/mL) e IS (2,0 mg/mL), cuja concentração final foi obtida pela diluição em água. O resultado foi uma mistura de DLX (250 µg/mL) com NPH (2,5 µg/mL) e PI (100 µg/mL) incorporados.

2.5.5 Exatidão

A exatidão do método foi determinada através do ensaio de recuperação das amostras, utilizando-se quantidades conhecidas de DLX e NPH, ambas SQR. Para o método por MEKC, alíquotas da solução de DLX (2,0 µg/mL) e da solução de NPH (100 µg /mL) foram adicionadas às soluções amostra contendo um quantidade fixa de DLX (200 µg/mL) com NPH (2,0 µg/mL) e PI (100 µg/mL) incorporados, correspondendo a um aumento nas concentrações de análise de 25, 50 e 75% (n = 3, para cada concentração adicionada). A exatidão foi calculada como a porcentagem de fármaco e de impureza adicionadas que foram recuperados da solução da amostra.

2.5.6 Robustez

A robustez do método foi determinada pela análise do efeito de pequenas mudanças nas condições de análise. As variações foram realizadas na temperatura do capilar (± 2 °C), na tensão aplicada (± 2 kV), no pH do eletrólito ($\pm 0,2$), e nas concentrações de Tris (± 2 mM) e SDS (± 2 mM). Os parâmetros eletroforéticos (tempo de migração, fator de cauda, resolução, pratos teóricos) e a repetibilidade foram avaliados utilizando tanto solução amostra como padrão de DLX adicionada de NPH e PI.

2.5.7 Adequação do sistema

Os testes de adequação do sistema foram realizados para garantir que o sistema eletroforético e o método desenvolvido são capazes de fornecer dados de qualidade, com base nas diretrizes da USP 2009 [39]. A adequação do sistema foi verificada através da avaliação dos parâmetros obtidos para as soluções padrão de DLX e NPH, tais como: pratos teóricos, tempo de migração, fator de cauda e resolução. Estes parâmetros foram verificados em diferentes dias da validação do método, calculados através do *software* Agilent Chemstation.

3. Resultados e discussão

3.1 Otimização das condições eletroforéticas

Neste estudo, vários eletrólitos foram testados a fim de obter um método com alta sensibilidade e baixo tempo de análise. Além disso, a influência de diferentes parâmetros analíticos na resolução entre os picos, corrente elétrica gerada e simetria dos picos, foram considerados para aperfeiçoar o método.

Eletroforese capilar em solução livre (FSCE) com baixo pH é a primeira opção para compostos básicos, a condição de FSCE foi testada usando soluções de fosfato e Tris, ambas em diferentes concentrações. Considerando que a DLX é instável em soluções de pH inferior a 2,50 [40], os valor de limite mínimo para o pH dos eletrólitos testados foi de 3,0. Os

resultados obtidos apresentaram parâmetros analíticos de baixa qualidade, como reduzida resolução entre os picos e elevado tempo de migração. Em todas as variações testadas, a intensidade dos picos e os fatores de cauda obtidos foram considerados inadequados.

MEKC é uma técnica que utiliza soluções com tensoativos iônicos formadores de micelas, e tornou-se uma das técnicas mais populares para a separação de moléculas neutras [41]. A partir desta técnica diferentes eletrólitos começaram a ser avaliados. Considerando que o pKa da DLX é 9,6, o pH do eletrólito deve ser superior para permitir que as moléculas fiquem em suas formas não ionizadas, desta maneira foi estabelecido um pH de 10,6 para o eletrólito. Foram testados os sais borato, tetraborato e Tris em diferentes concentrações, utilizando sempre SDS como tensoativo aniônico.

A tensão de 25 kV permitiu análises em tempo curto com corrente adequada. As soluções injetadas com 50 mbar por 5 segundos e a temperatura do capilar fixada em 25 °C apresentaram valores adequados de resolução e tempo de análise.

3.2 Seleção de padrão interno

O uso de um padrão interno é recomendado para análises quantitativas para corrigir possíveis erros gerados por variações no volume de injeção, na tensão aplicada e no EOF [42]. Diversos fármacos foram investigados como padrão interno antes da início do processo de validação.

As substâncias testadas foram: sitagliptina, hidrocortisona, imipramina, eritromicina, rosiglitazona, cimetidina e hidroclorotiazida. Para escolher o melhor PI, além da observação da absorção e da resolução entre os picos, estudos de proporcionalidade foram realizados com as substâncias que demonstraram comportamentos mais promissores. A cimetidina apresentou absorvância adequada no comprimento de onda selecionado e boa resolução de seu pico em relação aos dos analitos, possuindo também os menores valores de DPR e maior valor de r^2 , sendo um indicativo preliminar da linearidade.

