

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

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
BROMIDRATO DE DARIFENACINA COMPRIMIDO

LEONARDO ZANCHETTI MENEGHINI

PORTO ALEGRE, 2011

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

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
BROMIDRATO DE DARIFENACINA COMPRIMIDO**

Dissertação apresentada por **Leonardo Zanchetti Meneghini**
para obtenção do GRAU DE MESTRE em
Ciências Farmacêuticas

Orientador: Profa. Dr^a. Ana Maria Bergold

Coorientador: Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich

Porto Alegre, 2011

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 25.03.2011, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Renata Pereira Limberger

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Profa. Dra. Eliane Maria Donato

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS

Profa. Dra. Andréa Inês Horn Adams

Universidade Federal de Santa Maria - UFSM

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

M541d Meneghini, Leonardo Zanchetti

Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para bromidrato de darifenacina comprimido / Leonardo Zanchetti Meneghini. – Porto Alegre : UFRGS, 2011. – xvi, 182 p. : il.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Bromidrato de darifenacina. 2. Comprimido de liberação modificada. 3. Validação: métodos de análise de fármacos. 4. Desenhos experimentais. I. Bergold, Ana Bergold. II. Fröhlich, Pedro Eduardo. III. Título.

CDU: 615.2.011

Bibliotecária responsável:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB 10/480

*“A súmula da sabedoria  
esta: nunca nenhum tempo
  perdido o que se
consagra ao trabalho”.*

Ralph Waldo Emerson

*“S  humilde para evitar o orgulho, mas voa alto para alcançar a
sabedoria”.*

Santo Agostinho

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dr^a Ana Maria Bergold, pela orientação, paciência, amizade, dedicação, incentivo e pelo exemplo de pessoa e de profissional.

Ao Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich pelo incentivo, amizade e exemplo de conduta profissional e de figura humana.

À Profa. Dr^a. Andréa Inês Horn Adams da Universidade Federal de Santa Maria pela amizade, conselhos e apoio desde longa data.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em especial: George Luis Ortega, Grace Gosmann, Jarbas Alves Montanha, Renata Pereira Limberger.

Ao Laboratório Nacional Agropecuário-LANAGRO/RS, pela realização das análises em LC-MS/MS.

Aos colegas e funcionários da Faculdade de Farmácia pelo convívio e amizade: Ana Paula C. Silva, Andréia C. W. C. Lopes, Cristiano Dalpizzolo, Cristiane F. Codevilla, Douglas F. Rambo, Clésio S. Paim, Eliane M. Donato, Fabiane Bortoluzzi, Fabiano Barreto, Fernanda R. Salazar, Graziela, Jeferson J. Ferreira Kristiane de C. Mariotii, Letícia F. da S. Martins, Letícia L. Sfair, Liane Specke, Madson R. F. Gomes, Marco A. Taborda, Mariana Brandalise, Marise da S. Macedo, Mônica O. Duarte, Natália Canedo, Pâmela C. Lukasewicz, Rochele C. Rossi, Rômulo F. S. Canto, Samuel Kaiser, Silrei M. Zanin, Tamara dos S. Castilho.

Aos amigos pelo convívio profícuo, conselhos, discussões, críticas (sempre bem-vindas): Adriana S. Andrade, Cássia Manfrói, César A. Junqueira, Cléber N. Dalbosco, Guilherme Wiggers, Laura M. M. Kliemann, Maria C. Franck, Natasha Maurmann, Vinícius C. Bica.

Ao CNPq, pelo financiamento da bolsa de estudos.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação do bromidrato de darifenacina (DF) em comprimidos de liberação modificada. Na fase de identificação, a matéria-prima do fármaco (substância química de referência) foi analisada e caracterizada utilizando-se de medidas físicas (ponto de fusão, polarimetria, solubilidade), espectroscopia (infravermelho, ultravioleta-visível, massas) e técnicas cromatográficas (cromatografia a líquido de alta eficiência, cromatografia em camada delgada). Nos estágios posteriores, os experimentos para quantificação do comprimido foram realizados utilizando-se de desenhos experimentais (fatoriais completos, desenhos de composto central, fatoriais fracionados). O método de CLAE foi validado e um produto de degradação foi obtido na condição de estresse oxidativo (H₂O₂ 13%, 72h). Para o método espectrofotométrico, a interferência de excipientes foi verificada e a técnica de derivada (método *zero-crossing*) foi utilizada para quantificação. Ambos os métodos foram comparados e não demonstram diferença significativa quando aplicados ao doseamento do comprimido.

Palavras-chave: bromidrato de darifenacina, comprimido de liberação modificada, desenhos experimentais, validação de métodos analíticos.

ABSTRACT**DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE ANALYTICAL METHOD FOR THE
DARIFENACIN HYDROBROMIDE TABLET**

The aim of this study was the development and validation of the analytical methods to the determination of darifenacin hydrobromide (DF) in extended-release tablet. In the identification stage, the bulk drug was analyzed and characterized using physical measures (melting point, polarimetry, solubility), spectroscopy (infrared and ultraviolet-visible) and chromatographic techniques (high performance liquid chromatographic, HPLC, and thin-layer chromatography, TLC). In the subsequent stages, the experiments to quantification for the DF tablet were performed using experimental designs (full factorial designs, central composite designs and fractional factorial designs). The HPLC method was validated and a degradation product was obtained in oxidation stress condition (H_2O_2 13%, 72h). For the spectrophotometric method, excipient interference was observed and derivative technique (*zero-crossing* method) was employed to quantification. Both the methods were compared showing no significant difference to tablet assay.

Key-words: darifenacin hydrobromide, extended release tablet, experimental designs, validation of analytical methods.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Domínio de um fatorial 2^2	16
Tabela 2. Diferentes tipos de efeito a partir de um fatorial 2^2	17
Tabela 3. Arranjo dos resultados de um fatorial 2^2 para uma análise de variância.....	18
Tabela 4. Ábacos utilizados para análise de variância de um fatorial 2^2	18
Tabela 5. Distribuição dos sinais para os coeficientes do modelo de regressão do fatorial 2^2	20
Tabela 6. Valores de α para se obter um desenho ortogonal ou rotável e a relação com o número de replicatas do ponto central (N_c).....	23
Tabela 7. Matriz de sinais para um fatorial completo 2^3	27
Tabela 8. Matriz de sinais para um fatorial fracionado 2^3	27
Tabela 9. Método para gerar a matriz de Plackett-Burman para um fatorial com 11 fatores, sendo o <i>gerador</i> destacado pela elipse.....	28
Tabela 10. Geradores para desenho de Plackett-Burman considerando-se a primeira linha no nível “-“.....	29
Tabela 11. Transformações sugeridas a partir da proporcionalidade entre variância e média.....	37
Tabela 1.1. Resultados para as determinações dos pontos de fusão da SQR de bromidrato de darifenacina e padrões de PF.....	48
Tabela 1.2. Medidas de rotação óptica específica para o bromidrato de darifenacina.....	49
Tabela 1.3. Determinação da umidade do bromidrato de darifenacina SQR.....	50
Tabela 1.4. Resultados da avaliação de solubilidade da SQR em diferentes solventes.....	52
Tabela 1.5. Peso médio e limites de variação para o Enablex [®] 15 mg.....	55
Tabela 1.6. Comprimentos de onda máximos na região de 203 a 215 nm obtidos com as varreduras da SQR em diferentes tipos de solvente.....	57
Tabela 1.7. Comprimentos de onda máximos na região de 283 a 286 nm obtidos com as varreduras da SQR em diferentes tipos de solvente.....	58
Tabela 2.1. General full-factorial design.....	95
Tabela 2.2. Factors and levels investigated in the Plackett-Burman design.....	96

Tabela 2.3. Conditions applied to the forced degradation study.....	97
Tabela 2.4. Experimental design for DCC.....	98
Tabela 2.5. Parameters used in Derringer's desirability.....	99
Tabela 2.6. Requirements assessed for the RP-LC/UV method validation.....	100
Tabela 2.7. Analysis for accuracy and precision for the method validation.....	101
Table 3.1. Full factorial design 2^4 domain.....	121
Table 3.2. Factors and levels investigated in the <i>Plackett-Burman</i> design.....	121
Table 3.3. Central composite design domain.....	122
Table 3.4. Parameters used to built the Derringer's desirability.....	122
Table 3.5. Validation for the UVD method.....	123
Table 3.6. Approaches used to asses the comparation between UVD and HPLC/UV method.....	124
Tabela I.I. Áreas obtidas com a curva de regressão utilizada para a quantificação das amostras na avaliação da solubilidade.....	145
Tabela I.II. Resultados dos testes de premissas para avaliação da linearidade e confecção da curva analítica a partir dos dados da Tabela 16.	145
Tabela I.III Análise de variância para o teste de solubilidade.....	145
Tabela II.I. Matriz do fatorial 2^5 para o da CLAE.....	149
Tabela II.II. Análise de variância para os efeitos do fatorial 2^5 da CLAE sobre o k.....	150
Tabela II.III. Análise de variância para os efeitos do fatorial 2^5 da CLAE sobre a R.....	151
Tabela III.I. Parâmetros cromatográficos para o DCC da CLAE.....	160
Tabela IV.I. Análise de variância para o k no DCC da CLAE.....	163
Tabela IV.II.. Polinômio obtido para a superfície de resposta do k no DCC para CLAE e medidas da qualidade da regressão múltipla.....	163
Tabela IV.III. Análise de variância para a R no DCC da CLAE.....	164
Tabela IV.IV. Polinômio obtido para a superfície de resposta da R no DCC para CLAE e medidas da qualidade da regressão múltipla.....	164

Tabela VI.I. Resultados para a robustez da CLAE pelo desenho de Plackett-Burman.....	171
Tabela VII.I. Análise de variância para os efeitos do fatorial 2^4 da UVD sobre o LQ.....	175
Tabela VII.II. Polinômio obtido para a superfície de resposta do LQ no DCC para o método de UVD e medidas da qualidade da regressão múltipla.....	175
Tabela VII.III. Análise de variância para o LQ no DCC do método de UVD.....	176
Tabela VII.IV. Polinômio obtido para a superfície de resposta do DPR no DCC para o método de UVD e medidas da qualidade da regressão múltipla.....	176
Tabela VII.V. Análise de variância para o DPR no DCC do método de UVD.....	177

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural da darifenacina em duas dimensões.....	8
Figura 2. Principais reações envolvidas na metabolização da darifenacina.....	11
Figura 3. Esquema geral de um sistema e as variáveis envolvidas em um processo.....	13
Figura 4. Representação gráfica dos efeitos para um fatorial 2^2 quando se tem apenas os efeitos principais e a interação (antagonismo) entre os níveis superiores.....	17
Figura 5. Sequência de arranjos partindo-se de um fatorial completo 2^3	22
Figura 6. Superfície de reposta e gráfico de contornos para uma modelagem a partir de 2 variáveis independentes e uma variável dependente	24
Figura 7. Superfície de resposta e gráfico de contornos para uma função de segundo grau.....	25
Figura 1.1. Proposição da estrutura do bromidrato de darifenacina na forma de sal.....	53
Figura 1.2. Espectros obtidos na região do ultravioleta para a SQR em metanol, fase móvel, HCl 0,1M, NaOH 0,1M e água.....	59
Figura 1.3 Sistema cromatográfico com visualização em UV 254nm e por vapor de iodo platinato de potássio.....	61
Figura 1.4 Diferença visual de limpidez na solução metanólica do <i>pool</i> de comprimidos antes da centrifugação, e após a centrifugação.....	62
Figura 1.5. Espectro no infravermelho do bromidrato de darifenacina em pastilha de KBr.....	63
Figura 1.6. Cromatograma obtido na análise da SQR (A) e comprimidos de bromidrato de darifenacina (B).....	65
Figura 2.1. Darifenacin hydrobromide.....	88
Figura 2.2. Mass spectrum comparison between DF and peak from stress degradation; PDA scanning from DF peak and product from stress degradation	89
Figura 2.3. Perturbation plots from full-factorial 2^5 showing the significant effect of the examined factors on the responses Capacity factor, Resolution.....	90
Figura 2.4. RSM graphs showing the effect of factors on capacity factor (k').....	91
Figura 2.5. RSM graphs showing the factor effects on resolution (R).....	92

Figura 2.6. Desirability's Derringer RSM graph showing optimum operability region of the chromatographic method.....	93
Figura 2.7. Chromatogram showing DF and secondary peak from oxidation stress performed on validation chromatographic parameters.....	94
Figure 3.1. Darifenacin hydrobromide.....	118
Figure 3.2. Profiles of the darifenacin hydrobromide and matrice in methanolic solutions.....	118
Figure 3.3. Amplified zoom showing reference substance and matrice both in methanolic solution.....	118
Figure 3.4. Response surface to quantification limit (<i>LQ</i>), derivative order (<i>order</i>) and scale factor (<i>scale</i>).....	119
Figure 3.5. Response surface to relative standard deviation (<i>RSD</i>), derivative order (<i>order</i>) and scale factor (<i>scale</i>).....	119
Figure 3.6. Response surface to Derringer's desirability.....	119
Figure 3.7. Pareto chart of the standardized effects and half normal plot of the standardized effects.....	120
Figura III.I. Cromatograma do <i>experimento 1</i> do DCC da CLAE para SQR após ser submetida à degradação forçada por 72h em H ₂ O ₂ 13% (v/v).....	155
Figura III.II. Cromatograma do <i>experimento 2</i> do DCC da CLAE para SQR após ser submetida à degradação forçada por 72h em H ₂ O ₂ 13% (v/v).....	155
Figura III.III. Cromatograma do <i>experimento 3</i> do DCC da CLAE para SQR após ser submetida à degradação forçada por 72h em H ₂ O ₂ 13% (v/v).....	155
Figura III.IV. Cromatograma do <i>experimento 4</i> do DCC da CLAE para SQR após ser submetida à degradação forçada por 72h em H ₂ O ₂ 13% (v/v).....	156
Figura III.V. Cromatograma do <i>experimento 5</i> do DCC da CLAE para SQR após ser submetida à degradação forçada por 72h em H ₂ O ₂ 13% (v/v).....	156
Figura III.VI. Cromatograma do <i>experimento 6</i> do DCC da CLAE para SQR após ser submetida à degradação forçada por 72h em H ₂ O ₂ 13% (v/v).....	156
Figura III.VII. Cromatograma do <i>experimento 7</i> do DCC da CLAE para SQR após ser submetida à degradação forçada por 72h em H ₂ O ₂ 13% (v/v).....	157
Figura III.VIII. Cromatograma do <i>experimento 8</i> do DCC da CLAE para SQR após ser submetida à degradação forçada por 72h em H ₂ O ₂ 13% (v/v).....	157

Figura III.VIV. Cromatograma do <i>experimento 9</i> do DCC da CLAE para SQR após ser submetida à degradação forçada por 72h em H ₂ O ₂ 13% (v/v).....	157
Figura III.X. Cromatograma do <i>experimento 10</i> do DCC da CLAE para SQR após ser submetida à degradação forçada por 72h em H ₂ O ₂ 13% (v/v).....	158
Figura III.XI. Cromatograma do <i>experimento 11</i> do DCC da CLAE para SQR após ser submetida à degradação forçada por 72h em H ₂ O ₂ 13% (v/v).....	158
Figura III.XII. Cromatograma do <i>experimento 12</i> do DCC da CLAE para SQR após ser submetida à degradação forçada por 72h em H ₂ O ₂ 13% (v/v).....	158
Figura III. XIII. Cromatograma do <i>experimento 13</i> do DCC da CLAE para SQR após ser submetida à degradação forçada por 72h em H ₂ O ₂ 13% (v/v).....	159
Figura III.XIV. Cromatograma do <i>experimento 14</i> do DCC da CLAE para SQR após ser submetida à degradação forçada por 72h em H ₂ O ₂ 13% (v/v).....	159
Figura III.XV. Cromatograma do experimento referente ao <i>ponto central</i> do DCC da CLAE para SQR após ser submetida à degradação forçada por 72h em H ₂ O ₂ 13% (v/v).....	159
Figura V.I. Gráfico dos resíduos para o DCC da CLAE com o k.....	167
Figura V.II. Gráfico de <i>DFITS</i> para o DCC da CLAE com o k.....	167
Figura V.III. Gráfico da <i>distância de Cook</i> para o DCC da CLAE com o k.....	167
Figura V.IV. Gráfico dos resíduos padronizados para o DCC da CLAE com a R...	168
Figura V.V. Gráfico de <i>DFFITS</i> para o DCC da CLAE com a R.....	168
Figura V.VI. Gráfico da <i>distância de Cook</i> para o DCC da CLAE com a R.....	168
Figura VIII.I. Gráfico dos resíduos padronizados o DCC da UVD com o LQ.....	181
Figura VIII.II. Gráfico de <i>DFFITS</i> para o DCC da UVD com o LQ.....	181
Figura VIII.III. Gráfico da <i>distância de Cook</i> para o DCC da UVD com o LQ.....	181
Figura VIII.IV. Gráfico dos resíduos padronizados para o DCC da UVD com o DPR.....	182
Figura VIII.V. Gráfico de <i>DFFITS</i> para o DCC da UVD com o DPR.....	182
Figura VIII.VI.. Gráfico da <i>distância de Cook</i> para o DCC da UVD com o DPR.....	182

LISTA DE ABREVIATURAS

- ASC: área sob a curva da concentração plasmática versus tempo
- BH: bexiga hiperativa
- CAS: Chemical Abstracts Service
- CCD: cromatografia em camada delgada
- CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência
- $C_{m\acute{a}x}$: concentração plasmática máxima
- DAD: detector com arranjo de diodos
- DF: bromidrato de darifenacina
- DCB: Denominação Comum Brasileira
- DCC: desenho de composto central
- DPR: desvio padrão relativo
- GL: graus de liberdade
- IV: infravermelho
- LD: limite de detecção
- LQ: limite de quantificação
- MeCN: acetonitrila
- MSR: superfície de resposta ou metodologia de superfície de resposta
- PF: ponto de fusão
- QM: quadrado médio
- R^2 ajustado: coeficiente de determinação ajustado
- R^2 : coeficiente de determinação
- s: desvio padrão
- SQ: soma dos quadrados
- UVD: ultravioleta derivada

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DO TEMA.....	5
1 Aspectos Terapêuticos.....	7
2 Características físico-químicas do fármaco e formulação.....	7
3 Farmacocinética.....	10
3.1 Absorção.....	10
3.2 Distribuição.....	10
3.3 Metabolismo.....	10
4 Métodos analíticos de quantificação.....	11
5 Estratégias de Experimentação	13
6 Desenhos fatoriais.....	14
6.1 Características gerais.....	14
6.2 Notações.....	15
6.3 Interpretação dos resultados.....	16
6.4 Análise de variância e modelos de regressão.....	17
6.5 Fatoriais completos 2^k	19
6.6 Desenhos de composto central.....	21
6.6.1 Características gerais.....	21
6.6.2 Modelagem.....	23
6.6.3 Avaliação de respostas múltiplas.....	25
6.7 Desenhos fracionados.....	26
6.8 Adequação do modelo matemático.....	29
6.8.1 Medidas de Qualidade do Ajuste.....	31
6.8.2 Adequabilidade.....	32
6.8.3 Diagnóstico de influência.....	33

6.8.4 Verificação de suposições.....	35
6.8.5 Homocedasticidade.....	36
6.8.6 Teste de não correlação (independência)	36
6.8.7 Transformação de dados.....	37
7 Desenhos experimentais e métodos analíticos.....	38
8 Validação de métodos analíticas.....	40
9 Referências.....	42
CAPÍTULO 1- Caracterização e identificação da SQR e do produto acabado.....	47
1.1 Caracterização e propriedades físicas.....	49
1.1.1 Determinação do ponto ou Intervalo de Fusão.....	49
1.1.1.1 Materiais e método.....	49
1.1.1.2 Resultados e discussão.....	49
1.1.2 Rotação óptica específica.....	50
1.1.2.1 Materiais e método.....	50
1.1.2.2 Resultados e discussão.....	51
1.1.3 Determinação de água.....	51
1.1.3.1 Materiais e método.....	51
1.1.3.2 Resultados e discussão.....	52
1.1.4 Avaliação da solubilidade.....	52
1.1.4.1 Materiais e método.....	52
1.1.4.2 Resultados e discussão.....	53
1.2 Determinação de peso da forma farmacêutica.....	57
1.2.1 Materiais e método.....	57
1.2.2 Resultados e discussão.....	57
1.3 Espectrofotometria no ultravioleta.....	57
1.3.1 Materiais e método.....	57

1.3.2 Resultados e discussão.....	58
1.4 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	61
1.4.1 Materiais e método.....	61
1.4.2 Resultados e discussão.....	62
1.5 Espectroscopia de infravermelho.....	64
1.5.1 Materiais e método.....	64
1.5.2 Resultados e discussão.....	64
1.6 Cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE).....	65
1.6.1 Materiais e método.....	65
1.6.2 Resultados e discussão.....	66
1.7 Referências.....	68
CAPÍTULO 2 - Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE/UV.....	69
2.1 Introdução.....	71
Publicação 1.....	73
CAPÍTULO 3 - Desenvolvimento e validação de método analítico por espectrofotometria com UVD.....	103
3.1 Introdução.....	105
Publicação 2.....	107
DISCUSSÃO GERAL.....	125
Referências.....	133
CONCLUSÕES.....	139
ANEXO I.....	143
ANEXO II.....	147
ANEXO III.....	153
ANEXO IV.....	161
ANEXO V.....	165

ANEXO VI.....	169
ANEXO VII.....	173
ANEXO VIII.....	179

A bexiga hiperativa (BH) é uma disfunção miccional caracterizada pela Sociedade Internacional de Continência por sintomas de urgência, com ou sem incontinência urinária, geralmente com frequência e noctúria (ABRAMS et al., 2003). É uma condição que tem demonstrado uma prevalência significativa no Brasil e em outras regiões como Estados Unidos e Europa (IRWIN et al., 2006; TELOKEN et al., 2006). A incidência de bexiga hiperativa é de 10 a 15% em homens e mulheres de 10 a 50 anos, e aumenta para 35% em indivíduos com idade acima de 75 anos. Isso causa preocupação econômica, já que com previsão de que a população idosa aumente, os gastos com a saúde também aumentarão. Os sintomas da BH podem ter um impacto negativo significativo na saúde, relacionados com a qualidade de vida, prejudicando diversas áreas, incluindo o bem-estar emocional, a produtividade em casa e no trabalho, as relações sociais, a intimidade sexual, a baixa qualidade do sono, além de depressão e ansiedade (KHULLAR et al., 2006; TELOKEN et al., 2006; KLOTZ et al., 2007; PALMA, 2007).

Opções não cirúrgicas para o tratamento da BH incluem mudanças no estilo de vida, terapia comportamental, exercícios do assoalho pélvico e intervenção farmacológica. Considera-se atualmente que o tratamento farmacológico é a primeira opção terapêutica para a BH (PALMA, 2007). Uma vez que a contração da bexiga é amplamente regulada pela estimulação dos receptores muscarínicos, a farmacoterapia com antagonistas dos receptores muscarínicos é considerada o principal tratamento farmacológico para melhorar os sintomas da BH (TIWARI e NARUGANAHALLI, 2006; JONAS, 2007; TOOZS-HOBSON e LATTHE, 2007).

Entre os antimuscarínicos existentes no mercado, a darifenacina é considerada um fármaco de ação seletiva, disponível com o nome comercial Enablex[®] nas doses de 7,5 e 15 mg na forma de comprimidos de liberação controlada contendo o sal bromidrato de darifenacina.

De maneira geral, a elucidação de aspectos ligados às características físico-químicas de um fármaco é uma das ferramentas indispensáveis para a avaliação e monitoramento da qualidade e segurança de um medicamento no mercado. Neste sentido, o desenvolvimento de metodologia analítica para controle de qualidade tem papel fundamental já que propicia uma avaliação onde é possível identificar alterações que possam vir a comprometer a atividade terapêutica ou agregar

características tóxicas ao medicamento (AHUJA, 2001; YOSHIOKA e STELLA, 2002).

A darifenacina (DF) não possui método oficial em nenhum compêndio farmacêutico, sendo que os artigos publicados em periódicos indexados tiveram como principal enfoque a separação dos enantiômeros *R* e *S* por CLAE e a análise do fármaco em amostras biológicas utilizando-se de espectrometria de massas (KAYE et al., 1996; VENN e GOODY 1999; RADHAKRISHNANAND et al., 2008).

Por este fato justifica-se o estudo de métodos analíticos para controle de qualidade do bromidrato de darifenacina comprimidos. Além disso, para se obter um estudo mais completo dos métodos instrumentais a serem desenvolvidos, optou-se por utilizar de uma abordagem quimiométrica em certas etapas do desenvolvimento e validação dos mesmos.

A partir disso, definiu-se como objetivo geral:

- Desenvolver e validar métodos analíticos para determinação qualitativa e quantitativa de bromidrato de darifenacina em comprimidos de liberação prolongada.

Como objetivos específicos têm-se:

- Caracterizar a substância química de referência (SQR) do fármaco através da determinação da solubilidade, ponto (ou faixa) de fusão, determinação de água, polarimetria, cromatografia em camada delgada (CCD), espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) e infravermelho (IV);
- Desenvolver e validar métodos para a quantificação do bromidrato de darifenacina em comprimidos por espectrofotometria na região do UV, CLAE;
- Realizar estudo comparativo entre os métodos propostos.

A parte experimental do trabalho será dividida em três capítulos, que abordarão respectivamente: caracterização e identificação da SQR e do produto acabado (capítulo 1), desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE/UV (capítulo 2), desenvolvimento e validação de método analítico por espectrofotometria com UVD (capítulo 3). Os capítulos 2 e 3 serão apresentados na forma de artigo publicado ou submetido em periódico científico.

1 Aspectos terapêuticos

Por definição, bexiga hiperativa (BH) é a presença de urgência miccional associada ou não à incontinência urinária de urgência, geralmente acompanhada pela polaciúria e noctúria na ausência de fatores patológicos (infecção, neoplasia, litíase). Trata-se de uma condição com prevalência considerável em nível mundial onde os agentes antimuscarínicos constituem terapia de primeira escolha. Vários fármacos estão disponíveis no mercado como oxibutinina, tolterodina, propiverina, trospiuma e mais recentemente solifenacina, darifenacina e fesoterodina (CHAPPLE et al., 2005; KAY e WESNES; 2005; NOVARA et al., 2008).

Os antimuscarínicos agem pelo bloqueio da estimulação de receptores muscarínicos (M) no músculo detrusor da bexiga, reduzindo sua reflexibilidade, frequência e força das contrações involuntárias, auxiliar na redução da severidade dos sintomas. No entanto, os receptores muscarínicos estão associados com diversas funções como subtipo M₁, envolvido em certas funções cognitivas, como subtipo M₂, presente predominantemente no coração. Em virtude disso, fármacos específicos que maximizem a ação em receptores do subtipo M₃, presentes em maior quantidade do músculo detrusor são desejados, para reduzir os efeitos adversos e maximizar a ação desejada. Nesse sentido, a darifenacina tem a vantagem de ser mais seletivo e potente que alguns fármacos já existentes no mercado como oxibutinina e tolterodina, por exemplo (CHAPPLE et al., 2005; KAY e WESNES; 2005).

