

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

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA  
DETERMINAÇÃO DE CLORIDRATO DE TIZANIDINA EM FORMAS  
FARMACÊUTICAS**

**MARIANA BRANDALISE**

PORTO ALEGRE, 2012.



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

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA  
DETERMINAÇÃO DE CLORIDRATO DE TIZANIDINA EM FORMAS  
FARMACÊUTICAS**

Dissertação apresentada por  
**Mariana Brandalise** para  
obtenção de GRAU DE MESTRE  
em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Profa. Dr. Ana Maria Bergold

PORTO ALEGRE, 2012.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 27.03.2012, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr.: Cássia Virgínia Garcia

Universidade: Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Prof. Dr. Edna Sayuri Suyenaga

Universidade: FEEVALE

Prof. Dr.: Elfrides Eva Scherman Schapoval

Universidade: Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

### CIP - Catalogação na Publicação

Brandalise, Mariana

Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de cloridrato de tizanidina em formas farmacêuticas / Mariana Brandalise. -- 2012.

119 f.

Orientadora: Ana Maria Bergold.

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

1. Cloridrato de tizanidina. 2. Detector CAD. 3. Quimiometria. 4. Controle de Qualidade. 5. Volumetria em meio não-aquoso. I. Bergold, Ana Maria, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os

dados fornecidos pela autora.

"Sonhe com aquilo que você quiser.  
Seja o que você quer ser,  
porque você possui apenas uma vida  
e nela só se tem uma chance  
de fazer aquilo que se quer"

Clarice Lispector



## AGRADECIMENTOS

À professora Dr. Ana Maria Bergold, pela orientação, dedicação, amizade, incentivo e exemplo de profissional.

Ao professor Dr. Pedro Eduardo Fröhlich pelos esclarecimentos prestados.

À professora Francie Bueno, pelos ensinamentos, amizade, incentivo e exemplo de profissional.

À Importadora Química Delaware Ltda., pela oportunidade de desenvolver este trabalho e pela aquisição da SQR. Aos meus colegas Edenilso e Aline pelo apoio para eu poder me ausentar da empresa.

À Pharmacia Specifica pelo gentil fornecimento das cápsulas manipuladas para a realização deste trabalho

Ao Leonardo Zanchetti Meneghini, por toda ajuda, paciência, disposição e explicações sempre que necessárias. Pelo exemplo de pesquisador, pela curiosidade e motivação durante todo o desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Química Farmacêutica pela amizade e troca de conhecimento: Andréia, Andréa, Ana Paula, Felipe, Pâmela, Haline, Sirlei, Raquel, Cristiane, Marquinho e em especial ao César, Fernanda, Marcella e Tamara.

Agradecer a todos que ajudaram a construir esta dissertação não é tarefa fácil. O maior perigo que se coloca para o agradecimento seletivo não é decidir quem incluir, mas decidir quem não mencionar. Então, aos meus amigos e à família que contribuíram com sua amizade e com sugestões para a realização deste trabalho, gostaria de expressar minha profunda gratidão.



## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento e a validação de métodos analíticos para determinação de cloridrato de tizanidina (TZ) matéria-prima e forma farmacêutica. Na fase de identificação, a matéria-prima (substância química de referência) foi analisada e caracterizada utilizando-se medidas físicas (ponto de fusão e solubilidade), espectrometria no infravermelho e por técnicas cromatográficas (cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia em camada delgada). Após foi desenvolvido e validado método analítico para o doseamento de cloridrato de tizanidina matéria-prima utilizando a titulação por volumetria em meio não-aquoso, que pode ser realizada em estabelecimentos de pequeno porte. No estágio posterior, para quantificação da forma farmacêutica utilizou-se desenhos experimentais (fatorial fracionado e desenhos de composto central). O método CLAE com detector *Charged Aerosol Detection* (CAD) foi validado e um produto de degradação foi obtido na condição de degradação de estresse oxidativo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 13%). Foi também quantificado o cloreto presente na molécula. Tanto a volumetria em meio não-aquoso com determinação do ponto final por indicador, quanto o método cromatográfico foram comparados com métodos descritos em compêndios oficiais e não demonstraram diferença significativa quando aplicados ao doseamento da matéria-prima e forma farmacêutica, respectivamente.

**Palavras-chave:** cloridrato de tizanidina, detector CAD, quimiometria, controle de qualidade, volumetria em meio não-aquoso

---

---

**ABSTRACT**

The aim of this work was the development and validation of analytical methods for determination of tizanidine hydrochloride (TZ) raw material and dosage form. In the identification phase, the raw material drug (chemical reference) was analyzed and characterized using physical measures (melting point and solubility), infrared spectrophotometry and chromatographic techniques (high performance liquid chromatography and thin layer chromatography). An analytical method for assay of tizanidine hydrochloride raw material was developed and validated by using volumetric titration in a non-aqueous liquid, which can be performed in small establishments. In a later stage, for the measurement of the dosage form an experimental design was used (fractional factorial and centered composite design). The HPLC method with charged aerosol detection (CAD) was validated and a degradation product was obtained under the oxidative stress condition (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 13%). Chloride present in the molecule also was quantified. Both, the non-aqueous titration method with coloured indicator and the chromatographic one were compared to the methods described in official compendia and do not present significant difference when applied to the determination of the raw material and dosage form, respectively

**Keywords:** tizanidine hydrochloride, CAD detector, chemometrics, quality control, volumetric non-aqueous

---

---

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Domínio de um fatorial $2^2$ .....	18
<b>Tabela 2.</b> Diferentes tipos de efeito a partir de um fatorial $2^2$ .....	19
<b>Tabela 3.</b> Arranjo dos resultados de um fatorial $2^2$ para uma análise de variância .....	20
<b>Tabela 4.</b> Ábacos utilizados para análise de variância de um fatorial $2^2$ .....	21
<b>Tabela 5.</b> Matriz de sinais para um fatorial completo $2^3$ .....	29
<b>Tabela 6.</b> Matriz de sinais para um fatorial fracionado $2^3$ .....	29
<b>Tabela 7.</b> Método para gerar a matriz de <i>Plackett-Burman</i> para um fatorial com 11 fatores, sendo o <i>gerador</i> destacado pela elipse .....	30
<b>Tabela 8.</b> Geradores para desenho de Plackett-Burman considerando-se a primeira linha no nível “-” .....	31
<b>Tabela 1.1.</b> Principais bandas obtidas com o espectro da SQR .....	45
<b>Tabela 2.1.</b> Concentrações encontradas utilizando VMNA com a presença de indicador e por potenciometria .....	55

---

---

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura do cloridrato de tizanidina.....	10
<b>Figura 2:</b> Detector CAD .....	15
<b>Figura 3.</b> Esquema geral de um sistema e as variáveis envolvidas em um processo .....	15
<b>Figura 4.</b> Representação gráfica dos efeitos para um fatorial $2^2$ quando se tem apenas os efeitos principais ( <i>A</i> ) e a interação (antagonismo) entre os níveis superiores ( <i>B</i> ) .....	24
<b>Figura 5.</b> Sequência de arranjos partindo-se de um fatorial completo $2^3$ (a), com o acréscimo de 6 pontos axiais e um ponto central (b) e finalmente com a adição de repetições ao ponto central (c) .....	25
<b>Figura 6.</b> Superfície de reposta (a) e gráfico de contornos (b) para uma modelagem a partir de 2 variáveis independentes ( $x_1, x_2$ ) e uma variável dependente (resposta; $\hat{y}$ ) .....	26
<b>Figura 7.</b> Superfície de resposta (a) e gráfico de contornos (b) para uma função de segundo grau .....	42
<b>Figura 1.1.</b> Termograma obtido da análise da SQR de cloridrato de tizanidina .....	42
<b>Figura 1.2.</b> Espectro no infravermelho do cloridrato de tizanidina em pastilha de KBr .....	44
<b>Figura 1.3.</b> Representação dos cromatogramas em camada delgada para formas farmacêuticas contendo cloridrato de tizanidina em UV 254nm (I) e vapores de iodo (II) .....	46

---

---

---

**SUMÁRIO**

<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>REVISÃO DO TEMA.....</b>	<b>7</b>
1 Aspectos Terapêuticos.....	9
2 Características físico-químicas do fármaco e formulação.....	10
3 Farmacocinética.....	11
3.1 Absorção e biodisponibilidade .....	11
3.2 Posologia e modo de administração.....	11
4 Métodos analíticos de quantificação.....	12
5 Charged Aerosol Detector (CAD) .....	13
6 Estratégias de Experimentação .....	15
7 Desenhos fatoriais.....	17
7.1 Características gerais.....	17
7.2 Notações.....	18
7.3 Interpretação dos resultados.....	18
7.4 Análise de variância e modelos de regressão.....	19
7.5 Fatoriais completos $2^k$ .....	22
7.6 Desenhos de composto central.....	23
7.6.1 Características gerais.....	23
7.6.2 Modelagem.....	25
7.6.3 Avaliação de respostas múltiplas.....	26
7.7 Desenhos fracionados.....	28
8 Validação de métodos analíticos .....	31
9 Referências.....	33
<b>CAPÍTULO 1 – Caracterização e identificação da SQR de cloridrato de tizanidina e do produto acabado.....</b>	<b>37</b>
1.1 Caracterização e propriedades físicas.....	39

1.1.1	Determinação da solubilidade .....	39
1.1.1.1	Materiais e método .....	39
1.1.1.2	Resultados e discussão .....	39
1.1.2	Determinação do pH em solução .....	40
1.1.2.1	Materiais e método .....	40
1.1.2.2	Resultados e discussão .....	40
1.1.3	Calorimetria exploratória diferencial (DSC) .....	41
1.1.3.1	Materiais e métodos .....	41
1.1.3.2	Resultados e discussão.....	41
1.1.4	Reação para cloretos .....	42
1.1.4.1	Materiais e métodos .....	42
1.1.4.2	Resultados e discussão.....	42
1.1.5	Perda por dessecação .....	43
1.1.5.1	Material e método .....	43
1.1.5.2	Resultado e discussão .....	43
1.1.6	Espectrofotometria na região do infravermelho (IV) .....	44
1.1.6.1	Material e método .....	44
1.1.6.2	Resultado e discussão .....	44
1.1.7	Cromatografia em camada delgada (CCD) .....	45
1.1.7.1	Material e método .....	45
1.1.7.2	Resultado e discussão .....	46
2	Referências .....	48
	<b>CAPÍTULO 2 – Desenvolvimento e validação de método para determinação de cloridrato de tizanidina por volumetria em meio não- aquoso .....</b>	<b>49</b>
2.1	Introdução .....	51
2.2	Volumetria em meio não-aquoso (VMNA) .....	51
2.3	Materiais e método .....	53

---

2.3.1 Amostra .....	53
2.3.2 Reagentes e soluções .....	53
2.3.3 Volumetria em meio não-aquoso .....	54
2.3.4 Precisão .....	54
2.4 Resultados e discussão .....	54
2.5 Conclusão .....	56
2.6 Referências .....	57
<b>CAPÍTULO 3 – Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE/CAD para doseamento de cloridrato de tizanidina.....</b>	<b>59</b>
3.1 Introdução .....	61
Publicação .....	63
<b>DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>95</b>
Referências.....	102
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>105</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>109</b>
<b>ANEXO II.....</b>	<b>113</b>
<b>ANEXO III.....</b>	<b>117</b>

---

---



---

---

O espasmo é uma contração involuntária do músculo doloroso que pode causar o movimento involuntário, interferir com a função e causar distorção. É um sintoma que pode ocorrer em qualquer tipo de músculo e de outras doenças como esclerose múltipla e danos na medula espinhal e o tratamento deve ser prioritariamente destinado à causa subjacente. Normalmente relaxantes musculares do tipo benzodiazepínicos são usados para tratar os espasmos musculares, que ocorrem em resposta a trauma local ou músculo-esquelético e doenças articulares. *Splinting* é um espasmo muscular reflexo que produz rigidez muscular e age como um mecanismo de proteção para impedir o movimento e mais danos da parte afetada (SWEETMAN, 2007).

O cloridrato de tizanidina é um relaxante muscular esquelético de ação central. É um agonista  $\alpha_2$ -adrenérgico estruturalmente relacionado com a clonidina e atua principalmente em nível supra-espinhal (SWEETMAN, 2007).

É indicado no tratamento agudo e intermitente de aumento do tônus muscular com espasticidade associada à esclerose múltipla e lesão medular (SMITH *et al.*, 1994). É especialmente útil no alívio de espasmos musculares e clônus (LATASTE *et al.*, 1994). Também é usado no tratamento sintomático de espasmos musculares dolorosos (SWEETMAN, 2007).

No mercado está disponível com o nome comercial de Sirdalud<sup>®</sup> na forma de comprimidos com dose de 2mg.

Estudos comparando a eficácia da tizanidina com a de outros agentes normalmente utilizados, tais como diazepam e baclofeno, demonstraram que tizanidina é tão eficaz como os outros agentes na redução da espasticidade (MILANOV e GEORGIEV, 1994). Além disso, estudos clínicos têm demonstrado que a tizanidina reduz o tônus muscular, sem causar fraqueza muscular excessiva (LATASTE *et al.*, 1994) e quando administrado isoladamente tem mostrado que é seguro e eficaz para tratamento do controle da espasticidade (QI *et al.*, 2002).

Com relação à metodologia analítica envolvendo o cloridrato de tizanidina, na Farmacopéia Americana (USP 34, 2011) existe método que utiliza a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector UV para separação de compostos relacionados à tizanidina e na Farmacopéia Japonesa (JP 15, 2009) existem dois

métodos para doseamento do cloridrato de tizanidina: um por titulação potenciométrica utilizando ácido perclórico 0,1 M como titulante e outro por CLAE também com detector UV para determinação de compostos relacionados.

Vários trabalhos foram publicados com desenvolvimento e validação de método por CLAE para quantificar cloridrato de tizanidina e também métodos para quantificação simultânea com outros fármacos como aceclofeno, valecoxib e paracetamol (QI *et al.*, 2002; PURANIK *et al.* 2006, RAMMA *et al.*, 2006; KUMAR *et al.*, 2010; VAIDYA *et al.*, 2010).

A partir disso, definiu-se como objetivo geral:

- Desenvolver e validar metodologia de controle de qualidade utilizando diferentes métodos quali e quantitativos para determinação de cloridrato de tizanidina matéria-prima e formas farmacêuticas.

Como objetivos específicos têm-se:

- Avaliar a substância química de referência (SQR) de cloridrato de tizanidina e forma farmacêutica, quando cabível, por meio de: descrição, testes de solubilidade, pH em solução aquosa, faixa de fusão, reações de identificação de grupo químico, cromatografia em camada delgada, espectrofotometria na região do infravermelho (IV) e ponto de fusão;
- Desenvolver e validar método de análise para quantificação do fármaco por volumetria em meio não-aquoso com uso de química limpa e realizável em farmácias magistrais;
- Desenvolver e validar método de análise para quantificar cloridrato de tizanidina comprimidos e cápsulas através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando um detector universal;
- Proceder à comparação estatística entre os métodos de doseamento propostos;
- Realizar estudos preliminares quanto a estabilidade do cloridrato de tizanidina.

A parte experimental do trabalho será dividida em três capítulos, que abordarão, respectivamente: caracterização e identificação da SQR (capítulo 1), desenvolvimento e validação do método analítico por titulação volumétrica em meio não-aquoso (capítulo 2), desenvolvimento e validação do método analítico por CLAE/CAD (capítulo 3). O capítulo 3 será apresentado na forma de artigo a ser submetido a periódico científico.

---

---



---

---

## 1 Aspectos Terapêutico

Muitas doenças do cérebro e da medula espinhal produzem aumento do tônus muscular, que pode ser doloroso e incapacitante. São exemplos a espasticidade resultante de traumatismo ou de doenças vascular cerebral e paralisia produzida por lesões da medula espinhal (RANG *et al.*, 2007).