3.3 Validação do método

3.3.1 Seletividade

A interferência dos excipientes da formulação farmacêutica foi determinada pela injeção de uma solução contendo os excipientes, não havendo interferência nas migrações da DLX, do NPH e do PI.

A exposição das soluções de amostra DLX a radiação UV-C (254 nm) causou rápida fotólise do fármaco, gerando pico de impureza detectável e redução na concentração da DLX.

Para a degradação térmica da SQR, a temperatura foi fixada em 60 °C. Após 48 horas a concentração DLX teve uma redução significativa e gerou produtos de degradação detectáveis.

Soluções de DLX em ACN foram expostas aos meios ácido (0,1 M HCl), básico (NaOH 1,0 M) e oxidativo (H₂O₂ 6%), todos em temperatura de 70 °C por até 2 h. Somente as degradações nos meios ácido e oxidativo resultaram na redução na concentração de DLX. Em meio básico a amostra de DLX permaneceu intacta.

Foi realizada a análise de alguns produtos de degradação produzidos durante os estudos, através da comparação entre os picos detectados e o do NPH (SQR), através dos tempos de migração e da sobreposição dos espectros de UV gerados. Através da semelhança dos tempos da migração e da sobreposição dos espectros é possível sugerir alguns dos produtos de degradação detectados correspondem ao NPH.

3.3.2 LOD e LOQ

Os limites de detecção obtidos para DLX e NPH e de quantificação para a impureza foram abaixo de 1,0 µg/mL. O fármaco obteve um LOQ de 1,45 µg/mL. Como o NPH apresenta maior absorção em 231 nm, seus os valores de LOD e LOQ foram menores do que os obtidos para a DLX, o que é um fator importante, considerando que o composto deve ser analisado como uma impureza, presente em concentrações reduzidas.

3.3.3 Linearidade

Sob as condições ideais de análise, a linearidade foi estudada na faixa de concentração de 50-550 µg/mL para DLX. O estudo de linearidade foi realizado para o NPH a partir de 0,55 µg/mL até 5,5 µg/mL. A linearidade foi calculada através da construção de três curvas de calibração para cada composto, cada solução contendo DLX, NPH e IS em diferentes concentrações (n=7). Neste estudo levaram-se em consideração as diretrizes dos guias analíticos ICH [19] e USP 32 [39] com relação à presença de impurezas para determinar as concentrações de NPH no intervalo das curvas de linearidade. Uma vez que a dose máxima diária de NPH não é especificada em uma monografia individual, o valor de 1% de NPH em relação à concentração DLX foi considerado como concentração-alvo para o presente estudo. No entanto, a maioria dos estudos publicados até o momento não padronizaram a concentração da impureza em relação à do fármaco, nem seguiram as recomendações de guias de validação [43]. A proporção de áreas dos picos (DLX / IS e NPH / IS) foi escolhida para traçar a curva de calibração. Conforme calculado pela análise da regressão linear, o método apresentou linearidade adequada ($r = 0,9999$), tanto para o fármaco quanto para a impureza. Os dados da linearidade foram avaliados pela ANOVA, que demonstrou regressão linear significativa ($p < 0,05$) e desvio da linearidade não significativo ($p > 0,05$).

3.3.4 Precisão

A determinação da precisão do método por MEKC foi realizada utilizando as soluções amostra de DLX adicionadas de NPH e IS. A repetibilidade e a precisão intermediária tiveram seus resultados expressos em DPR, variando de 0,75-1,42 % para a DLX e de 0,52-1,24 % para o NPH nas análises intra-dia. Na análise inter-dia os valores foram de 0,47 % e de 0,81 % para fármaco e impureza, respectivamente. Os valores de DPR obtidos abaixo de 2,0 % demonstram que o método desenvolvido tem precisão adequada para a análise da forma farmacêutica.

3.3.5 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através de medidas de recuperação em três níveis (25%, 50% e 75%) das soluções padrão de DLX e NPH, que foram adicionados a solução da amostra de DLX com NPH e IS incorporados. Os valores médios de recuperação para DLX estão entre 99,25-102,26% e 101,23-102,13% para o NPH, o que satisfaz os critérios de aceitação para o estudo.

3.3.6. Robustez

Pequenas, mas deliberadas variações em alguns dos mais importantes parâmetros, tais como temperatura do capilar, tensão aplicada, pH da solução de eletrólitos, e concentração do Tris e do SDS foram realizados a fim de verificar a robustez do método. As percentagens de fármaco e impureza quantificados foram avaliadas, sempre em comparação com os valores obtidos em condições normais de análise, e estão abaixo do desvio padrão máximo (DPR <2%). As condições de tempo de migração, número de pratos teóricos e resolução entre os picos foram também analisadas com relação a valores em condições usuais, e não foram encontradas diferenças significativas, permanecendo os valores adequados para esses parâmetros analíticos. Esses resultados asseguram a capacidade do método de permanecer inalterado após as variações aplicadas.