2 Características físico-químicas do fármaco e formulação

O fármaco é disponível como comprimidos de liberação prolongada na forma do sal bromidrato de darifenacina nas doses de 7,5 mg ou 15 mg (28 comprimidos) sendo comercializado no Brasil como Enablex[®] pelo laboratório Novartis (NOVARTIS, 2009). Quimicamente é denominado como bromidrato de (S)-2-{1-[2-(2,3-diidrobenzofurano-5-il)etil]-3-pirrolidinil}-2,2-difenilacetamida. Como o nome químico denota, a molécula possui um centro de assimetria (Figura 1) porém, o fármaco só apresenta atividade como enantiômero simples S (SKERJANEC, 2006). Denominações e algumas das propriedades físico-químicas são apresentadas no Quadro 1 (WATERSTONE TECHNOLOGY, 2010).

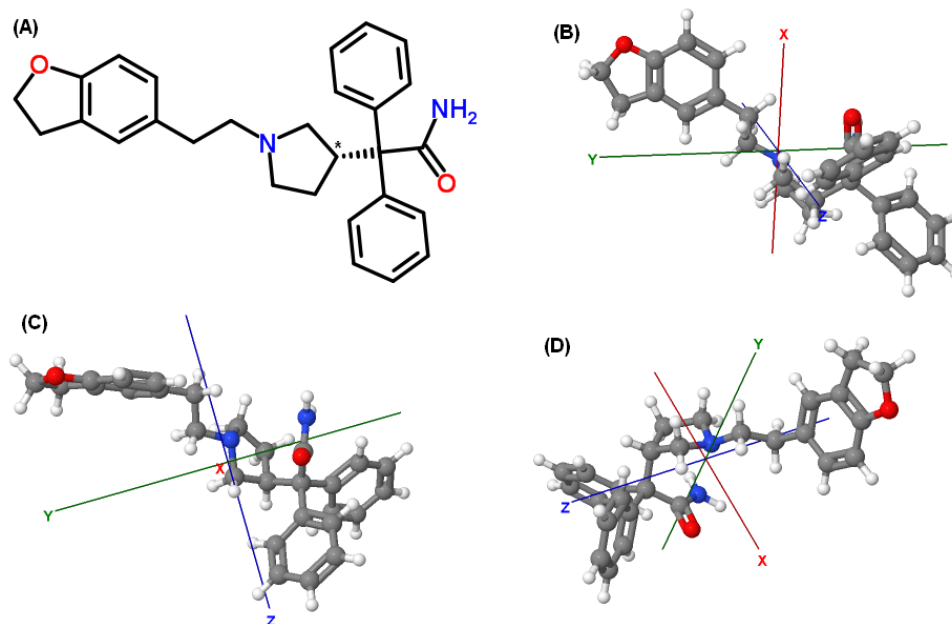


Figura 1. Fórmula estrutural da darifenacina em duas dimensões (A; carbono assimétrico indicado com asterisco) e em três dimensões (B, C, D), onde as cores das esferas na cor cinza, branco, vermelho e azul representam átomos de carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio, respectivamente.

Quadro 1. Dados referentes ao registro e propriedades físico-químicas da molécula.

	Composto	
	Darifenacina	Bromidrato de darifenacina
Faixa de fusão (°C)	-	227-232 °C
Rotação óptica (°)	-	+43° - +48°
Solubilidade	-	Solúvel em diclorometano, ligeiramente solúvel em etanol, praticamente insolúvel em água.
Fórmula molecular	C ₂₈ H ₃₀ N ₂ O ₂	C ₂₈ H ₃₁ N ₂ O ₂ Br
Massa molecular	426,6	507,5
DCB	02691	09576
CAS	133099-04-4	133099-07-7

Na formulação do Enablex[®], além do fármaco, encontram-se os seguintes excipientes: fosfato de cálcio hidrogenado anidro, hipromelose, estearato de magnésio, Opadry[®] branco (hipromelose, macrogol, talco e dióxido de titânio), Opadry amarelo[®] (hipromelose, macrogol, talco e dióxido de titânio e óxido de ferro

amarelo) e Opadry vermelho[®] (hipromelose, macrogol, talco, dióxido de titânio e óxido de ferro vermelho) (NOVARTIS, 2009).

Por definição, um comprimido do tipo liberação prolongada é uma formulação com o objetivo de liberar o fármaco por um período de tempo estendido após a ingestão, sendo as expressões “ação prolongada”, “ação repetida” e “liberação-sustentada” sinônimos (USP, 2008). Neste sentido, os sistemas de liberação mais comumente presentes no mercado são do tipo matricial, reservatório e osmótico. No caso de sistema matricial, o fármaco fica confinado em um sistema formado por cadeias de uma ou várias substâncias químicas polimerizadas que funcionam como agentes moduladores da liberação (LOPES *et al.*, 2005; PUCHUN *et al.*, 2006). Entre os agentes moduladores de liberação, a hipromelose é um dos polímeros mais comumente empregados. Para este fim, ela deve estar presente em grande quantidade (entre 70 a 80% da massa do comprimido) e possuir peso molecular e grau de substituição que lhe confirmam viscosidade razoável (PUCHUN *et al.*, 2006; ROWE *et al.*, 2006). Desta forma o Enablex[®] pode ser considerado um sistema farmacêutico matricial já que o único excipiente capaz de conferir a característica de liberação modificada é a hipromelose (DOLAN *et al.*, 2000; NOVARTIS, 2009).

A hipromelose por se tratar de um polímero hidrofílico linear possui capacidade de hidratação levando ao intumescimento e formação de uma camada gelatinosa na superfície do comprimido. Esta camada funciona como barreira à rápida liberação do fármaco que, ao controlar a penetração de água, acaba por condicionar a velocidade de liberação do fármaco (COLOMBO *et al.*, 2000). As etapas envolvidas na liberação do fármaco a partir de uma matriz hidrofílica qualquer podem ser esquematizadas da seguinte forma (RANGA *et al.*, 1988):

- Transporte do meio de dissolução para a matriz polimérica;
- Intumescimento (“swelling”) do polímero com formação de uma camada de gel;
- Difusão do fármaco através da camada de polímero intumescido;
- Erosão do polímero intumescido.

3 Farmacocinética

3.1 Absorção

Darifenacina é rápida e completamente (aproximadamente 97%) absorvida após a administração oral, ainda que a biodisponibilidade oral seja limitada pelo metabolismo de primeira passagem. A taxa de absorção do fármaco dos comprimidos de liberação modificada é limitada pela velocidade de liberação da matriz do comprimido, resultando em absorção tardia, principalmente no cólon. A biodisponibilidade oral média da darifenacina no estado de equilíbrio é estimada em aproximadamente 15% e 19% para os comprimidos de 7,5 e 15 mg, respectivamente. Estudos *in vitro* envolvendo monocamadas de células CaCo-2 têm sido conduzidos para melhor entendimento do processo de absorção, e os resultados tem apontado que o fármaco atravessa prontamente as membranas celulares de uma maneira bidirecional não-seletiva. O efeito da alimentação foi avaliado em diferentes estudos e não houve diferenças significativas para concentração máxima (C_{max} ; em torno de 7h), área sob a curva da concentração plasmática *versus* tempo (ASC) e aumento dos efeitos adversos entre administração entre os estados pré-prandial e pós-prandial. Os parâmetros C_{max} , t_{max} e ASC são dose dependentes, ainda que o aumento na concentração plasmática é proporcionalmente maior do que o aumento na dose devido à saturação do metabolismo pré-sistêmico (SKERJANEC, 2006; NOVARTIS, 2009).

3.2 Distribuição

Similarmente a outros fármacos antagonistas da acetilcolina, a darifenacina é um fármaco lipofílico e sua taxa de ligação às proteínas plasmáticas é de aproximadamente (principalmente à alfa-1-glicoproteína-ácida). Possui extenso volume de distribuição (V_d), que excede a água total do corpo. Em estudos com administração intravenosa (IV), V_d foi obtido na faixa de 165 a 276 L (SKERJANEC, 2006; NOVARTIS, 2009).

3.3 Metabolismo

O fármaco é intensamente metabolizado pelo fígado após administração oral. O metabolismo é mediado pelas enzimas do citocromo P450 (CYP2D6 e CYP3A4).

As três principais vias metabólicas (Figura 2) são: monoidroxilação do anel diidrobenzofurano, abertura do anel diidrobenzofurano e N-desalquilação do nitrogênio da pirrolidina. Os produtos iniciais das vias de hidroxilação e N-desalquilação são os principais metabólitos circulantes, sendo que são encontrados em maior nível o UK-148.993, UK-88.862 e UK-73.689 dos quais somente o UK-148.993 possui atividade antimuscarínica significativa. Não há estudos demonstrando a metabolização para a forma do enantiômero *R*. Uma quantidade negligenciável do fármaco (aproximadamente 3%) é excretada diretamente na urina, sendo que este é o maior caminho de excreção dos metabólitos (aproximadamente 60%) e o restante excretado pelas fezes (SKERJANEC, 2006; NOVARTIS, 2009).

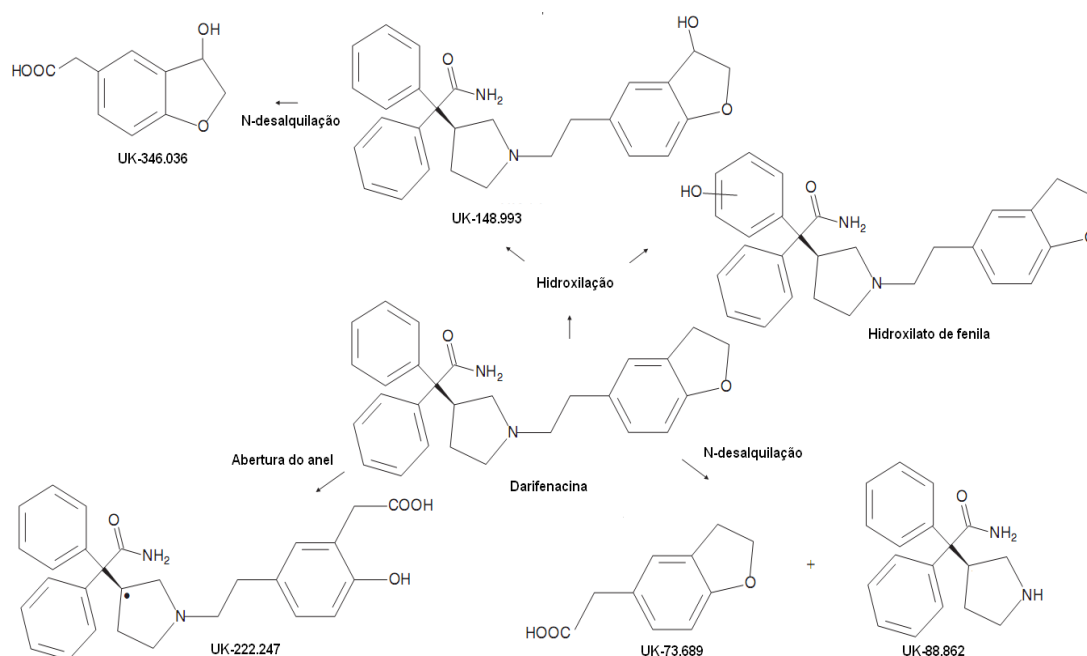


Figura 2. Principais reações envolvidas na metabolização da darifenacina.

4 Métodos analíticos de quantificação

A revisão da literatura apresentou três estudos de identificação e quantificação envolvendo Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

No estudo de KAYE e colaboradores (1996) foi empregado um método de CLAE acoplado a detector de massas triplo-quadrupolo com dispositivo de ionização à pressão atmosférica. O trabalho utilizou ainda um sistema de extração em fase sólida no preparo de amostra para obter o fármaco a partir de amostras plasmáticas. O sistema cromatográfico desenvolvido utilizou uma coluna de fase reversa com octilsilano (300 mm de comprimento x 4,6 mm de diâmetro interno). A fase móvel foi

constituída de metanol e água contendo acetato de amônio (0,02 M) e trietilamina (0,005 M) na proporção respectiva de 80:20 (v/v) com pH ajustado para 7,0. As análises foram realizadas com fluxo de 1 mL/min operando-se o quadrupolo com ionização química à pressão atmosférica no modo positivo, com nebulizador aquecido e descarga na corona. Como resultado foi obtido método validado na faixa de 25-2000 pg/mL com recuperação de aproximadamente 50% para o método de extração utilizado.

VENN e GOODY (1999) utilizaram a tecnologia de impressão molecular para desenvolver polímeros dotados de sítios específicos para separação estereoquímica dos enantiômeros *R* e *S* da darifenacina. Os polímeros foram utilizados tanto na etapa de extração em fase sólida (a partir de plasma) como fase estacionária em colunas de CLAE. Para monitoramento e quantificação foram utilizados dois métodos de CLAE: com detector de fluorescência (285 nm para excitação e 325 nm para emissão) e com detector de ultravioleta (230 nm). Ambos os métodos utilizaram uma coluna com grupamento nitrila como fase estacionária (250 mm de comprimento x 4,6mm de diâmetro interno) e fase móvel constituída de acetonitrila, água e ácido trifluoracético na proporção de 50:50:0,1(v/v) com fluxo de 1 mL/min. A partir deste trabalho foi possível desenvolver um polímero capaz de extrair cerca de 100 µg de darifenacina por 100 mg de polímero em amostra biológica (plasma). O mesmo polímero foi utilizado em coluna de CLAE sendo capaz de separar os isômeros *R* e *S*.

RADHAKRISHNANAND e colaboradores (2008) desenvolveram método por CLAE utilizando coluna quiral com celulose imobilizada de fase normal. Com isso foi possível identificar e quantificar os dois enantiômeros da darifenacina em matéria-prima e comprimidos de liberação prolongada. O método utilizou fase móvel composta por *n*-hexano, etanol e dietilamina na proporção 50:50:0,3(v/v), respectivamente, fluxo de 1 mL/min e detector de ultravioleta em 225 nm. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram 0,02 µg/mL e 0,07 µg/mL, respectivamente. A estabilidade foi avaliada utilizando-se solução exposta a radiação ultravioleta e matéria-prima sob calor seco (60°C) por 10 dias. Não foi observado nenhum produto de degradação utilizando-se detector de ultravioleta com arranjo de diodos (DAD).

5 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 outras. 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)

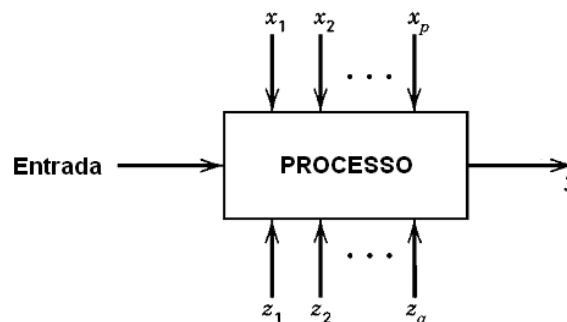


Figura 3. Esquema geral de um sistema e as variáveis envolvidas em um processo.

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).

6 Desenhos fatoriais

6.1 Características gerais

Quando o estudo envolve dois ou mais fatores, os *desenhos fatoriais* são os mais eficientes tipos de experimentos. Um fator, na definição mais simples, é toda variável controlável que se acredita ter influência sobre o processo em estudo e conseqüentemente sobre a resposta. 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. Um desenho fatorial implica que em cada replicação ou triagem do experimento todas as combinações de níveis e fatores são investigadas. Como vantagens pode-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*.

6.2 Notações

Um desenho fatorial pode ser representado por L^k (lê-se L na 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. Há autores que também utilizam 1 e 2 para representar o nível inferior e superior,

respectivamente. 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	(+)	(+)

6.3 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. Considerando-se um exemplo de arranjo 2^2 , demonstrado na Tabela 2, com quaisquer fatores A e B resultando em uma resposta (saída) qualquer, pode-se segregar os efeitos dos fatores sobre a resposta 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 = $1/2 [(24-15)-(12-8)]=2,5$				

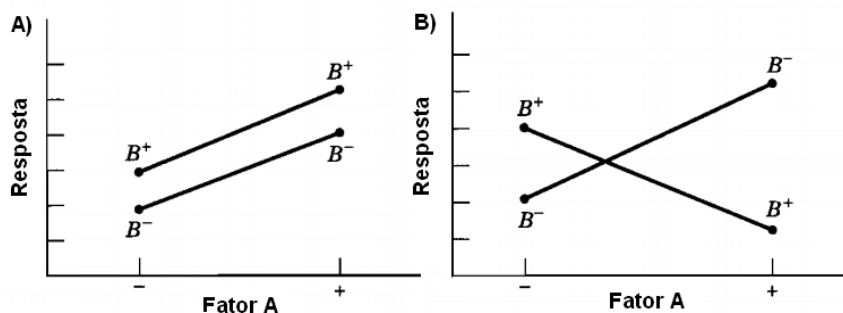


Figura 4. Representação gráfica dos efeitos para um fatorial 2^2 quando se tem apenas os efeitos principais (A) e a interação (antagonismo) entre os níveis superiores (B).

6.4 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 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	$a - 1$	_____	QM_A
Fator B	$b - 1$	_____	QM_B
Interação AB	$(a - 1) (b - 1)$	_____	QM_{AB}
Erro Experimental	$(r - 1) (ab - 1)$		QM_E
Total	$abr - 1$		-

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

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad \text{Equação 1}$$

Onde μ é a média geral do efeito principal, τ_i é o efeito no i -ésimo nível da linha do fator A , β_j é o efeito do j -ésimo nível da coluna do fator B , $(\tau\beta)_{ij}$ é o efeito de interação entre τ_i e β_j e ε_{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 τ_i temos (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 β_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 $(\tau\beta)_{ij}$
- $H_1: \text{no mínimo um } (\tau\beta)_{ij} \neq 0$

6.5 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. Algumas vezes onde as predições e modelagem não são possíveis, como nos casos onde se utilizam fatores categóricos ou simplesmente em casos em que a informação do desenho exploratório já supre os questionamentos iniciais, a utilização de fatoriais completos isoladamente torna-se suficiente. 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 e 6 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. Proceder-se com os experimentos;
- 5º. Insere-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

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 \quad \text{Equação 2}$$

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. Na Tabela 5 observa-se a distribuição dos sinais na estimação dos coeficientes indicando uma outra característica dos fatoriais completos, a *ortogonalidade*. Esta pode ser percebida pela presença de uma correlação de nível 0 para qualquer par de colunas a serem consideradas, já que os fatores estão presentes em ambos os níveis em cada uma das colunas dos coeficientes. Algebricamente pode-se verificar esta ortogonalidade pelo somatório dos sinais de cada coluna que sempre resulta em 0 (MONTGOMERY, 2000; MASON et al., 2003).

Tabela 5. Distribuição dos sinais para os coeficientes do modelo de regressão do fatorial 2^2 .

	Coeficientes		
	b_1	b_2	b_{12}
Sinais	-	-	-
	-	+	-
	+	-	+
	+	+	+

6.6 Desenhos de composto central

6.6.1 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), acoplado-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 α , dado por:

$$\alpha = \frac{1}{N} \sqrt{\frac{Nf}{N-1}}$$

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 α implica em duas características

importantes: *rotabilidade* e *ortogonalidade*. Um DCC pode se tornar rotável dependendo do valor de α , que por sua vez depende do número de pontos na porção fatorial do planejamento. Para um modelo de segunda ordem fornecer previsões através da região de interesse é necessário ter uma variância razoavelmente consistente e estável nos pontos de interesse das variáveis independentes. Isso significa que a variância do valor previsto para a resposta é a mesma em todos os pontos das variáveis independentes que estejam à mesma distância do centro do planejamento. Por exemplo, se dois fatores correspondem à concentração de acetona e metanol, sabe-se que quanto mais distantes as concentrações estão do ponto central, menor é a confiança da medida. Quando um modelo é rotável, a variância da resposta prevista, ou seja, a confiança da medida permanece constante (DEMING *et al.*, 1987; MONTGOMERY, 2000; BRERETON, 2003; MASON, 2003; MYERS *et al.*, 2003).

Já a *ortogonalidade* implica que todos os termos (linear, quadráticos e interações) são ortogonais uns contra os outros. Para os termos lineares e interações isto sempre irá ocorrer, porém, para termos quadráticos, na maioria dos tipos de DCC, isto não ocorre. A ortogonalidade depende das replicatas do número total de experimentos, o que eleva a implicação do número de replicatas do ponto central. Uma falta de ortogonalidade de pequena magnitude nos termos quadráticos é geralmente tolerada e irá depender do tipo de experimento envolvido (MYERS *et al.*, 2003)

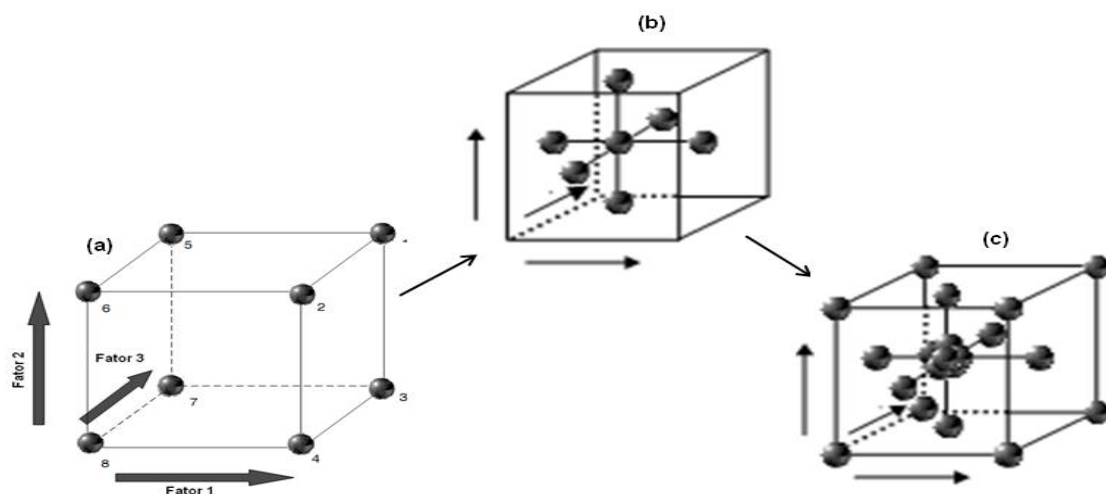


Figura 5. Sequência de arranjos partindo-se de um fatorial completo 2^3 (a), com o acréscimo de 6 pontos axiais e um ponto central (b) e finalmente com a adição de repetições ao ponto central (c).

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 α não possuem uma magnitude suficiente para causar diferenças significativas no 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 α é ditado principalmente pela região de interesse do estudo (DEMING *et al.*, 1987; MONTGOMERY, 2000; BRERETON, 2003; MASON, 2003; MYERS *et al.*, 2003).

Tabela 6. Valores de α para se obter um desenho ortogonal ou rotável e a relação com o número de replicatas do ponto central (N_c).

k	Rotabilidade	Ortogonalidade		
		N_c		
		4	5	6
2	1,414	1,210	1,267	1,320
3	1,682	1,428	1,486	1,541
4	2,000	1,607	1,664	1,719
5	2,378	1,764	1,820	1,873

6.6.2 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. A análise de variância e a formulação das hipóteses são feitas da mesma forma como citado no item 6.4 (MYERS *et al.*, 2003).

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

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 \quad \text{Equação 4}$$

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 contorno* como demonstrado na Figura 6 (MYERS et al., 2003).

O gráfico de contorno expressa a resposta estimada (linhas) plotada em termos da variação dos níveis dos fatores (eixo das ordenadas e abscissas). Uma superfície de resposta representa o mesmo tipo de informação, só que através de três eixos ao invés de dois. Um plano reto na superfície de resposta e linhas paralelas no gráfico de contornos representam o comportamento gráfico de uma função de primeiro grau (MYERS et al., 2003).

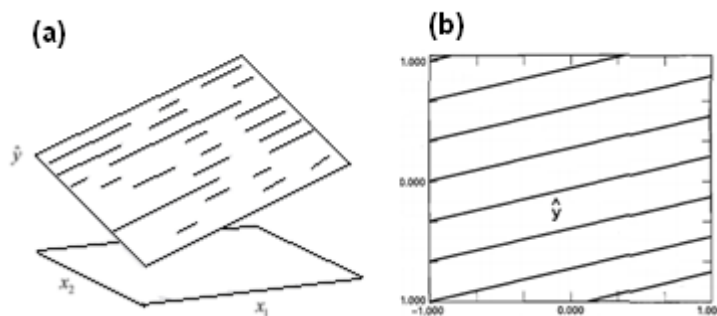


Figura 6. Superfície de resposta (a) e gráfico de contornos (b) para uma modelagem a partir de 2 variáveis independentes (x_1 , x_2) e uma variável dependente (resposta; \hat{y}).

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

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 + b_{12}x_1x_2 \quad \text{Equação 5}$$

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-paralelismo das linhas no gráfico de contorno o comportamento de uma função de segundo grau (MYERS *et al.*, 2003).

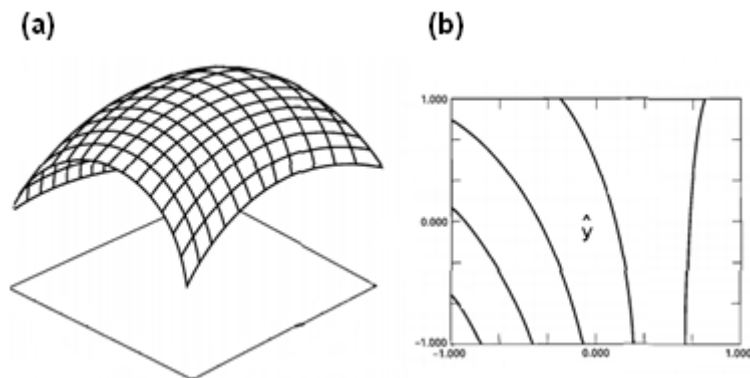


Figura 7. Superfície de resposta (a) e gráfico de contornos (b) para uma função de segundo grau.