Quando o sistema motor responsável pela manutenção do tônus muscular esquelético é afetado por trauma ou doença do cérebro ou da medula espinhal, pode resultar em hiperexcitabilidade dos motoneurônios  $\alpha$  do arco reflexo. Pacientes com lesões na coluna ou esclerose múltipla também podem sentir dor, espasmos flexores ou extensores, hiper-reflexia autonômica, contraturas restritivas, paresia, falta de destreza e fadiga. Espasticidade varia em intensidade de doente para doente (WAGSTAFF e BRYSON, 1997).

Para o tratamento destes espasmos existem certos agentes de ação central que têm por efeito reduzir o tônus basal do músculo, sem afetar seriamente a sua capacidade de contrair-se transitoriamente sob controle voluntário. Dentre estes pode-se citar a mefenesina, baclofeno, benzodiazepínicos e a clonidina (RANG *et al.*, 2007).

O cloridrato de tizanidina é um agonista central  $\alpha_2$ -adrenérgico que foi desenvolvido para alívio da espasticidade em pacientes com danos na medula espinhal (QI *et al.*, 2002), sendo considerado um agente miotonolítico.

Seu mecanismo de ação desenvolve-se sobre as vias neuronais polissinápticas que participam da ativação dos motoneurônios e unidades motoras (tanto do sistema  $\alpha$  como  $\delta$ ) com diminuição do tônus muscular patologicamente elevado. O efeito miotonolítico poderia ser atribuído a seu efeito agonista sobre os receptores  $\alpha$ -noradrenérgicos, dado que mostra alta afinidade pelos pontos de união da clonidina no córtex de ratos. No nível espinhal, o fármaco causa inibição da liberação induzida por  $K^+$  do neurotransmissor putativo aspartato, a partir dos interneurônios excitativos. A tizanidina pode atuar também sobre centros supraespinhais através de mecanismos locais  $\alpha_2$  (agonista central) (LATASTE *et al.*, 1994; WAGSTAFF e BRYSON, 1997).

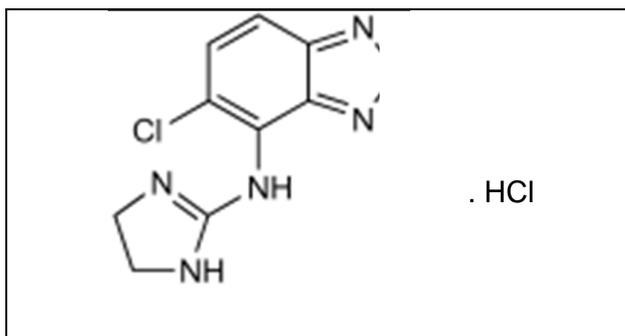
Estudos neurofisiológicos realizados em animais e em seres humanos sugerem que a tizanidina reforça a inibição tanto pré-sináptica quanto na medula espinhal. Além disso, inibe a transmissão nociceptiva no corno dorsal (KATZUNG, 2003).

As indicações da tizanidina variam entre patologias espasmódicas e dolorosas do músculo esquelético, esclerose múltipla e afecções neurológicas que ocorrem com espasmos musculares, espasmos musculares dolorosos pós-cirúrgicos, doenças da medula espinhal devidas a processos degenerativos, traumáticos, infecciosos ou tumorais (SWEETMAN, 2007; KOROLKOVAS, 2008/2009).

## 2 Características físico-químicas do fármaco e formulação

A estrutura básica de cloridrato de tizanidina (Figura 1) é denominada quimicamente como 5-cloro-N-(4,5-diidro-1H-2-imidazolil)-2,1,3-benzotiadiazol-4-amina. O Quadro 1 apresenta algumas das propriedades físico-químicas (WAGSTAFF e BRYSON, 1997; ABBRUZZESE, 2002; USP 34, 2011).

O fármaco é comercializado pelo laboratório Novartis na forma de comprimido contendo 2 mg de cloridrato de tizanidina (30 comprimidos) sob o nome de Sirdalud®. Existe a versão genérica, comercializada pelo laboratório Ranbaxy (cloridrato de tizanidina 2 mg, 30 comprimidos).



**Figura 1.** Estrutura do cloridrato de tizanidina

**Quadro 1.** Dados referentes ao registro e propriedades físico-químicas da molécula de cloridrato de tizanidina (USP 34, 2011; JP 15, 2009).

	<b>Cloridrato de tizanidina</b>
<b>Ponto de fusão (°C)</b>	Aproximadamente 290,0
<b>Solubilidade</b>	Solúvel em água e metanol, praticamente insolúvel em acetona, clorofórmio e acetato de etila
<b>Fórmula molecular</b>	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> ClN <sub>5</sub> S HCl
<b>Massa molecular</b>	290, 17
<b>DCB</b>	8705
<b>CAS</b>	64461-82-1

Na formulação do Sirdalud<sup>®</sup>, além do fármaco, encontram-se os seguintes excipientes: lactose, ácido esteárico, celulose microcristalina e sílica coloidal anidra (NOVARTIS, 2007).

### 3 Farmacocinética

#### 3.1 Absorção e biodisponibilidade

A tizanidina é absorvida de forma rápida e quase completa após sua administração oral, atingindo picos de concentração entre 1 e 2 horas após a administração da dose. A biodisponibilidade absoluta média é cerca de 34% por causa do extenso metabolismo de primeira passagem (SWEETMAN, 2007; NOVARTIS, 2007).

#### 3.2 Posologia e modo de administração

No tratamento da espasticidade, a dose deverá ser ajustada às necessidades individuais. Aconselha-se iniciar com doses baixas: 2 a 6 mg por dia, divididos a cada 8 horas. Esta posologia pode ser aumentada de forma progressiva em 2 a 4 mg cada semana, até atingir a dose ótima, que oscila entre 12 e 24 mg diários divididas em 3 a 4 doses. Em terapias prolongadas a dose ideal é de 4 mg, 3 vezes ao dia. A dose máxima diária total não deve ultrapassar os 36 mg. No espasmo muscular doloroso músculo-esquelético, a dose recomendada é de 2 a 4 mg, 3 vezes ao dia, com dependência da gravidade da sintomatologia. Se for necessário, pode-se agregar uma dose noturna, ao deitar, de 2 a 4 mg (SWEETMAN, 2007; NOVARTIS, 2007).

#### 4 Métodos analíticos de quantificação

Com relação à metodologia analítica envolvendo o cloridrato de tizanidina, na Farmacopéia Americana (USP, 2011) existe um método que utiliza a cromatografia líquida de alta eficiência para separação de compostos relacionados à tizanidina A, B e C, presentes na matéria-prima e produto acabado. Este método utiliza coluna  $C_{18}$ , fase móvel constituída de tampão pentasulfonato de sódio (pH 3,0) e acetonitrila, com detecção em 230 nm.

Na Farmacopéia Japonesa (JP 15, 2009) existe um método para doseamento do cloridrato de tizanidina matéria-prima (por titulação potenciométrica utilizando ácido perclórico 0,1 M como titulante) e outro para determinação de impureza (por CLAE utilizando uma coluna  $C_{18}$ , fase móvel uma mistura de acetonitrila, água e ácido fórmico, com detecção em 230nm e 318nm).

QI e colaboradores (2002) desenvolveram e validaram método por CLAE utilizando como fase móvel a mistura de metanol e acetonitrila (50:57:18 – v:v); vazão de 1,0 mL/min e comprimento de onda de 227 nm para determinar tizanidina na matéria-prima, comprimido e cápsulas.

PURANIK e colaboradores (2006) desenvolveram e validaram método por CLAE utilizando como fase móvel acetonitrila e tampão fosfato 0,02 M (pH ajustado para 3,5 com ácido fosfórico) na proporção 60:40 (v:v), filtrada, com vazão de 1,5 mL/min e comprimento de onda de 240 nm para determinação de tizanidina em comprimido.

RAMAA e colaboradores (2006) desenvolveram e validaram método por CLAE em fase reversa, simples, reprodutível e eficiente, para determinação simultânea de tizanidina e valecoxib em forma farmacêutica. Foi utilizada como fase móvel mistura composta de tampão acetato 0,1 M, metanol e acetonitrila (50:30:20 - v:v:v); a quantificação foi feita com detecção UV em 230 nm.

KUMAR e colaboradores (2010) validaram um método para determinação de tizanidina em comprimido utilizando CLAE em fase reversa, utilizando como fase móvel tampão fosfato 20 mM (pH ajustado para 4,0): acetonitrila: metanol na

proporção de (30:40:30 - v:v:v) vazão de 1,0 mL/min. e comprimento de onda de 230 nm.

VAIDYA e colaboradores (2010) desenvolveram método por CLAE para determinação simultânea de aceclofenaco, paracetamol e tizanidina em forma farmacêutica. Foi utilizada como fase móvel mistura de tampão fosfato pH 7,0 e acetonitrila (40:60 – v:v) e comprimento de onda de detecção em 230 nm.

### **5 Charged Aerosol Detector (CAD)**

Um grande problema dentro da indústria farmacêutica, e muito importante dentro da técnica de cromatografia líquida, é o desejo de usar um detector que forneça uma resposta uniforme para todos os compostos, independente das suas propriedades físico-químicas. Na indústria farmacêutica, as análises preliminares são normalmente realizadas utilizando detecção fotométrica (UV/Vis), e após a caracterização por espectrofotometria de massas e espectrofotometria por ressonância magnética nuclear. Porém, algumas moléculas, como intermediários sintéticos e matérias-primas, não contém cromóforos UV/Vis ou absorvem muito pouco nesta região e assim exigem um detector mais universal. As características ideais desse detector é que todos os tipos de analitos possam ser detectados sensivelmente com fator de resposta uniforme em um único instrumento, e o detector deve ser capaz de ser usado com uma grande variedade de fases móveis e atingir separações eficientes. Também é ideal que o detector seja de baixo custo sendo que fatores de resposta uniformes eliminam a necessidade da calibração individual ao determinar muitos novos compostos sintetizados ou desconhecidos (LIU *et al.*, 2008)

Um novo detector vem sendo comercializado desde 2004: o *charged aerosol detector* (CAD). O CAD (Figura 7) tem um método de detecção baseado em partículas carregadas, fornecendo um novo mecanismo compostos com cromóforos fracos ou nenhum. O CAD é um detector supostamente universal para todos os analitos não-voláteis com magnitude de resposta independente das propriedades químicas do analito (GORECKI *et al.*, 2006).

Nesse tipo de detector, o eluente da coluna do CLAE é nebulizado com nitrogênio e depois as gotículas são secas, produzindo partículas de analito. Uma

corrente secundária de nitrogênio transfere partículas positivas para os analitos ao longo de um fio de alta tensão e fornece resposta quando as partículas entram em contato com um eletrômetro altamente sensível. A carga é transferida para um coletor, onde é medida, gerando um sinal em proporção direta à quantidade de analito presente. Este processo acomoda uma grande variedade de classes de compostos diferentes, desde que sejam menos voláteis do que a fase móvel (GAMACHE *et al.*, 2005,).

O CAD apresenta alta sensibilidade e baixo limite de detecção para ampla variedade de analitos, independentes de sua estrutura química. Ele pode detectar compostos presentes em quantidades muito baixas (nanogramas). A resposta do detector não depende das propriedades óticas dos analitos, nem da capacidade dos analitos serem ionizados na fase gasosa e é capaz de detectar analitos não-voláteis independentemente de conterem ou não um cromóforo. Porém, como qualquer detector de aerossóis, CAD tem resposta reduzida se o analito é volátil, ou se a formação de partículas é incompleta. No entanto, o CAD é capaz de detectar todos os analitos não-voláteis, e mais analitos semi-voláteis com resposta reduzida, e tem sido usado em combinação com uma variedade de modos diferentes de separação (isocrático e gradiente de fase reversa, cromatografia iônica, interação hidrofílica, cromatografia com fluido supercrítico, cromatografia de exclusão) em formatos de coluna normal e de diâmetro estreito, para uma ampla variedade de analitos diferentes (GAMACHE *et al.*, 2005; BRUNELLI *et al.*, 2007 ). As aplicações do CAD encontradas na literatura são bastante diversas e incluem a análise de polímeros sintéticos (KOU *et al.*, 2009), íons inorgânicos (HUANG *et al.*, 2009), lipídios (SCHONHERR *et al.*, 2009), análise de produtos farmacêuticos, (BRUNELLI *et al.*, 2007; VERVOORT *et al.*, 2008) e sua pureza (REILLY *et al.*, 2008).

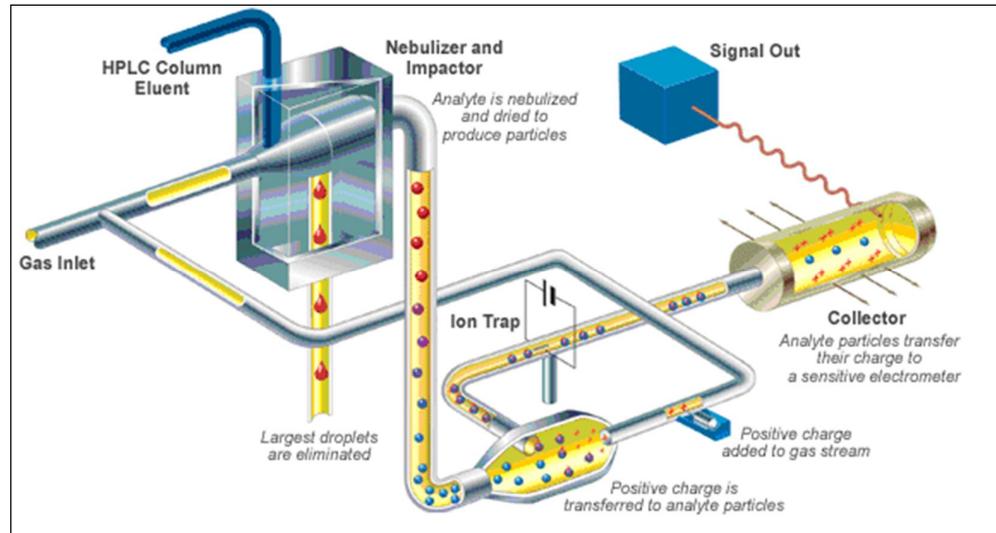
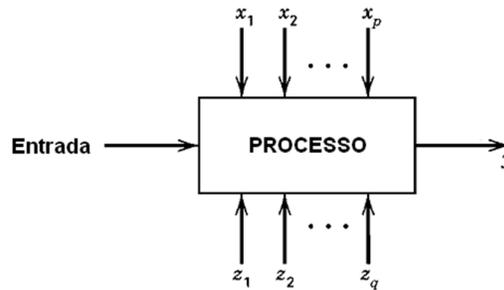


Figura 2: Detector CAD (CORONACAD, 2007)

## 6 Estratégias de experimentação

Experimentos são utilizados para avaliar *sistemas* em que ocorrem *processos*. Pode-se considerar um *sistema* como um modelo onde estão envolvidos combinação de máquinas, métodos, pessoas e outros. Neste, ocorre uma *entrada* de algo material ou de dados que sofrerá um *processo* resultando em *saída* de uma ou mais *respostas* a partir do que ocorreu no processo. Sobre o processo atuam fatores controláveis e não-controláveis (ainda que possam ser monitorados) como representado na Figura 3. As variáveis controláveis são representadas por  $x$ , podendo ser variadas pelo experimentalista conforme o desejado, as variáveis não-controláveis por  $z$  e a saída por  $y$ . Na entrada e na saída também existem variáveis controláveis e não-controláveis, como erros de variações não mensuráveis no material de entrada e erros de medida nos dados de saída (MONTGOMERY, 2000; BRERETON, 2003).



**Figura 3.** Esquema geral de um sistema e as variáveis envolvidas em um processo.

Os objetivos do experimento podem ser de determinação de quais variáveis são mais influentes sobre a resposta  $y$ , onde o conjunto de variáveis  $x$  está mais próximo do valor nominal desejado ou a sua variabilidade é pequena, ou ainda em que níveis as variáveis  $x$  sofrem menos influência das variáveis não-controláveis. Geralmente o objetivo do experimentalista é determinar a influência das variáveis (denominadas também de *fatores*) sobre as saídas (*respostas*) do sistema, utilizando-se para isso de uma estratégia de experimentação (MONTGOMERY, 2000).