3.3.7 Adequação do sistema

As análises das SQR do fármaco e da impureza foram realizadas durante a rotina de validação, nas condições experimentais desenvolvidas. Os valores aproximados dos parâmetros para a análise DLX foram: um único pico da droga em 3,69 min, 57.800 pratos teóricos e 1,25 de fator de cauda. Os valores aproximados dos parâmetros para a análise NPH foram: tempo de migração de 2,60 min, 215.100 pratos teóricos e 0,82 de fator de cauda. O valor de resolução entre os picos de DLX e NPH foi de 25,52 e entre o NPH e PI, de 9,24.

4. Conclusão

Pode ser visto que a detecção e quantificação de impurezas relacionadas com fármacos utilizando MEKC têm sido extensivamente estudadas nos últimos anos. O desempenho do método e os dados de validação adquiridos demonstram claramente que a análise por MEKC pode ser aplicada com sucesso na quantificação de fármacos, produzindo resultados iguais ou superiores àqueles por RP-LC.

O método desenvolvido mostrou-se sensível, específico, robusto, linear, preciso e exato para a determinação de DLX em cápsulas e sua impureza mais significativa, o NPH.

Além das análises de rotina em controle de qualidade, o método por MEKC pode ser aplicado no desenvolvimento de novas formulações de DLX, considerando que o NPH pode estar presente como impureza de síntese.

A importância do desenvolvimento de um método analítico para DLX em formulação farmacêutica capaz de detectar e quantificar o NPH é reforçado pelos efeitos tóxicos apresentados por esta impureza, estes podem levar a sérios danos nas células hepáticas e até mesmo aumentar a possibilidade de desenvolvimento de câncer.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelo CNPq e pela UFRGS. Os autores gostariam de agradecer aos membros do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Controle de Qualidade de Medicamentos pelo suporte técnico e apoio durante o estudo.

Referências

[1]. Bymaster, F. P., Beedle, E. E., Findlay, J., Gallagher, P. T., Kroshinski, J. H., Michell, S., Robertson, D. W., Thompson, D. C., Wallace, L., Wong, D. T., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2003, 13, 4477-4480.

- [2]. Wernicke, J. F., Pritchett, Y. L., D'Souza, D. N., Waninger, A., Tran, P., Iyengar, S., Raskin, J., *Neurol.* 2006, 67, 1411-1420.
- [3]. Arnold, L. M., Lu, Y., Crofford, L. J., Wohlreich, M., Detke, M. J., Iyengar, S., Goldstein, D. J., *Arthritis Rheum.* 2004, 50, 2974-2984.
- [4]. Norton, P. A., **Zinner, N. R., Yalcin, I., Bump, R. C.**, *Am. J. Obstetricis Gynecol.*, 2002, 187, 40-48.
- [5]. The Merck Index, Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, USA. 2006, 587.
- [6]. Altria, K., Marsh, A., Griend, C. S., *Electrophoresis* 2006, 27, 2263-2282.
- [7]. Holland, L. A., Chetwyn, N. P., Perkins, M. D., Lunte, S. M., *Pharmaceutic. Research* 1997, 14, 372-388.
- [8]. Srinivasulu, P., Srinivas, K. S., Reddy, R. S., Mukkanti, K., Buchireddy, R., *Pharmazie* 2009, 64, 10-13.
- [9]. Gomes, P., Wingert, N. R., Paim, C. S., Schapoval, E. S., Steppe, M., *J. AOAC Internation.* In Press, 2010.
- [10]. Johnson, J. T., Oldham, S. W., Lantz, R. J., DeLong, A. F., *J. Liq. Chromatogr. Rel. Tech.* 1996, 19, 1631-1641.
- [11]. Waldschmitt, C., Vogel, F., Maurer, C., Hiemke, C., *Ther. Drug Monitoring* 2007, 29, 767-772.
- [12]. Mercolini, L., Mandrioli, R. Cazzolla, R., Amore, M., Raggi, M. A., *J. Chromatogr. B.* 2007, 856, 81-87.
- [13]. Malfará, W. R., Bertucci, C., Queiroz, M. E., Carvalho, S. D., Bianchi, M. L., Cesarino, E. F., Crippa, J. A., Queiroz, R. H., *J. Pharmaceutic. Biomedic. Anal.* 2007, 44, 955-962.
- [14]. Chaves, A. R., Chiericato Jr., G., Queiroz, M. A., *J. Chromatogr. B* 2009, 877, 587-593.
- [15]. Selvan, P. S., Gowda, K. V., Mandal. U., Solomon, W. D. S., Pal, T. K., *J. Chromatogr. B* 2007, 858, 269-275.