6.6.3 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 concilia 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:

$$d_i = \begin{cases} 0 & y_i < L \\ (\hat{y}_i - L / T - L)^\omega & L \leq y_i \leq T \\ 1 & y_i > T \end{cases} \quad \text{Equação 6}$$

Onde T representa o *valor alvo* da i -ésima resposta y_i , L representa o limite inferior aceitável para a resposta e ω 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:

$$d_i = \begin{cases} 1 & y_i < L \\ (U - \hat{y}_i / U - T)^{\omega} & T \leq y_i \leq U \\ 0 & y_i > U \end{cases} \quad \text{Equação 7}$$

Onde U representa o limite superior aceitável para a resposta (as demais designações seguem como na Equação 7). 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:

$$d_i = \begin{cases} 0 & y_i < L \\ (\hat{y}_i - L / T - L)^{\omega 1} & L \leq y_i \leq T \\ (U - \hat{y}_i / U - T)^{\omega 2} & T \leq y_i \leq U \\ 0 & y_i > U \end{cases} \quad \text{Equação 8}$$

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

$$D = (d_1^{r_1}, d_2^{r_2}, \dots, d_m^{r_m})^{1/(r_1 + r_2 + \dots + r_m)} \quad \text{Equação 9}$$

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).

6.7 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. Além disso, muitas combinações de fatores podem resultar em informação não proveitosa, além do fato de que as interações após uma certa ordem de magnitude tendem a não ser significativas. Um desenho com três fatores é demonstrado na forma de

fatorial completo na Tabela 7 e na forma de fatorial fracionado (2^{k-1}) na Tabela 8 (BRERETON, 2003).

Tabela 7. Matriz de sinais para um fatorial completo 2^3 .

Experimento	Fator 1	Fator 2	Fator 3	Desenho da matriz								
				x_0	x_1	x_2	x_3	x_1x_2	x_1x_3	x_2x_3	$x_1x_2x_3$	
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
3	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-
4	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
5	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-
6	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+
7	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
8	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-

x_0 representa o intercepto e x_1, x_2, x_3 representam os fatores no formato de modelo de regressão para o fatorial 2^3 .

Tabela 8. Matriz de sinais para um fatorial fracionado 2^3 .

Experimento	Fator 1	Fator 2	Fator 3	Desenho da matriz								
				x_0	x_1	x_2	x_3	x_1x_2	x_1x_3	x_2x_3	$x_1x_2x_3$	
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
3	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
4	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+

x_0 representa o intercepto e x_1, x_2, x_3 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 8) possui as quatro primeiras colunas diferentes (x_0, x_1, x_2, x_3) 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. Desde que são realizados somente quatro experimentos só é possível medir quatro únicos fatores. Como consequência a interação entre os fatores 1 e 2 é dita *confundida* com o fator 3. Na prática isto significa que, por exemplo, a interação entre temperatura e pH é indistinguível do fator concentração aplicado isoladamente (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 9 (BRERETON, 2003).

Tabela 9. 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	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+

Como mostrado na Tabela 9, podem ser destacadas algumas características para este tipo de desenho como (BRERETON, 2003):

- Na primeira linha todos os fatores estão no mesmo nível;
- A primeira coluna, considerada somente a partir da segunda linha, é chamada *gerador*;

- A chave do desenho é que há somente certos geradores permitidos obtidos de tabelas. O número de fatores (k) será sempre um número ímpar igual a $k=4m-1$ (nesse caso 11), onde m é qualquer inteiro. Se a primeira linha consiste de níveis (-), o gerador será $2m$ (neste caso 6) experimentos no nível (+) e $2m-1$ (5 neste caso) no nível (-), sendo o recíproco verdadeiro se a primeira linha está no nível "+". Para a Tabela 9 o gerador é ++++++----+;
- As próximas $4m-2$ (=10) colunas são geradas da primeira coluna simplesmente por substituição das células inferiores pela coluna 1 (indicado pelas setas diagonais na Tabela 9);
- O nível de um fator qualquer F no experimento (ou linha) 2 é igual ao nível deste fator na linha L para o fator $F-1$. Por exemplo, o nível do fator 2 no experimento 2 é igual ao nível do fator 1 no experimento 12.

Geradores para desenhos padrão de Plackett-Burman para 7, 11, 15, 19 e 23 fatores são dados na Tabela 10. 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 10. Geradores para desenho de Plackett-Burman considerando-se a primeira linha no nível "-".

<i>Fatores</i>	<i>Gerador</i>
7	++++--
11	+++++----+
15	++++-+-+----
19	+++++---+-----+--
23	+++++---+---+---+-----

6.8 Adequação do modelo matemático

O uso de modelos lineares e as várias técnicas estatísticas relacionadas tornaram-se quase que um padrão dentre os processos de análise de dados. A análise de regressão e a análise de variância são, provavelmente, as técnicas

estatísticas de uso mais rotineiro dentro da estatística. Entretanto, essas ferramentas têm sua base teórica assentada sobre pressuposições rígidas e a quebra de alguma ou de algumas dessas pressuposições podem comprometer seriamente as conclusões (DEMING e MORGAN, 1987; MASON et al., 2003).

As pressuposições básicas associadas à essas metodologias são (DEMING e MORGAN, 1987; MASON et al., 2003):

- i) Aditividade
- ii) Variância constante (Homocedasticidade)
- iii) Normalidade
- iv) Erros não correlacionados (Independência)

Essas pressuposições têm vários objetivos, mas essencialmente visam a facilitar a interpretação dos resultados, tornarem as técnicas estatísticas mais simples e possibilitar testes de hipóteses. A validade exata dessas pressuposições é meramente teórica e, na prática, o que se deseja é a validade aproximada, pelo menos, dessas pressuposições uma vez que os procedimentos obtidos através dos modelos lineares são razoavelmente robustos e pouco se perde se a validade das pressuposições é apenas aproximada. Muitas vezes, no entanto, sabe-se de antemão que uma ou mais das pressuposições anteriores não tem qualquer razão de ser, nem mesmo aproximadamente. É o caso da presença de assimetrias extremas na amostra, observações referentes a variáveis sabidamente não normais ou conhecidas relações entre médias e variâncias. Tudo isso pode afetar mais ou menos gravemente as conclusões tomadas com base nos modelos estabelecidos e nas técnicas de análise a ele associadas. Os efeitos dos desvios das pressuposições são variados e a gravidade depende sempre da situação em particular (DEMING e MORGAN, 1987; MASON et al., 2003).

Desse modo, a aditividade está ligada à facilidade de interpretação do modelo que, se ela é válida, então as observações serão sempre combinações lineares de efeitos principais somente. Não é pressuposição sempre necessária, seja na estimação seja nos testes de hipótese. Em muitas situações, a presença de termos

não aditivos é de grande interesse (DEMING e MORGAN, 1987; MASON et al., 2003).

A variância constante ou homogeneidade de variâncias (homocedasticidade) é, na maioria das vezes, um requisito necessário. Sob heterogeneidade de variância o método dos mínimos quadrados ordinários não produz os melhores estimadores e o teste F, as comparações múltiplas, os contrastes ortogonais, ou a estimação dos componentes de variância poderão ser grandemente afetados (DEMING e MORGAN, 1987; MASON et al., 2003).

Quanto à normalidade, é necessária nos testes de hipóteses. Sendo válida, poderão ser utilizados procedimentos padrão amplamente estudados e cujas distribuições encontram-se disponíveis. Uma vez observado qualquer desvio importante nas pressuposições, dois caminhos podem ser tomados. O primeiro deles é uso de uma nova concepção onde aquela pressuposição não seja crítica ou mesmo não exista necessidade de pressuposições (como a Estatística Não Paramétrica e os Modelos Lineares Generalizados). O segundo é procurar utilizar, ao invés das observações originais que não atendem as pressuposições, funções delas construídas de tal modo que, para essas funções, as pressuposições sejam atendidas. A construção dessas funções recebe o nome genérico de transformação de dados (DEMING e MORGAN, 1987; MASON et al., 2003).

Quanto à suposição de erros não correlacionados pode-se dizer que é uma das características mais importantes já que a presença autocorrelação significa que a regressão pelos mínimos quadrados ordinários não poderá estimar com acuracidade o erro padrão dos coeficientes, podendo-se ter, por exemplo, preditores significativos quando de fato não são (DEMING e MORGAN, 1987; MASON et al., 2003).

6.8.1 Medidas de Qualidade do Ajuste

O coeficiente de determinação (R^2) é definido como

$$R^2 = \frac{SQ\text{ Regressão}}{SQ\text{ Total}} = 1 - \frac{SQ\text{ Erro}}{SQ\text{ Total}}$$

Equação 10

sendo uma medida da redução na variabilidade de y , obtida pelo uso dos regressores x_1, x_2, \dots, x_k , tendo-se que ter $0 \leq R^2 \leq 1$. Entretanto, um valor grande de R^2 não implica necessariamente que o modelo de regressão seja bom. A adição de uma variável ao modelo sempre aumentará R^2 , independente da variável adicional ser ou não estatisticamente significativa. Assim, modelos que tenham valores grandes de R^2 podem resultar em previsões pobres de novas observações ou estimativas da resposta média (DEMING e MORGAN, 1987; MASON et al., 2003).

Já o coeficiente de determinação ajustado (R^2_{aj}) é definido como

$$R^2_{aj} = 1 - \left(\frac{n-1}{n-p} \right) \frac{SQ_{Resíduo}}{SQ_{Total}} \quad \text{Equação 11}$$

onde n é o número de observações e p é o número de parâmetros do modelo. Devido ao termo $(n-1/n-p)$, ocorre uma normalização do R^2 e o R^2_{aj} não aumenta seu valor na medida em que novos coeficientes são adicionados à regressão (DEMING e MORGAN, 1987; MASON et al., 2003).

Outra estatística importante para avaliar a habilidade preditiva é a *Predição da Soma dos Quadrados (PRESS)*. Em geral, quanto menor o valor de PRESS, melhor é a capacidade preditiva do modelo, sendo calculado por:

$$PRESS = \sum_{i=1}^n y_i - Y_{(i)}^2 \quad \text{Equação 12}$$

Onde y_i é a resposta observada, $Y_{(i)}$ é a resposta ajustada para a observação omitida e n é o número de observações.

6.8.2 Adequabilidade

A análise de resíduos é uma ferramenta extremamente eficiente no diagnóstico de adequabilidade de modelos lineares, e constitui o mecanismo mais comumente empregado para tal. Ela pode ser verificada tanto grafica como individualmente através de testes estatísticos específicos, e costumeiramente são empregados os testes de homogeneidade de variâncias e os testes de normalidade. Graficamente é possível observar o comportamento geral dos dados, no entanto,

pela subjetividade inerente, as tomadas de decisão devem ser realizadas somente a partir dos testes estatísticos específicos (DEMING e MORGAN, 1987; MASON *et al.*, 2003).

O resíduo e_i é definido como a diferença entre o valor observado (y_i) e o ajustado (\hat{y}_i) pelo modelo, ou seja, é uma medida da variabilidade não explicada pelo modelo de regressão. Quaisquer desvios nas suposições dos erros repercutirão nos resíduos. Já os resíduos ordinários do modelo de regressão são definidos por

$$e_i = y_i - \hat{y}_i \quad \text{Equação 13}$$

Os resíduos padronizados (d_i) (*resíduos de Jackknife* ou *resíduos de Pearson*) são definidos por

$$d_i = \frac{e_i}{\sqrt{QM_E}} = \frac{e_i}{\sqrt{s}} \quad \text{Equação 14}$$

Onde s é o desvio padrão da amostra e QM_E é o quadrado médio do erro. São frequentemente mais úteis do que os resíduos ordinários quando se verifica a diferença na magnitude dos resíduos. Alguns analistas preferem plotar resíduos padronizados ao invés de resíduos ordinários, já que os resíduos padronizados são escalonados de modo que seus desvios-padrão sejam aproximadamente iguais a um. Conseqüentemente, resíduos grandes (que podem indicar possíveis *outliers* ou observações não usuais) serão mais óbvios a partir da inspeção dos gráficos desses resíduos (DEMING e MORGAN, 1987; MASON *et al.*, 2003).

6.8.3 Diagnóstico de influência

O objetivo da análise de influência é determinar o impacto de observações na análise. De fato todas as observações são influentes, no sentido que suas remoções modificam os resultados numéricos da análise. O objetivo é identificar aquelas observações que são tão influentes que sua presença ou ausência nos dados modificam importantes aspectos da análise, produzem inferências qualitativamente diferentes ou violam suposições do modelo. O objetivo não é identificar observações para removê-las da análise, mas determinar quais casos exercem influência excessiva na análise e de que forma. Em regressão múltipla, quando três ou mais

variáveis preditoras (independentes) são usadas em um modelo de regressão, combinações extremas de preditores podem não ser aparentes na inspeção gráfica de resposta-preditor e preditor-preditor, sendo indispensável este tipo de análise (DEMING e MORGAN, 1987; MASON et al., 2003).

A influência em todos os valores ajustados pode ser verificada pela estatística *D* de Cook (*Distância de Cook, D_i*), a qual mede a mudança escalonada nas soluções dos parâmetros decorrente da remoção da *i*-ésima observação. É uma medida de influência agregada e pode ser expressa em termos dos resíduos padronizados (*d_i*) e da alavanca (*H_i*) sendo expressa por (DEMING e MORGAN, 1987; MASON et al., 2003).

$$D_i = \frac{e_i^2}{s^2 p} \left[\frac{h_i}{(1 - h_i)^2} \right] \quad \text{Equação 15}$$

Onde *e_i* é o resíduo ordinário, *s*² é variância, *p* é o número de preditores e *h_i* é a alavanca.

A estatística *D_i* pode ser vista como uma medida da distância entre os coeficientes calculados com e sem *i*-ésima observação e então a distribuição *F* poderia ser utilizada para decidir pela grandeza da estatística. Em geral, considera-se na prática que se o valor de *D_i* for muito inferior a 1, então a eliminação de qualquer observação não vai alterar muito as estimativas dos parâmetros, mas um valor de *D_i* > 1 indica que o ponto exerce influência (DEMING e MORGAN, 1987; MASON et al., 2003).

A influência em valores ajustados individuais pode ser acessada pela estatística *DFITS*. Esta mede a influência de cada observação sobre os valores ajustados na regressão e no modelo de ANOVA. *DFITS* representa grosseiramente o número de desvios padrão que o valor ajustado muda quando cada observação é removida e o modelo é reajustado (DEMING e MORGAN, 1987; MASON et al., 2003). Pode ser descrita como:

$$DFITS = e_i \left[\frac{n - p - 1}{SQE(1 - h_i) - e_i^2} \right] \left[\frac{h_i}{1 - h_i} \right] \quad \text{Equação 16}$$

Onde e_i é o i -ésimo resíduo ordinário, n é o número de observações, p é o número de coeficientes, SQE é a soma dos quadrados do erro, h_i é a i -ésima alavanca. No caso do DFITS, os pontos influentes são aqueles superiores a 1 em módulo para pequenos e médios conjuntos de dados em que $DFITS \geq 2[p/(n-p)]^{1/2}$ (onde p é o número de termos do modelo, incluindo a constante, e n é o número de observações) (DEMING e MORGAN, 1987; MASON et al., 2003).

6.8.4 Verificação de suposições

Para os testes de normalidade podem ser usados *Kolmogorov-Smirnoff*, *Anderson-Darling*, *Qui-quadrado*, *Cramer-Von Mises* e *Shapiro-Wilk*. Estes testes são baseados na função empírica de distribuição e verificam a aderência da função em relação à função de distribuição normal. As hipóteses testadas são (DEMING e MORGAN, 1987; MASON et al., 2003):

- H_0 : os dados se ajustam à uma distribuição normal;
- H_a : os dados não se ajustam à uma distribuição normal.

O teste qui-quadrado pode ser usado para qualquer modelo de distribuição, incluindo o normal e exponencial. Entretanto para esses dois casos o teste de Shapiro-Wilk (teste W) é geralmente mais poderoso, isto é, ele fornece uma chance melhor de rejeitar um modelo incorreto. Assim, quando os dados são limitados, é geralmente aconselhável usar o teste W apropriado, ao invés do teste qui-quadrado, para avaliar a suposição de normalidade ou de exponencialidade. O teste W se apresenta como um procedimento eficiente para avaliar a suposição de normalidade contra um amplo espectro de alternativas não normais, principalmente com um número relativamente pequeno de observações (DEMING e MORGAN, 1987; MASON et al., 2003).

Os testes de Kolmogorov-Smirnoff, Anderson-Darling e Cramer-Von Mises são equivalentes, possuindo pequenas diferenças (principalmente em relação ao tamanho de amostra), por vezes utilizados no lugar do teste W ou concomitante a este (DEMING e MORGAN, 1987; MASON et al., 2003).

6.8.5 Homocedasticidade

Existe uma série de testes estatísticos que podem ser empregados para testar a hipótese de igualdade de variância dentre cada tratamento. Com frequência são empregados os testes de *Bartlett*, *Levene*, *Ryan-Joiner*, *Box*, *Cochran*, *Hartley* ou *F máximo*. O teste padrão para variância constante é o teste de Levene, facilmente implementado no caso de experimentos em que se tem, geralmente, repetições dos tratamentos (DEMING e MORGAN, 1987; MASON et al., 2003).

6.8.6 Teste de não correlação (independência)

O teste comumente utilizado é o de *Durbin-Watson (d)*. Avalia a presença de auto-correlação nos resíduos por determinação se há ou não a correlação entre dois termos adjacentes. O teste assume que os erros são gerados por um processo auto-regressivo de primeira ordem (DEMING e MORGAN, 1987; MASON et al., 2003).

Tem-se as seguintes hipóteses:

- H_0 : não há correlação entre os resíduos;
- H_a : há correlação entre os resíduos.

É calculado pela fórmula:

$$d = \frac{\sum_{i=2}^n (e_i - e_{i-1})^2}{\sum_{i=1}^n e_i^2}$$

Equação 17

onde e_i é o valor do i -ésimo resíduo, e_{i-1} é o resíduo para a observação anterior e n é o número de observações. A partir do valor calculado da estatística, compara-se o mesmo com valores tabelados de d_U e d_L onde as seguintes situações podem aparecer:

- Se $d > d_U$, aceita-se H_0 ;
- Se $d < d_L$, rejeita-se H_0 ;
- Se $d_L \leq d \leq d_U$, o teste é inconclusivo

- Pequenos valores de d indicam que erros adjacentes tendem a ser da mesma magnitude quando são positivamente correlacionados.

6.8.7 Transformação de dados

Se o modelo é correto e se as suposições são satisfeitas, os resíduos não deveriam apresentar estrutura nenhuma, em particular eles deveriam ser não-correlacionados com qualquer outra variável, incluindo a resposta (y) (DEMING e MORGAN, 1987; MASON et al., 2003).

Variância não-constante decorre de não-normalidade (heterogeneidade regular), principalmente por problemas de assimetria, onde para distribuições assimétricas a variância tende a ser função da média. Resposta errática de tratamentos também pode provocar variância não constante (heterogeneidade do tipo irregular). O procedimento usual para resolver problemas de variância não-constante é a aplicação de uma transformação para estabilizar a variância e então realizar a análise de variância com os dados transformados (DEMING e MORGAN, 1987; MASON et al., 2003).

Se a distribuição teórica das observações é conhecida, pode-se utilizar esta informação na escolha da transformação. Por exemplo, se as observações, seguem a distribuição de Poisson, então a transformação raiz quadrada é adequada. Quando o pesquisador não conhece a distribuição das observações (não se conhece a relação entre variância, σ , e média, μ) pode-se empiricamente estimar a forma da transformação requerida pelos dados (DEMING e MORGAN, 1987; MASON et al., 2003).

Na busca da transformação supõe-se que o desvio padrão de y (σ_y) é proporcional a uma potência da média de y tal que

$$\sigma_y \propto \mu^\alpha$$

Para a identificação da transformação necessária obtém-se uma regressão linear simples entre o logaritmo do desvio-padrão e o logaritmo da média de cada tratamento. Através do valor do coeficiente de regressão linear (β) identifica-se a constante de transformação (λ), pela relação $\lambda=1-\beta$, que identifica a potência que se

aplica aos dados. Isto é, obtêm-se os dados transformados (Y^*) através de $Y^*=Y^\lambda$. As principais transformações sugeridas são apresentadas na Tabela 11 (DEMING e MORGAN, 1987; MASON et al., 2003).

Tabela 11. Transformações sugeridas a partir da proporcionalidade entre variância (σ_y) e média (μ).

Relação entre σ_y e μ	Coefficiente de regressão angular	$\lambda=1-\beta$	Transformação
$\sigma_y \propto \text{constante}^a$	0	1	Nenhuma
$\sigma_y \propto \mu^{1/2}$	1/2	1/2	Raiz quadrada
$\sigma_y \propto \mu$	1	0	Logartimo
$\sigma_y \propto \mu^{3/2}$	3/2	-1/2	Raiz quadrada recíproca
$\sigma_y \propto \mu^2$	2	-1	recíproca

^a α representa o símbolo matemático de proporcionalidade.

7 Desenhos experimentais e métodos analíticos

A aplicação de métodos e ferramentas quimiométricas encontra numerosas aplicações, desde a etapa de preparo de amostra até a validação de um método analítico.

Nesse sentido, SIVAKUMAR e colaboradores (2007) utilizaram um desenho de composto central (DCC) no desenvolvimento de um método por CLAE/UV para análise de domperidona e pantoprazol com acetofenona como padrão interno. Neste trabalho os fatores foram fluxo da fase móvel, molaridade do tampão e concentração de acetonitrila; como respostas foram avaliados fator capacidade e resolução. As superfícies de resposta foram modeladas por polinômios de primeira e segunda ordem. Somente uma interação foi significativa: sinergismo entre os níveis superiores dos fatores molaridade do tampão e volume de acetonitrila para o tempo de retenção da domperidona. Buscando encontrar o sistema que atendessem a um ótimo global para o fator capacidade e resolução foi aplicada uma função de Derringer. O método ótimo encontrado (e posteriormente validado) era constituído por:

- Fase-móvel com metanol, acetonitrila e fosfato de potássio dibásico na proporção de 20:33:47(v/v/v), respectivamente, com pH 7;

- Tampão na molaridade de 15,3 mM;
- Fluxo de 1,19 mL/min.

Em outro trabalho através de um DCC rotável, BARMPALEXIS e colaboradores (2009) desenvolveram e otimizaram um sistema de CLAE/UV isocrático para separar nimodipino de três impurezas (A, B, C). Inicialmente avaliaram-se como fatores o tipo de modificador orgânico (acetonitrila ou metanol), concentração da fase orgânica (65 e 70%), temperatura da coluna (30 ou 40°C), fluxo da fase móvel (0,8-1,0 mL) e pH (3,5 ou 7,5). Como resposta foram avaliados fator capacidade, tempo de retenção e um fator de resposta único denominado *função de otimização cromatográfica (COF)*, onde levaram em conta, entre outros, os parâmetros de tempo de retenção do pico de interesse e a resolução. Na otimização o DCC empregaram como fatores temperatura do forno da coluna, concentração da fase orgânica e fluxo, além da função de Derringer para encontrar o sistema ótimo. Observaram que a *desejabilidade* (d) da função de Derringer aumentava com o aumento da temperatura da coluna, concentração de acetonitrila e fluxo. O seguinte sistema foi considerado como ótimo:

- Fase móvel: acetonitrila e água na proporção 67,5:32,5 (v/v), respectivamente;
- Temperatura da coluna: 40 °C;
- Fluxo: 0,9 mL/min.

Na validação, com o intento de avaliar a robustez, os pesquisadores foi utilizaram mais um desenho fatorial, do tipo fatorial completo em dois níveis. Como fatores foram considerados a quantidade de acetonitrila, fluxo, temperatura da coluna e comprimento de onda para detecção no ultravioleta. O método foi validado obtendo-se um tempo de retenção para o nimodipino em torno de 7,5 minutos, com adequada separação em relação às 3 impurezas avaliadas.

Também procurando desenvolver e otimizar um método para separação adequada de fármaco e impureza, JANCIC-STOJANOVIC e colaboradores (2009) utilizaram um DCC de fase centrada para o ropinirol e sua impureza (impureza C).

Após a utilização de um fatorial completo de 2 níveis, definiram-se 3 fatores para o estudo de superfície de resposta: quantidade de acetonitrila presente na fase

móvel, pH da fase móvel e concentração do 1-heptano sulfonato de sódio. O sistema ótimo foi definido a partir da avaliação pela função de Derringer, considerando-se como respostas o fator de retenção, resolução e simetria do ropinirol e da sua respectiva impureza. Os principais efeitos observados foram:

- Para o fator capacidade, quanto mais baixa a concentração de acetonitrila e do 1-heptano sulfonato de sódio, maior o fator capacidade, sendo que em valores de acetonitrila menores do que 20% a interação com o 1-heptano sulfonato de sódio causou curvatura na superfície de resposta;
- Para a resolução, quanto menor o pH e a quantidade de acetonitrila na fase móvel, maior a resolução, apresentando também uma curvatura significativa na superfície de resposta.

Finalmente, a partir da função de Derringer, a fase móvel ótima foi composta de acetonitrila e 1-heptano sulfonato de sódio (5 mM) na proporção de (21,6:78,4;v/v) e pH 2,0 ajustado com ácido ortofosfórico. Na etapa de validação, a robustez foi explorada através das superfícies de resposta obtidas no desenvolvimento do método. O tempo de retenção e resolução finais para o ropinirol foram aproximadamente 4,6 minutos e 2,1, respectivamente. Estes resultados apresentaram uma diferença de aproximadamente 10% em relação ao predito pelo modelo de *desejabilidade*, dentro da faixa aceitável.

8 Validação de métodos analíticos

Validação de método é um processo de demonstração que os procedimentos analíticos são desejáveis para o uso ao qual são destinados. O processo de validação para um procedimento analítico inicia com um conjunto planejado e sistemático de informações sobre o método pretendido a ser validado, incluindo uma fase detalhada de desenvolvimento do método, estudo de pré-validação e finalmente a validação por si mesma (BLIESNER, 2006).

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 RDC da

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e a agência estadunidense *Food and Drugs Administration* (FDA) (FDA, 1994; BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP, 2008).

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, DEJAEGHER 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 completa as possíveis variações que o método poderá sofrer e o impacto sobre as características de resposta.

9 Referências

ABRAMS, P.; CARDOZO, L.; FALL, M.; GRIFFITHS, D.; ROSIER, P.; ULMSTEN, U.; VAN KERREBROECK, P.; VICTOR, A.; WEIN, A. The standardisation of terminology in lower urinary tract function: report from the standardization sub-committee of the International Continence Society. *Urology*, n. 61, p. 37-49, 2003.

AHUJA, S. Modern Pharmaceutical Analysis: An Overview. In: AHUJA, S.; SCYPINSKI, S. *Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis*. San Diego: Academic Press, 2001. v.3

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.

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.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Lista de DCB 2006*. Atualizada pela Resolução - RDC nº 211, de 17 de novembro de 2006. Publicada no D.O.U de 20 de novembro de 2006.

BLIESNER, DAVID M. *Validating Chromatographic Methods-A Practical Guide*. Hoboken: John Wiley & Sons, 2006, 297p.

BRERETON, R. G. *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*. Chichester: John Wiley & Sons, 2003. 497p.