Existem vários tipos de estratégia de experimentação, sendo a forma mais simples a intuitiva, ou seja, baseando-se na experiência prévia do analista sobre o sistema em estudo; definem-se certas condições e realiza-se o experimento (*best-guess approach*). O problema desta estratégia é que os fatores envolvidos no processo são definidos e modificados aleatoriamente, não se tendo garantia de que a condição eleita é realmente a melhor. Outra estratégia utilizada rotineiramente é a variação dos fatores um de cada vez (*one-factor-at-a-time approach*). Este método consiste em selecionar um ponto inicial de níveis para os fatores e então variar sucessivamente cada fator mantendo-se os demais fatores no nível inicial. A desvantagem nesse caso é desconsiderar as interações entre os fatores que quando existirem e forem significativas, acarretam perda relevante de informações sobre o objeto de estudo (MONTGOMERY, 2000; BRERETON, 2003).

O terceiro tipo de estratégia são os desenhos fatoriais. Nessa os fatores são variados juntos ao invés de separadamente. Com isso pode-se observar se há sinergismo ou não entre os fatores, além de possibilidades de exploração estatística que as outras estratégias não permitem (MONTGOMERY, 2000).

## 7 Desenhos fatoriais

### 7.1 Características gerais

Quando o estudo envolve dois ou mais fatores, os *desenhos fatoriais* são os mais eficientes tipos de experimentos. O fator pode ser de natureza quantitativa, quando seus níveis podem ser expressos em termos de valores, ou qualitativa, quando os níveis são expressos em termos de categorias ou classes. Como vantagens podem-se citar: maior eficiência no uso de recursos experimentais disponíveis, uma vez que permitem tirar conclusões mais amplas a respeito dos fatores estudados simultaneamente; informações sobre interação de fatores e uma maior precisão para estimativa de efeitos principais de fatores. As desvantagens consistem na maior dificuldade na seleção de unidades experimentais homogêneas (devido ao grande número de tratamentos); dificuldade na escolha do delineamento experimental e na execução dos experimentos (se houver um grande número de fatores); dificuldades na escolha de certos tratamentos (combinações de níveis dos fatores), pois podem agregar pouca informação aos objetivos do estudo (MONTGOMERY, 2000; BRERETON, 2003)

Os desenhos experimentais podem ser divididos em três grandes áreas dependendo dos objetivos do experimentalista (MONTGOMERY, 2000; BRERETON, 2003):

- a) Estudo exploratório (*screening*): envolve um grande número de fatores, geralmente em dois níveis, com o objetivo de selecionar quais fatores são influentes sobre as respostas do processo;
- b) Otimização: desenhos que envolvem poucos fatores (geralmente três) com objetivo de gerar modelos matemáticos e assim encontrar condições ótimas para o processo;
- c) Qualidade global do processo: desenhos avaliando a perturbação da qualidade e/ou respostas do processo por fatores controláveis e não-controláveis propostos pela metodologia de *Taguchi*, *Plackett-Burman* e *Youden-Steine*.

## 7.2 Notações

Um desenho fatorial pode ser representado por  $L^k$  onde  $L$  se refere ao número de níveis de cada fator e  $k$  o número de fatores. O número de experimentos, para um fatorial completo, é dado pelo resultado da potenciação de  $L^k$ . Logo, para um arranjo  $2^2$  ter-se-á 4 experimentos. Tomando o mesmo fatorial  $2^2$  com dois fatores denominados  $A$  e  $B$ , obteríamos um *domínio* de experimentos conforme a Tabela 1. Para a representação dos níveis pode-se ter a notação real do nível (valor ou categoria) ou a representação codificada (DEMING e MORGAN, 1987; MONTGOMERY, 2000; BRERETON, 2003)

Para a forma codificada os níveis superiores são representados por um sinal positivo (+), sinal positivo acompanhado do número *um* (+1) ou simplesmente o número *um* (1). Para os níveis inferiores a representação é oposta: sinal negativo (-) ou sinal negativo acompanhando o número *um* (-1). O nível que representa o valor central, médio da magnitude ou a situação de ausência do fator é codificado por 0.. Na Tabela 1 os níveis de cada fator estão representados na forma codificada (DEMING e MORGAN, 1987; MONTGOMERY, 2000; BRERETON, 2003).

**Tabela 1.** Domínio de um fatorial  $2^2$ .

	Fator A	Fator B
Experimento 1	(-)	(-)
Experimento 2	(-)	(+)
Experimento 3	(+)	(-)
Experimento 4	(+)	(+)

## 7.3 Interpretação dos resultados

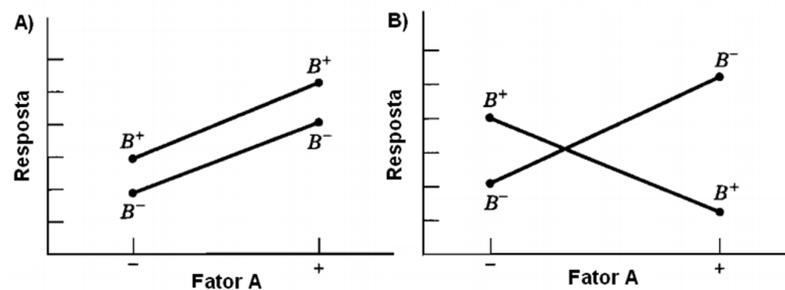
O efeito do fator é definido como a mudança na resposta produzida por uma mudança no nível do fator, denominado efeito principal. Os efeitos podem ser segregados em três tipos: efeito *simples*, para aquele que ocorre a partir de um fator dentro do nível do outro; efeito *principal* que é a média dos efeitos simples e o *efeito de interação* representando a magnitude de efeito adicional que não é produzido por nenhum dos fatores isoladamente. No exemplo representado na Tabela 2, a resposta tem sua magnitude aumentada em 4 unidades quando o fator  $A$  está atuando no processo em seu nível superior, já o  $B$  produz um aumento de 7 unidades quando aplicado em seu nível superior. No entanto, quando se analisam

os efeitos dos fatores atuando em seus maiores níveis tem-se um incremento de 16 unidades ao invés de 11 (soma dos efeitos simples de A e B), indicando um *efeito sinérgico* dos fatores que resulta em uma interação positiva. A interação pode ocorrer também de modo negativo, com efeito antagônico dos fatores, ou simplesmente não existir (MONTGOMERY, 2000; MASON *et al.*, 2003).

O efeito de interação também pode ser observado graficamente como exemplificado na Figura 4. Quando as linhas se cruzam, pode-se considerar indicativo de haver interação, quando as linhas se mantêm paralelas, só ocorrem efeitos principais. A interpretação dos gráficos de interação deve ser cuidadosa, haja vista que é uma interpretação visual e que no caso de arranjos  $2^k$  não se pode fazer inferências além dos níveis delimitados no desenho (MONTGOMERY, 2000; MASON *et al.*, 2003).

**Tabela 2.** Diferentes tipos de efeito a partir de um fatorial  $2^2$ .

		Fator B		
Fator A	(-)	(+)		Efeito Simples de B
(-)	8	15		$8-15=7$
(+)	12	24		$24-12=12$
Efeito simples de A	$8-12=4$	$24-15=9$		
Efeito principal de A	$(4+9)/2=6,5$			
Efeito principal de B	$(7+12)/2=9,5$			
Interação A x B = $1/2 [(24-15)-(12-8)]=2,5$				



**Figura 4.** Representação gráfica dos efeitos para um fatorial  $2^2$  quando se tem apenas os efeitos principais (A) e a interação (antagonismo) entre os níveis superiores (B).

#### 7.4 Análise de variância e modelos de regressão

Seja um experimento fatorial com dois fatores, A e B, em que  $a_i$  é um dos níveis do fator A ( $i = 1, 2, 3, \dots, a$ ), e  $b_j$  é um dos  $b$  níveis do fator B ( $j = 1, 2, 3, \dots, b$ )

com  $r$  repetições, sendo  $k$  o número de ordem da repetição ( $k = 1, 2, 3, \dots, r$ ). Uma observação experimental qualquer é então representada por  $Y_{ijk}$  (por exemplo,  $Y_{113}$  seria a resposta da terceira repetição obtida com o nível 1 do fator  $A$  e nível 1 do fator  $B$ ). Os totais para os níveis de  $A$  são  $Y_{i..}$ , para os níveis de  $B$  são  $Y_{.j.}$  e para as combinações dos níveis  $A$  e  $B$  são  $Y_{ij.}$ . Representa-se por  $Y_{...}$ , o total geral. Haverá  $abr$  unidades experimentais ou parcelas. Pode-se então representar o arranjo conforme a Tabela 3 (MONTGOMERY, 2000; MASON *et al.*, 2003).

**Tabela 3.** Arranjo dos resultados de um fatorial  $2^2$  para uma análise de variância.

	$a_1$	$a_2$	...	Totais $Y_{.j.}$
$b_1$	$Y_{11.}$	$Y_{21.}$	...	$Y_{.1.}$
$b_2$	$Y_{12.}$	$Y_{22.}$	...	$Y_{.2.}$
.	.	.	.	.
.	.	.	.	.
.	.	.	.	.
Totais $Y_{i..}$	$Y_{1..}$	$Y_{2..}$	$Y_{.i.}$	$Y_{...}$ (Total geral)

Para a análise da variância considerando-se um fatorial  $2^2$ , procede-se com o cálculo das somas dos quadrados (SQ)  $SQ_A$ ,  $SQ_B$ ,  $SQ_{AB}$ ,  $SQ_E$  correspondentes aos efeitos principais de  $A$ ,  $B$ , interação  $AB$  e erro experimental (além da soma dos quadrados para blocos quando houver), respectivamente. As equações para os respectivos cálculos estão relacionadas na Tabela 4. Na maioria das situações experimentais, a significância estatística dos efeitos principais dos fatores  $A$ ,  $B$  e da interação  $AB$ , é dada pelo teste  $F$  comparando os respectivos quadrados médios (QM)  $QM_A$ ,  $QM_B$  e  $QM_{AB}$ , com o quadrado médio do erro experimental ( $QM_E$ ) como ilustrado na Tabela 4 (MONTGOMERY, 2000; MASON *et al.*, 2003).

**Tabela 4.** Ábacos utilizados para análise de variância de um fatorial  $2^2$ .

Causas da variação	GL	SQ	QM
Fator A	a - 1	$SQA = \frac{A\sum Y_{i...}^2}{br} - \frac{Y_{...}^2}{abr}$	QM <sub>A</sub>
Fator B	b - 1	$SQB = \frac{\sum Y_{.j.}^2}{ar} - \frac{Y_{...}^2}{abr}$	QM <sub>B</sub>
Interação AB	(a - 1) (b - 1)	$SQAB = \frac{\sum Y_{ij.}^2}{r} - \frac{Y_{...}^2}{abr} - Ayy - Byy$	QM <sub>AB</sub>
Erro Experimental	(r - 1) (ab - 1)	$SQE = SQT - Ayy - Byy$	QM <sub>E</sub>
Total	abr - 1	$SQT = \sum Y_{ijk}^2 - Y_{...}^2 / abr$	-

Em termos de *modelo de regressão*, um fatorial  $2^2$ , pode ser descrito pelo seguinte polinômio:

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

### Equação 1

Onde  $\mu$  é a média geral do efeito principal,  $\tau_i$  é o efeito no  $i$ -ésimo nível da linha do fator A,  $\beta_j$  é o efeito do  $j$ -ésimo nível da coluna do fator B,  $(\tau\beta)_{ij}$  é o efeito de interação entre  $\tau_i$  e  $\beta_j$  e  $\varepsilon_{ijk}$  é o componente do erro aleatório. Ambos os fatores são assumidos por serem fixos e os efeitos dos tratamentos são definidos como desvio da média geral, então. Para as hipóteses em termos de  $\tau_i$  tem-se (MONTGOMERY, 2000; MASON *et al.*, 2003):

- $H_0: \tau_1 = \tau_2 = \dots = \tau_a = 0$
- $H_1: \text{no mínimo um } \tau_i \neq 0$

para o efeito de  $\beta_j$

- $H_0: \beta_1 = \beta_2 = \dots = \beta_a = 0$
- $H_1: \text{no mínimo um } \beta_i \neq 0$

e finalmente para os efeitos de interação tem-se

- $H_0: (\tau\beta)_{ij} = 0$  para todos  $(\tau\beta)_{ij}$
- $H_1$ : no mínimo um  $(\tau\beta)_{ij} \neq 0$

### 7.5 Fatoriais completos $2^k$ (MONTGOMERY, 2000; BRERETON, 2003)

Fatoriais completos em dois níveis são principalmente usados para estudos de *screening*, onde o objetivo é determinar a influência de um número de efeitos sobre a resposta, possibilitando assim eliminar fatores que não são significativos em desenhos sequenciais. Para fins de exemplo, pode-se considerar uma reação química na qual 2 fatores estão envolvidos no processo: pH e temperatura; como resposta tem-se o rendimento da reação. A implementação do desenho fatorial segue os seguintes passos:

1º. Para fins exploratórios um arranjo do tipo  $2^2$  é suficiente, resultando em 4 experimentos;

2º. A partir do conhecimento do processo da reação e a faixa operacional dos fatores, define-se os níveis superior e inferior, por exemplo, 30 e 60°C para temperatura, 4,0 e 6,0 para o pH;

3º. Com o auxílio de *software* estatístico específico, insere-se o desenho pretendido, obtendo-se também a *ordem aleatória* para a execução dos experimentos;

4º. Procede-se com os experimentos;

5º. Inserem-se as respostas no *software* e obtém-se a análise estatística do desenho.

Na forma de modelo de regressão, o desenho pode ser expresso como

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2$$

#### **Equação 2**

Substituindo pelos respectivos coeficientes calculados, tem-se

$$y = 10 + 0,2x_1 + 2,5x_2 + 0,05x_1x_2$$

onde  $y$  representa a resposta do processo (neste caso o rendimento da reação),  $b_0$  é a média geral  $b_1$ ,  $b_2$  e  $b_{12}$  são os parâmetros/coeficientes e  $x_1$ ,  $x_2$ , e  $x_1x_2$  são os fatores pH, temperatura e a interação pH com temperatura, respectivamente.

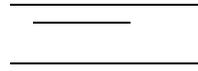
## 7.6 Desenhos de composto central

### 7.6.1 Características gerais

Após o estudo exploratório dos fatores que possuem importância e/ou significância sobre o processo estudado, pode-se realizar sequencialmente um desenho onde se obtenham informações mais detalhadas e precisas. Com modelos mais detalhados trabalha-se em níveis mais próximos da *resposta ótima*, sendo possível prever, por meio de um modelo matemático validado, como as respostas se relacionam com os níveis dos fatores empregados. Para isto pode-se utilizar-se um *desenho de composto central (DCC)* também conhecido como *desenho de superfície de resposta* ou *metodologia de superfície de resposta (MSR)* (DEMING *et al.*, 1987; MONTGOMERY, 2000; BRERETON, 2003; MASON, 2003; MYERS *et al.*, 2003)

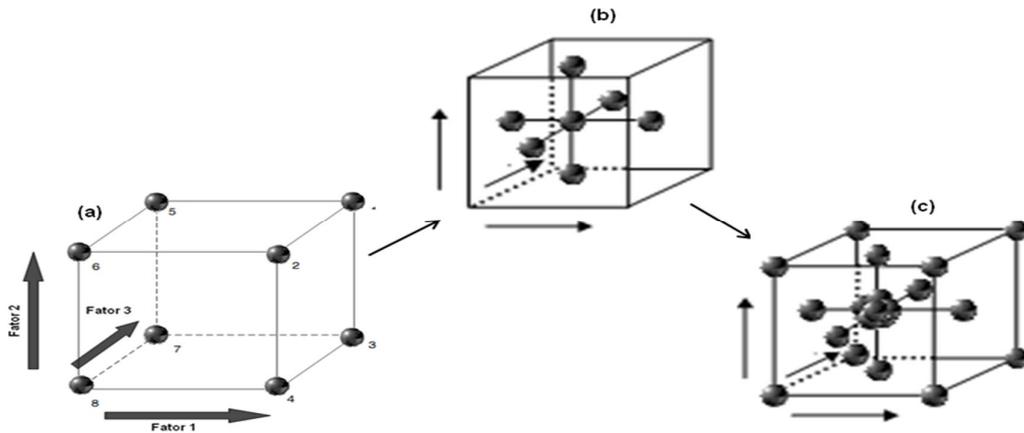
O DCC nada mais é do que a expansão de um fatorial completo utilizando-se os fatores mais significativos (em termos das respostas estudadas), acoplando-se um maior número de pontos ao desenho, o que acaba por fornecer certas características estatísticas adequadas para estabelecimento de uma regressão e estabelecimento de um modelo matemático. Como mostrado na Figura 5, é necessário o acréscimo de dois tipos de experimentos em relação ao desenho exploratório, os quais serão novos *pontos* para o modelo de regressão: os chamados *pontos axiais* e o *ponto central*. Os pontos axiais permitem a adição de um número mínimo de experimentos para se obter a regressão; com o ponto central e suas respectivas repetições, pode-se estimar o erro experimental (DEMING *et al.*, 1987; MONTGOMERY, 2000; BRERETON, 2003; MASON, 2003; MYERS *et al.*, 2003).