- [16]. Santonin, D. K., McCulloch, J. D., Kuo, F., Knadler, M. P., *J. Chromatogr. B* 2007, 852, 582-589.
- [17]. Rickard, E. C., Bopp, R. J., Skanchy, D. J., Cherwyn, D. L., Pahlen, B., Stobaugh, J. F., *J. Chromatogr. A* 1994, 680, 609-621.
- [18]. Musenga, A., Amore, A., Mandrioli, R., Kenndler, E., Martino, L., Raggi, M. A., *J. Chromatogr. B* 2009, 877, 1126-1132.
- [19]. International Conference on Harmonization (ICH) of technical requirements for the registration of pharmaceutical for human use. Impurities in new drug substances Q3A (R2). 2006, 1-8.
- [20]. International Conference on Harmonization (ICH) of technical requirements for the registration of pharmaceutical for human use. Impurities in new drug products Q3B(R2). 2006, 1-10.
- [21]. Borraccino, R., Kharoune. M., Giot, R., Agathos, S. N., Nyns. E. J., Naveau, H. P., Pauss, A., *Water Research* 2001, 35, 3729-3737.
- [22]. Doherty, M. D., Cohen, G. M., Smith, M. T., *Biochemic. Pharmacol.* 1984, 33, 543-549.
- [23]. Croera, C., Ferrario, D., Gribaldo, L., *Toxicol. in Vitro* 2008, 22, 1555-1561.
- [24]. Cho, T.M., Rose, R.L., Hodgson, E., *Drug Metabolism Dispos.* 2006, 34, 176–183.
- [25]. Wilson, A. S., Davis, C. D., Williams, D. P., Buckpitt, A. R., Pirmohamed, M., Park, B. K., *Toxicol.* 1996, 114, 233-242.
- [26]. Wilson, A. S., Davis, C. D., Williams, D. P., Buckpitt, A. R., Pirmohamed, M., Park, B. K., *Toxicol.* 1996, 114, 233-242.
- [27]. Inoue, H., Yokota, H., Taniyama, H., Kuwahara, A., Ogawa, H., Kato, S., Yuasa, A., *Life Sci.* 1999, 65, 1579-1588.
- [28]. Stohs, S. J., Ohia, S., Bagchi, D., *Toxicol.* 2002, 180, 97–195.
- [29]. Reddy, P. R., Sreeramulu, J., Naidu, P. Y., Reddy, A. R., *Chromatogr.* 2010, 71, 95-100.

- [30]. Raman, N. V., Harikrishna, K. A., Prasad, A. V., Reddy, K. R., Ramakrishna, K., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2009, 51, 994-997.
- [31]. Soni, P., Mariappan, T. T., Banerjee, U. C., *Talanta* 2005, 67, 975-978.
- [32]. Jansen, P. J., Oren, P. L., Kemp, C. A., Maple, S. R., Baertschi, S. W., *J Pharm Sci.* 1998, 87, 81-85.
- [33]. Brenna, E., Frigoli, S., Fronza, G., Fuganti, C., Malpezzi, L., *J. Pharmaceutic. Biomedic. Anal.* 2007, 43, 1573-1575.
- [34]. Kumar, A. C., Mishra, A. K., *Talanta* 2007, 71, 2003-2006.
- [35]. Nogueira, D. R., Sangoi, M. S., Silva, L. S., Todeschini, V., Dalmora, S. L., *J. Sep. Sci.* 2008, 31, 3098-3105.
- [36]. International Conference on Harmonization (ICH) of technical requirements for the registration of pharmaceutical for human use. Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1), 1 – 13. November 2005, Geneva, Switzerland.
- [37]. International Conference on Harmonization (ICH) of technical requirements for the registration of pharmaceutical for human use. Stability testing of new drugs substance and products Q1A(R2), 1–18. February 2003, Geneva, Switzerland.
- [38]. Rowe, R. C., Sheskey, P. J., Quinn, M. E., *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, Pharmaceutical Press, 2009, 6th edition.
- [39]. United States Pharmacopeial Convention 2009. USP 32: the United States pharmacopeia; NF 26: the national formulary, 31st edition. Rockville, USA.
- [40]. Wong, D. T., Bymaster, F. P., Mayle, D. A., Reid, L. R., Krushinski, J. H., Robertson, D. W., *Neuropsychopharmacol.* 1993, 8, 23-33.
- [41]. Altria, K. D., *Capillary Electrophoresis Guidebook*, Human Press, New Jersey, 1996.
- [42]. Altria, K. D., Fabre, H., *Chromatographia* 1995, 40, 313-320.
- [43]. Jouyban, A., Kenndler, E., *Electrophoresis* 2008, 29, 3531-3551.