CHAPPLE, C.; STEERS, W.; NORTON, P.; MILLARD, R.; KRALIDIS, G.; GLAVIND, K.; ABRAMS, P. A pooled analysis of three phase III studies to investigate the efficacy, tolerability and safety of darifenacin a muscarinic M3 selective receptor antagonist, in the treatment of overactive bladder. *British Journal of Urology International*, v.95, p.993–1000, 2005.

COLOMBO, P.; BETTINI, R.; SANTI, P. Swellable matrices for controlled drug delivery: gel-layer behaviour, mechanisms and optimal performance. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, v. 3, p. 198-204, 2000.

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

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

DOLAN, T.F.; HUMPHREY, M.J.; NICHOLS, D.J. *Pharmaceutical Formulations Containing Darifenacin. United States Patent*, n.6106864, 2000.

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

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.

IRWIN, D. E.; MILSOMB, I.; HUNSKAAR, S.; REILLY, K.; KOPP, Z.; HERSCHORN, S.; COYNE, K.; KELLEHER, C.; HAMPEL, C.; ARTIBANI, W.; ABRAMS, P. *Population-Based Survey of Urinary Incontinence, Overactive Bladder, and Other Lower Urinary Tract Symptoms in Five Countries: Results of the EPIC Study. European Urology*, v.50, p.1306–1315, 2006.

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.

JONAS, U. *Overactive Bladder: What Matters to the Patient? European Urology Supplements*, n. 6, p. 423-424, 2007.

KAY, G.G.; WESNES, K. A. *Pharmacodynamic effects of darifenacin, a muscarinic M3 selective receptor antagonist for the treatment of overactive bladder, in healthy volunteers. British Journal of Urology International*, v.96, p.1055-106, 2005.

KAYE, B.; HERRON, W. J.; MACRAE, P. V.; ROBINSON, S.; STOPHER, D. A.; VENN, R. F.; WILD, W. *Rapid, Solid Phase Extraction Technique for the High-Throughput Assay of Darifenacin in Human Plasma. Analytical Chemistry*, v. 68, n. 9, p.1658-1660, 1996.

KHULLAR, V.; CHAPPLE, C.; GABRIEL, Z.; DOOLEY, J. A. *The effects of antimuscarinics on health-related quality of life in overactive bladder: a systematic review and meta-analysis. Urology*, v. 68, p. 38-48, 2006.

KLOTZ, T.; BRÜGGENJÜRGEN, B.; BURKART, M.; RESCH, A. *The Economic Costs of Overactive Bladder in Germany. European Urology*, v. 51, p. 1654-1663, 2007.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. *Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 41, n. 2, p.143-154, 2005.

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.

NOVARA, G.; GALFANO A.; SECCO, S.; D'ELIA, C; CAVALLERI, S.; FICARRA, V.; ARTIBANI, W. A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials with Antimuscarinic Drugs for Overactive Bladder. *European Urology*, v.54, p.740–764, 2008.

NOVARTIS. Enablex®15mg. Rio de Janeiro, 2009. 1f. Bula.

PALMA, T. Aspectos práticos do tratamento farmacológico da bexiga hiperativa. *Prática Hospitalar*, v. 54, p. 58-61, 2007.

PUCHUN, L.; TZUCHI, R.J.; YIHONG, Q. Diffusion-Controlled Drug Delivery Systems. In: XIALONG, L.; JASTI, B.R. *Design of Controlled Release Drug Delivery Systems*. New York: McGraw-Hil, 2006, 452p.

RADHAKRISHNANAND, P.; SUBBA RAO, D. V.; HIMABINDU, V. A Validated LC Method for Determination of the Enantiomeric Purity of Darifenacin in Bulk Drug and Extended Release Tablets. *Chromatographia*, v.68, n. 11/12, p.1059-1062, 2008.

RANGA RAO, K.V.; DEVI, K.P. Swelling controlled release systems: recent development and application. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 48, p.1-13, 1988.

ROWE, R. C; SHESKEY, P. J.; OWEN, S. C. Handbook of pharmaceutical excipients. Washington : American Pharmaceutical Association, 2006, 918p.

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.

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.

SKERJANEC, A. The Clinical Pharmacokinetics of Darifenacin. *Clinical Pharmacokinetics*, v.45, p.325-350, 2006.

TELOKEN, C.; CARAVER, F.; WEBER, F. A.; TELOKEN, P. E.; MORAES, J. F.; SOGARI, P. R.; GRAZIOTTIN, T. M. Overactive Bladder: Prevalence and Implications in Brazil. *European Urology*, v. 49, p. 1087–1092, 2006.

TIWARI, A.; NARUGANAHALLI, K. S. Current and emerging investigational medical therapies for the treatment of overactive bladder. *Expert Opinion Investigational Drugs*, v. 15, p. 1017-1037, 2006.

TOOZS-HOBSON, P.; LATTHE, P. Critical Evaluation of the Efficacy and Safety of Anticholinergics in Overactive Bladder. *European Urology Supplements*, v. 6, p. 425-431, 2007.

USP. The United States Pharmacopeia. 31st ed. Rockville. United States Pharmacopeial Convention, 2008. <1225>.

VENN, R. F.; GOODY, R. J. Synthesis and Properties of Molecular Imprints of Darifenacin: The Potential of Molecular Imprinting for Bioanalysis. *Chromatographia*, v.50, n. 7/8, 1999.

WATERSTONE TECHNOLOGY. Bromidrato de darifenacina. Carmel, 2010. 1f. Laudo do fornecedor.

YOSHIOKA, S.; STELLA, V.J. *Stability of Drugs and Dosage Forms*. New York: Kluwer Academic Publishers, 2002.

1.1 Caracterização e propriedades físicas

1.1.1 Determinação do ponto ou intervalo de fusão

1.1.1.1 Materiais e método

Com o objetivo de caracterizar a substância química de referência (SQR) foram realizadas determinações do intervalo de fusão utilizando-se o Método do Bloco Metálico (*Método IV*), em equipamento de Koffler da marca Reichert (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). Como padrões de ponto de fusão (PF) foram utilizados a cafeína (PF de 236,5°C; Mettler ME-18872A.4.96 *Calibration Substance*) e a fenolftaleína (PF de 262,1°C; Mettler ME-18872A.4.96 *Calibration Substance*). A SQR foi adquirida do laboratório Waterstone Technology (pó em ampola unitária de 1 g, lote 1221-2, fabricada em 25/10/09) com teor de 99,70% e umidade de 0,4%.

Como recomendado pela FARMACOPÉIA BRASILEIRA (2010) a taxa de aquecimento empregada foi de 10 °C/minuto até atingir a temperatura de 10 °C abaixo do início da faixa de fusão prevista para o fármaco. Após essa temperatura, a taxa foi ajustada para 1 °C/minuto.

O resultado obtido experimentalmente foi comparado com o especificado pelo fabricante, já que não há monografia oficial do fármaco em compêndios oficiais.

1.1.1.2 Resultados e discussão

Como ilustrado na Tabela 1.1, os resultados dos padrões internos indicaram que a medição pôde ser realizada com confiabilidade (SHRINER *et al.*, 1998). O ponto de fusão da SQR ficou dentro do que é preconizado pelas especificações do fabricante, o que é um indicativo de pureza adequada da SQR.

Tabela 1.1. Resultados para as determinações dos pontos de fusão da SQR de bromidrato de darifenacina e padrões de PF.

	SQR ¹ (227-232°C) ²	Fenolftaleína ¹ (262,1°C) ²	Cafeína ¹ (236,5°C) ²
Média (°C)	230,2	262,6	236,4
s (°C)	1,39	3,29	2,18
DPR (%)	0,60	1,25	0,92
IC ³	230,2 ± 1,46	-	-

¹Para as determinações utilizaram-se 6, 3 e 3 repetições para SQR, fenolftaleína e cafeína, respectivamente; ²PF teórico (fornecedor); ³intervalo de confiança com 5 graus de liberdade, 95% de confiança e 2,57 para o valor de *t* tabelado.

1.1.2 Rotação óptica específica

1.1.2.1 Materiais e método

A rotação óptica específica foi determinada em polarímetro Perkin Elmer 341, em temperatura ambiente (20 ± 0,5 °C). Utilizou-se cubeta de quartzo com 1 dm de percurso óptico e volume de 1 mL. A análise foi realizada com 589,3 nm de comprimento de onda da raia D de sódio. O ensaio foi repetido em 2 dias diferentes, com a SQR em diclorometano a 1% p/v para cada análise. A determinação foi realizada em quintuplicata.

Os cálculos foram efetuados pela substituição dos valores na Equação 1.1:

$$[\alpha]_D^{20} = \alpha/l.c \quad \text{Equação 1.1}$$

Onde:

α = ângulo de rotação;

l = comprimento, em dm, da cubeta do polarímetro

c = concentração da substância, expressa em porcentagem p/v.

O resultado obtido experimentalmente foi comparado com o especificado pelo fabricante, já que não há monografia oficial da molécula.

1.1.2.2 Resultados e discussão

A Tabela 1.2 expressa o resultado obtido, o qual se encontra dentro da faixa de aceitação estipulada pelo fabricante (+43° a +48°).

A determinação da rotação óptica permite estabelecer a identidade, a pureza e, às vezes, indica o valor terapêutico da substância. As substâncias que desviam o plano da luz polarizada são ditas opticamente ativas, podendo ser classificadas em dextrógiras (+) ou levógiras (-) (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). Geralmente, um dos enantiômeros de um fármaco quiral é mais ativo do que o outro. Contudo, apenas nos casos em que um dos enantiômeros é tóxico ou possui efeitos aversos importantes é realizada o isolamento de um dos enantiômeros. A principal razão para isto é o elevado custo do processo de isolamento a partir de uma mistura racêmica (MOORE et al, 1999; WATSON, 2005).

No caso do bromidrato de darifenacina somente o enantiômero *S* possui ação terapêutica. Pelo resultado da rotação óptica percebe-se que o enantiômero *S* é do tipo dextrógiro, sendo que o resultado deste ensaio é mais um indicativo da pureza e confirmação da identidade da SQR.

Tabela 1.2. Medidas de rotação óptica específica para o bromidrato de darifenacina.

	Dia 1	Dia 2
Média (°)	+ 44,72	+ 43,50
s	0,49	0,46
DPR (%)	1,09	1,05
Média interdía	44,11	
DPR interdía	1,77	

1.1.3 Determinação de água

1.1.3.1 Materiais e método

Devido à grande quantidade de substância necessária para realizar as determinações pelo método gravimétrico e método volumétrico direto, optou-se pelo método coulométrico para determinação da umidade na SQR. Utilizou-se um equipamento coulométrico Mettler Toledo 1015 e reagente de Karl Fischer (Merck). Realizou-se a medida em triplicata.

1.1.3.2 Resultados e discussão

O resultado da determinação de umidade da SQR é expresso na Tabela 1.3. Conforme o fabricante, o teor máximo de água é de 1,0%, sendo que o resultado condiz com este limite. O baixo teor de umidade é esperado para uma SQR que não possui molécula de hidratação molecular e possui alto grau de pureza.

Tabela 1.3. Determinação da umidade do bromidrato de darifenacina SQR.

	Umidade
Média (%)	0,43
s	0,03
DPR (%)	5,90

1.1.4 Avaliação da solubilidade

1.1.4.1 Materiais e método

A FARMACOPÉIA BRASILEIRA (2010) indica a avaliação da solubilidade pelo método de *análise de solubilidade por fases*. No entanto, os métodos recomendados apresentam dois fatores limitantes: a necessidade de se possuir o equipamento específico e uma quantidade significativa de substância para realização dos experimentos. Outros compêndios oficiais também recomendam o mesmo método da FARMACOPÉIA BRASILEIRA (com pequenas diferenças) já que fornece a solubilidade de maneira absoluta, propriamente dita. Em virtude disso, uma série de trabalhos vem sendo realizados no sentido de avaliar a solubilidade através de protocolos adaptados (*in house*). Estes possuem o intuito de realizar uma avaliação direcionada para a finalidade a qual se destina a informação de solubilidade, como solubilidade em certo solvente em método analítico, permeabilidade de membrana, avaliações *in vivo*, etc. (PAN et al., 2001; CHEN e VENKATESH, 2004; BALA et al. 2006; HENCHOZ et al., 2009)

Certas etapas operacionais consideradas *fundamentais* devem estar sempre presentes, independentemente do tipo de protocolo a ser utilizado, sendo elas:

- Agitação mecânica;
- Período de equilíbrio;

- Filtração;
- Quantificação.

Anteriormente havia sido feita uma triagem nos mesmos solventes, mas quantificando-se por espectrofotometria no ultravioleta. Também em etapa anterior foi realizado um monitoramento da repetibilidade e reprodutibilidade de sinal analítico para uma solução mãe de SQR em metanol (100 mg/mL) durante 48 h, a fim de se verificar possíveis degradações. Então, para a presente avaliação de solubilidade do bromidrato de darifenacina SQR foram realizadas as seguintes etapas:

1° Pesagem de exatamente cerca de 10 mg de SQR e adição de solvente até completar o balão volumétrico;

2° Solubilização com auxílio de banho de ultrassom (Thorthon; 60Hz) por 15 minutos;

3° Agitação mecânica (agitador de mesa marca STK) a 50 rpm por 12 h;

4° Refrigeração das soluções por 48 h a 4°C;

5° Filtragem das amostras em filtro de nylon de 0,45 µm;

6° Diluição do filtrado em fase móvel constituída de acetonitrila e ácido ortofosfórico 0,05% na proporção de 30:70 (v/v) em pH 3,0;

7° Análise por CLAE.

A quantificação foi realizada a partir da equação da reta obtida pelo método dos mínimos quadrados ordinários utilizando-se os dados de três curvas da SQR dissolvida em metanol no dia das análises. Utilizaram-se as seguintes concentrações na construção das curvas: 5, 10, 15; 20 e 25 µg/mL.

1.1.4.2 Resultados e discussão

Os resultados da quantificação do bromidrato de darifenacina em cada solvente estão presentes na Tabela 1.4. A avaliação estatística da regressão linear obtido com o método dos mínimos quadrados ordinários consta na Tabela I.I e I.II (Anexo I). A análise de variância para avaliar a diferença entre os solventes consta na Tabela I.III (Anexo I).

Tabela 1.4. Resultados da avaliação de solubilidade da SQR em diferentes solventes.

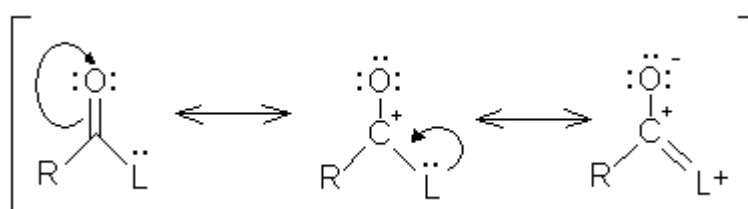
Solvente	Concentração da SQR ¹	Solução trabalho ^{1,2}	Média (%) (n = 2)	DPR ³ (%)
Metanol	20	10	99,46	0,62
Metanol	500	20	99,66	0,18
NaOH 0,1 M	250	10	99,56	0,28
Água	250	10	99,50	0,57
Fase móvel ⁴	250	10	99,64	0,53
HCl 0,1 M	250	10	100,04	0,92

¹Expresso em µg/mL; ²diluição final em fase móvel; ³foi utilizado n = 2 para cada condição; ⁴desvio-padrão relativo; ⁴fase móvel de CLAE constituída de acetonitrila e ácido orto-fosfórico 0,05% na proporção de 30:70 (v/v) com pH 3,0.

A análise de variância demonstrou não haver diferença significativa entre os grupos (p=0,91). Este resultado indica que o bromidrato de darifenacina possui solubilidade na concentração especificada para cada solvente avaliado.

Para a explicação da solubilidade deve-se considerar o comportamento físico-químico de ionização da molécula, principalmente referente a dois grupamentos químicos: a amina terciária e amida (VOLLHARDT e SCHORE, 2002; BRUICE, 2003).

A amida é um derivado do ácido carboxílico; este apresenta ressonância no seu grupo funcional como mostrado no Esquema 1 (VOLLHARDT e SCHORE, 2002; BRUICE, 2003).



Esquema 1

No Esquema 1, R é um radical alquila qualquer e L pode ser um grupo funcional considerado derivado do ácido carboxílico, como amida (–NR₂; R₂ podendo ser hidrogênio ou alquila), éster, entre outros. Em reações o L funciona como *grupo abandonador*. Quanto mais reativo o grupo abandonador, mais reativo torna-se o derivado do ácido carboxílico já que facilita a deslocalização dos elétrons

para o oxigênio da carbonila e conseqüentemente, por exemplo, favorece um ataque nucleofílico. A amida é o grupo abandonador mais estável dentre os derivados do ácido carboxílico. Mesmo assim a existência do híbrido de ressonância é possível (VOLLHARDT e SCHORE, 2002; BRUICE, 2003). Por sua vez esta estrutura de ressonância pode viabilizar uma interação eletrostática como a ligação iônica com o íon brometo. Neste sentido, o bromidrato de darifenacina pode se apresentar como na Figura 1.1.

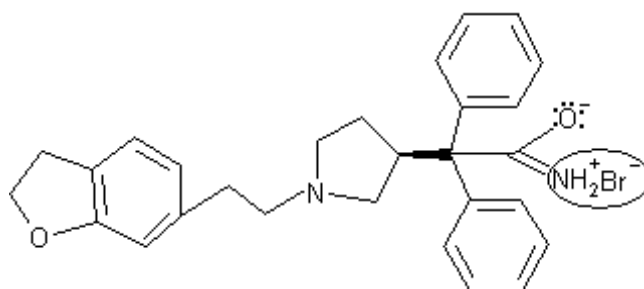
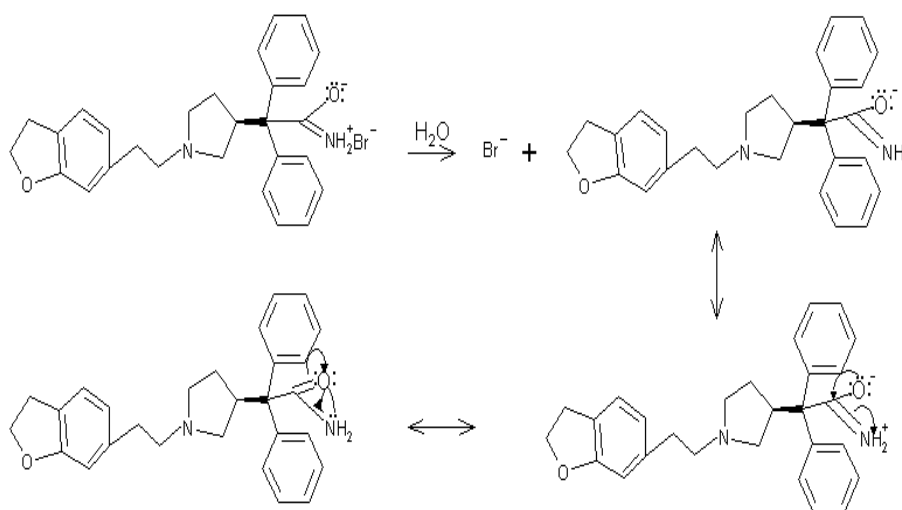


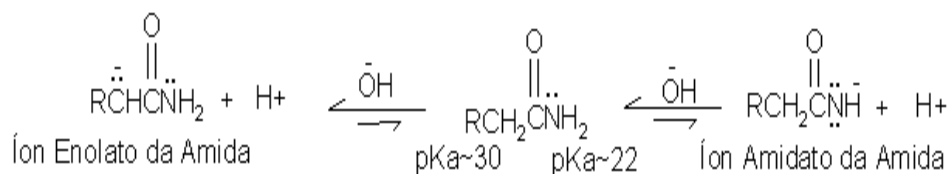
Figura 1.1. Proposição da estrutura do bromidrato de darifenacina na forma de sal (círculo destacando o local da ligação iônica).

Considerando-se o meio aquoso, o sal pode se dissociar (como no Esquema 2), possibilitando a ressonância da amida e conseqüentemente a formação de carga que poderá formar ligações intermoleculares em solvente prótico, como a água, viabilizando a solvatação da molécula em certa magnitude de concentração.



Esquema 2

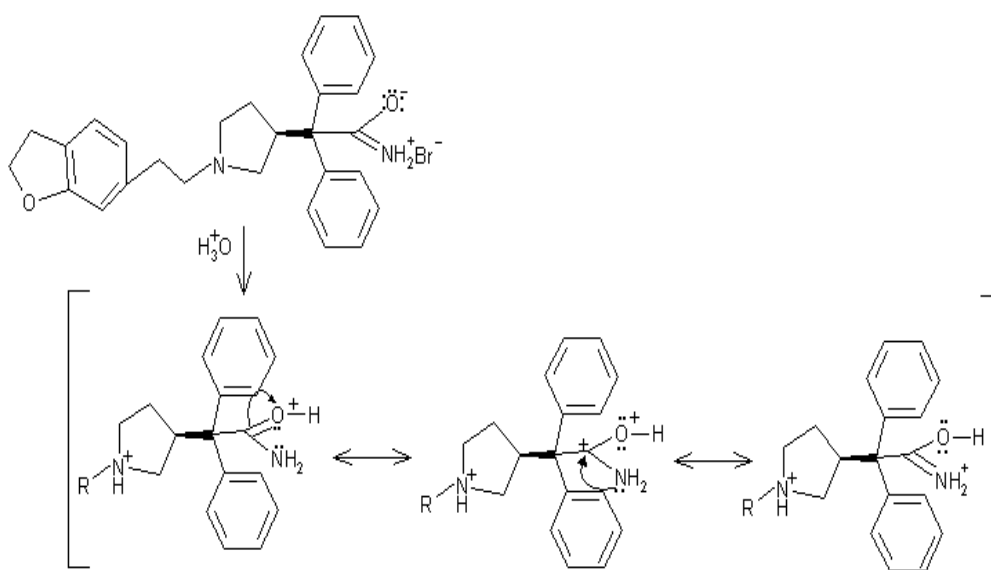
Já em meio alcalino (NaOH 0,1 M), o comportamento da amida pode ser descrito pelo Esquema 3 denominado de *rearranjo de Hofmann* (VOLLHARDT e SCHORE, 2002; BRUICE, 2003).



Esquema 3

Em meio alcalino, dependendo do pH e força da espécie básica presente no meio, pode-se ter liberação do hidrogênio do carbono adjacente à carbonila (pka de aproximadamente 30) ou do hidrogênio ligado ao nitrogênio (pka aproximadamente 22) (VOLLHARDT e SCHORE, 2002; BRUICE, 2003). Em ambos os casos, após a dissociação (Esquema 2), pode-se ter o comportamento da acetamida da darifenacina como demonstrado no Esquema 3. Este rearranjo garante um sítio ionizado para que a água possa solvatar a molécula até certo nível de concentração, tornando-a solúvel em água.

Para o meio ácido, a estrutura do bromidrato de darifenacina sofrerá efeitos em dois sítios diferentes (Esquema 4): na amida, onde a protonação da carbonila contribui para estabilização da carga positiva sobre o nitrogênio (VOLLHARDT e SCHORE, 2002; BRUICE, 2003); na amina terciária, onde o par de elétrons disponível é compartilhado com um próton de hidrogênio tornando a amina terciária ionizada. Pode ser dito que estas modificações concomitantes ocorridas em meio ácido acarretam uma contribuição significativa para a solubilidade em solventes como água e a fase móvel utilizada na quantificação da solubilidade.



Esquema 4

1.2 Determinação de peso da forma farmacêutica

1.2.1 Materiais e método

Com o objetivo de caracterizar e verificar a qualidade dos comprimidos de Enablex[®] 15 mg que serão utilizados nas análises posteriores, realizou-se a determinação do peso das doses unitárias. O resultado foi comparado com a variação permitida pela FARMACOPÉIA BRASILEIRA (2010).

1.2.2 Resultados e discussão

Os resultados obtidos com a determinação do peso médio e seus limites de variação estão contidos na Tabela 1.5. Observa-se que a variação de peso das unidades está dentro do limite estabelecido.

Tabela 1.5. Peso médio e limites de variação para o Enablex[®] 15 mg¹.

Parâmetro	Valor
Peso médio ²	207,6 mg
Coeficiente de variação	1,45 %
Maior peso para uma unidade	212,2 mg
Maior peso para uma unidade	201,1 mg
Limite estabelecido ³	±15,6 mg

¹Determinado para o lote S0056; ²Para uma amostra de 20 unidades; ³Conforme preconizado pela Farmacopéia Brasileira: *comprimidos não revestidos ou revestidos com filme, comprimidos efervescentes, comprimidos sublinguais, comprimidos vaginais e pastilhas* possuem uma variação aceita de ±7,5 %, em comprimidos com peso médio maior que 80 mg e menor que 250 mg.

1.3 Espectrofotometria no ultravioleta

1.3.1 Materiais e método

Os espectros foram obtidos em espectrofotômetro de absorção (faixa de ultravioleta-visível) de duplo feixe (Shimadzu UV-1601PC) e por meio do software UV2401PC versão 3.91. Foram traçados espectros com comprimento de onda entre 190 e 400 nm, empregando-se cubetas de quartzo com 1 cm de percurso óptico.

Para a SQR, utilizou-se como diluente água, HCl 0,1 M, NaOH 0,1 M, metanol, e fase móvel de CLAE constituída de acetonitrila e ácido orto-fosfórico 0,05% na proporção de 30:70 (v/v) com pH de 3,0. Todos os reagentes utilizados nessa

análise foram de grau analítico. A concentração da SQR em solução também foi alterada e avaliada. Avaliaram-se os espectros obtidos a partir de soluções com concentrações de 5 e 15 $\mu\text{g/mL}$. Realizaram-se varreduras em triplicata em dois dias consecutivos.

Para a solução obtida a partir do *pool* de comprimidos foram realizadas varreduras somente com solução metanólica na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$. A varredura da amostra foi comparada posteriormente com o espectro da SQR.

1.3.2 Resultados e discussão

Os resultados são apresentados nas Tabelas 1.6 e 1.7 e Figura 1.2. Na Figura 1.2 percebem-se duas regiões de máximo: em torno de 205 nm e 285 nm. As bandas em aproximadamente 205 nm podem ser atribuídas ao benzeno por transições π - π antiligante (π, π^*). A banda de baixa intensidade em torno de 285 nm pode ser atribuída ao sistema tetraidrobenzofurano (SILVERSTAIN e WEBSTER, 2000; SKOOG et al., 2006).

As diferenças de máximo de absorção em torno de ± 3 nm entre os solventes água, fase móvel, metanol e ácido clorídrico podem ser atribuídas às variações do instrumento que utilizou um comprimento de fenda de 2 nm. O alargamento do pico em solventes muito polares como a água é um efeito esperado em análises espectrofotométricas com este tipo de solvente (SKOOG et al., 2006).