A magnitude ou a distância geométrica entre os diversos tipos de pontos experimentais é definida pelo cálculo do valor de  $\alpha$ , dado por:



**Equação 3**

onde  $N$  é o número total de experimentos ou pontos e  $Nf$  é o total de pontos ou experimentos do tipo fatorial. O cálculo de  $\alpha$  implica em duas características importantes: *rotabilidade e ortogonalidade*.



**Figura 5.** Sequência de arranjos partindo-se de um fatorial completo  $2^3$  (a), com o acréscimo de 6 pontos axiais e um ponto central (b) e finalmente com a adição de repetições ao ponto central (c).

Não há desenho perfeito; há certos tipos de desenho adotados para satisfazer certas propriedades e objetivos do modelo, como mostrado na Figura 5. É Interessante notar que estas duas condições são usualmente não compatíveis, resultando em consideráveis dilemas do ponto de vista teórico ainda que do ponto de vista prático pequenas diferenças no valor de  $\alpha$  não possuem uma magnitude suficiente para causar diferenças significativas nos níveis dos fatores. O número de pontos centrais para alcançar as características de rotabilidade ou ortogonalidade também deve ser bem planejado, já que um excesso de pontos centrais para, por exemplo, produzir um modelo ortogonal e rotável, agrega pouca operacionalidade ao desenho. Novamente, na prática, o valor de  $\alpha$  é ditado principalmente pela região de interesse do estudo (DEMING *et al.*, 1987; MONTGOMERY, 2000; BRERETON, 2003; MASON, 2003; MYERS *et al.*, 2003).

### 7.6.2 Modelagem

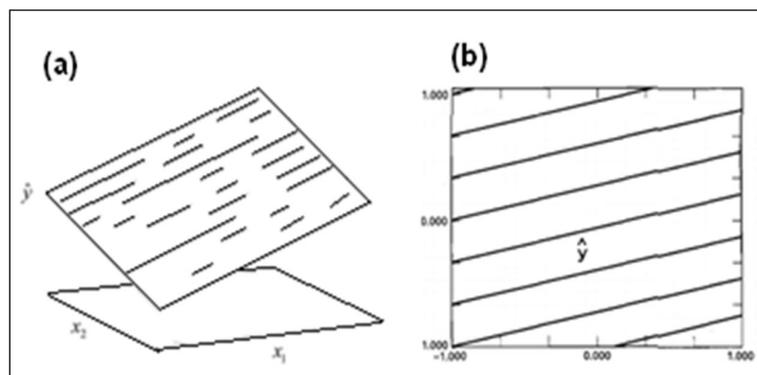
A forma verdadeira de uma função  $f$  que poderia representar o processo em estudo é sempre desconhecida, necessitando-se criar um modelo que se aproxime da real função. Os modelos aplicados são modelos de regressão múltipla. Os coeficientes podem ser obtidos da mesma forma que utilizado na regressão simples, ou seja, pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MYERS *et al.*, 2003). A análise de variância e a formulação das hipóteses são feitas da mesma forma como citado no item 7.4.

O modelo de primeira ordem pode ser apropriado quando o experimentador está interessado em aproximar a superfície de resposta sobre uma região relativamente pequena de variáveis independentes no espaço em uma localização onde há uma pequena curvatura. Considerando-se um desenho com dois fatores, o polinômio que representa este tipo de função é representado por

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2$$

#### Equação 4

onde  $y$  representa a resposta do processo,  $b_0$  é a média geral,  $b_1$ ,  $b_2$  e  $b_{12}$  são os parâmetros (coeficientes) e  $x_1$ ,  $x_2$ , e  $x_1x_2$  são os fatores. A partir do polinômio pode-se obter uma *superfície de resposta* e um *gráfico de contornos* como demonstrado na Figura 6 (MYERS *et al.*, 2003).



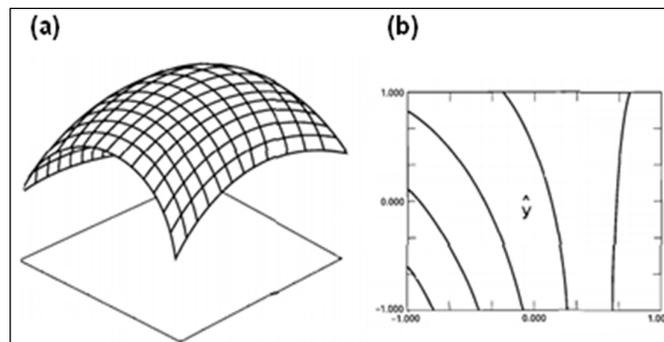
**Figura 6.** Superfície de resposta (a) e gráfico de contornos (b) para uma modelagem a partir de 2 variáveis independentes ( $x_1$ ,  $x_2$ ) e uma variável dependente (resposta;  $\hat{y}$ ).

Graficamente, quando a interação de termos causa curvatura na superfície de resposta e esta curva possui magnitude significativa, um modelo de segunda ordem pode ser o mais indicado, o qual, para um desenho com dois fatores, pode ser representado algebricamente pela seguinte equação

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 + b_{12}x_1x_2$$

### Equação 5

onde os termos  $b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2$  representam os termos quadráticos. Uma modelagem de segundo grau resulta em uma superfície de resposta e um gráfico de contorno como representado na Figura 7. Percebe-se tanto pela acentuada curvatura da superfície de resposta como pelo não-parallelismo das linhas no gráfico de contorno o comportamento de uma função de segundo grau (MYERS *et al.*, 2003).



**Figura 7.** Superfície de resposta (a) e gráfico de contornos (b) para uma função de segundo grau.

#### 7.6.3 Avaliação de respostas múltiplas

Em certos casos, o experimentador quer otimizar certo número de respostas ao mesmo tempo. No entanto, algumas vezes o objetivo para cada resposta é conflitante, sendo necessário utilizar alguma ferramenta que concilie o objetivo para cada uma das respostas, ou seja, que seja encontrado um ótimo global. Nesse sentido o uso da chamada *função desejabilidade (desirability)* ou *função de Derringer* mostra-se como abordagem mais adequada (MYERS *et al.*, 2003).

Na função de Derringer cada  $i$ -ésima resposta é designada como uma *função desejabilidade*,  $d_i$ , onde o valor de  $d_i$  varia entre 0 e 1. A função  $d_i$  é definida de

forma diferente baseada sobre o objetivo da resposta. Se a resposta é para ser maximizada,  $d_i$  é definido como:

$$d_i = \begin{cases} 0 & y_i < L \\ (\hat{y}_i - L / T - L)^\omega & L \leq y_i \leq T \\ 1 & y_i > T \end{cases}$$

### Equação 6

onde  $T$  representa o *valor alvo* da  $i$ -ésima resposta  $y_i$ ,  $L$  representa o limite inferior aceitável para a resposta e  $\omega$  representa o *peso*. Quando  $\omega=1$  a função  $d_i$  é linear. Se  $\omega>1$  então a importância é enfatizada para obtenção da resposta alvo. Quando  $\omega<1$  menos peso é designado para a obtenção da resposta alvo. Na situação em que se deseja minimizar a resposta,  $d_i$  é definido como:

$$d_i = \begin{cases} 1 & y_i < L \\ (U - \hat{y}_i / U - T)^\omega & T \leq y_i \leq U \\ 0 & y_i > U \end{cases}$$

### Equação 7

onde  $U$  representa o limite superior aceitável para a resposta (as demais designações seguem como na Equação 6). No entanto há situações em que a resposta desejada não é um máximo ou mínimo mas sim tão próximo quanto possível de um valor ótimo. Neste caso  $d_i$  é definida como:

$$d_i = \begin{cases} 0 & y_i < L \\ (\hat{y}_i - L / T - L)^{\omega_1} & L \leq y_i \leq T \\ (U - \hat{y}_i / U - T)^{\omega_2} & T \leq y_i \leq U \\ 0 & y_i > U \end{cases}$$

### Equação 8

Uma vez definida a função de *desejabilidade* para cada resposta, assumindo que há  $m$  respostas, a *desejabilidade global ou desejabilidade total* é obtida por:

$$D = (d_1^{r_1}, d_2^{r_2}, \dots, d_m^{r_m})^{1/(r_1 + r_2 + \dots + r_m)}$$

### **Equação 9**

Onde  $r_m$  representa a importância  $d$  de cada resposta. Quanto maior o valor de  $r_m$ , maior a importância da resposta em relação às demais. O objetivo final da função  $D$  é encontrar o melhor ajuste; quanto maior o valor de  $D$ , mais próximo do ótimo, sendo  $D=1$  o valor máximo da função (MYERS *et al.*, 2003).

### **7.7 Desenhos fracionados**

Um problema de utilizar fatoriais completos é o grande número de experimentos que por vezes é gerado. Por exemplo, em um fatorial  $2^k$  com 10 fatores ter-se-á 1024 experimentos, o que por vezes pode ser impraticável. Muitas combinações de fatores podem resultar em informação não proveitosa, além do fato de que as interações após certa ordem de magnitude tenderem a não ser significativas. Um desenho com três fatores é demonstrado na forma de fatorial completo na Tabela 5 e na forma de fatorial fracionado ( $2^{k-1}$ ) na Tabela 6 (BRERETON, 2003).

**Tabela 5.** Matriz de sinais para um fatorial completo  $2^3$ .

Experimento	Fator 1	Fator 2	Fator 3	Desenho da matriz								
				<sup>1</sup> x <sub>0</sub>	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>	x <sub>1</sub> x <sub>2</sub>	x <sub>1</sub> x <sub>3</sub>	x <sub>2</sub> x <sub>3</sub>	x <sub>1</sub> x <sub>2</sub> x <sub>3</sub>	
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
3	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-
4	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
5	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-
6	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+
7	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
8	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-

<sup>1</sup>x<sub>0</sub> representa o intercepto e x<sub>1</sub>, x<sub>2</sub>, x<sub>3</sub> representam os fatores no formato de modelo de regressão para o fatorial  $2^3$ .

**Tabela 6.** Matriz de sinais para um fatorial fracionado  $2^3$ .

Experimento	Fator 1	Fator 2	Fator 3	Desenho da matriz								
				x <sub>0</sub>	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>	x <sub>1</sub> x <sub>2</sub>	x <sub>1</sub> x <sub>3</sub>	x <sub>2</sub> x <sub>3</sub>	x <sub>1</sub> x <sub>2</sub> x <sub>3</sub>	
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
3	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
4	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+

<sup>1</sup>x<sub>0</sub> representa o intercepto e x<sub>1</sub>, x<sub>2</sub>, x<sub>3</sub> representam os fatores no formato de modelo de regressão para o fatorial  $2^3$ .

Com relação aos efeitos, a matriz de experimentos do fatorial fracionado (Tabela 6) possui as quatro primeiras colunas diferentes (x<sub>0</sub>, x<sub>1</sub>, x<sub>2</sub>, x<sub>3</sub>) e cada uma das últimas quatro correspondem a uma das primeiras quatro colunas. Isso implica que pela redução de experimentos a quantidade de informações também é reduzida (BRERETON, 2003).

No entanto, quando se utiliza este tipo de desenho, não se está interessado em segregações detalhadas dos efeitos, em gerar modelos, mas sim em uma avaliação geral de como os vários fatores e suas interações influenciam a resposta do sistema. Existem várias formas de se realizar o fracionamento e a forma mais simples é utilizar a fórmula  $2^{k-1}$  (k para o número de fatores), onde, por exemplo, a partir de 5 fatores ao invés de 32 experimentos (fatorial completo) ter-se-á 16 experimentos (BRERETON, 2003).

Nesse sentido, *Plackett e Burman* publicaram seu trabalho clássico em 1946, onde desenvolveram uma forma mais reduzida para ser utilizada no fracionamento de desenhos fatoriais. Eles propuseram um número de desenhos fatoriais de dois níveis onde o número de experimentos é múltiplo de 4 e o número de experimentos excede o número de fatores,  $k$ , por uma unidade. O método de geração do fracionado de Plackett-Burman é demonstrado na Tabela 7 (BRERETON, 2003).

**Tabela 7.** Método para gerar a matriz de Plackett-Burman para um fatorial com 11 fatores, sendo o *gerador* destacado pela elipse.

		Fatores										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Experimentos	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
	3	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-
	4	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
	5	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+
	6	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+
	7	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
	8	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
	9	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-
	10	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+
	11	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
	12	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+

Geradores para desenhos padrão de Plackett-Burman para 7, 11, 15, 19 e 23 fatores são dados na Tabela 8. Nota-se que de 7 para 15 fatores também é possível utilizar fatoriais fracionados de forma convencional. Se o número de fatores é menor do que o padronizado no desenho (múltiplo de 4 -1), os fatores finais podem ser do tipo *dummy*. Este tipo de fator não representa nenhuma variável do sistema; simplesmente é uma forma de completar a matriz de dados para que o arranjo matricial possa ser realizado (BRERETON, 2003).

**Tabela 8.** Geradores para desenho de Plackett-Burman considerando-se a primeira linha no nível “-”.

Fatores	Gerador
7	+++--+
11	+++++---
15	+++++---+
19	+++-----+
23	+++++---+

## 8 Validação de métodos analíticos

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve ser validado. O processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado (RIBANI *et al.*, 2004)

Diversas normas e guias de orientação sobre validação de métodos encontram-se atualmente disponíveis, como a *International Conference on Harmonization* (ICH), *United States Pharmacopeia* (USP), a Resolução RE 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e a agência estadunidense *Food and Drugs Administration* (FDA) (FDA, 1994; BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP, 2011).

Além disso, trabalhos de revisão em periódicos procuram orientar sobre alguns detalhes que por vezes não são suficientemente explorados nos textos apresentados pelas guias e normas oficiais, como por exemplo a forma de realizar estudos de degradação forçada, limites de variabilidade nas medidas realizadas e formas de abordagem da robustez (BAKSHI e SINGH, 2002; SHABIR, 2003).

Neste sentido, considerando-se especificamente aplicações para validação de metodologia analítica envolvendo métodos cromatográficos, DEJAEGER e HEYDEN (2007) recomendam a utilização de desenhos fracionados para a análise da robustez. Desta maneira, segundo os autores, é possível avaliar de um modo

mais completo as possíveis variações que o método poderá sofrer e o impacto sobre as características de resposta.

## 9 Referências

ABBRUZZESE, G. The medical management of spasticity. *European Journal of Neurology*. v. 9 (1), p. 30-34, 2002.

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.

BERETON, R. G. *Chemometrics: Data analysis for the laboratory and chemical plant*. Chichester: John Wiley & Sons, 2006, 297p.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 899 de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 jun. 2003.

BRUNELLI C.; GORECKI T.; ZHAO Y.; SANDRA P. Corona-charged aerosol detection in supercritical fluid chromatography for pharmaceutical analysis. *Analytical Chemistry*. v. 79 (6), p. 2472-2482, 2007.

CORONACAD. *The new era in HPLC detection*. 2010. Disponível em <<http://www.coronacad.com/corona.htm>>. Acesso em 22/09/2011.

DEJAEGHER, B.; HEYDEN, Y. V. Ruggedness and robustness testing. *Journal of Chromatography A*. v.1158, p.138–157, 2007.