No entanto, variação superior, como na região em torno de 205 nm, entre as varreduras com NaOH 0,1 M e os demais solventes, pode-se observar dois fenômenos: efeito batocrômico e hipsocrômico. Sugere-se que, como mostrado no Esquema 3 do item 1.1.4.2, este efeito possa estar relacionado ao efeito do íon enolato da amida (1) que funcione como um grupo auxócromo. Este reduziria a deslocalização dos elétrons no orbital p dos radicais fenila facilitando a excitação do elétron da região de maior probabilidade de densidade eletrônica (ligante) para o nodo do orbital p (antiligante) (HUNTER e SANDERS, 1990; VOLLHARDT e SCHORE, 2002; SKOOG et al., 2006).

Tabela 1.6. Comprimentos de onda máximos na região de 203 a 215nm obtidos com as varreduras da SQR em diferentes tipos de solvente.

Solvente	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Dia	Média (%)	s^1	DPR ² (%)
Água	5	1	207,2	0,20	0,10
		2	207,1	0,31	0,15
	15	1	207,1	0,23	0,11
		2	206,9	0,12	0,06
HCl 0,1 M	5	1	203,3	0,12	0,06
		2	203,1	0,12	0,06
	15	1	203,1	0,12	0,06
		2	203,1	0,23	0,11
NaOH 0,1 M	5	1	215,2	0,20	0,09
		2	215,1	0,12	0,05
	15	1	215,1	0,42	0,19
		2	215,1	0,31	0,14
Metanol	5	1	205,3	0,12	0,06
		2	205,2	0,20	0,10
	15	1	205,3	0,12	0,06
		2	205,2	0,20	0,10
Fase-móvel ³	5	1	205,1	0,12	0,06
		2	205,0	0,20	0,10
	15	1	205,2	0,20	0,10
		2	205,1	0,12	0,06

¹Desvio padrão; ²desvio-padrão relativo; ³solução mãe em metanol e posteriormente diluída em fase-móvel para realização da varredura.

Tabela 1.7. Comprimentos de onda máximos na região de 283 à 286 nm obtidos com as varreduras da SQR em diferentes tipos de solvente.

Solvente	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Dia	Média	s^1	DPR ² (%)
Água	5	1	283,1	0,12	0,04
		2	283,1	0,31	0,11
	15	1	283,1	0,12	0,04
		2	283,0	0,20	0,07
HCl 0,1M	5	1	285,6	0,20	0,07
		2	285,2	0,20	0,07
	15	1	285,3	0,31	0,11
		2	285,1	0,12	0,04
NaOH 0,1M	5	1	283,1	0,12	0,04
		2	283,3	0,31	0,11
	15	1	283,2	0,20	0,07
		2	283,1	0,12	0,04
Metanol	5	1	286,3	0,12	0,04
		2	286,3	0,31	0,11
	15	1	286,2	0,20	0,07
		2	286,5	0,23	0,08
Fase-móvel ³	5	1	286,1	0,12	0,04
		2	286,0	0,35	0,12
	15	1	286,0	0,20	0,07
		2	286,2	0,35	0,12

¹Desvio padrão; ²desvio-padrão relativo; ³solução mãe em metanol e posteriormente diluída em fase-móvel para realização da varredura.

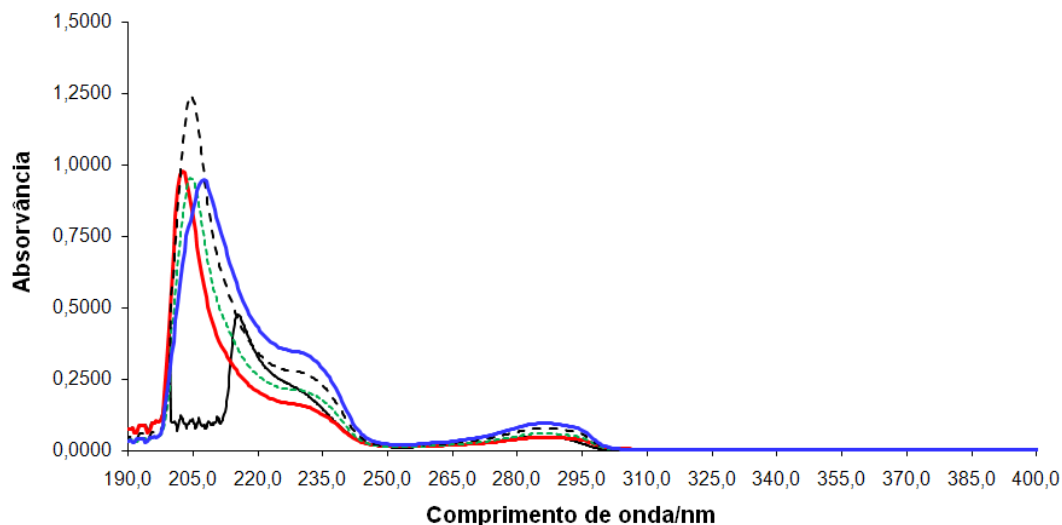


Figura 1.2. Espectros obtidos na região do ultravioleta para a SQR em metanol (preto e pontilhado), fase móvel (verde e pontilhado), HCl 0,1 M (vermelho), NaOH 0,1 M (preto) e água (azul).

Os resultados envolvendo a aplicação da espectrofotometria no ultravioleta para análise da forma farmacêutica comprimido se encontram no capítulo 3.

1.4 Cromatografia em camada delgada (CCD)

1.4.1 Materiais e método

Para desenvolver o método de caracterização utilizaram-se placas analíticas de gel de sílica GF₂₅₄ (Merck) como fase estacionária, com espessura da camada de sílica de 0,2 mm. As amostras foram solubilizadas em metanol.

A fase móvel testada foi colocada na câmara de eluição 1h antes da análise a fim de saturar a cuba. Como detecção utilizou-se vapor de iodo platinato de potássio 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 *R_f* de cada ponto de aplicação, sendo calculado pela Equação 1.2.

$$R_f = \frac{\text{(distância atingida pela mancha a partir da origem)}}{\text{(distância percorrida pelo solvente desde a origem)}} \quad \text{Equação 1.2}$$

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 R_f da SQR com o da amostra (pool de 20 comprimidos) após proceder a eluição no sistema cromatográfico otimizado.

1.4.2 Resultados e discussão

O sistema final obtido para a CCD encontra-se descrito no Quadro 1.1 e ilustrado na Figura 1.3. Testes com a SQR em solventes isolados como hexano, tolueno, diclorometano não permitiram a eluição adequada na cromatoplaça. A utilização de metanol demonstrou excessiva afinidade pelo eluente, não produzindo resultados satisfatórios. Como o metanol é imiscível com n-hexano, optou-se pelo uso do isopropanol, testando-se algumas variações de proporção entre eles até se encontrar a que foi considerada mais adequada.

Após o sistema estar definido, surgiram problemas no preparo de amostra do pool de comprimidos. Devido à capacidade de intumescimento, alta viscosidade e quantidade da hipromelose presente no comprimido, a concentração máxima padronizada (para não haver problemas durante a operação de filtragem e aplicação) foi de aproximadamente 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para melhorar a qualidade da análise (fluxo no capilar de aplicação, problemas de precipitação de excipientes na cromatoplaça) decidiu-se adicionar uma etapa de *clean up* por centrifugação a 5000 rpm por 15 minutos. A diferença visual na limpidez da solução pode se observada na Figura 1.4. Para se obter um limite de detecção da amostra do pool de comprimidos foi necessária a aplicação de 50 μL , distribuídos em 5 aplicações consecutivas de 10 μL .

Tanto na detecção por vapor de iodo platinato de potássio como por radiação ultravioleta em 254 nm é possível verificar que a mancha da amostra e da SQR possuem o mesmo comportamento de eluição, o que se confirma pelos valores de R_f próximos. Logo, foi possível identificar o fármaco a partir de pool de comprimidos por comparação de seu R_f com o valor da SQR.

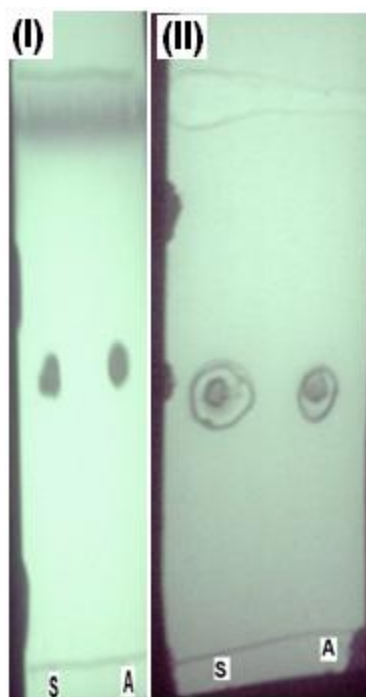


Figura 1.3 Sistema cromatográfico com visualização em UV 254 nm (I) e vapor de iodo platinato de potássio (II).

Quadro 1.1. Sistema final de CCD empregado para identificação do fármaco em comprimidos

Parâmetro	Valor
Quantidade substância aplicada	50 μ L (concentração de 300 μ g/mL)
Fase móvel	n-hexano:isopropanol (60:40, v/v)
Fase estacionária	Cromatoplasmas de gel de sílica GF 254 Merck
Deteção	Vapor de iodo platinato de potássio ou radiação ultravioleta em 254 nm
Rf da SQR	0,54
RF da amostra do pool de comprimidos	0,56

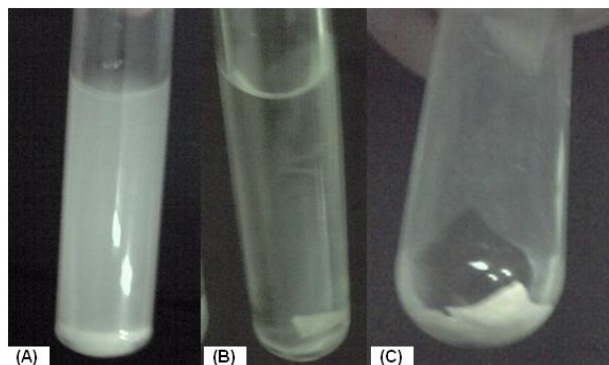


Figura 1.4 Diferença visual de limpidez na solução metanólica do pool de comprimidos (300 $\mu\text{g/mL}$) antes da centrifugação (A), e após a centrifugação (B), (C).

1.5 Espectroscopia de infravermelho

1.5.1 Materiais e Método

Os espectros foram registrados em espectrofotômetro com transformada de Fourier na região do infravermelho médio (Perkin-Elmer) com varredura na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} . Para tanto, foram produzidas pastilhas de 150 mg de brometo de potássio contendo 1% da SQR.

1.5.2 Resultados e discussão

O espectro de infravermelho obtido com a SQR pode se visualizado na Figura 1.5. O Quadro 1.2 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 amida, amina e éter cíclico. Com este ensaio pode-se confirmar mais algumas características importantes da SQR e conseqüentemente de sua identidade.

Quadro 1.2. Principais bandas obtidas com o espectro da SQR (NAKANISHI e SOLOMON, 1977; SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

Número de onda (cm^{-1})	Atribuição
1247	Deformação axial assimétrica do grupo C-O do éter cíclico
1442	Deformação axial do grupo C- da amina
1492	Deformação axial de C=C do anel aromático
1586	Deformação axial de C=C do anel aromático
1669	Estiramento do grupo C=O da amida
2850	Deformação axial em alcano e ciclo-alcano
2950	Deformação axial em alcano e ciclo-alcano
3094	Deformação axial dos grupos C-H do anel aromático
3210-3094	Deformação axial do N-H da amida
3466	Estiramento do grupo N-H da amina

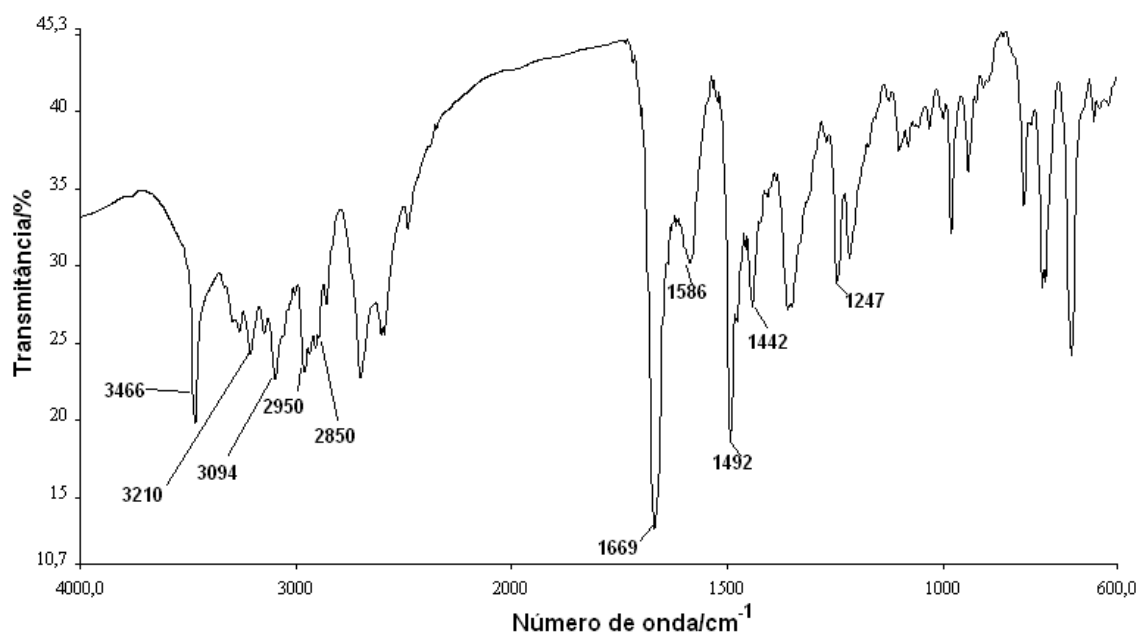


Figura 1.5. Espectro no infravermelho médio do bromidrato de darifenacina em pastilha de KBr.

1.6 Cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE)

1.6.1 Materiais e método

A análise por CLAE foi realizada para a identificação do bromidrato de darifenacina comprimido (Enablex® 15 mg). Foram realizadas análises da SQR e da amostra proveniente de um *pool* de 20 comprimidos. As soluções estoque foram

preparadas em metanol, diluídas em fase móvel na concentração de 15 µg/mL e filtradas em filtro de nylon de 0,45 µm.

No sistema cromatográfico foi utilizada uma coluna de fase reversa do tipo octilsilano (Shimadzu; 5 µm x 2,0 mm diâmetro interno x 150 mm), fase móvel constituída de acetonitrila e ácido fosfórico 0,01% (p/v) na proporção de 28:72 (v/v). Foi utilizado cromatógrafo Shimadzu com bomba quaternária LC20A, injetor manual Rheodyne modelo 7725, detector de arranjo de diodos SPD-AVvp ultravioleta-visível. A aquisição e a análise dos dados foram realizadas através do aplicativo CLASS-VP versão 3.0.1.

Os parâmetros cromatográficos encontram-se no Quadro 1.3. A identificação foi feita através da comparação do tempo de retenção entre amostra e SQR.

Quadro 1.3 Parâmetros cromatográficos utilizados na identificação do bromidrato de darifenacina comprimido.

Parâmetro	Valor
Fluxo	1 mL/min
Comprimento de onda	205 nm
Volume de injeção	20 µL
Temperatura	25°C ± 2°C

1.6.2 Resultados e discussão

Os cromatogramas resultantes das análises constam na Figura 1.6. O método por CLAE possibilitou a identificação do fármaco em estudo na forma farmacêutica empregada já que o tempo de retenção entre SQR e amostra foi o mesmo (8,50 minutos aproximadamente). A CLAE pode ser utilizada para análise qualitativa, possibilitando a identificação de fármacos por comparação dos tempos de retenção entre substância química de referência e amostra.

A discussão detalhada do desenvolvimento e validação do método de CLAE encontra-se no capítulo 2.

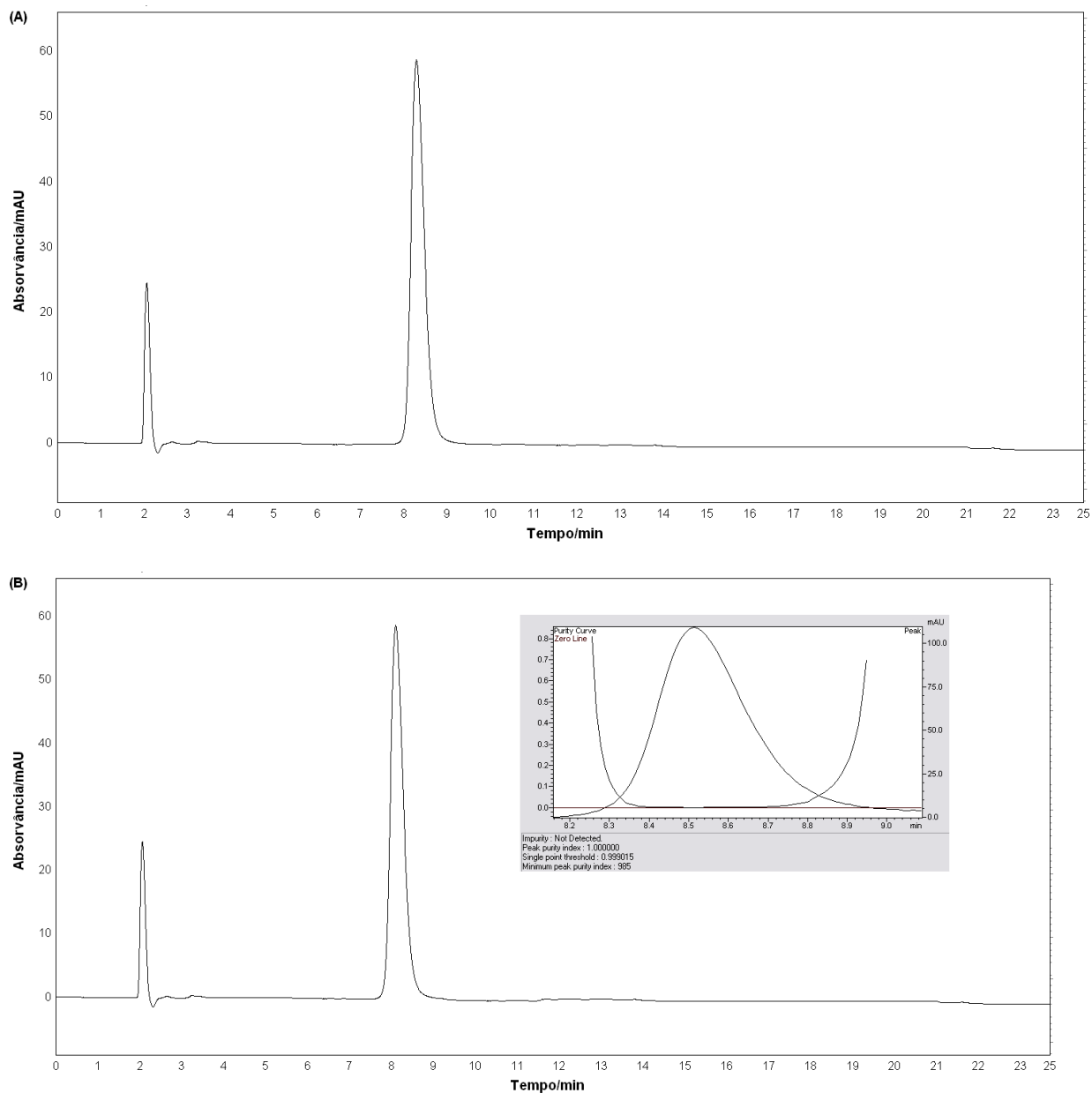


Figura 1.6. Cromatograma obtido na análise da SQR (A) e comprimidos de bromidrato de darifenacina (B).

1.7 Referências

BALA, I.; BHARDWAJ, V.; HARIHARAN, S.; RAVI KUMAR, M.N.V. Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.40, p. 206–210, 2006.

BRUCE, P. Y. *Organic chemistry*. Upper Saddle River: Pearson Prentice Hall, 2003.

CHEN, X.-Q; VENKATESH, S. Miniature Device for Aqueous and Non-aqueous Solubility Measurements During Drug Discovery. *Pharmaceutical Research*, v. 21, 2004 , p.1758-1761.

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

HENCHOZ, Y.; GUILLARME, D.; MARTEL, S.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J.-L.; CARRUPT, P.-A. Fast log P determination by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled with UV and mass spectrometry detections. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, v.394, p.1919–1930, 2009.

HUNTER, C. A.; SANDER, J. K. M. The Nature of π - π Interactions. *Journal American. Chemistry. Society*, v. 112, p.5525-5534, 1990.

MOORE, J.W.; STANITSKI, C.L.; WOOD, J.L; KOTZ, J.C. *The chemical world: concepts and application*. Saunders: New York, 1999. 906 p.

NAKANISHI, K.; SOLOMON, P.H. *Infrared absorption spectroscopy*. San Francisco: Holden-Day, 1977. 287p.

PAN., L.; QUYNH, H.; TSUTSUI, K.; TAKAHASHI, L. Comparison of Chromatographic and Spectroscopic Methods Used to Rank Compounds for Aqueous Solubility. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 90, p.521-529, 2001

SHRINER, R. L.; HERMANN, C. K. F.; MORRILL, T. C.; CURTIN, D.; FUSON, R. *The Systematic Identification of Organic Compounds*. New York : John Wiley, 1998. 656 p.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. Rio de Janeiro: LTC, 2000. 460 p.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. *Princípios de Análise Instrumental*. Porto Alegre: Bookman, 2006. 1055 p.

VOLLHARDT, K. P.C.; SCHORE, N.E. *Organic Chemistry: Structure and Function*. New York: W. H. Freeman, 2002. 1254 p.

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

2.1 Introdução

Os trabalhos até o presente momento envolvendo o bromidrato de darifenacina abordaram a extração e separação dos enantiômeros *R* e *S* por CLAE quiral, além de estudos visando à aplicação farmacocinética em que se utilizou detecção por espectrometria de massas acoplada ao sistema cromatográfico (KAYE *et al*, 1996; VERM e GOODY, 1999; RADHAKRISHNANAND *et al*, 2008).

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

Publicação 1: *Chemometric evaluation of darifenacin hydrobromide using a stability-indicating reversed-phase LC method.* Aceito no periódico Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies.

Chemometric evaluation of darifenacin hydrobromide using a stability-indicating reversed-phase LC method

MENEHINI, L.Z.* , JUNQUEIRA, C.* , ANDRADE, A.S.** , SALAZAR, F.R.* , CODEVILLA, C.F.* , FRÖEHLICH, P. E.* , BERGOLD, A.M.*

*Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS. Av. Ipiranga, 2752, CEP 906610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

**Laboratório de Pesticidas e Resíduos Veterinários-Ministério da Agricultura do Brasil Corresponding author. Tel: 55 51 33085451.

E-mail address: ana.bergold@ufrgs.br (Ana Maria Bergold).

Abstract

A set of chemometric tools including in silico simulation and design of experiments (DOE) was used to develop and validate an RP-LC/UV method for darifenacin hydrobromide. Retention factor (k') from darifenacin and resolution (R) between darifenacin and degradation product were assessed by an exploratory study using organic modifier type, organic modifier content, mobile phase pH, flow rate and column oven temperature as factors in a full factorial 2^5 design. The significant factors (organic modifier content, mobile phase pH and column oven temperature) were selected and applied in a central composite design (CCD) with axial points positioned in $\alpha=1.681$. The optimum condition was obtained with *Derringer's desirability*. The validation was performed with a C_8 (150mm x 4.6mm, 5 μ m) column, wavelength 205nm, 1.1mL.min⁻¹ flow rate, mobile phase with acetonitrile (MeCN) and orthophosphoric acid (OPA) 0.01% (v/v) pH 3.0 in a ratio 28:72 and column maintained at room temperature (25 \pm 1°C). Forced decomposition was performed in agreement with the guidelines and collected data were confirmed with LC-MS/MS. The obtained k' and R were 3.22 and 2.62, respectively. Additionally a Plackett-Burman design was done to study robustness, and the results agreed with the guideline requirements for a stability-indicating method.

1. Introduction

Development and optimization may be excessively time-consuming in analytical separations, when the technique uses a broad range of factors for this purpose, and more than one response must be optimized concurrently ^[1]. Reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) is a traditional technique for pharmaceutical dosage. It utilizes many experimental conditions (concentration of organic modifier, pH, flow rate, and others) associated with more than one response (retention time, capacity factor, resolution, among others). Since a one-factor-at-a-time optimization could be a complicated process, a chemometric approach involving optimization and validation steps is recommended for a quick, economic, precise and accurate LC method ^[2-4].

This paper aimed at developing and validating a simple stability-indicating LC/UV method, employing the design of experiments (DOE) methodology to determine darifenacin hydrobromide (2,3-dihydrobenzofuran-5-yl)ethyl)-3-pyrrolidinyl)-2,2-diphenylacetamide hydrobromide) in an extended-release tablet formulation with 15 mg of the drug. Darifenacin hydrobromide (DF) (Figure 1) is an anticholinergic drug used in patients with an overactive bladder who do not achieve symptom relief and quality of life improvement with conservative management ^[5]. In the literature, LC/APCI-MS/MS was used for the determination of DF enantiomers in human plasma ^[6]. In addition, other chiral chromatography methods have been used for the determination of DF in bulk drug and extended release tablets ^[7, 8]. However, they employed techniques that require a special column and complex mobile phase unusual in routine analysis. Furthermore, no degradation products resulting from forced-degradation in the validation study have been reported.

DOE provides a variety of designs and chemometric tools for the LC application. In the development stage, two-level factorial design is useful for screening, but it does not provide a detailed model of the system investigated ^[1, 9-11].

The central composite design (CCD) is often used to find the optimum condition and to provide a mathematical model to predict how one or more responses relate to the values of various factors ^[9, 12-13]. When the situation involves simultaneous consideration of multiple

responses, a multi-criteria decision making (MCDM) chemometric tool is necessary. There are many deals for MCDM, including the desirability functions (*Derringer's desirability*). After an appropriate building response surface model for each response, this technique converts the latter into an individual *desirability function (di)* to achieve a global optimization ^[13-15]. Once the method has been developed it must be validated. In official compendia it is encouraged that some requirements, like robustness, be performed with DOE. Many types of factorial designs using small variations in the method parameters can be performed to observe method reliability in routine analysis ^[16, 17, 18].

In the present work, initial chromatographic conditions in the RP-LC were investigated by *in silico* simulation. An exploratory two-level factorial design was used to assess some factors that could affect the DF retention factor and the resolution. Next, a CCD design was applied for a response surface methodology (RSM) study. *Derringer's desirability* has been used to define the global optimum conditions in RSM models and to predict the best chromatographic system. In addition, a *Plackett-Burman* (PB) design was performed to test robustness in the validation stage.