DEMING, S. N.; MORGAN, S. L. *Experimental design; a chemometric approach*. Amsterdam: Elsevier, 1987, 286p.

FDA - Food and Drug Administration. Reviewer Guidance: *Validation of Chromatographic Methods*, Center for Drug Evaluation and Research, US Food and Drug Administration, 1994.

GAMACHE, P.H.; MCCARTHY S.M.; FREETO S.M.; ASA M.J.; WOODCOCK M.J.; LAWS K.; COLE R.O. HPLC analysis of non-volatile analytes using charged aerosol detector. *LC/CG Europe*.v. 18(6), p. 345-354, 2005.

GORECKI T.; LYNEN F. SZUCS R. SANDRA P. Universal response in liquid chromatography using charged aerosol detection. *Analytical Chemistry*. v. 78(9) 3186-3192, 2006.

HUANG Z.; RICHARDS M.A.; ZHA Y.; FRANCIS R.; LOZANO J.; RUAN J. Determination of inorganic pharmaceutical counter ions using hydrophilic interaction chromatography coupled with a Corona CAD detector. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. v. 50(5), p. 809-14, 2009.

ICH - International Conference on Harmonization. Validation of analytical procedure: text and methodology Q2 (R1). ICH Steering Committee, Switzerland, 2005.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia Básica e Clínica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003, 400.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008/2009, 5.3.

KOU, D.; MANIUS, G.; ZHANG, S.; CHOKSHI, H.P. Size exclusion chromatography with Corona charged aerosol detector for the analysis of polyethylene glycol polymer. *Journal of Chromatography A*. v. 1216 (28). p.5424-5428, 2009.

KUMAR, R.S., NATHAN, P.S., NALLASIVAN, P.K., SOLOMON, W.D.S., VENKATNARAYANAN R. A validated reversed phase HPLC-method for the determination of aceclofenac and tizanidine in tablets. *Journal of Pharmaceutical Research and Health Care*. v. 2. p. 84-94, 2010.

LATASTE, X., EMRE M., DAVIS C., GROVES L. Comparative profile of tizanidine in the management of spasticity. *Neurology*. v. 44 (9). p. S53-S59, 1994.

LIU, K.X.; FANG, J.B.; CAUCON, N.; ZHOU, P. Direct stability-indicating method development and validation for analysis of etidronate disodium using a mixed-mode column and charged aerosol detector. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis*. v.46. p. 639-644, 2008.

MASON, R. L.; GUNST, R.F.; HESS, J. L. *Statistical Design and Analysis of Experiments*. Hoboken: John Wiley & Sons, 2003, 760p.

MONTGOMERY, D. C. *Design and Analysis of Experiments*. Hoboken: John Wiley & Sons, 2000, 696p.

MYERS, R. H; MONTGOMERY, D. C.; ANDERSON-COOK, A. C. M. *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments*. Hoboken: John Wiley & Sons, 2003, 760p.

MILANOV I., GEORGIEV D. Mechanisms of tizanidine action on spasticity. *Acta Neurol Scand.* v.89, p. 274-279, 1994.

NOVARTIS, 2007. Sirdalud® 2 mg. São Paulo, 2007. 1f. Bula

PURANIK M., WADHER S. J., DHOLE S., PG YEOLE P. G. Simultaneous estimation of valdecoxib and tizanidine hydrochloride in tablets by RP-HPLC. *Indian Journal Pharmaceutical Science.* v.68, p. 670–672, 2006.

QI M. L., WANG P., WANG L. Validated liquid chromatography method for assay of tizanidine in drug substance and formulated products. *Analytica Chimica Acta.* v. 478, p. 171-177, 2002.

RAMMA C. S., DESHPANDE D.K., SHIRODE A. R., WAMORKAR V. V., KAKAD A. B., KADAM V. J. Reverse-phase high performance liquid chromatographic determination of Tizanidine and Valdecoxib in tablets. *Indian Journal Pharmaceutical Science.* v. 68, p. 514-516, 2006.

RANG H. P., DALE M. M., RITTER J. M., MOORE P. K. **Farmacologia.** 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007, 483p.

REILLY J.; EVERATT B.; ALDEROFT C. Implementation of Charged Aerosol Detection in Routine Reversed Phase Liquid Chromatography Methods. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies.* v. 31(20), p. 3132-3142, 2008.

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

SCHONHERR C.; TOUCHENE S.; WILSER G.; PESCHKA-SUSS R.; FRANCESE G. Simple and precise detection of lipid compounds present within liposomal formulations using a charged aerosol detector. *Journal of Chromatography A.* v. 1216 (5), p. 781-786, 2009.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A.* v.987, p. 57–66, 2003.

SMITH C., BIRNBAUM G., CARTER J., GREESTEIN J., LUBLIN F. D. Tizanidine treatment of spasticity caused by multiple sclerosis: results of a double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology*. v. 44(9), p. S34-S43, 1994.

SWEETMAN S. **Martindale: The complete drug reference**. London: Pharmaceutical Press. Greenwood Village, 2007. CD-ROM.

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

USP -The United States Pharmacopeial Convention. NF 34. Rockville: 2011.

VAIDYA V. V., SINGH G. R., CHOUKEKAR M. P., KEKARE M. B. Simultaneous RP HPLC determination of aceclofenac, paracetamol and tizanidine in pharmaceutical preparations. *E-Journal of Chemistry*. v. 7(1), p. 260-264, 2010.

VERVOORT N.; DAEMEN D.; TOROK G. Performance evaluation of evaporative light scattering detection and charged aerosol detection in reversed phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. v. 1189(1-2), p. 92-100, 2008.

WAGSTAFF A. J., BRYSON H. M. Tizanidine: A review of its pharmacology, clinical efficacy and tolerability in the management of spasticity associated with cerebral and spinal disorders. *Drugs*. v. 53, p.435-452, 1997.

**CAPÍTULO 1 – Caracterização e identificação da SQR de cloridrato de tizanidina e do produto acabado**

---



## **1.1 Caracterização e propriedades físicas**

Neste trabalho, utilizou-se como substância química de referência (SQR) cloridrato de tizanidina, teor 99,70% (lote: TIZB08001), que foi caracterizada e quantificada, a fim de garantir a sua identidade e o grau de pureza informado. A mesma foi fornecida pela Importadora Química Delaware Ltda., com origem da Índia (Elder Pharma Ltda.). Três formulações farmacêuticas foram adquiridas: comprimidos de 2 mg de cloridrato de tizanidina do medicamento de referência (Sirdalud<sup>®</sup> - lote: Z0061 - Novartis) e do medicamento genérico (lote: 2090323 - Ranbaxy) e cápsulas de 2 mg de cloridrato de tizanidina manipuladas. A SQR e as formas farmacêuticas encontram-se dentro do prazo de validade.

### **1.1.1 Determinação da solubilidade**

#### **1.1.1.1 Materiais e método**

Com o objetivo de caracterizar a SQR foi realizada a determinação da solubilidade como recomendado pela FARMACOPÉIA BRASILEIRA (2010).

Os solventes testados foram: água; metanol; acetato de etila; clorofórmio, éter etílico; ácido clorídrico 0,1 *M* e hidróxido de sódio 0,1 *M*.

O teste de solubilidade foi conduzido à temperatura ambiente (25 °C). Adicionaram-se volumes crescentes de cada solvente sobre o fármaco, mediante agitação, até a sua completa solubilização. A classificação de solubilidade foi determinada de acordo com a FARMACOPÉIA BRASILEIRA (2010).

O resultado obtido experimentalmente foi comparado com as especificações das monografias da Farmacopeia Americana (USP 34, 2011) e Farmacopeia Japonesa (JP 15, 2009).

#### **1.1.1.2 Resultados e discussão**

O Quadro 1.1, apresenta os resultados, os quais indicaram que a SQR ficou dentro do especificado pelas monografias oficiais.

**Quadro 1.1.** Resultados da determinação de solubilidade da SQR de cloridrato de tizanidina frente a cada solvente.

<b>Solvente</b>	<b>Solubilidade</b>	<b>Classificação de Solubilidade*</b>
Água	Solúvel	De 10 a 30 partes
Metanol	Solúvel	De 10 a 30 partes
Acetato de etila	Praticamente insolúvel	Mais de 10.000 partes
Acetona	Praticamente insolúvel	Mais de 10.000 partes
Clorofórmio	Praticamente insolúvel	Mais de 10.000 partes
Ácido acético	Praticamente insolúvel	Mais de 10.000 partes
Anidrido acético	Praticamente insolúvel	Mais de 10.000 partes

\*Conforme a FB (2010), o termo *partes* refere-se à dissolução de 1 g do fármaco por mililitros do solvente estabelecido no número de *partes*.

Água e metanol são solventes polares, conseqüentemente, são solventes perfeitos para solubilização de aminas que são compostos polares. O teste de solubilidade cumpre com o especificado na USP 34 (2011) e JP 15 (2009).

## 1.1.2 Determinação do pH em solução

### 1.1.2.1 Materiais e método

Para a determinação do pH da SQR, foi utilizado um potenciômetro Q400 da marca Quimis, com compensação automática de temperatura. Acoplou-se a esse um eletrodo de vidro-calomelano pH/ATC. O equipamento foi previamente aferido com as soluções tampão de pH 7,0 e pH 4,0, nessa ordem.

Mediram-se os pH das soluções aquosas do fármaco a 1%. Para tanto, foram preparadas três soluções de SQR, e a determinação foi realizada em triplicada para cada uma delas.

### 1.1.2.2 Resultados e discussão

A média da determinação de pH foi de 4,82 (n=3) e um DPR de 0,21%. Estes resultados indicaram que a SQR estava de acordo com a faixa especificada pela USP (2011) (4,3 – 5,3 para solução aquosa 1%).

A medida potenciométrica do pH ocorre mediante alteração do potencial de

uma célula galvânica, a qual é inserida na solução cujo pH se quer determinar. A determinação do pH em solução aquosa constitui um método rápido e simples, auxiliando na caracterização do fármaco (KOROLKOVAS, 1988).

### **1.1.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)**

#### **1.1.3.1 Materiais e métodos**

A SQR foi submetida à análise por DSC.

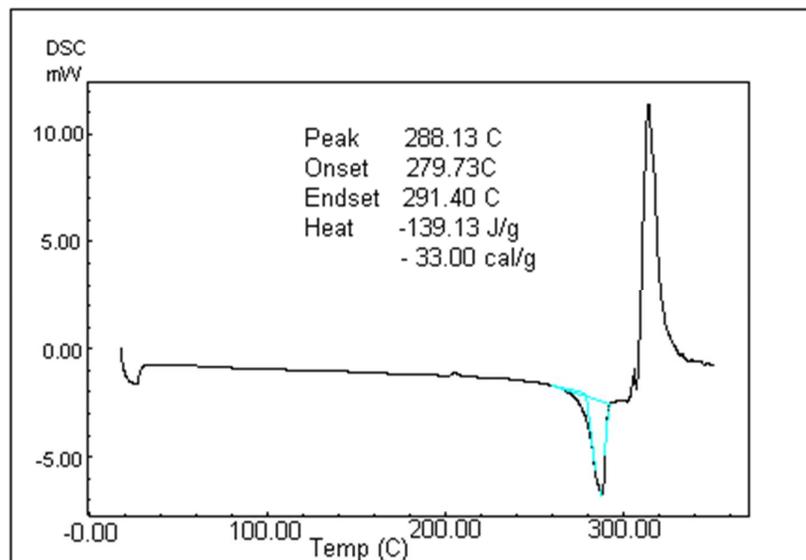
Pesou-se de 1 a 2 mg, da SQR em um porta-amostra de alumínio, em balança (Satorius MC210P), o qual foi posteriormente tampado e selado em selador adequado. O equipamento utilizado foi SHIMADZU DSC-60 acoplado a integrador THERMAL ANALYZER TA-60WS e ao controlado de fluxo FC-60A, sob atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de 50 mL / min e velocidade de aquecimento de 10 °C /min até 300 °C.

O equipamento foi previamente calibrado com índio e zinco. Como referência, foi utilizado um porta-amostra vazio.

As análises foram realizadas no Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTF), da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

#### **1.1.3.2 Resultados e discussão**

O termograma obtido na análise da SQR (Figura 1.1) apresenta dois eventos: um endotérmico e um exotérmico. O evento endotérmico é característico de fusão. O ponto de fusão da SQR foi obtido através da determinação do *Onset* (279,73°C) e *Endset* (291,40°C) já calculado e fornecido pelo próprio equipamento, que corresponde ao ponto de fusão de 290 °C (com decomposição) especificado na JP 15 (2009). O termograma ainda apresenta um evento exotérmico que pode ser característico de degradação ou de polimorfismo.



**Figura 1.1** Termograma obtido da análise da SQR de cloridrato de tizanidina

#### 1.1.4 Reação para cloretos

##### 1.1.4.1 Materiais e método

Pesaram-se cerca de 20 mg da SQR e das amostras de produto acabado. Adicionou-se 1 mL de água. A esta solução, acrescentou-se: 1 gota de HNO<sub>3</sub> 1% e 0,5 mL de AgNO<sub>3</sub> 0,1 M. Formou-se um precipitado branco caseoso. Dividiu-se o precipitado entre dois tubos de ensaio. Em um tubo de ensaio, realizou-se o teste de solubilidade com HNO<sub>3</sub> 1%, enquanto no outro com NH<sub>4</sub>OH 6 M.

A positividade do teste é confirmada pela formação de precipitado branco caseoso, insolúvel em HNO<sub>3</sub> 1%, mas, solúvel em ligeiro excesso de NH<sub>4</sub>OH 6 M.

##### 1.1.4.2 Resultado e discussão

A SQR reagiu com AgNO<sub>3</sub> 0,1 M e produziu um precipitado branco. O precipitado formado foi insolúvel em HNO<sub>3</sub> 1% e solúvel em NH<sub>4</sub>OH 6 M, confirmando a presença de cloreto na amostra. Fármacos na forma de cloridrato reagem com AgNO<sub>3</sub> 0,1 M, em meio acidificado com HNO<sub>3</sub> 1%, formando precipitado branco caseoso. O precipitado é insolúvel em ácido nítrico e solúvel em hidróxido de amônio 6 M (FB, 2010; KOROLKOVAS, 1988; USP 34, 2011).

### 1.1.5 Perda por dessecação

#### 1.1.5.1 Material e método

Pesou-se, exatamente, cerca de 1 g de SQR em pesa-filtro previamente dessecado e pesado. Colocou-se o pesa-filtro contendo a amostra na estufa, a 105 °C até peso constante. Após resfriamento em dessecador, pesou-se o pesa-filtro. A porcentagem de perda por dessecação é dada pela equação 1.1:

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

Pa

#### Equação 1.1

Onde:

Pu: pesa-filtro com amostra antes da dessecação

Ps: pesa-filtro com amostra após a dessecação

Pa: peso da amostra

#### 1.1.5.2 Resultado e discussão

Esse ensaio se destina a determinar a quantidade de substância volátil de qualquer natureza eliminada nas condições especificadas na monografia (FB 2010). Foi realizado em triplicada, e a SQR dessecada foi utilizada para o desenvolvimento e validação do método analítico utilizando volumetria em meio não-aquoso.

A média da umidade foi de 0,04% (n=3) e DPR de 2,43%. Estes resultados indicam que a SQR estava de acordo com a faixa especificada pela USP 34 (2011) (não mais que 0,5%) e também pela JP 15 (2009) (não mais que 0,2%). O baixo teor de umidade é esperado para uma molécula que não possui água de hidratação e possui alto grau de pureza.

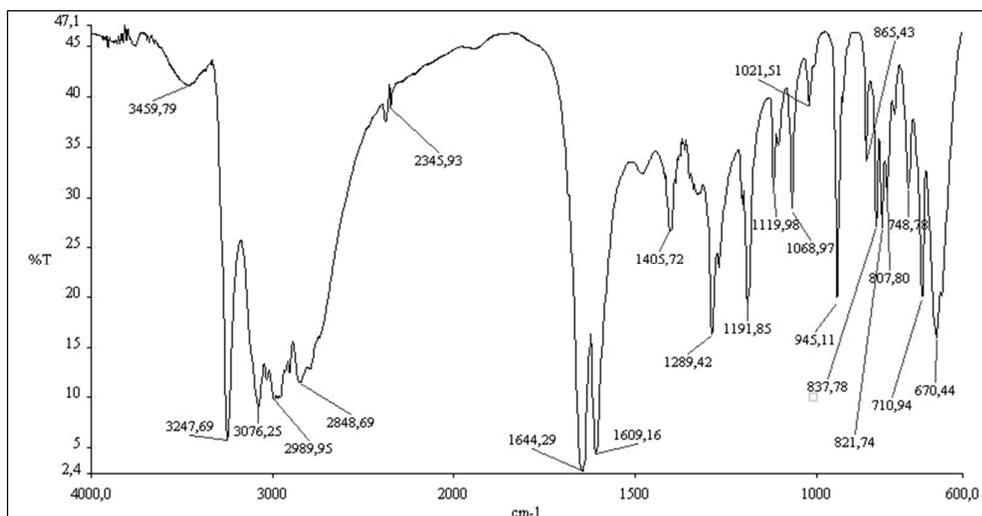
## 1.1.6 Espectrofotometria na região do infravermelho (IV)

### 1.1.6.1 Material e método

Os espectros foram registrados em espectrofotômetro de absorção na região do infravermelho (marca Bomen-Hartmann & Braun, série MB), na faixa de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Para tanto, foram produzidas pastilhas de 150 mg de brometo de potássio contendo 1% da SQR.

### 1.1.6.2 Resultados e discussão

O espectro de infravermelho obtido com a SQR pode ser visualizado na Figura 1.2. A Tabela 1.1 lista as principais bandas de absorção levando em conta os grupos funcionais importantes para a identificação da molécula. Foi possível observar grupamentos importantes para identificação como bandas da amina secundária e amina associada. Com este ensaio pode-se confirmar sua identidade.



**Figura 1.2.** Espectro no infravermelho do cloridrato de tizanidina em pastilha de KBr.

**Tabela 1.1.** Principais bandas obtidas com o espectro da SQR de cloridrato de tizanidina (SOLOMONS, 2009; SILVERSTEIN, 2007).

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
3247	Deformação axial de N-H associado em aminas secundárias
3076	Deformação axial de C-H em alcenos
1644	C=C alcenos
1609	C=C alcenos conjugados
1289	Estiramento do grupo N-H da amina
837	Anel aromático com 2 H adjacentes (tetrassubstituído)

### 1.1.7 Cromatografia em camada delgada

#### 1.1.7.1 Material e método

Para desenvolver o método de caracterização utilizaram-se placas analíticas de gel de sílica SIL G/UV<sub>254</sub> (Macherey-Nagel) como fase estacionária, com espessura da camada de sílica de 0,2 mm. As amostras foram solubilizadas em água.

A fase móvel testada (metanol:acetona) foi colocada na câmara de eluição 1h antes da análise a fim de saturar a cuba. Como detecção utilizou-se vapor de iodo como revelador ou irradiação com luz ultravioleta em 254 nm. Após a secagem do eluente em temperatura ambiente, procedeu-se a revelação ou visualização das manchas correspondentes à migração da amostra e SQR a partir dos seus respectivos pontos de aplicação. Mediu-se esta distância com auxílio de paquímetro, a qual originou o Rf de cada ponto de aplicação, sendo calculado pela Equação 1.2.

$$R_f = \frac{(\text{distância atingida pela banda a partir da origem})}{(\text{distância percorrida pelo solvente desde a origem})}$$

#### Equação 1.2

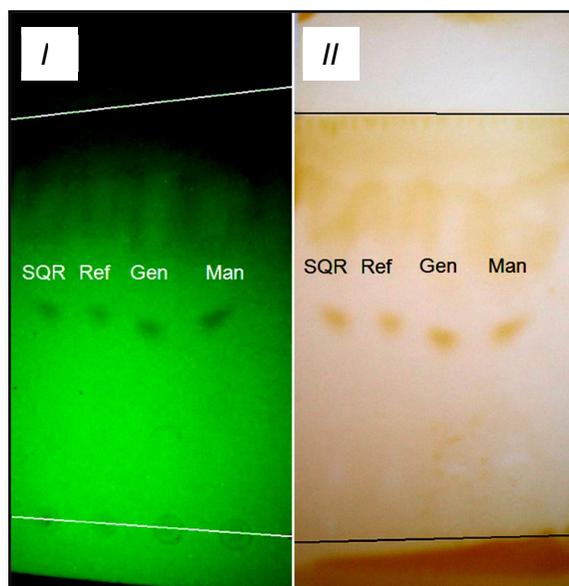
Foram realizadas variações quanto à quantidade de amostra no ponto de aplicação da cromatoplaça e a proporção de solventes nas fases móveis testadas.

A caracterização foi realizada comparando-se o Rf da SQR com o das amostras de produto acabado (*pool* de 20 comprimidos/cápsulas) após proceder a eluição no sistema cromatográfico otimizado.

### 1.1.7.2 Resultado e discussão

O sistema final obtido para a CCD encontra-se descrito no Quadro 1.2 e ilustrado na Figura 1.3. Testes com a SQR em solventes isolados como metanol, acetona, isopropanol, não permitiram a eluição adequada na cromatoplaça. A utilização de metanol e acetona demonstrou excessiva afinidade pelo eluente, não produzindo resultados satisfatórios. Foram testadas algumas variações de proporção entre metanol e acetona até se encontrar a que foi considerada mais adequada.

Tanto na detecção por vapores de iodo como por radiação ultravioleta em 254nm é possível verificar que a mancha das amostras de comprimido de referência (Ref), do genérico (Gen) e das cápsulas manipuladas (Man) e da SQR possuem o mesmo comportamento de eluição, o que se confirma pelos valores de Rf próximos. Logo, foi possível identificar o fármaco a partir de *pool* de comprimidos e cápsulas por comparação de seu Rf com o valor da SQR.



**Figura 1.3.** Representação dos cromatogramas em camada delgada para formas farmacêuticas contendo cloridrato de tizanidina em UV 254nm (I) e vapores de iodo (II).

**Quadro 1.2.** Sistema final de CCD empregado na identificação da SQR e formas farmacêuticas de cloridrato de tizanidina

<b>Parâmetro</b>	<b>Valor</b>
Quantidade substância aplicada	50 µL (concentração 400 µg/mL)
Fase móvel	metanol:acetona (95:5, v/v)
Fase estacionária	Cromatoplasmas de gel de sílica SIL G/UV <sub>254</sub> (Macherey-Nagel)
Detecção	Vapores de iodo ou radiação ultravioleta em 254nm
Rf da SQR	0,50
Rf da amostra de comprimidos Referência	0,50
Rf da amostra de comprimidos Genéricos	0,47
Rf da amostra de cápsulas Manipuladas	0,49

## 2 Referências

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5. ed. Brasília: ANVISA, v.1: 2010.

KOROLKOVAS, A. **Análise Farmacêutica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1988. 208 p.

SILVERSTEIN, R. M. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SOLOMONS, T.W. G. **Química orgânica**. 9. ed. Rio de Janeiro : LTC, 2009. 1 v.

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

USP -The United States Pharmacopeial Convention. NF 34. Rockville: 2011.

**CAPÍTULO 2 – Desenvolvimento e validação de método para determinação de cloridrato de tizanidina por volumetria em meio não-aquoso.**

BRANDALISE. M., BERGOLD. A. M., SALAZAR. F. R., MENEGHINI. L. Z., CASTILHOS. T. S., **Doseamento de cloridrato de tizanidina por volumetria em meio não-aquoso.** *Revista Técnica do Farmacêutico*, v. 3, p. 14-18, 2012.

---



## 2.1 Introdução

Uma exigência legal para o monitoramento do processo magistral é a determinação do teor e/ou uniformidade do conteúdo do produto acabado, em casos específicos e com periodicidade estabelecida. É permitida a realização dessas análises em laboratórios terceirizados. Entretanto, muitos métodos requerem aparelhagem disponível no próprio laboratório da farmácia, além de possuírem um custo reduzido. Assim, sua realização deve ser incentivada, a fim de agilizar o processo de garantia da qualidade do serviço prestado (BRASIL, 2007).

Nas farmácias, as matérias-primas sólidas devem ser analisadas, no seu recebimento, efetuando-se, no mínimo, os testes qualitativos: caracteres organolépticos, solubilidade, pH, peso e ponto (ou faixa) de fusão. Podem ser aceitos os demais ensaios farmacopeicos realizados pelos fabricantes/fornecedores desde que esses estejam qualificados pela farmácia (BRASIL, 2007).

Nas indústrias farmacêuticas, antes que as matérias-primas sejam liberadas para uso, o responsável pelo controle de qualidade deve garantir que as mesmas sejam testadas quanto à conformidade em relação, às especificações de identificação, pureza, teor e outros parâmetros de qualidade. Além disso, é realizado o controle em processo e do produto acabado (BRASIL, 2003 a).

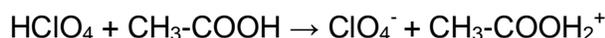
Embora exista monografia para o produto em compêndios internacionais (USP 34, 2011 e JP 15, 2009), o presente trabalho tem por objetivo estabelecer método para o doseamento de cloridrato de tizanidina matéria-prima por volumetria em meio não-aquoso utilizando indicador, o qual seja adequado para a realização em farmácias magistrais e em estabelecimentos de pequeno porte e comparar o mesmo com o método oficial.

## 2.2. Volumetria em meio não-aquoso (VMNA)

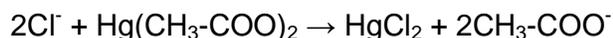
A VMNA é amplamente recomendada em monografias farmacopeicas para o doseamento de fármacos (BP, 2007; BUVÁRI-BARCZA e BACZA, 2005; FB 2010). Além disso, essa técnica é rápida, exata e requer aparelhagem simples. Sendo assim é o método de escolha por muitos laboratórios, inclusive para aqueles de controle de qualidade em farmácias magistrais.

A técnica por VMNA é utilizada para quantificar fármacos que sejam ácidos ou bases fracas, abrangendo, entre as últimas, alguns sais de aminas (FB 2010, KOROLKOVAS, 1988; WATSON, 2005). Quimicamente, o cloridrato de tizanidina é classificado como um sal de amina secundária (Figura 1, p. 10), sendo possível o seu doseamento por VMNA.

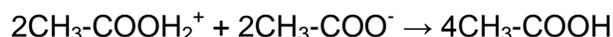
Nos cloridratos de aminas, é usual a titulação com ácido perclórico diluído em ácido acético (esquema 2.1). O ânion cloreto do fármaco, porém é uma base extremamente fraca para reagir quantitativamente com o ácido perclórico em ácido acético. Conseqüentemente, para o doseamento desses fármacos por VMNA as farmacopéias preconizam a adição de acetato mercúrico (FB 2010; USP 34, 2011). Dessa forma, o ânion cloreto é quantitativamente substituído pelo acetato produzido (esquema 2.2), sendo o último uma base forte em solução de ácido acético e passível de reação quantitativa com o titulante (esquema 2.3).



**Esquema 2.1**



**Esquema 2.2**



**Esquema 2.3**

Entretanto, o acetato mercúrico é um produto insalubre em grau máximo (BRASIL, 1978), por conter um metal pesado de elevada toxicidade (BRASIL, 2004, BUVÁRI-BARCZA e BARCZA, 2005). Considerando a repercussão do uso desse reagente quanto aos aspectos trabalhistas e ambientais, é primordial que os laboratórios priorizem o uso de técnicas analíticas com química limpa (LENARDÃO *et al.*, 2003; PRADO, 2003).

Atualmente, como alternativa ao uso do acetato mercúrico, a Farmacopéia Japonesa e algumas referências na literatura sugeriram o uso de mistura de anidrido acético e ácido acético glacial (JP 15, 2009, BUVÁRI-BARCZ e BARCZA, 2005).

Nesses casos, os resíduos formados são constituídos de ácido acético glacial, o qual é mais facilmente descartado, além de não apresentar insalubridade (BRASIL, 1978; BRASIL, 2004).

O ácido acético glacial apresenta variações do volume, em função do coeficiente de dilatação temperatura dependente. O volume de titulante gasto na bureta deve ser corrigido através da equação (esquema 2.4):

$$V_c = V_g \cdot [1 + (t_1 - t_2) \cdot 0,0011]$$

#### Esquema 2.4

Onde:

$V_c$  = volume corrigido;

$V_g$  = volume gasto na bureta;

$t_1$  = temperatura ambiente no momento da padronização do titulante;

$t_2$  = temperatura ambiente no momento da titulação da amostra;

0,0011 = coeficiente de expansão cúbica do ácido acético glacial

### 2.3 Materiais e método

#### 2.3.1 Amostra

A amostra de cloridrato de tizanidina (lote: TIZBO8001) foi fornecida pela Importadora Química Delaware Ltda., com pureza declarada de 99,7% de acordo com a USP 29, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência.

#### 2.3.2 Reagentes e soluções

A solução titulante utilizada foi o ácido perclórico 0,1 M diluído em ácido acético glacial e padronizado frente a uma solução titulante de biftalato de potássio em triplicata (FB 2010).

A solução indicadora utilizada foi a  $\alpha$ -naftolbenzeína, preparada conforme descrito na Farmacopéia Brasileira (2010).

### 2.3.3 Titulação em meio não-aquoso

Pesaram-se exatamente cerca de 200 mg de matéria-prima, previamente dessecada a 105 °C até peso constante os quais foram dissolvidos em mistura de 18 mL de ácido acético glacial e 42 mL de anidrido acético. Como indicador adicionaram-se 2 mL de  $\alpha$ -naftolbenzeína em ácido acético. Titulou-se com ácido perclórico 0,1 M e o ponto final da reação foi indicado pela mudança de cor de amarelo para verde-amarelado. Concomitantemente, o ponto final da titulação foi determinado potenciometricamente (eletrodo de vidro/calomelano).

1,0 mL de ácido perclórico 0,1 M equivale a 29,02 mg de cloridrato de tizanidina.

A temperatura durante a realização das análises variou entre 20,6 e 25,7 °C; foi feita a correção do volume do titulante de acordo com o esquema 2.4.

### 2.3.4 Precisão

A precisão foi avaliada com relação aos parâmetros de repetibilidade e precisão intermediária de acordo com a RE nº 899 (BRASIL, 2003 b).

## 2.4 Resultados e discussão

A matéria-prima utilizada foi caracterizada conforme descrito no Capítulo 2.

Os resultados das concentrações encontradas pelos métodos de VMNA utilizando indicador e potenciometria encontram-se na Tabela 2.1.

**Tabela 2.1.** Concentrações encontradas utilizando VMNA com a presença de indicador e por potenciometria.

<b>Repetição</b>	<b>Indicador</b>	<b>Potenciometria</b>
<b>1</b>	100,09	101,26
<b>2</b>	100,34	101,10
<b>3</b>	101,20	100,69
<b>4</b>	100,40	100,66
<b>5</b>	100,20	100,44
<b>6</b>	100,65	100,55
<b>7</b>	100,29	100,75
<b>8</b>	99,71	100,75
<b>9</b>	100,32	100,57
<b>10</b>	101,35	100,54
<b>11</b>	100,52	100,71
<b>12</b>	100,62	100,92
<b>13</b>	100,95	101,70
<b>14</b>	100,25	101,56
<b>15</b>	101,08	100,57
<b>16</b>	100,27	101,57
<b>17</b>	100,42	100,63
<b>18</b>	100,62	99,68
<b>Média (%)</b>	<b>100,52</b>	<b>100,81</b>
<b>DPR (%)</b>	<b>0,41</b>	<b>0,48</b>

De acordo com a Farmacopéia Japonesa (2009) o teor de cloridrato de tizanidina deve variar entre 99,0% a 101,0% em relação à substância anidra. Pelos dois métodos, as concentrações ficaram dentro dos limites estabelecidos.

O desvio padrão relativo (DPR) encontrado para os métodos ficou abaixo de 1%. Assim os mesmos são considerados reprodutíveis de acordo com a RE nº 899 (BRASIL, 2003 b).