2 Experimental

2.1. Materials and reagents

Darifenacin hydrobromide (99.70%) was purchased from Waterstone Technology (USA). Methanol, acetonitrile and tetrahydrofuran LC grade are from J.T Baker (USA). Orthophosphoric acid, formic acid and acetic acid were obtained from Merck (Germany). The 0.45- μm nylon filters were purchased from Millipore (USA). Analysis was performed on a Shimadzu chromatographic system with LC20A binary pump, SPD-AVvp UV/VIS photodiode array detector, SIL 20-AC autosampler and CTO20A oven. Alternatively, for the robustness study, a Shimadzu system with LC20A quaternary pump, SPD-AV UV/VIS photodiode array

detector and Rheodyne 7725i manual injector was used. Samples from forced degradation study were analyzed by LC Agilent 1100 series (quaternary pump) coupled MS/MS API 5000 (LINAC) in electrospray positive mode. The chromatographic separations were achieved with Shimadzu C₈ column (150mm × 4.6mm, 5μm) for the experimental designs and validation; Merck C₈ (250mm×4.6mm × 5μm), Merck C₈ (125mm × 4.6mm × 5μm) columns in the robustness study; Macherey-Nagel C₁₈ (150mm × 4.6mm × 5μm), Macherey-Nagel C₁₈ (250mm×4.6mm × 5μm) and Merck C₈ (250mm × 4.6mm × 5μm) columns for the *in silico* simulations.

2.2 Softwares

Osiris® 4.2.0.0 version (DATALYS Inc., France) was used for the *in silico* chromatographic simulations. The experimental designs were analyzed by Design-Expert® 7.0.0 version (Stat-Ease Inc., USA) and the other statistical tests (linearity, ANOVA) by STATISTICA® 5.0 version (Stat-Soft Inc., USA).

2.3 Chemometric Methods

Initial chromatographic conditions were assessed by simulation using Osiris®. This software provides many interfaces (*tabs*) and it was necessary to perform some runs under specific conditions (*inputs*) to obtain predictions (*outputs*) from modifications in the chromatographic parameters. The mobile phase (MP) - pH *tab* was used with different stationary phases (RP-C₁₈, RP-C₈); eluent composition (acetonitrile-water, methanol-water) and pH range (2.5-3.5) were the *inputs* and the DF retention time was the *output*. After this trial, two chromatographic systems were performed with samples from the stress testing. In order to improve the chromatographic parameters retention factor (*k'*) and resolution (*R*), an exploratory 2⁵ general factorial design (Table1) was applied. In factorial design 2^{*k*}, *k* is the number of factors and 2 is the number of levels for each factor. It was therefore possible to

select significant factors and to apply a rotatable CCD design with eight factorial points, six axial points (positioned in $\alpha=1.681$) and six central points. Once the design has been performed, the first step in RSM is to find a suitable approximation for the true functional relationship between response and the set of independent variables ^[9]. For an experimental design with three factors, a low-order polynomial model is usually employed:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 \quad (1.0)$$

In this first order response surface model, y represents the estimated response (e.g., resolution); b_0, b_1, b_2, b_m is a set of unknown parameters where b_0 is the average experimental response, b_1 to b_3 are the estimated effects (main effects) on the factors (x_1, x_2, x_3) and b_{12} to b_{23} are estimated effects with interaction. After model assessment a higher order (quadratic or cubic) polynomial model and/or mathematical transformation in the response is sometimes necessary ^[19].

2.4 Stress studies

Forced decomposition was performed in agreement with the guidelines and specific literature ^[16, 20] in methanolic solutions containing drug substance or drug product. Intentional degradation was carried out by exposing 5mL of reference/test stock solution to 5mL of hydrochloric acid or sodium hydroxide at different concentrations. This procedure was repeated using additional 50°C heat in a water bath. The solutions were transferred to a 10mL volumetric flask, allowed to attain room temperature and then neutralized with acid or base (when necessary). Oxidative degradation was performed by mixing equal volumes of standard stock solution with 13% hydrogen peroxide solution in a 10mL volumetric flask. The samples were allowed to reach ambient temperature and diluted with methanol. The solutions were kept in a dry oven at 50°C and 80°C for different lengths of time to perform a thermal stress study. Photolytic studies were carried out with a 2mL sample in a quartz container and exposed to light (UV 352nm) in a photostability chamber (controlled temperature). Blank solutions were prepared by the aforementioned procedure, wherein

instead stock solutions methanol was used. The analytical data of the method were collected by PDA detector for the peak purity evaluation. When secondary peak was detected an ESI LC/MS/MS analysis was performed for confirmation.

2.5 Validation

Validation was performed according to the International Conference on Harmonization (ICH) guidelines and United States Pharmacopeia (USP 31).

2.5.1 System suitability and solution stability

The stability of DF in solution was assessed at room temperature, under ultrasound effects and refrigeration condition at different periods. Prior to beginning the method validation stage the accuracy and precision of LC data collected were checked. For this, ten injections were performed and the chromatographic parameters were evaluated by RSD.

2.5.2 Linearity and range

Solutions of DF were prepared at seven concentrations (0.005, 0.010, 0.015, 0.020, 0.025, 0.030, 0.035mg.mL⁻¹) spanning the range of 25–175% of the target DF assay concentration (0.020mg.mL⁻¹) for the linearity experiments. Ordinary least-squares method was applied to calibration curve construction $y = ax \pm b$, where y is the response (peak area), x is the concentration, and a and b are the slope and intercept, respectively. The model was evaluated by determination coefficient regression significance, lack-of-fit and residual analysis.

2.5.3 Precision

Fifty tablets were weighed and finely powdered. A portion of powder was accurately weighed, placed for 15 minutes in an ultrasound bath and diluted to $0.020\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in mobile phase. Then, the sample solutions were filtered through $0.45\mu\text{m}$ membrane and transferred to vials for LC quantification. Nine experiments were carried out in triplicate on three different days with different analysts and instruments. The RSD was assessed for repeatability and intermediate precision.

2.5.4 Accuracy

Method accuracy was calculated as a percentage of recovery by assaying the known added amount of analyte in the samples. The concentrations were 75%, 100% and 125% from nominal concentration. The recoveries RSD were evaluated.

2.5.5 Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ)

LOQ was determined by two approaches: based on signal-to-noise ratio ($R_{S/N}$), with 10:1 ratio and based on standard deviation of response and slope (SD_{LOQ}). This limit was subsequently validated by the assay of a set of samples. Likewise, LOD was assessed on $R_{S/N}$ (generally 3:1) and SD_{LOD} ; additionally the LOD was justified with an experimental test. The equations for LOQ and LOD involving standard deviation of the slope and intercept have been estimated by the following equations:

$$SD_{LOQ}=10.0 \times s/S \qquad SD_{LOD}=3.3 \times s/S \qquad (2.0)$$

where s is the standard deviation of the response (blank) and S is the slope of calibration curve.

2.5.6 Robustness

Eleven factors were selected to construct the centered Plackett-Burman design (Table 2), but three factors, named dummy factors represent unreal physical changes in the chromatographic system. Nominal levels are the conditions used for method validation. *Pareto* chart (with *t* statistics) and *half-normal probability* plot were used to indicate relevant effects.

3 Results and discussion

3.1 Forced decomposition Study

The results are shown in Table 3. A stress condition with hydrogen peroxide 13% for 72h resulted in significant degradation of DF drug substance and drug product. The data were collected from a PDA detector and confirmed with LC-MS/MS, (Figure 2). Mass balance between non-degraded DF solution and degraded samples agreed (information not shown).

3.2 DOE

In silico chromatographic simulation demonstrated that C₈ (250mm x 4.6mm x 5μm, Merck) was the best choice for the column. An isocratic elution employing a mixture of acetonitrile (MeCN), methanol (MeOH) and orthophosphoric acid (OPA) (pH 2.5, 0.01%v/v) at a ratio 20:40:40 resulted in adequate parameters for the drug product assay. This HPLC system was performed with samples from stress studies. Peak impurity was detected in the 13% hydrogen peroxide solution of the samples. New MeCN: OPA 0.01% ratios were attempted but not enough peak purity was achieved. As selectivity is a function of type and concentration of organic modifier^[11,22], the full-factorial 2⁵ was used to assess the differences between MeCN and tetrahydrofuran (THF) and other conditions. Significant effects with the *k'*

response were found for all factors analyzed (Figure 3, a). Flow rate did not present a significant mean effect or interaction effect for R (Figure 3, b). No significant R difference was found between THF and MeCN; than the last one was chosen to be investigated in the CCD (less expensive and damaging for the apparatus). The results of CCD performed in twenty runs are shown in Table 4.

Statistical analysis demonstrated that a second order polynomial was most appropriate for the relationship between factors and responses, as the response surface graphs show in the Figures 4 and 5. Based on the k' results (Figure 4) it can be seen that the k' value increases in the region with lower pH, higher MeCN content and higher column oven temperature. For R (Figure 5), the lowest values of pH, MeCN content and column oven temperature results in the highest resolution value. The polynomials were obtained after “backward elimination” of the non significant coefficients.

Derringer's desirability was used to optimize the k' and R. The first step in this procedure was to convert each response into an individual desirability function (di) which varies over the range 0 ≤ di ≤ 1, where di = 1 is the best alternative and di = 0 when the response is outside the optimal region. Then the design variables are chosen to maximize global desirability (D),

$$D = (d_1 \times d_2 \times \dots \times d_m)^{1/m} \quad (3.0)$$

where there are m responses and d1, d2 ... dm are the individual desirabilities. If the objective or target T for the response y is a maximum value,

$$d = \begin{cases} 0, & y < L \\ \frac{y - L}{T - L}, & L \leq y \leq T \\ 1, & y > T \end{cases} \quad (3.1)$$

when weight r = 1, the desirability function is linear. Choosing r > 1 places more emphasis on being close to the target value, and choosing 0 < r < 1 makes this less important. If the target for the response is a minimum value,

$$d = \begin{cases} 1, & y < T \\ \frac{U - y}{U - T} & T \leq y \leq U \\ 0, & y > U \end{cases} \quad (3.2)$$

the two-sided desirability function (3.3) assumes that the target is located between the lower (L) and the upper (U) limits, and is defined as

$$d = \begin{cases} 0, & y < L \\ \frac{y - L}{T - L} & L \leq y \leq T \\ \frac{U - y}{U - T} & L \leq y \leq U \\ 0, & y > U \end{cases} \quad (3.3)$$

The results of Derringer's function are demonstrated in Figure 6. The conditions proposed for criteria selection have been established in the appropriate parameters for routine analysis (Table 5). Room temperature was chosen to be used for method simplification. Ten solutions have been obtained from the response surface producing a desirability value (D) of 0.726, where the MeCN content, mobile phase pH and column oven temperature considering the global optimum condition were 28%, 3.0 and 25.0°C, respectively; the predicted k' and R were 4.46 and 2.45, respectively.

The mobile phase pH and organic modifier content play an important role for elution and selectivity in RP/LC mechanisms and could have a dramatic effect on separation of the ionizable compounds [11, 22]. The 8.80 pKa and basic behavior in aqueous solution were predicted for DF by ALOGPS2.1® simulator and the molecule until 7.8 would be in the ionized form. The changes in flow rate did not demonstrate any effect on the resolution parameter, probably because the DF has a poor basic behavior, without a free primary amine which could interact with the free silanols in the stationary phase [11,23].

3.3 Method Validation

The samples showed stability in 45 days under refrigeration (methanolic solution) and 2 days at room temperature (mobile phase solution). The parameters utilized for the present

validation were 205nm (wavelength), 1.1mL.min⁻¹ flow rate, mobile phase with MeCN and OPA (pH 3.0, 0.01%v/v) in at a 28:72 ratio and column maintained at room temperature (25±1°C). The results are presented in Table 6, Table 7 and the chromatogram is shown in Figure 7. Resolution between peaks of darifenacin and degradation product was adequate, resulting in peak purity (UV/PDA) for the darifenacin peak. As seen in Table 6, LOQ and LOD results, using different approaches, are not similar. The greatest difference occurred between SD_{LOQ} and the experimental value, because the point in LOQ is not only the lowest quantification level but a compromise with the precision ^[18] and this was only possible with 400.00 ng.mL⁻¹ level (RSD<1.0%). For the precision study (Table 7), although were used variations involving analysts, days and instruments, the method showed adequate values for the RSD.

The results for the robustness study are presented in Figure 8. The method can be considered robust because the significant factors pointed-out in a half-normality curve (not shown) and *Pareto* chart (*F* factor for % assay and *A* factor for tail) have been statistical different from *nominal condition*, but they do not exceed the limits from the model requirements (2% RSD for the repeatability and 2.0 as the maximum value for tail). When one or more dummy factors are excluded from the model, this situation is maintained (not shown). Also, the other-chromatographic parameters (theoretical plates, retention factor and resolution) presented values within appropriate specifications.

4 Conclusions

The study successfully developed and validated a stability-indicating RP-LC/UV method. The chemometric methodologies employed were useful to improve information about the influence of the factors on responses *R* and *k'* without taking a lot of time and cost-consuming (no buffers, low organic modifier content). It was only possible to optimize the chromatographic method using Derringer's desirability, because resolution and retention factor presented distinct behaviors when the factors were changed. A robustness study

provided more complete evaluation about deliberate variations in the method. Finally, it can be said that the method developed is fully applicable to the routine assay of the drug product.

Acknowledgements

The authors thank CAPES and CNPq of Brazil, LANAGRO (Brazil) and Labex Inc. (USA).

References

1. Harvey, D. *Modern Analytical Chemistry*; McGraw-Hill: New York, NY, 2000.
2. Jancic-Stojanovic, I. J., Malenovic, A., Markovic, S., Ivanovic, D., Medenica, M. Optimization and Validation of an RP-HPLC Method for Analysis of Hydrocortisone Acetate and Lidocaine in Suppositorie. *J. AOAC Int.* **2010**, 93 (1), 102-107.
3. 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. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2009**, 49, 1192-1202.
4. Vignaduzzo, S. E.; Castellano, P. M.; Kaufman, T. S. Experimentally Designed, Validated HPLC Simultaneous Determination of Pridinol and Diclofenac in their Combined Pharmaceutical Formulations, which allows Limiting Diclofenac Related Compound A. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2010**, 33 (19), 1720-1732.
5. Novara, G., Galfano A., Secco, S., D'Elia, C., Cavalleri, S., Ficarra, V., Artibani, W. A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials with Antimuscarinic Drugs for Overactive Bladder. *Eur. Urol.*, **2008**, 54, 740–764.
6. Kaye, B., Herron, W. J., Macrae, P. V., Robinson, S., Stopher, D. A., Venn, R. F., Wild, W. Rapid, Solid Phase Extraction Technique for the High-Throughput Assay of Darifenacin in Human Plasma. *Anal. Chem.*, **1996**, 68, 1658-1660.
7. Venn, R. F., Goody, R.J. Synthesis and Properties of Molecular Imprints of Darifenacin: The Potential of Molecular Imprinting for Bioanalysis. *Chromatographia*, **1999**, 50, 407-414.
8. Radhakrishnanand, P., Rao, D. V. S., Himabindu, V. H. A Validated LC Method for Determination of the Enantiomeric Purity of Darifenacin in Bulk Drug and Extended Release Tablets. *Chromatographia*, **2008**, 68, 1059-1062.
9. Montgomery, D. C. *Design and Analysis of Experiments*; Wiley: New York, NY, 2001.
10. Brereton, R. G. *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*, Wiley, New York, NY, 2003.
11. Kazakevich, Y., Lobrutto, R. *LC for Pharmaceutical Scientists*, Wiley, New Jersey, NJ, 2007.
12. Myers, R. H. *Response Surface Methodology: process and product optimization using designed experiments*, Wiley, New Jersey, NJ, 2009.

-
13. Jancic-Stojanovica, B., Malenovica, A., Ivanovica, D., Rakica, T., Medenica, M. Chemometrical evaluation of ropinirole and its impurity's chromatographic behavior. *J. Chromatogr. A*, **2009**, 1216, 1263-1269.
 14. Lewis, G. A., Roger, D. M., Phan, T. L. *Pharmaceutical Experimental Design*; Marcel Dekker, New York, NY, 1999.
 15. 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. *J. Pharm. Biomed.*, **2007**, 43, 1842–1848.
 16. ICH. International Conference on Harmonisation-Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: text and methodology, Q2(R1), 2005.
 17. Dejaegher, B., Heyden, Y. V. Ruggedness and robustness testing. *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1158, 138-157.
 18. 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. *J. Chromatogr. A*, **2003**, 987, 57-66.
 19. Mason, R. L., Gunst, R. F., Hess, J. L. *Statistical Design and Analysis of Experiments*; Wiley, New Jersey, NJ, 2003.
 20. Bakshi, M., Singh, S. Development of validated stability-indicating assay methods—critical review. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2002**, 28, 1011-1040.
 21. USP. 31th edition. The United States Pharmacopeia, Rockville, United States, 2008.
 22. Glajch, J.L., Kirkland, J.J., Squire, K. M. Optimization of solvent strength and selectivity for reversed-phase liquid chromatography using an interactive mixture-design statistical technique. *J. Chromatogr.* **1980**, 199, 57-59.
 23. McCalley, D. V. Effect of temperature and flow-rate on analysis of basic compounds in high-performance liquid chromatography using a reversed-phase column. *J. Chromatogr. A*, **2000**, 902, 311-321.

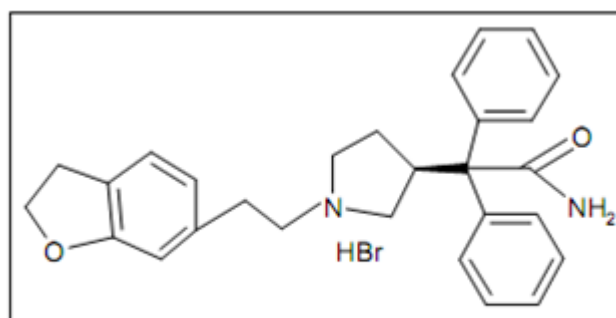


Figure 1. Darifenacin hydrobromide (molecular weight 507.5)

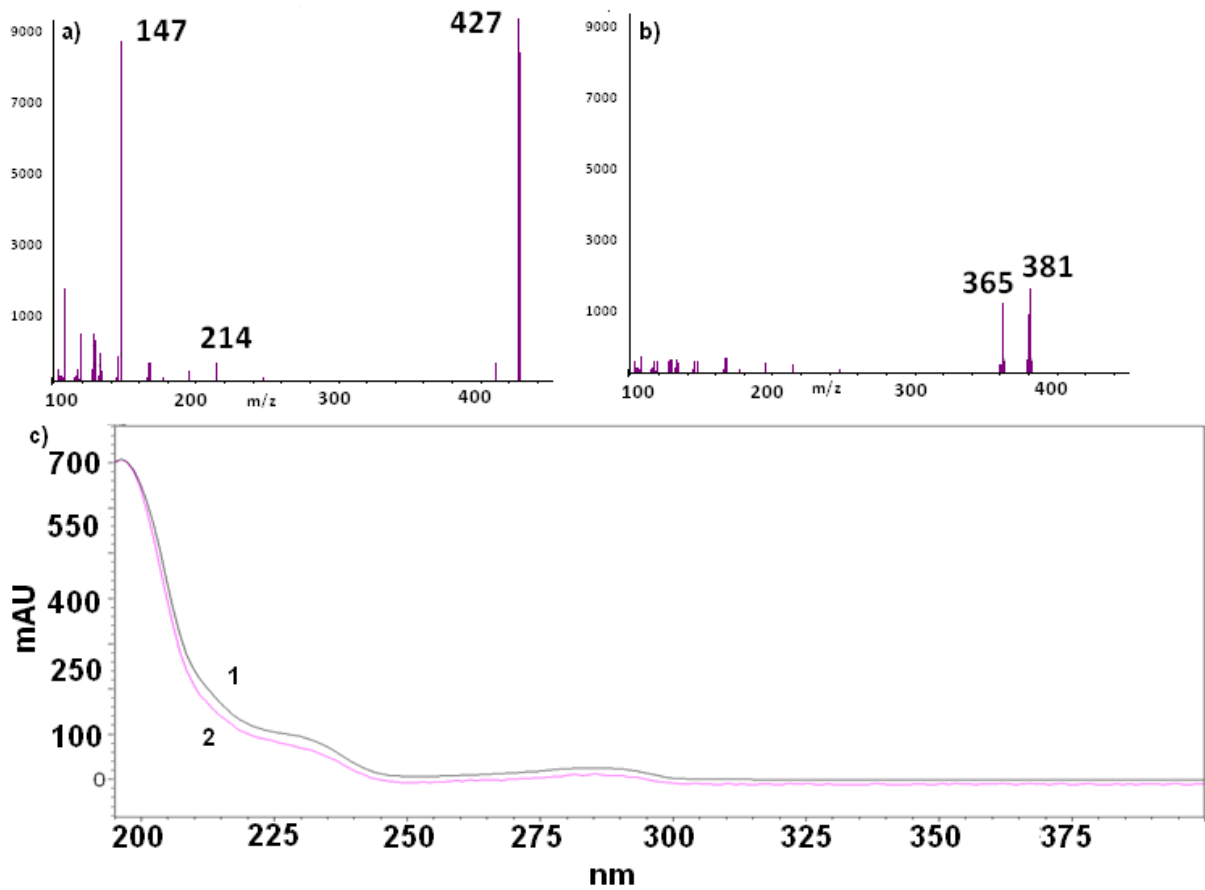


Figure 2. Mass spectrum comparison between DF (a) and peak from stress degradation (b); PDA scanning from DF peak(1) and product from stress degradation (2).

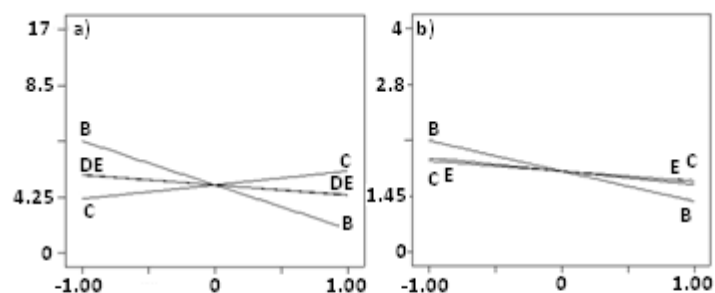


Figure 3. Perturbation plots from full-factorial 2^5 showing the significant effect of the examined factors on the responses (a) Retention factor, (b) Resolution. Where the organic modifier type is (-1) for the MeCN and (+1) for the THF, *B* is an organic modifier content, *C* is mobile phase pH, *D* is a flow rate and *E* is a column oven temperature.

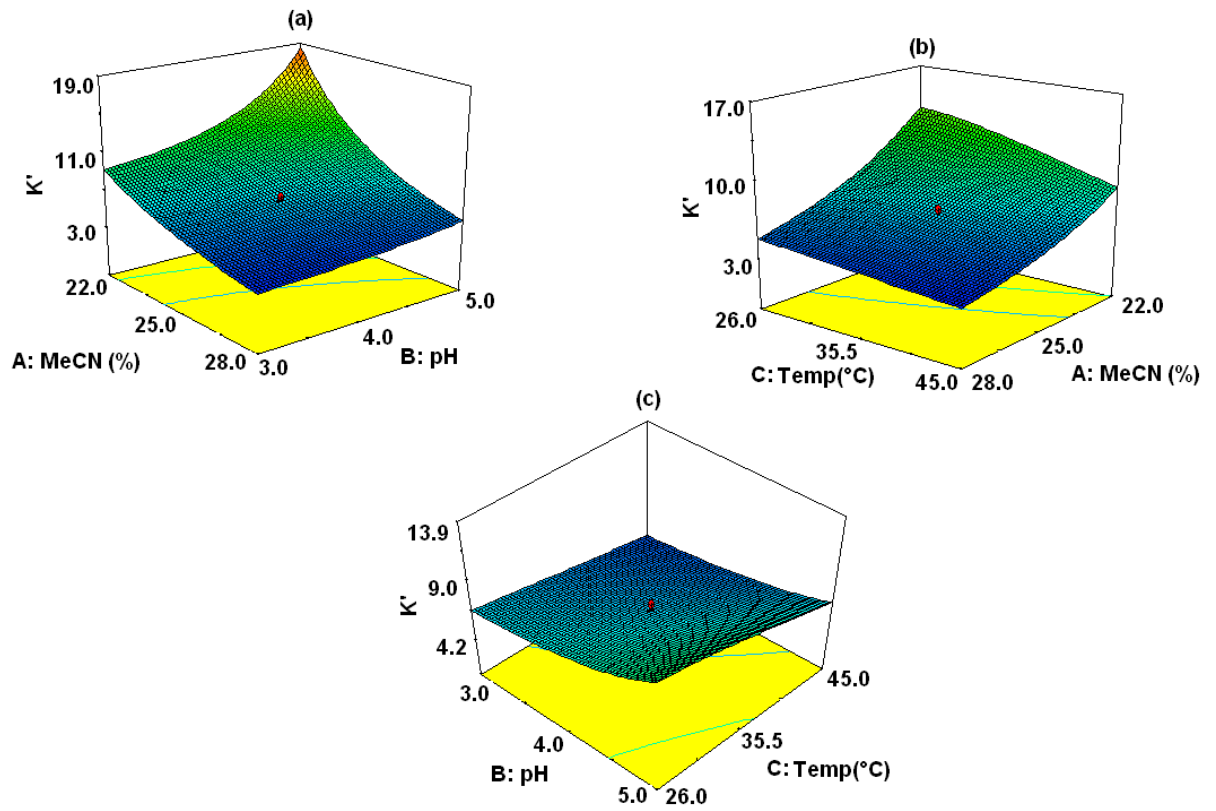


Figure 4. RSM graphs showing the effect of factors on retention factor (k'): (a) MeCN content (A) and pH (B) in mobile phase; (b) MeCN content (A) and column oven temperature (C), (c) mobile phase pH (B) and column oven temperature (C).