A análise estatística dos resultados (ANOVA) (Anexo I) foi realizada considerando todas as repetições. Não demonstrou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os resultados obtidos pelos dois métodos ( $F_{cal} = 3,94 < F_{tab} = 4,13$ ).

## **2.5 Conclusão**

O método proposto demonstra ser preciso e exato, pelo baixo desvio padrão relativo. Por se tratar de técnica com metodologia muito simples, rápida e viável economicamente, a VMNA utilizando indicador  $\alpha$ -naftolbenzeína representa uma alternativa para o controle de qualidade do cloridrato de tizanidina matéria-prima em farmácias de manipulação e estabelecimentos de pequeno porte.

## 2.6 Referências

BP 2007. *British Pharmacopoeia*. Pharmacopoeia Commission British. London: The Stationery Office, 2007.

BRASIL. Ministério do Trabalho. Portaria n.º 3214, de 08 de junho de 1978. *NR 15 - Atividades e operações insalubres*. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 06 de julho de 1978.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. *Resolução RDC nº 210, de 04 de agosto de 2003*. Determina a todos os estabelecimentos fabricantes de medicamentos, o cumprimento das diretrizes estabelecidas no Regulamento Técnico das Boas Práticas para a Fabricação de Medicamentos. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, 14 de agosto de 2003 a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. *Resolução RE nº 99, de 29 de maio de 2003*. Guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, 02 de junho de 2003 b.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. *Resolução RDC nº 306, de 07 de dezembro de 2004*. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. Diário oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 10 de dezembro de 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. *Resolução - RDC nº 67 de 08 de outubro de 2007*. Dispõe sobre Boas Práticas de Manipulação de Preparações Magistrais e Oficiniais para Uso Humano em farmácias. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, 09 de outubro de 2007.

BUVÁRI-BARCZA, A.; BARCZA, L. Problems in the interpretation of nonaqueous titrations. *Pharmazie*, v.60, n.4, p 243-6, 2005.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5. ed. Brasília: ANVISA, v.1: 2010.

KOROLKOVAS, A. *Análise Farmacêutica*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1988. 208 p.

LENARDÃO, E.J.; FREITAG, R.A.; DABDOUB, M.J.; BATISTA A.C.F; SILVEIRA, C.C. "Green chemistry" - Os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. *Química Nova*, v.26, n.1. São Paulo, 2003.

PRADO, A.G.S. Química verde, os desafios da química do novo milênio. *Química Nova*, v.26, n.5, São Paulo, 2003.

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

USP 34. *The United States Pharmacopeia*. 34<sup>th</sup> ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2011.

WATSON, D.G. *Pharmaceutical analysis: a textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists*. London: Churchill Livingstone, 2005. 382p.





### 3.1 Introdução

Os trabalhos e compêndio oficiais até o presente momento envolvendo a quantificação de cloridrato de tizanidina utilizam métodos por titulometria (USP 34, 2011; JP 15, 2009), por espectrofotometria (SHARMA et al., 2010) e por CLAE utilizando detector UV (USP, 34, 2011; KUMAR et al., 2010; VAYDIA et al., 2010; GADHIMATHI et al., 2005; QI et al., 2003; MAHADIK et al., 2003).

Na ausência de método CLAE-CAD indicador de estabilidade, o objetivo desse estudo foi o desenvolvimento e validação de um método por CLAE-CAD utilizando ferramentas quimiométricas nas diferentes etapas.



**Publicação:** *Direct stability-indicating method development and validation for determination of tizanidine hydrochloride in pharmaceutical formulation using a mixed-mode column and charged aerosol detector.* Submetido ao periódico *Journal of Chromatography A*.

---



**STABILITY-INDICATING METHOD FOR DETERMINATION OF THE TIZANIDINE HYDROCHLORIDE IN PHARMACEUTICAL FORMULATION USING A LC-CAD**

BRANDALISE, M.<sup>1</sup>; MENEGHINI, L.Z. <sup>1</sup>; JUNQUEIRA, C. <sup>1</sup>; FRÖEHLICH, P. E. <sup>1</sup>; BERGOLD, A.M<sup>1</sup>

<sup>1</sup> \*Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Sul-UFRGS. Av. Ipiranga, 2752, CEP 906610-000, Porto Alegre, RS,

O *charger aerosol detector* (CAD) é um novo detector que vem sendo muito utilizado na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) nas aplicações farmacêuticas já que o CAD pode detectar grande variedade de analitos, incluindo íons, pois não é necessário que a molécula apresente cromóforo. Este trabalho teve como objetivos desenvolver e validar um método simples por CLAE-CAD para doseamento de cloridrato de tizanidina (TZ) em formas farmacêuticas, verificar a estabilidade das mesmas, comparar o método desenvolvido com o método descrito da Farmacopéia Americana (USP 34, 2011) e, através do íon cloreto (Cl), realizar a quantificação indireta do fármaco nas formulações. Para o desenvolvimento do método, os fatores que influenciam as respostas procuradas foram selecionados através de estudo exploratórios (DOE) a fim de eliminar aqueles fatores que não são significativos sobre a resposta e um desenho fatorial fracionado ( $2^{5-2}$ ) foi utilizado com o objetivo de diminuir o número de experimentos. O método foi desenvolvido e validado no cromatógrafo Shimadzu LC20AT, Corona CAD conectado em série com detector fotodiodo SPD-AVvp UV/VIS. Foi utilizada a coluna mista *Trynity* P1 C<sub>18</sub> (3.0mm x 100 mm, 3 µm); gás nitrogênio, pressão 35 psi. Para a especificidade foi realizado análises cromatográficas com os excipientes das formulações e os mesmos demonstraram não apresentar interferência para a quantificação de TZ. O estudo de estabilidade foi realizado em meio ácido, meio alcalino, oxidação (peróxido de hidrogênio 13%), calor e luz UV 352 nm. Apresentou perda de teor a amostra submetida à oxidação. Para a linearidade foi feita uma curva para TZ e outra para o Cl e o coeficiente de correlação ( $R^2$ ) foi de 0,999 para ambas curvas. A precisão do método foi confirmada pelo baixo valor do desvio padrão relativo (DPR) encontrado e a exatidão pela boa recuperação encontrada. Foi determinado também o limite de quantificação e detecção para TZ e Cl. Para a robustez do método foi utilizado um desenho fatorial descrito por *Plackett-Burmann* para avaliar a assimetria do pico e o teor da TZ e assimetria do pico do Cl. O método demonstrou ser robusto. Através do *teste-t* verificou-se que o método é equivalente ao método da USP 34. O

método desenvolvido e validado demonstrou ser preciso, exato, específico e robusto e ainda, o detector CAD detectou o produto de degradação não detectado pelo detector UV e houve a possibilidade da quantificação de TZ através do íon Cl.





O controle de qualidade é fundamental nas diversas fases do desenvolvimento farmacêutico, como nos estudos de formulações, bem como nos processos de produção dos medicamentos, o que garante a segurança e a eficácia terapêutica dos produtos farmacêuticos (WATSON, 2005).

O desenvolvimento e validação de metodologia analítica na área farmacêutica evoluíram nas últimas duas décadas acompanhando as mudanças econômicas e tecnológicas. Portanto, atualmente, existe grande variedade de métodos analíticos que podem ser utilizados no controle de qualidade de rotina. No entanto esta escolha deve ser criteriosa, levando-se em conta a análise a ser efetuada. A identidade e pureza da amostra a ser analisada, o grau de precisão e exatidão a serem obtidos, a disponibilidade de reagentes e equipamentos são fatores que devem ser considerados (SHABIR, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

Após o desenvolvimento analítico, a validação do método é necessária para garantir, através de estudos experimentais, que o mesmo atende às exigências de suas aplicações, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos (SHARBIN 2003; BRASIL, 2003, ICH, 2005).

Os estudos para validação dos métodos analíticos foram realizados de acordo com os principais códigos, avaliando os seguintes parâmetros (quando cabível): especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 34, 2011).

Para atingir o objetivo de desenvolver e validar metodologia analítica para doseamento do cloridrato de tizanidina em estabelecimentos de pequeno porte foi adaptado o método da Farmacopéia Japonesa (2009), que preconiza a volumetria em meio não-aquoso com detecção potenciométrica do ponto de equivalência. O método desenvolvido utiliza a titulação por volumetria e indicador para a determinação do ponto final. Esta técnica analítica pode ser considerada uma alternativa, mas também apresenta vantagem como simplicidade operacional, baixo consumo de amostra e de solvente, além do tempo de análise diminuído.

No setor tecnológico o avanço da microeletrônica, juntamente com a microinformática, permitiu o desenvolvimento de instrumentos e *softwares* mais sofisticados, viabilizando análises mais complexas, elucidando e/ou melhorando o

entendimento dos fenômenos e princípios anteriormente desconhecidos ou desconsiderados.

Com relação às técnicas de separação, o desenvolvimento e validação de métodos analíticos começaram a ser explorados de forma mais completa por meio de ferramentas estatísticas e computacionais, aumentando a confiabilidade da implementação dessas técnicas em análises de rotina.

Concomitantemente a quimiometria foi alcançando espaço em diferentes áreas, como nas técnicas de separação. Na CLAE o uso de superfícies de resposta se mostra de grande valia, pois, permite explorar o desenvolvimento do método de forma mais completa. As formas de aplicação podem ser conferidas nos trabalhos de MEDENICA e colaboradores (2004), WANG e colaboradores (2006), SIVAKUMAR e colaboradores (2007), BARMPALEXIS e colaboradores (2009), JANCIC-STOJANOVIC e colaboradores (2009; 2010a; 2010b) onde fatores como pH, temperatura da coluna, força iônica de fase móvel, entre outros, puderam ser avaliados em relação aos parâmetros cromatográficos. No início dos anos dois mil o uso de desenhos experimentais para CLAE e eletroforese capilar já era difundido e recomendado por HEYDEN e colaboradores (2000) tanto para a etapa de desenvolvimento como para a de validação. Posteriormente outros trabalhos confirmaram esta premissa, como no trabalho de DEJAEGER e HEYDEN (2007) sobre o uso de desenhos fatoriais na robustez de CLAE, cromatografia gasosa e eletroforese capilar. Recentemente LEARDI (2009) também expôs as vantagens de uma abordagem com desenhos experimentais, além de esclarecimentos sobre as aplicações e interpretação de resultados.

A utilização de desenhos estatísticos experimentais tem-se constituído em modelos efetivos de análise, pois possibilita a variação constante e planejada de fatores a serem estudados, com os quais se obtém grande número de informações através de menos número possível de experimentos, o que maximiza o rendimento, a produtividade e a qualidade dos resultados, minimizando tempo e custos (GABRIELSSON *et al.*, 2002;). A idéia fundamental é mudar todos os fatores relevantes, simultaneamente, sobre um conjunto de experiências planejadas e em seguida, conectar e interpretar os resultados utilizando modelos matemáticos. A metodologia do planejamento fatorial, associada à análise das superfícies de

resposta, é uma ferramenta fundamental na teoria estatística, que fornece informações seguras sobre o processo, minimizando o empirismo que envolve técnicas de tentativa e erro. Essas metodologias além de permitir uma maior precisão das estimativas dos efeitos principais dos fatores, também possibilitaram tirar conclusões mais amplas a respeito dos fatores estudados de forma simultânea, além de informar sobre a interação entre os fatores (WISSMANN & GROVER, 2009). A sua utilização no desenvolvimento e validação de métodos analíticos aumentou consideravelmente nos últimos anos, coincidindo com a evolução da informática e a disponibilização de *softwares* estatísticos. No entanto, para que essa metodologia atinja seus objetivos desejados, é necessário haver uma integração entre o processo, a estatística e o bom senso do responsável pela montagem dos experimentos e análise estatística e estratégia dos resultados (MONTGOMERY, 2001).

Dessa forma, neste trabalho buscou-se utilizar técnicas quimiométricas para explorar mais adequadamente os fatores pertinentes ao desenvolvimento e validação do método quantitativo proposto (cromatografia líquida de alta eficiência), possibilitando reduzir o número de análises e o tempo necessário para a realização dos testes, além de diminuir o gasto de solventes e reagentes.

Também foi utilizado um detector considerado universal. O detector CAD apresenta alta sensibilidade e não necessita que o analito apresente um cromóforo. Já existem alguns trabalhos como, GAMACHE e colaboradores (2005), HUTCHINSON e colaboradores (2010) e VEHOVEK e OBRAZA (2010) que fazem uma revisão dos usos e aplicação de cromatografia líquida acoplada com detector CAD. LIU e colaboradores (2008) e ZHANG e colaboradores (2010) apresentam trabalhos onde utilizam detector CAD e coluna mista para análise de fármacos e determinação de íons. BTAZEWICZ e colaboradores (2010) e STYLKOWSKA e colaboradores (2010) determinaram substâncias relatadas de fármaco e impurezas em preparação farmacêutica, respectivamente, através de LC-CAD.

A avaliação das propriedades físico-químicas, como identificação de grupo funcional, identificação por IV, pH, quantidade de água presente na molécula e cromatografia em camada delgada, abordada no Capítulo 1, foi essencial para a identificação e determinação da pureza da SQR e das amostras utilizadas neste

trabalho. A importância da avaliação dessas propriedades é fundamental para as etapas sequenciais, como apontado por HARVEY (2000), MOLDOVEANU e DAVID (2002).

Para a CLAE a modelagem estatística desenvolvida via desenho de composto central (DCC) permitiu avaliar as melhores condições para um sistema cromatográfico capaz de quantificar e identificar cloridrato de tizanidina frente ao seu produto de degradação. Com a aplicação dos protocolos de degradação forçada obteve-se a formação de um produto de degradação após a exposição do fármaco em solução ao peróxido de hidrogênio 13% por 72h. Testaram-se alguns sistemas utilizando-se coluna  $C_8$  e  $C_{18}$  e fases móveis com diferentes concentrações de solvente orgânico.

O uso da coluna mista de alta eficiência (com vários mecanismos de retenção como fase-reversa, trocador de ânions e trocador de cátions) resulta em sensibilidade podendo ser otimizada pelo ajuste da concentração de tampão na fase móvel, pH e quantidade de solvente foi possível reduzir a quantidade de solvente orgânico sem influenciar excessivamente a retenção do fármaco, observando-se modificações na resolução frente a modificações na quantidade de fase orgânica. A partir dos resultados do estudo com o fatorial fracionado exploratório  $2^{5-2}$  (Tabela II.I, Tabela II.II, Tabela II.III Tabela II.IV, anexo II) empregando-se diferentes fases móveis por meio de fatores como tipo de solvente orgânico (metanol e acetonitrila), concentração do tampão, pH, fluxo da fase móvel, e temperatura da coluna foi possível definir a região experimental para o estudo seguinte de otimização, o DCC.

Em relação ao  $K$  do cloridrato de tizanidina, pode-se verificar que a força iônica e a quantidade de acetonitrila na fase móvel influenciam muito, devido a ionização da amostra e por ser uma coluna mista. A temperatura não tem tanta influência. Porém o  $K$  do cloreto sofre influência indireta da acetonitrila, pois a força iônica predomina por se tratar de um íon (Figura III.I, anexo III).

A resolução entre o pico de degradação e da tizanidina, também sofre grande influência da força iônica do tampão e a seletividade se dá pela acetonitrila. O pico interferente sofre as mesmas influências do cloreto (Figura III.II, anexo III).

A largura do pico tem influência direta da acetonitrila e da concentração do tampão, porém o aumento da quantidade de acetonitrila na fase móvel é diretamente proporcional ao aumento do ruído, conseqüentemente um menor LQ.

O método otimizado foi validado com resultados condizentes com o que é preconizado nos compêndios oficiais (ICH, 2005; USP, 2011) tanto para a validação do modelo matemático (modelo de regressão linear) como para os demais parâmetros (exatidão, precisão). A robustez foi conduzida por meio de um desenho fracionado de *Plackett-Burman* conforme recomendação de DEJAEGER e HEYDEN (2007), apresentando resultados condizentes para ser considerado robusto.

Como demonstrado no Capítulo 3, este método foi comparado com método descrito na USP 34 (2011) e ambos os métodos foram considerados equivalentes para quantificação do cloridrato de tizanidina na forma farmacêutica estudada.