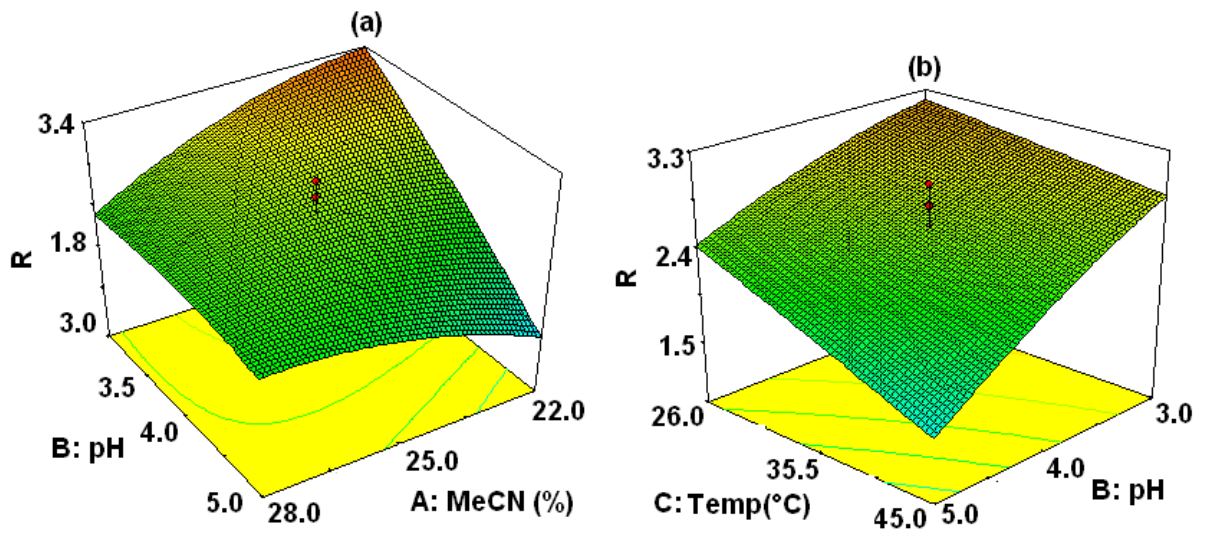


Figure 5. RSM graphs showing the factor effects on resolution (R): (a) MeCN content (A) and mobile phase pH (B); (b) mobile phase pH (B) and column oven temperature (C).

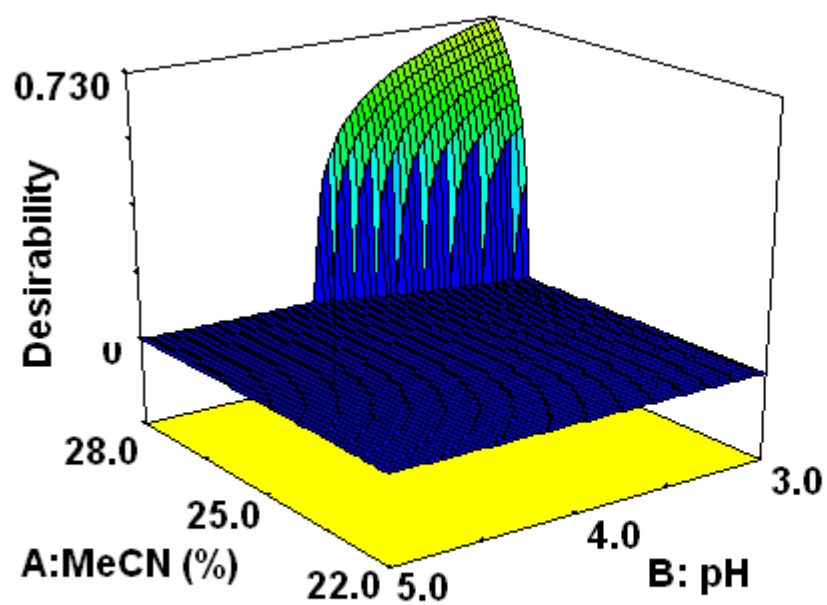


Figure 6. Desirability's Derringer RSM graph showing optimum operability region of the chromatographic method where (A) is MeCN content and (B) is pH in mobile phase.

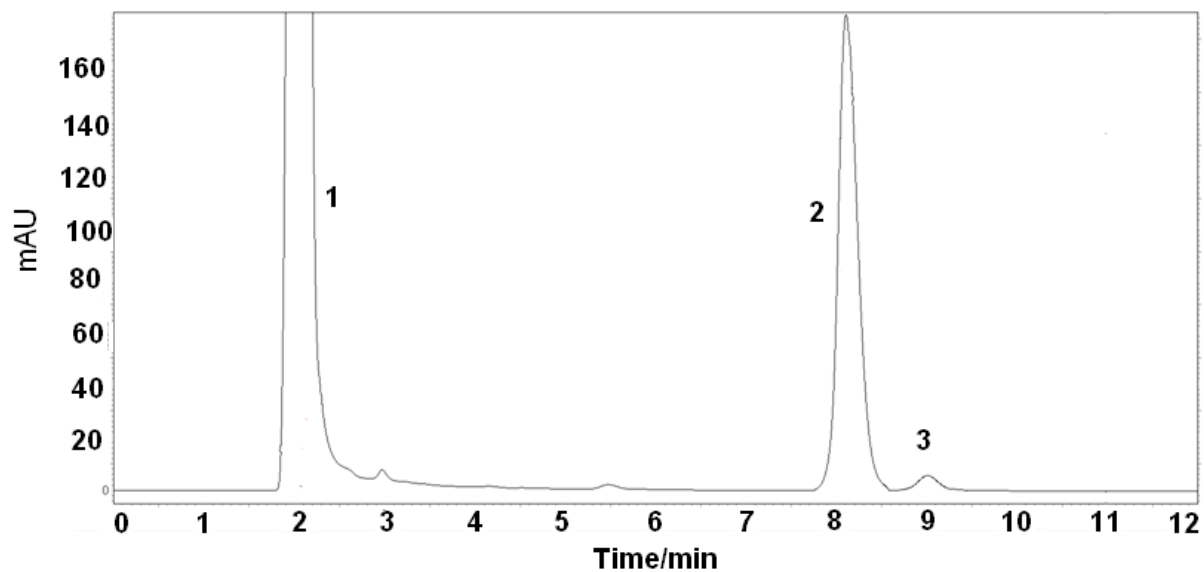


Figure 7. Chromatogram showing hydrogen peroxide (1), DF (2) and secondary peak from oxidation stress (3) performed on validation chromatographic parameters.

Table 1. General full-factorial design

Factors	Units	Levels*	
		(-1)	(+1)
A: organic modifier type	Category	acetonitrile	tetrahydrofuran
B: organic modifier content	% (v/v)	20	40
C: mobile phase pH	-	2.5	5.0
D: flow rate	mL.min ⁻¹	0.90	1.20
E: column oven temperature	°C	25.0	50.0

*(-1) and (+1) are "low" and "high" levels.

Table 2. Factors and levels investigated in the Plackett-Burman design

Factors	Units	Levels*		
		(-1)	(+1)	(0)
A: MeCN content (%) in MP	% (v/v)	27	29	28
B: pH aqueous component in MP	-	2.90	3.10	3.00
C: Flow rate	mL/min	1.0	1.2	1.1
D: Wavelength	nm	206	210	208
E: Autosampler injection volume	µL	10	30	20
F: Column oven temperature	°C	23	27	25
G: Acid type	Categoric	acetic	formic	OPA
H: Column type	Categoric	Merck, 120mm	Merck, 250mm	Shimadzu, 150mm
I-L: Dummies 1, 2, 3	-	-	-	-

*(-1), (+1), (0) are "low", "high" and nominal levels, respectively.

Table 3. Conditions applied to the forced degradation study.

Stress Agent	Time (hours)	Assay	
		Drug substance	Drug Product
HCl 0.1M	24	99.98	99.64
HCl 1M	72	99.75	99.11
NaOH 0.1M	24	99.34	99.13
NaOH 1M	72	100.26	99.34
Heat 50°C	24	99.70	99.10
Heat 80°C	72	100.24	99.32
Heat 50°C+ HCl 0.1M	14	99.57	99.83
Heat 50°C+ NaOH 0.1M	14	100.12	98.83
H ₂ O ₂ 1.3%	72	99.62	99.39
H ₂ O ₂ 13%	72	92.54	94.23
UV 352nm	24	100.38	99.32
UV 352nm	72	100.24	100.22

Table 4. Experimental design for DCC

Runs	Factors and levels ¹			Responses	
	MeCN ²	pH ³	Oven temperature ⁴	<i>k'</i>	<i>R</i>
1	22.0 (-1)	3.0(-1)	26.0(-1)	11.40	3.68
2	28.0(+1)	3.0(-1)	26.0(-1)	4.41	2.51
3	22.0(-1)	5.0(+1)	26.0(-1)	19.73	1.90
4	28.0(+1)	5.0(+1)	26.0(-1)	6.01	2.53
5	22.0(-1)	3.0(-1)	45.0(+1)	7.34	3.25
6	28.0(+1)	3.0(-1)	45.0(+1)	3.12	2.15
7	22.0(-1)	5.0(+1)	45.0(+1)	13.93	0.73
8	28.0(+1)	5.0(+1)	45.0(+1)	4.32	1.68
9	20.0(-1.681)	4.0(0)	35.5(0)	16.83	2.08
10	30.0(+1.681)	4.0(0)	35.5(0)	3.23	1.88
11	25.0 (0)	2.3(-1.681)	35.5(0)	5.30	3.07
12	25.0(0)	5.7(+1.681)	35.5(0)	13.70	1.57
13	25.0(0)	4.0(0)	19.5(-1.681)	8.39	3.03
14	25.0(0)	4.0(0)	51.5(+1.681)	4.31	2.17
15	25.0(0)	4.0(0)	35.5(0)	6.45	2.60
16	25.0(0)	4.0(0)	35.5(0)	6.08	2.37
17	25.0(0)	4.0(0)	35.5(0)	6.46	2.42
18	25.0(0)	4.0(0)	35.5(0)	6.92	2.62
19	25.0(0)	4.0(0)	35.5(0)	7.21	2.60
20	25.0(0)	4.0(0)	35.5(0)	6.87	2.55

¹(-1), (+1), (0) are "low", "high" and nominal levels, respectively; ²acetonitrile content (%) in mobile phase; ³pH of the mobile phase; ⁴column oven temperature in degree Celsius.

Table 5. Parameters used in Derringer's desirability.

Response/Parameter	Lower limit	Upper limit	Criteria	
			Goal	Importance
K'	2	5	Target = 3.5	2
R	2	4	Range	2
Column oven temperature	23	28	Target = 25°C	1

Table 6. Requirements assessed for the RP-HPLC/UV method validation

System suitability test ($n=10$)						
	Area	Rt^2	k'	T^3	N^4	R^5
RSD ¹	1397478	8.45	3.22	1.25	4712	2.62
	0.03	0.47	0.12	0.35	0.22	0.46
Linearity			LQ analysis ⁶			
Parameter	CL^7	Se^8	p -value	$R_{S/N}$	SD_{LOD}	Experimental
R^2	-	12877	-	79.69	11.78	400.00
$b = 743$	± 13152	6283	0.91	LD analysis ⁶		
$a = 70109$	± 588	281	<0.01	$R_{S/N}$	SD_{LOD}	Experimental
				29.30	3.89	20.00
Model assessment						
Parameter	Statistical test		Critical value	Calculated value		
Regression	ANOVA; F -value		3.87	62240.80		
Lack-of-fit	ANOVA; p -value		0.05	0.99		
Autocorrelation in residuals	Durbin-Watson; D -value		$d_L = 1.22$; $d_U = 1.42$	2.72		
Homoscedasticity	Levene; p -value		0.05	0.72		
	Bartlett; p -value		0.05	0.15		
	Ryan-Joiner; p -value		0.05	0.12		
Normality test	Kolmogorov-Smirnoff; p -value		0.05	0.15		
	Anderson-Darling; p -value		0.05	0.30		
	Dixon; τ -value		0.976	0.680		

¹Relative standard deviation; ²retention time; ³tail; ⁴theoretical plates; ⁵resolution; ⁶concentration in ng.mL⁻¹; ⁷confidence Limit; ⁸standard error.

Table 7. Analysis for accuracy and precision for the method validation

Accuracy		
Range (%)	Mean (%)	RSD ¹ (%)
97.45-99.18	98.33	0.88
Precision		
Repeatability		
<i>Condition</i> ²	Mean assay (%)	RSD (%)
<i>N</i> ^o 1	99.43	0.52
<i>N</i> ^o 2	101.12	0.78
<i>N</i> ^o 3	98.33	0.60
Intermediary		
	99.63	1.32

¹Standard error; ²*N*^o1: Day 1, Analyst 1, Instrument 1; *N*^o2: Day 2, Analyst 2, Instrument 2; *N*^o3: Day 3, Analyst 1, Instrument 2.

3.1 INTRODUÇÃO

A espectrofotometria no ultravioleta-visível ainda permanece como uma técnica instrumental necessária de ser desenvolvida para utilização em análises de rotina dada a sua simplicidade em termos de tempo de análise e facilidade operacional.

Diante da interferência de outro analito, no caso de matrizes contendo múltiplos fármacos, ou devido à interferência espectral dos excipientes da matriz do fármaco, a utilização da transformação de sinal torna-se uma ferramenta necessária. Nesse sentido a espectrofotometria de ultravioleta derivada (UVD) com o método do *zero crossing* é um artifício bastante adequado e necessário para implementação de método de quantificação frente à interferência no espectro do fármaco de interesse (WATSON, 2000; ROJAS e OJEDA, 2009; DONATO, 2010).

Pela ausência de método espectrofotométrico para quantificação do bromidrato de darifenacina em comprimido, justifica-se o desenvolvimento e validação de um método proposto para este fim. Desenhos experimentais foram escolhidos por fornecer um maior número de informações sobre as variações nos fatores do método, tornando mais concisa a decisão sobre os melhores parâmetros a serem utilizados.

Publicação 2: *Development and validation of a derivative ultraviolet spectrophotometric method for darifenacin tablet using experimental designs and comparison study with chromatographic method.* Submetido no periódico *Journal of Analytical Chemistry*.

Development and validation of a derivative ultraviolet spectrophotometric method for darifenacin tablet using experimental designs and comparison study with chromatographic method

Meneghini, L.Z.; Junqueira, C.A.; Salazar, F.R.; Brandalise, M.; Fröhlich, P. E; Bergold, A.M.

Abstract: A set of experimental designs was applied to develop and validate a spectrophotometric method using derivative transformation coupled with *zero-crossing* methodology for quantification of the darifenacin hydrobromide extended-release tablet form. In the presence of the matricial interference a central composite (face-centered) design was necessary to reach the best condition without interference in the quantification. The optimal system was confirmed using the function named *Derringer's desirability* to assess high precision and low quantification limit. The best condition pointed was the first order to derivative transformation, $\Delta\lambda$ 4, scale factor 150, scanning speed 280nm/s and *anulation point* in 239.4nm as wavelength. From these parameters it was possible to perform the method validation resulting in $r^2=0.999$, concentration ranging from 0.10-2.50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, recovery 98.65% and mean precision 97.67% (RSD 1.36%). Additionally, robustness was assessed by a *Plackett-Burman* design and no significant variability was obtained. So the spectrophotometric method was compared with high-performance liquid chromatography method, resulting in no significant difference between the methods.

Key-words: drug-analysis, darifenacin, derivative transformation, central composite design, *Plackett-Burman*.

INTRODUCTION

Darifenacin (DF) is an antimuscarinic drug, chemically (S)-2-{1-[2-(2,3-dihydrobenzofuran-5-yl)ethyl]-3-pyrrolidinyl}-2,2-diphenylacetamide, used for the overactive bladder, available as its hydrobromide salt (Figure 1) in extended-release tablet with 7.5 mg or 15 mg of the drug [1]. There are literature reports using high-performance liquid chromatography for the determination of darifenacin in plasma and its enantiomeric purity [2, 3, 4] but assay by spectrophotometric methods have

not been showed. Ultraviolet/visible (UV/vis) absorption spectrophotometry is a standard method for drug release measure used for the in vitro study where faster (large number of samples) and sensible method (low levels of concentration) is necessary. The development and validation of an alternative method for the HPLC method is important in quality control [5]. For DF, zero order spectrum demonstrated two wavelengths maximum (205 and 284nm), but the presence of many excipients with interference in all the extension of the spectrum makes quantification impossible (Figure 2), so derivative spectrophotometry was used. Zero-crossing measurement technique is usually employed in the pharmaceutical analysis [6,7], but, the optimization of the others factors involved in the method (derivative order, $\Delta\lambda$, so on) its necessary to obtain a specific and sensitive method [8,9]. When there are many factors wich can influence in the response, the use of the design of experiments (DOE) is the better choice to find the optimum system [10, 11]. In the literature there are many approaches with DOEs, manly using response surface methodology [12, 13, 14]. In the present work the aim was the development and validation of UVD method using central composite design (CCD) face-centered to obtain lower quantification limit without matrice interference. Additionally, a *Plackett-Burman* (PB) design was used for robustness study. The UVD method was validated and compared with stability-indicating HPLC/UV method validated previously [15].

MATERIAL AND METHODS

Instrumentation and softwares

The UVD method was developed and validated with a Shimadzu UV/vis double beam spectrophotometer model UV-1601 using a UVPC 3.91 software version for data collection. Shimadzu chromatographic system with LC20A binary pump, SPD-AVvp UV/VIS photodiode array detector, SIL 20-AC autosampler and CTO20A oven and a LC Agilent 1100 series (quaternary pump) coupled MS/MS API 5000 (LINAC) with electrospray ionization were used for chromatographic analysis. To perform the chromatographic runs a Shimadzu C₈ column (150mm × 4.6mm, 5 μ m) was used.

The experimental designs were analyzed by Design-Expert[®] 7.0.0 version (Stat-Ease Inc., USA) and the other statistical tests by Minitab[®] 15.0 version (Stat-Soft Inc., USA).

Chemical

Darifenacin hydrobromide (99.70%) was donated by Labex Inc. (USA). Methanol and acetonitrile HPLC grade are J.T Baker (USA); methanol spectroscopic grade are from Merck (Germany) and Vetec; orthophosphoric acid was obtained from Merck (Germany) The cellulose filters were purchased from Millipore (USA).

Samples

The identity of the darifenacin hydrobromide was confirmed by mass spectrometry, infrared spectrometry and polarimetry. The stability of the samples (reference substance and tablet) in methanolic solution under refrigeration condition (5°C, thirty days) and room temperature (two days) were assessed by mass spectrometry.

Central Composite Design

Initially a full factorial design was applied to determine which factors were significant for the quantification limit. In a full factorial 2^k , k is a number of factors (categorical or numerical type) and 2 is the respective number of *levels* for each *factor*. It was employed a 2^4 design with *scanning speed*, *derivative order*, *scale factor* and $\Delta\lambda$ as factors, like showed in Table 1, was employed. From three calibration curves (six concentrations, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), minimum squared ordinary was applied and sixteen curves were obtained. From curves, the limit of quantification (LQ) was calculated by the following equation:

$$SD_{LQ} = 10.0 \times s/S \quad (1.0)$$

where SD_{LQ} is the calculated LQ , s is the standard deviation of the response (blank) and S is the slope of calibration curve. After the selection of the significant factors, a CCD with four factorial points, four axial points (positioned in $\alpha = 1.000$), and five central points in an overall of the thirteen runs was carried out. CCD is a kind of design where the best response can be obtained by a polynomial function (linear, quadratic and sometimes cubic order) and a response surface is built from the best polynomial function adjusted. So the polynomial model obtained from CCD explains the influence of the factors on responses and this relationship can be accessed graphically by a surface response. The International Conference on Harmonization

(ICH) defines the LQ as the lowest amount that can be used with adequate precision [16]. For this purpose, two responses were analyzed: LQ and relative standard deviation (RSD) calculated from an assay with tablets powder. Then, considering two responses, the function named *Derringer desirability*, D , is applicable to find the optimum condition. The *Derringer's desirability* function is defined as the geometric mean, weighted, or otherwise, of the individual desirability functions [17]. The expression for this function is:

$$D = \left[d_1^{p_1} \times d_2^{p_2} \times d_3^{p_3} \times \dots \times d_n^{p_n} \right]^{1/n} \quad (2.0)$$

where p_n ($p_1, p_2, p_3 \dots$) is the weight of the response, n the number of responses and d_n is the individual desirability function of each response obtained from the transformation of the individual response of each experiment. The scale of the individual desirability function ranges between $d_n = 0$, for a completely undesired response, to $d_n = 1$, for a fully desired response. The D value is related to the combination of the different criteria (d_n); D value close to zero implies that all responses are in an undesirable region simultaneously; a value of D close to 1 implies in an optimum region. Additionally, the factors and responses can be normalized by *weight* and *importance* and the function possess a *goal* that can be adjusted to *minimize, maximize or to target* the factors and responses.

Validation

The validation was carried out in accordance with the International Conference on Harmonization (ICH) guidelines and United States Pharmacopeia (USP 31).

Linearity and range

For the linearity experiments, solutions of DF were prepared at seven concentrations (0.10, 0.50, 0.90, 1.30, 1.70, 2.10, 2.50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) spanning a range of 25–175% of the target DF assay concentration (1.30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Ordinary least-squares method was applied to calibration curve construction $y = ax \pm b$. The model was evaluated by determination coefficient regression significance, lack-of-fit, and residual analysis.

Precision

Fifty tablets were weighed and finely powdered. A portion of the powder was accurately weighed, placed for 15 minutes in ultrasound bath and diluted to

1.30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in methanol. Then the samples were filtered in cellulose membrane before quantification. Nine experiments were carried out in triplicate in three different days and different analysts. The RSD was assessed for the repeatability and intermediate precision.

Accuracy

Accuracy of the method was calculated as a percentage of recovery by the assay of the known added amount of analyte in the samples. The concentrations were 75%, 100% and 125% from nominal concentration. The recoveries were evaluated by RSD.

Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ)

LOQ was determined by equation (1.0) previously mentioned. This limit was subsequently validated by the assay of a set of samples. In the same way, LOD have been estimated by the following equation:

$$SD_{\text{LOD}}=3.3 \times s/S \quad (3.0)$$

where s is the standard deviation of the response (blank) and S is the slope of calibration curve.

Robustness

The centered Plackett-Burman design was constructed with 11 factors performed in sixteen runs (Table 2), but seven factors, named *dummy factors* represent unreal physical change. Nominal levels are the conditions used for the method validation. *Pareto* chart (with t statistics) and *half-normal probability* plot were used to indicate relevant effects.

Comparison of methods

The present UVD method was compared with stability-indicating HPLC/UV method previously validated [15]. The parameters used for the HPLC/UV method were C_8 column (150mm \times 4.6mm, 5 μm), 205nm (wavelength), 1.1mL $\cdot\text{min}^{-1}$ flow rate, mobile phase with acetonitrile and orthophosphoric acid (pH 3.0, 0.01%v/v) in a ratio 28:72 and column maintained in room temperature (25 \pm 1 $^\circ\text{C}$). The USP considers necessary to compare two methods to determine if their average results or

their variability differ by an amount that is deemed important. One way of two methods comparison is the precision evaluation. An alternative method can be considered to have “comparable” precision with a current method if its precision differs from the one of the current method only by acceptable difference. An increase in variability can lead to an increase in the number of results expected to fail required specifications. For this, statistical inference must be done with adequate *confidence level* (1- α) and *power level* (1- β) to obtain a parameter of the largest acceptable difference (δ) between current method and alternative method (in this case, HPLC/UV and UVD, respectively).

So an initial study, using twenty samples was used to predict adequate power level. Later, using a larger number of samples (N), the differences between the methods was assessed by *t-test* (4.0), *F-test* (5.0), *confidence interval limit for the ratio of variance* (5.1) and δ (6.0-6.2) like following equations:

$$t_{cal} = \frac{x - \mu}{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n1} (X_i - \bar{X})^2 + \sum_{j=1}^{n2} (X_j - \bar{X})^2}{n1 + n2}}} \quad (4.0)$$

where t_{cal} is the calculated value to the *t-Student* test, x is the current method mean, μ is the alternative method mean and denominator is the *combined standard deviation* two methods,

$$F_{cal} = S_1^2 / S_2^2 \quad (5.0)$$

$$UL = F_{cal} / F_{0.95} \quad (5.1)$$

where F_{cal} is the calculated value for the *F-test*, S_1^2 , S_2^2 are the variance between alternative and current method, respectively. UL is the calculated upper limit, F_{cal} as described previously and $F_{0.95}$ is the value from *F* distribution. Moreover, for the δ calculation,

$$\delta_A = 110 - x + K \times s \quad (6.0)$$

$$\delta_B = (x - K \times s) - 90 \quad (6.1)$$

$$\delta_{cal} = x \pm \delta_{A, B} \quad (6.2)$$

where δ_A , δ_B are the acceptable differences considering the lower and the higher specification limit for the assay, respectively; x , s are the current method mean and

the standard deviation, respectively; K is tabulated value based on the K distribution under a specific level of confidence, $\delta_{A,B}$ is the lower difference obtained from δ_A or δ_B and δ_{cal} is the interval for the largest acceptable difference between the methods.

RESULTS AND DISCUSSION

The variation results from in UVD method development are showed in Figure 3. The wavelengths where the annulation point was found for quantification were 239.4, 232.0 and 296.4nm for the first, second and third order, respectively. With the results from exploratory study 2^4 (Table 1) and it is possible to notice that the lower LQ is present in runs with first order. Scan velocity no presented significant changes in LQ. The lowest order value and the highest values of scale factor and $\Delta\lambda$ reduced the LQ.

In the next stage, the *CCD* was performed with two factors (order and *scale factor*). This way, a new set of curves were carried out and additionally thirteen *runs* were obtained (Table 3). Also, for more complete assessment, an assay ($N=9$) was carried out for the RSD evaluation. The response surfaces from *CCD* are showed in Figures 4 and 5. The model from LQ response was adjusted to a linear function and RSD to a quadratic function. The lowest LQ was obtained using transformation with first order and 150 as scale factor; the highest with third order and 50 as scale factor. The response surface in the (Figure 4) demonstrated that the order caused a curvature reducing the LQ in bigger proportion than second order did. This is probably because the annulation point in third order is located in spectral region where the signal is low. However, when the RSD are compared (Figure 5), the worst result is demonstrated when the transformation use the second order. This fact can be caused by low reproducibility of the signal form produced after the transformation.

The best condition was confirmed only using a *Derringer function* (Figure 6) with the parameters demonstrated in Table 4. This condition was established with four *solutions*, being three for the first order (D about 0.9) and one for the third order (D about 0.5). The highest D (0.990) was found using first order and scale factor of 150.

The validation was carried out using first order, $\Delta\lambda=4$, scale factor of the 150, 280nm/s as scanning speed and $\lambda=239.4$. The results are show in Table 5. Overall

the results are in accordance with the official guide and compendia [17,18]. The difference between approaches for the quantification limit was minimal, and the adequate precision was only possible with concentration of the $1.0\mu\text{g.mL}^{-1}$. No significant difference exists when changes in method are applied to assay, like is demonstrated in the results from Plackett-Burman design (Figure 7). When the dummy factors are catch off from statistical analysis the real factors remain no significant on assay content (information no showed).

A correct assessment for the comparison between methods is critical and there are multiple approaches, including general approach in analytical chemistry and specific requirements in the pharmaceutical applications [19]. Classical statistical tests like F and t tests are generally employed, where the *pointed* analysis (comparison between absolute means or variances) is considered [19, 20]. However, in the pharmaceutical analysis, specifically USP approach, the comparison between alternative and current method can be done using *intervals*. The present results (Table 6) showed no significative difference by the t test and F -test (considering p -value). However the F -test considering the UL parameter (USP approach) showed a larger tolerance interval for variance, but transforming this parameter to RSD, UVD not exceed the 2.00% value, which is the accepted value in this analytical field. The determination of δ showed to be very important because the interval used in the assay for the current method (HPLC/UV, 90.0-110.0%) for mean and precision were adjusted by it (UVD, 93.4-100.3%). Finally, as is emphasized by USP, choose of sample size (N) is essential to obtain an adequate power (β), because an inadequate use of this parameter ($\beta-1 < 0.80$) can compromise the statistical inference.