## Referências

BARMPALEXIS, P.; KANAZE, F.I.; GEORGARAKIS, E. Developing and optimizing a validated isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography separation of nimodipine and impurities in tablets using experimental design methodology. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. v.49. p. 1192-1202, 2009.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”; Publicada no D.O.U de 02 de junho de 2003.

BTAZEWICZ, A.; FIJATEC, Z.; SARNA, K.; WAROWNA-GRZÉRKIEWICZ, M. Determination of pancuronium and its impurities in Pharmaceutical preparation by LC with charge aerosol detection. *Chromatographia*. v. 72. p. 183-189, 2010.

DEJAEGHER, B.; HEYDEN, Y. V. Ruggedness and robustness testing. *Journal of Chromatography A*. v.1158. p.138–157, 2007.

GABRIELSSON, G.; LINDBERG, N.O; LUNDSTED, T. Multivariate methods in pharmaceutical application. *Journal of Chemometric*. V. 16. p. 141-160, 2002.

GAMACHE, P.H.; MCCARTHY S.M.; FREETO S.M.; ASA M.J.; WOODCOCK M.J.; LAWS K.; COLE R.O. HPLC analysis of non-volatile analytes using charged aerosol detector. *LC/CG Eur*. 2005, 18(6), 345-54.

HARVEY, D. *Modern Analytical Chemistry*. New York: McGraw-Hill, 2000, 816p.

HEYDEN, Y.V; PERRIN, C.; MASSART, D.L. Optimization strategies for HPLC and CZE. In: VALKÓ, K. *Separation Methods in Drug Synthesis and Purification*. Amsterdam: Elsevier, 2000. Chap. 6, p.160-190. 1007p.

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

ICH-Internacional Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline: *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2 (R1)*, 2005.

JANCIC-STOJANOVIC, B.; MALENOVIC, A.; IVANOVIC, D.; MEDENICA, M. Optimization and Validation of an RP-HPLC Method for Analysis of Hydrocortisone Acetate and Lidocaine in Suppositories. *Journal of AOAC International*, v 93, p.102-107, 2010a.

JANCIC-STOJANOVIC, B.; MALENOVIC, A.; IVANOVIC, D.; RAKIC T.; MEDENICA, M. Chemometrical evaluation of ropinirole and its impurity's chromatographic behavior. *Journal of Chromatography A*, v.1216, p.1263–1269, 2009.

JANCIC-STOJANOVIC, B.; POPOVIC, I.; MALENOVIC, A.; IVANOVIC, D.; MEDENICA, M. Factorial Design in Optimization of Chromatographic Separation of Ramipril and Its Impurities. *Chromatographia*, v. 71, p. 799–80, 2010b.

LEARDI, R. Experimental design in chemistry: A tutorial. *Analytica Chimica Acta*, v. 652, p.161–172, 2009.

LIU, X. K.; FANG. B.; CAUCHON, N.; ZHOU, P. Direct stability-indicating method development and validation for analysis of etidronate disodium using mixed-mode column and charge aerosol detector. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 46, p. 639–644, 2008.

MEDENICA, M.; JANCIC, B.; IVANOVIC, D.; MALENOVIC, A. Experimental design in reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of imatinib mesylate and its impurity. *Journal of Chromatography A*. v.1031, p. 243–248, 2004.

MOLDOVEANU, S.C.; DAVID, V. *Journal of Chromatography Library: Sample preparation in chromatography*. Amsterdam: Elsevier, 2002, v. 65, 938 p.

MONTGOMERY, D. C. *Design and Analysis of Experiments*. Hoboken: John Wiley & Sons, 2000, 696p.

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

SIVAKUMAR, T ; MANAVALAN, R; MURALIDHARAN, C; VALLIAPPAN, K. Multi-criteria decision making approach and experimental design as chemometric tools to optimize HPLC separation of domperidone and pantoprazole. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.43, p. 1842–1848, 2007.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A*, v.987, p. 57–66, 2003.

STYLIKOWSKA, K.; BTAZEWICZ, A; FIJATEC, Z.; SARNA, K.;. Determination of gentamicin sulphate composition and related substance by LC with charge aerosol detection. *Chromatographia*. v. 72. p. 1225-1229, 2010.

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

USP -The United States Pharmacopeial Convention. NF 34. Rockville: 2011.

VEHOVEK, T.; OBRAZA, A. Review of operating and applications of the charged aerosol detector. *Journal of Chromatography A*. v.1217, p. 1549–1556, 2010.

WANG, Y.; HARRISON, M.; CLARK, B.J. Optimising reversed-phase liquid chromatographic separation of an acidic mixture on a monolithic stationary phase with the aid of response surface methodology and experimental design. *Journal of Chromatography A*, v.1105, p.199–207, 2006.

WATSON, D.G. *Pharmaceutical analysis: a textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists*. London: Churchill Livingstone, 2005. 382p.

WISSMANN, P.J.; GROVER, M.A. A new approach to batch process optimization using experimental design. *AIChE Journal*. v. 55. p. 342–353, 2009.

ZHANG, K., DAÍ, L.; CHETWYN, N.P. Simultaneous determination of positive and negative pharmaceutical counterions using mixed-mode chromatography coupled with charged aerosol detector. *Journal of Chromatography A*, v.1217, p.5776–5784, 2010.





- A SQR de cloridrato de tizanidina foi identificada e caracterizada através de técnicas qualitativas como solubilidade, pH, ponto de fusão (DSC), reação para cloretos, CLAE, CCD e IV.
- A identificação da forma farmacêutica foi possível por CCD e reação para cloretos;
- O método desenvolvido para o doseamento por VMNA, intercambiável com o método oficial, pode ser utilizado em estabelecimentos de pequeno porte para determinação do teor da matéria-prima;
- A utilização de desenhos experimentais permitiu avaliar de forma eficiente os fatores mais significativos no desenvolvimento do método por CLAE usando número relativamente pequeno de experimentos, quando comparado com as modelagens matemáticas tradicionais;
- O método de CLAE para doseamento de cloridrato de tizanidina foi validado de acordo com os parâmetros requeridos pelos compêndios oficiais, sendo específico frente aos excipientes e ao produto de degradação obtido;
- Cloridrato de tizanidina submetido a condições de estresse mostrou-se bastante estável, sendo o *stress* oxidativo a condição em que ocorreu a maior degradação (7,75%);
- Para a realização das condições de estresse alcalino e ácido, utilizou-se hidróxido de amônio e ácido acético, devido à restrição da utilização de solventes voláteis com o *charged aerosol detector* (CAD);
- O produto de degradação originado no estresse oxidativo só pode ser detectado com o uso do CAD não sendo observado com detector UV;
- As três formulações analisadas, produto referência, produto genérico e cápsulas manipuladas apresentaram teores de fármaco dentro dos limites estabelecidos por compêndio oficial.







**Tabela I.I:** Análise de variância (ANOVA) comparando os resultados obtidos pelos dois métodos por VMNA

<b>Fontes da variação</b>	<b>gl</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>Fcal</b>	<b>Ftab</b>
<b>Entre</b>	1	0,8010	0,8010	3,9462*	4,1300
<b>Dentro</b>	34	6,9014	0,2029		
<b>Total</b>	35	7,7024			

\*Significativo para  $p < 0,05$







**Tabela II.I.** Matriz fatorial  $2^{5-2}$  para CLAE

Experimento	Solvente <sup>1</sup>	Tampão <sup>2</sup>	pH	Fluxo <sup>3</sup>	Temperatura <sup>4</sup>	K' <sub>TZ</sub> <sup>5</sup>	K' <sub>Cl</sub> <sup>6</sup>
1	MeOH	2,00	4,00	0,80	30,00	18,65	40,76
2	ACN	2,00	4,00	0,70	25,00	14,5	41,4
3	MeOH	6,00	4,00	0,70	30,00	17,1	41,87
4	ACN	6,00	4,00	0,80	25,00	10,65	40,2
5	MeOH	2,00	5,00	0,80	25,00	18,3	45,5
6	ACN	2,00	5,00	0,70	30,00	13,9	41,5
7	MeOH	6,00	5,00	0,70	25,00	15,9	42,3
8	ACN	6,00	5,00	0,80	30,00	9,5	39,52

<sup>1</sup>Tipo de solvente, metanol (MeOH) ou acetonitrila (ACN); <sup>2</sup>Concentração do tampão na fase móvel em mM; <sup>3</sup>fluxo da fase móvel em mL / min, <sup>4</sup>temperatura do forno da coluna em °C; <sup>5</sup>fator de retenção da tizanidina, <sup>6</sup> fator de retenção do cloreto.

**Tabela II.II.** Análise de variância para os efeitos do fatorial  $2^{5-2}$  da CLAE sobre o K'<sub>TZ</sub>

Fonte	SQ <sup>1</sup>	GL <sup>2</sup>	QM <sup>3</sup>	p <sup>4</sup>
Modelo	58,37	5	11,67	< 0,0001
A (solvente orgânico) <sup>5</sup>	4,62	1	4,62	< 0,0001
B (concentração do tampão) <sup>6</sup>	44,67	1	44,67	< 0,0001
C (temperatura) <sup>7</sup>	0,62	1	0,62	0,0008
AB <sup>8</sup>	1,14	1	1,14	< 0,0001
B <sup>2</sup>	7,33	1	7,33	< 0,0001
Residual	0,42	13	0,032	0,0964
Total	0,38	18		

<sup>1</sup>Soma dos quadrados; <sup>2</sup>Graus de liberdade; <sup>3</sup>quadrado médio; <sup>4</sup>p = 0,05; <sup>5</sup>Acetonitrila; <sup>6</sup>8, 12 ou 18 mM; <sup>7</sup>30, 34 ou 38°C; <sup>8</sup>interação entre fatores.

**Tabela II.III.** Análise de variância para os efeitos do fatorial  $2^{5-2}$  da CLAE sobre o K'<sub>Cl</sub>.

Fonte	SQ <sup>1</sup>	GL <sup>2</sup>	QM <sup>3</sup>	p <sup>4</sup>
Modelo	2223,08	4	555,77	< 0,0001
A (solvente orgânico) <sup>5</sup>	98,98	1	98,98	< 0,0001
B (concentração do tampão) <sup>6</sup>	1889,94	1	1889,94	0,0001
AB <sup>7</sup>	7,04	1	7,04	0,0773
B <sup>2</sup>	227,12	1	227,12	< 0,0001
Residual	27,10	14	1,94	0,0019
Total	2250,18	18		

<sup>1</sup>Soma dos quadrados; <sup>2</sup>Graus de liberdade; <sup>3</sup>quadrado médio; <sup>4</sup>p = 0,05; <sup>5</sup>Acetonitrila; <sup>6</sup>8, 12 ou 18 mM; <sup>7</sup>interação entre fatores.

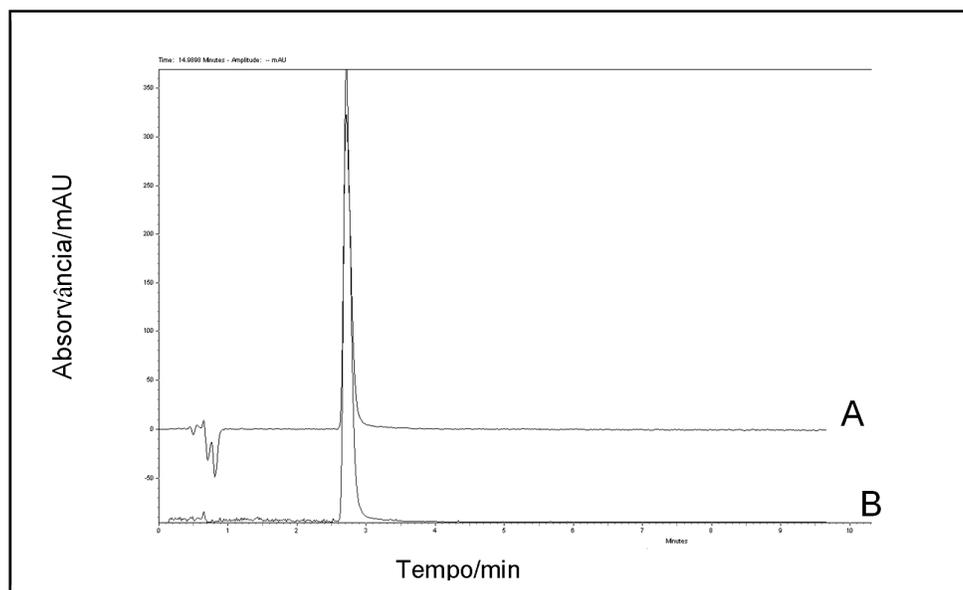
**Tabela II.IV** Análise de variância para os efeitos do fatorial  $2^{5-2}$  da CLAE sobre R.

Fonte	SQ <sup>1</sup>	GL <sup>2</sup>	QM <sup>3</sup>	p <sup>4</sup>
Modelo	85,70	6	14,28	< 0,0001
A (solvente orgânico) <sup>5</sup>	24,29	1	24,29	< 0,0001
B (concentração do tampão) <sup>6</sup>	2,86	1	2,86	0,0334
AB <sup>7</sup>	13,56	1	13,56	0,0002
A <sup>2</sup>	2,65		2,65	0,0394
B <sup>2</sup>	18,71	1	18,71	< 0,0001
A <sup>2</sup> B	3,55	1	3,55	0,0202
Residual	5,95	12	0,50	0,0118
Total	91,65	18		

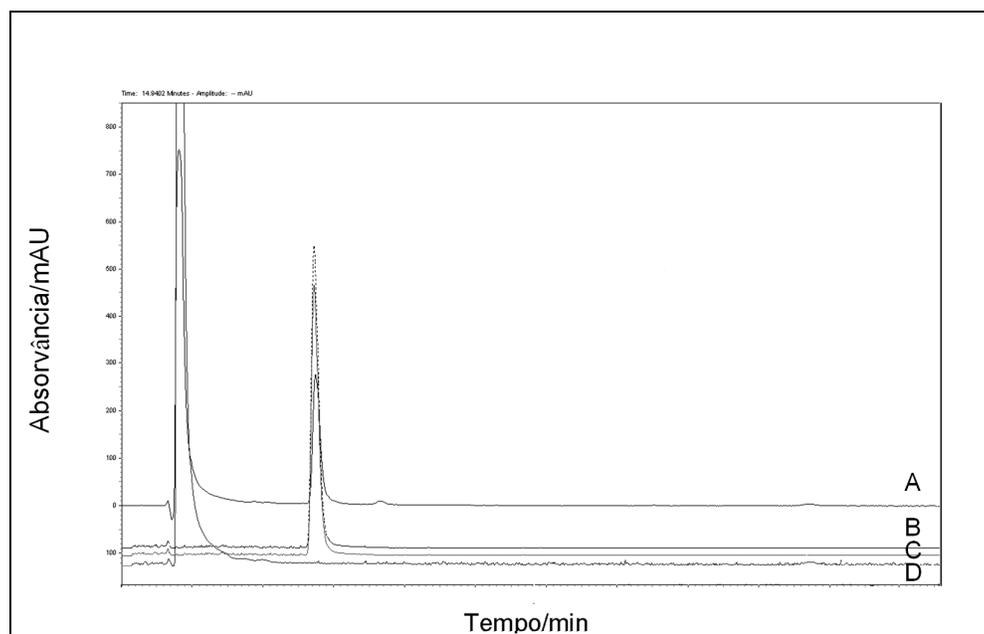
<sup>1</sup>Soma dos quadrados; <sup>2</sup>Graus de liberdade; <sup>3</sup>quadrado médio; <sup>4</sup>p = 0,05; <sup>5</sup>Acetonitrila; <sup>6</sup>8, 12 ou 18 mM; <sup>7</sup>interação entre fatores.







**Figura III.I:** Cromatograma do doseamento do comprimido de referência com detector UV 227 nm (A) e detector CAD (B).



**Figura III.II:** Cromatograma da especificidade, onde : A é o comprimido de referência degradado, B é a SQR sem ser degradada, C é o comprimido de referência sem ser degradado e D é o branco (peróxido de hidrogênio 13%).