CONCLUSION

Using some types of experimental designs was possible to develop and to perform the validation for UVD method in presence of the strong matrice interference, without the use of derivative agents. Second and third order increased the spectral resolution but the variability in results increased too. The first order was the best choice for sensibility and precision, confirmed by *Derringer's function*; the factor *order* demonstrated to be the most significant factor. The comparison with HPLC/UV method demonstrated that is possible uses both methods for assay or low concentrations for the *in vitro* studies application.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil) for the financial support and Labex Inc. (USA) for the kind donation of darifenacin hydrobromide.

REFERENCES

- [1] Novara, G.; Galfano, A.; Secco, S.; D'Elia, C.; Cavalleri, S.; Ficarra, V.; Artibani, W. 2008. A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials with Antimuscarinic Drugs for Overactive Bladder. *Eur. Urol.* 54: 740–764.
- [2] Kaye, B.; Herron, W. J.; Macrae, P. V.; Robinson, S.; Stopher, D. A.; Venn, R. F.; Wild, W. 1996. Rapid Solid Phase Extraction Technique for the High-Throughput Assay of Darifenacin in Human Plasma. *Anal. Chem.* 68: 1658-1660.
- [3] Venn, R. E; Goody, R. J. 1999. Synthesis and Properties of Molecular Imprints of Darifenacin: The Potential of Molecular Imprinting for Bioanalysis. *Chromatographia.* 50: 407-414.
- [4] Radhakrishnanand, P.; Subba Rao, D. V.; Himabindu, V. 2008. A Validated LC Method for Determination of the Enantiomeric Purity of Darifenacin in Bulk Drug and Extended Release Tablets. *Chromatographia.* 68: 1059-1062.
- [5] Watson, D. G. 2005. *Pharmaceutical Analysis*. Edinburgh, UK: Elsevier Churchill Livingstone.
- [6] DONMEZ, O. A.; BOZDOGAN, A.; KUNT, G.; DIV, A. Y. *Spectrophotometric Multicomponent Analysis of a Mixture of Chlorhexidine Hydrochloride and Lidocaine Hydrochloride in Pharmaceutical Formulation Using Derivative Spectrophotometry and Partial Least Squares Multivariate Calibration. Journal of Analytical Chemistry*, v. 65, p. 30–35, 2010.
- [7] MILLERSHIP, J. S., CHIN, J. Determination of Simvastatin in Tablet Formulations by Derivative UV Spectrophotometry. *Journal of Analytical Chemistry*, v. 65, p. 164–168, 2010.
- [8] Rojas, F. S.; Ojeda, C. B. 2009. Recent development in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry: 2004–2008. A review. *Anal. Chim. Acta.* 635: 22–44.
- [9] Krzek, J.; Woltyńska, H.; Hubicka, U. 2009. Determination of Gentamicin Sulphate in Injection Solutions by Derivative Spectrophotometry. *Anal Lett.* 42: 473–482.
- [10] Montgomery, D. C. 2001. *Design and Analysis of Experiments*. New York, USA: John Wiley & Sons.

- [11] Harvey, D. 2000. Modern analytical chemistry. Boston, USA: Mcgraw-Hill.
- [12] LEARDI, R. Experimental design in chemistry: A tutorial. *Analytica Chimica Acta*, v. 652, p.161–172, 2009.
- [13] IDRIS, A.M. Factorial Design and Response Surface Optimization of Spectrophotometric Sequential Injection Analysis of Olanzapine Formulations. *Journal of Analytical Chemistry*, .v. 65, p. 36–42, 2010.
- [14] Souza, J. M. O.; Tarley, C. R. T. 2008. Preconcentration and Speciation of Sb(III) and Sb(V) in Water Samples and Blood Serum after Cloud Point Extraction Using Chemometric Tools for Optimization. *Anal Lett.* 41: 2465–2486.
- [15] Meneghini, L.Z., Junqueira, C., Andrade, A.S., Salazar, F.R., Codevilla, C.F., Fröhlich, P. E., Bergold, A.M. Chemometric evaluation of darifenacin hydrobromide using a stability-indicating reversed-phase LC method. Submitted to *Journal of AOAC International*.
- [16] International Conference on Harmonisation (ICH). 2005. Harmonised Tripartite Guideline- Validation of Analytical Procedures: text and methodology, Q2(R1).
- [17] Myers, R. H. 2009. Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments. Hoboken, USA: John Wiley.
- [18] The United States Pharmacopeia (USP31). 2008. Rockville, USA: United States Pharmacopeial Convention.
- [19] Holler, F. J.; D., Skoog; Crouch, S. R. 2004. Fundamentals of Analytical Chemistry. Florence, USA: Cengage Learning.
- [20] Roussas, G. G. 1997. A Course in Mathematical Statistics. San Diego, USA: Academic Press.

Figures

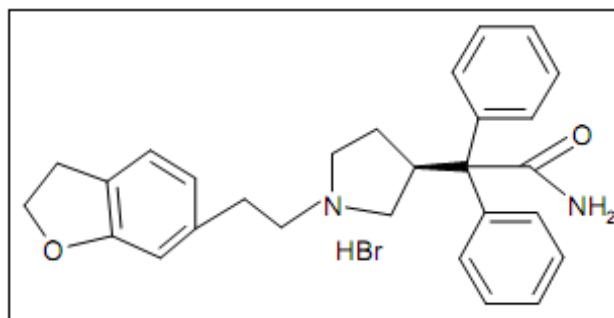


Figure 1. Darifenacin hydrobromide (molecular weight 507.5).

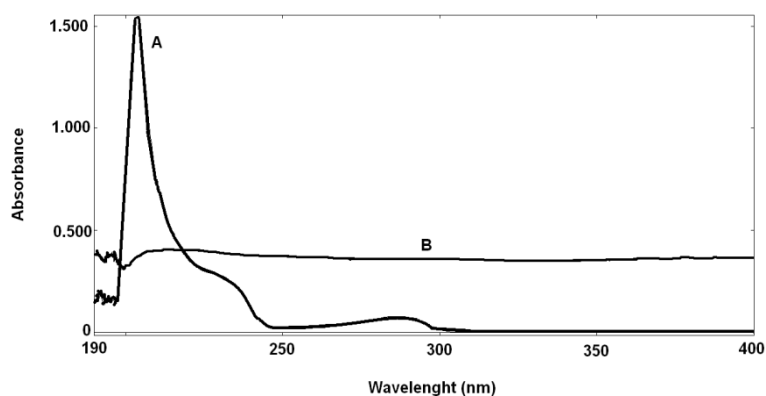


Figure 2. Profiles of the darifenacin hydrobromide (A) and matrix (B) in methanolic solutions.

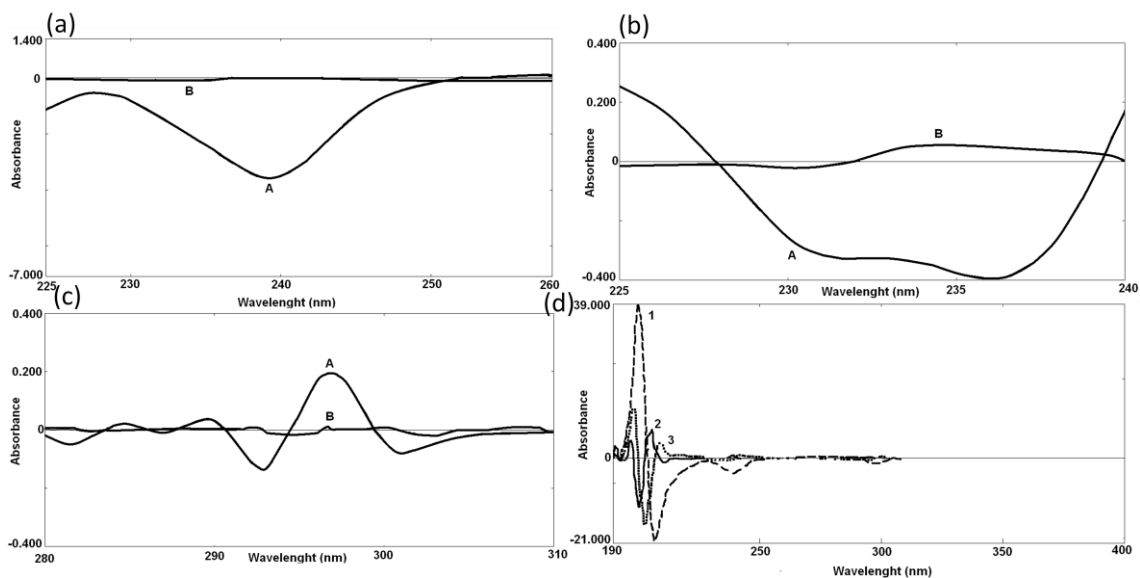


Figure 3. Amplified zoom showing reference substance (A) and matrix (B) both in methanolic solution in first-order derivative (a), second-order derivative (b) and third-order derivative (c); reference substance in methanolic solution for the different derivative orders (d), where 1, 2, 3 for the 1st, 2nd and 3rd derivative order, respectively.

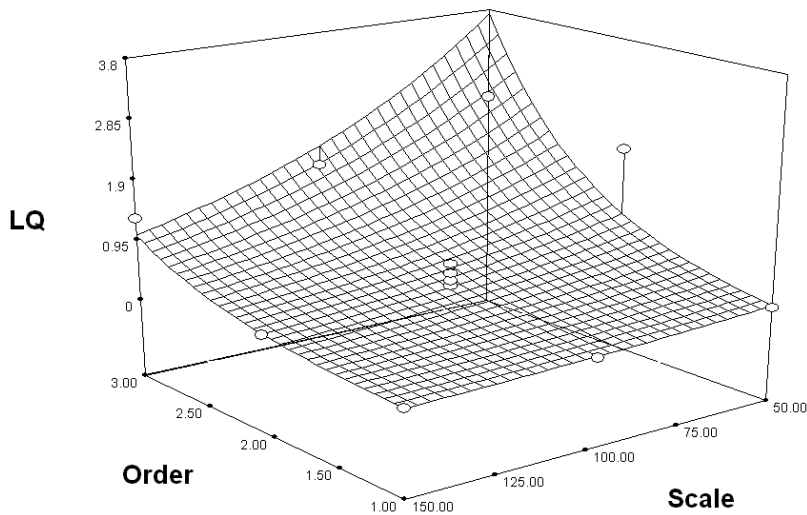


Figure 4. Response surface to quantification limit (*LQ*), derivative order (*order*) and scale factor (*scale*).

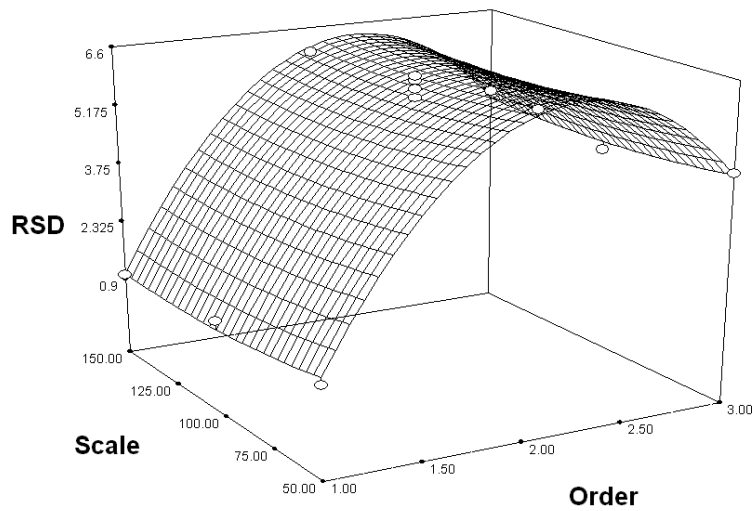


Figure 5. Response surface to relative standard deviation (*RSD*), derivative order (*order*) and scale factor (*scale*).

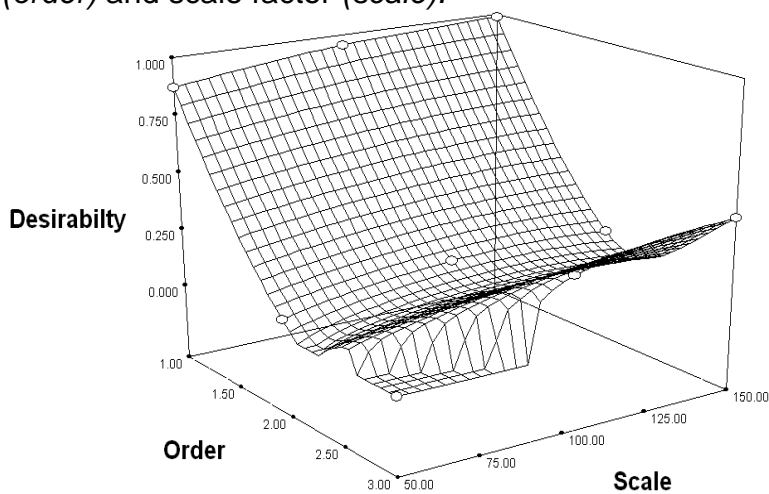


Figure 6. Response surface to Derringer's desirability.

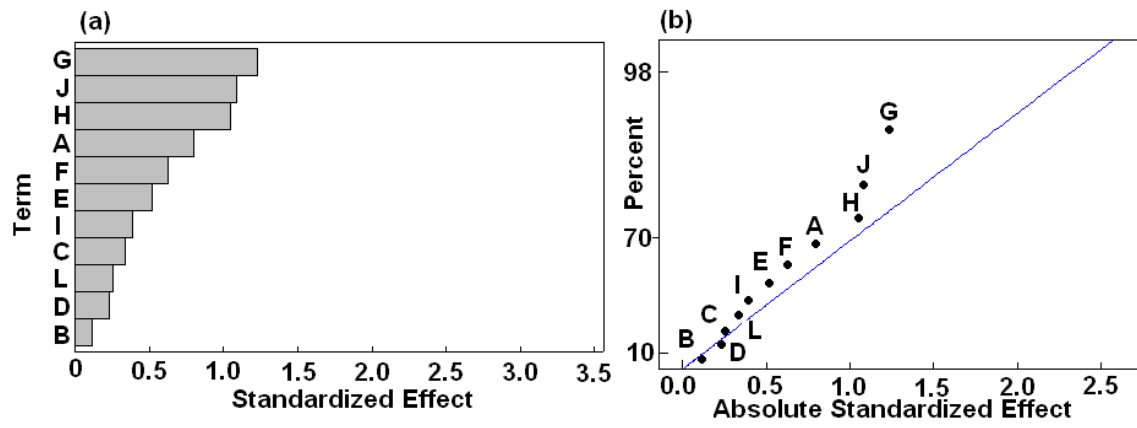


Figure 7. (a) Pareto chart of the standardized effects and half normal plot of the standardized effects (b).

Tables

Table 1. Full factorial design 2^4 domain.

Runs	Factors and levels ¹			Response ³	
	Order ²	$\Delta\lambda$ ²	Scale Factor ²	Scanning speed ²	LQ
1	1.00 (-)	2.00(-)	50.00(-)	40.00(-)	0.08
2	3.00 (+)	2.00(-)	50.00(-)	40.00(-)	1.33
3	1.00(-)	4.00(+)	50.00(-)	40.00(-)	0.08
4	3.00(+)	4.00(+)	50.00(-)	40.00(-)	2.01
5	1.00(-)	2.00(-)	100.00(+)	40.00(-)	0.09
6	3.00(+)	2.00(-)	100.00(+)	40.00(-)	2.05
7	1.00(-)	4.00(+)	100.00(+)	40.00(-)	0.08
8	3.00(+)	4.00(+)	100.00(+)	40.00(-)	1.16
9	1.00(-)	2.00(-)	50.00(-)	280.00(+)	0.18
10	3.00(+)	2.00(-)	50.00(-)	280.00(+)	1.52
11	1.00(-)	4.00(+)	50.00(-)	280.00(+)	0.08
12	3.00(+)	4.00(+)	50.00(-)	280.00(+)	1.98
13	1.00(-)	2.00(-)	100.00(+)	280.00(+)	0.06
14	3.00(+)	2.00(-)	100.00(+)	280.00(+)	2.34
15	1.00(-)	4.00(-)	100.00(+)	280.00(+)	0.07
16	3.00(+)	4.00(-)	100.00(+)	280.00(+)	0.83

¹(-), (+), (0) are “low” and “high” levels, respectively; ²undimensional units; ³In $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

Table 2. Factors and levels investigated in the *Plackett-Burman* design.

Factors	Units	Levels ^a		
		(-1)	(+1)	(0)
A: Wavelength	nm	239.2	239.6	239.4
B: Scanning speed	nm/min	260	300	280
C: Cuvett type ^b	Categoric	Type I	Type II	Quartz
D: Solvent ^c	Categoric	Supplier I	Supplier III	Supplier II
E-L: Dummies 1-7	-	-	-	-

^a(-1), (+1), (0) are “low”, “high” and nominal levels, respectively; ^bType I: plastic, 1.5mL capacity, for wavelength range 200-400nm; type II: plastic, 0.75 mL capacity, for wavelength range 205-800nm; ^csupplier I: Merck, spectroscopic grade; supplier II: Vettec, spectroscopic grade; supplier III: J.T. Backer, HPLC grade.

Table 3. Central composite design domain.

Runs	Factors and levels		Responses	
	Order	Scale Factor	LQ	RSD
1	1.00(-)	50.00(-)	0.24	1.25
2	3.00(+)	50.00(-)	2.34	4.51
3	1.00(-)	150.00(+)	0.08	1.05
4	3.00(+)	150.00(+)	1.31	4.59
5	1.00(-)	100.00(0)	0.12	1.28
6	3.00(+)	100.00(0)	1.67	4.05
7	2.00(0)	50.00(-)	2.07	6.52
8	2.00(0)	150.00(+)	0.27	6.47
9	2.00(0)	100.00(0)	0.41	6.00
10	2.00(0)	100.00(0)	0.49	6.25
11	2.00(0)	100.00(0)	0.61	5.89
12	2.00(0)	100.00(0)	0.76	6.33
13	2.00(0)	100.00(0)	0.61	6.09

Table 4. Parameters used to built the Derringer’s desirability.

Response/Parameter	Lower limit	Upper limit	Criteria		
			Goal	Importance	Weighths
LQ	0.07	2.35	Minimize	4	default
RSD	1.00	6.50	minimize	4	default
Order	1.00	3.00	<i>in range</i>	default	default
Scale factor	50	150	<i>in range</i>	default	default

Table 5. Validation for the UVD method.

Model assessment			Linearity (N=21)		
Parameter	Statistical test ¹	Calculated value	Parameter	CL ⁵	p-value ¹
Regression	ANOVA; p-value	<0.001	$r^2 = 0.999$ $a = 0.00009^5$ $b = 0.24$	- ± 0.0008 ± 0.0005	- 0.81 <0.001
Lack-of-fit	ANOVA; p-value	0.807	<u>LQ analysis⁶</u>		<u>LD analysis⁶</u>
			SD _{LoQ} 0.089	Experimental 0.10	SD _{LoD} 0.027
Autocorrelation ²	D.W, D-value	2.287	<u>Accuracy</u>		
			Range ⁷	Mean ⁷	RSD
	Levene; p-value	0.906	98.1-100.3	98.65	1.15
Homoscedasticity ³			<u>Precision⁸</u>		
	Bartlett; p-value	0.801	<u>Repeatability</u>	Mean ⁷	RSD
			Day 1	97.81	0.83
			Day 2	96.19	0.74
	R.-J.;	0.151	Day 3	98.87	0.68
	p-value		<u>Intermediary</u>	97.62	1.36
Normality test ⁴	K.-S.;				
	p-value	0.150			
	A.-D.;	0.259			
	p-value				

¹With $\alpha=0.95$; ²Durbin-Watson test for residual autocorrelation with $d_L = 1.221$ and $d_U=1.421$;

³Levene-test and Bartlett test for homoscedasticity; Normality⁴ tests R.-J., A.-D., K.S. are Ryan-Joiner, Anderson-Darling and Kolmogorov-Smirnoff, respectively; value to the confidence limit; results in $\mu\text{g.mL}^{-1}$
^{1, 7}results in %; ⁸Days 1 and 2 performed with analyst 1, Day 3 with analyst 2; N=9 per Day

Table 6. Approaches used to assess the comparison between UVD and HPLC/UV method.

Precision (N=50)			F-test	
	HPLC	UVD	1- α^e	0.95
Mean ^a	96.88	97.26	Estimated 1- β^f	0.90
s ^{2b}	2.07	2.01	Obtained 1- β^g	0.89
s ^c	1.44	1.38	p-value	0.07
RSD ^d	1.48	1.42	Fcal	0.97
			UL	1.56
t-test			δ	
1- α^e		0.95	$\delta_A^{a,h}$	9.69
Estimated 1- β^f		0.90	$\delta_B^{a,h}$	3.45
Obtained 1- β^g		0.88	δ_{cal}^a	± 3.45
t-tabled		2.01	Assay interval ^{a,i}	93.43-100.33
t-calculated		1.80		
CI 95% ^h		96.86-97.67		
Pearson Correlation ^j				
p-value		<0.001		
r ²		97.99		

^aExpressed in %; ^bvariance; ^cstandard deviation; ^dc relative standard deviation; ^eConfidence level, ^fPower estimated from pilot study with N=20; ^g Power obtained, ^hConfidence calculated with 95% confidence level and 2.382 to the k value, ⁱInterval for the UVD mean, obtained from δ_{cal}^a , to consider no difference with HPLC mean; ^jCalculated between HPLC and UVD sets of values.

O desenvolvimento e validação de metodologias analíticas na área farmacêutica evoluiu nas últimas duas décadas acompanhando as mudanças econômicas e tecnológicas.

A primeira mudança se refletiu na necessidade de uniformização dos protocolos e legislações associadas ao controle de qualidade de medicamentos, além do que já existia nas farmacopéias, para assim estabelecer um padrão na área analítica de análise de produtos farmacêuticos. O marco que iniciou esta tendência foi a criação, no início da década de noventa, das normas Q2A e Q2B pela *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH), seguida pela publicação de normas por outros órgãos, como o FDA, por exemplo. 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.

Na cromatografia líquida de alta eficiência, os trabalhos clássicos como os de STEWART e PERRY (1968), SNYDER (1978), SNYDER e colaboradores (1979), GLAJCH e colaboradores (1980), CANTWELL (1985) e WEST (1987;1989) puderam ser aprofundados em trabalhos de modelagem envolvendo CLAE como os apresentados por THEVENON-EMERIC e colaboradores (1991), VALKO e SIEGEL (1993), VALKO e colaboradores (1993), HAMOIR e colaboradores (1994), CZAJKOWSKA e JARONIEC (1997), REUBSAET e VIESKAR (1999), KAZAKEVICH e colaboradores (2001), LOBRUTTO e colaboradores (2001), NIKITAS e PAPPA-LOUISI (2001), ROSES e BOSCH (2002), HEINISCH e ROCCA (2004).

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 2000 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.

Nesse sentido, no presente trabalho buscou-se utilizar técnicas quimiométricas para se explorar mais adequadamente os fatores pertinentes ao desenvolvimento e validação dos métodos quantitativos propostos (cromatografia líquida de alta eficiência e espectrofotometria no ultravioleta).

Não obstante, a avaliação das propriedades físico-químicas como solubilidade e espectrofotometria no ultravioleta, abordadas no Capítulo 1, foi essencial para o estabelecimento dos métodos analíticos de quantificação do bromidrato de darifenacina. 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 empírica desenvolvida via desenho de composto central (DCC) permitiu avaliar as melhores condições para um sistema cromatográfico capaz de quantificar e identificar o bromidrato de darifenacina 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 por 72 h. Testaram-se alguns sistemas utilizando-se coluna de fase reversa octadecilsilano e fases móveis com

alta concentração de solvente orgânico (50% em diante) sem se obterem resultados satisfatórios quanto ao parâmetro cromatográfico *resolução* (R).

Com a coluna de fase reversa octilsilano 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 exploratório 2^5 (Tabela II.I, Tabela II.II e Tabela II.III, anexo II) empregando-se diferentes fases móveis por meio de fatores como tipo de solvente orgânico (tetraidrofurano e acetonitrila), concentração do solvente orgânico, pH e fluxo da fase móvel, foi possível definir a região experimental para o estudo seguinte de otimização, o DCC.

Com as superfícies de resposta do DCC, para o fator de retenção (k) foi possível constatar que, apesar da simulação de pKa do fármaco (forma livre) indicar um valor de 8,80 (VCCLAB, 2007), o comportamento cromatográfico revelou outra possibilidade. Pelo postulado de equilíbrio secundário na CLAE, o pH influencia a retenção do analito somente quando varia na faixa de aproximadamente uma unidade (para mais ou para menos) de pH em relação ao valor do pKa. Isto ocorre pois o pH influencia diretamente na ionização, dissociação do analito (KAZAKEVICK e LOBRUTTO, 2007). Com isso, a variação no k , quando ocorre mudança de pH na faixa de aproximadamente 3 a 6, sugere que o pKa real do fármaco seja inferior ao valor obtido com a simulação. A hipótese da influência da mudança da força iônica pela alteração da concentração do ânion fosfato não pode ser apresentada como causa, já que, com o aumento da força iônica e o efeito caotrópico (íon fosfato) em uma magnitude significativa ocorreria um aumento na retenção e não a redução (como o que ocorreu experimentalmente em menor pH) (SYKORA *et al.*, 1997; LOBRUTTO *et al.*, 2001; McCALLEY, 2003; KAZAKEVICH e LOBRUTTO 2007). Em relação aos outros fatores pode-se dizer que o aumento da temperatura e da quantidade de acetonitrila seguiram o postulado aceito para o modelo de equilíbrio primário: aumento da temperatura reduz a retenção por facilitar a transferência de massa; o aumento na quantidade do solvente orgânico na fase móvel aumenta a força de eluição da mesma independente do equilíbrio secundário (MCCALLEY, 2000; BUCKENMAIER *et al.*, 2004; KAZAKEVICH e LOBRUTTO, 2007).

Com relação às mudanças na resolução, pode-se observar pelos cromatogramas das corridas dos experimentos 1, 2, 3 e 4 (Figuras III.I, III.II, III.III e III.IV, anexo III) que as diferenças ocorreram devido ao alargamento dos picos (Tabela III.I, anexo III). Este efeito pode ser explicado em termos de mudança na resolução com manutenção da seletividade.

Pelas diferenças de pH, considerando-se os experimentos 1, 2, 3 e 4, nota-se que em pH 5,0 os picos apresentam-se bem mais largos do que nos experimentos com pH aproximadamente 3,0. Este efeito do pH sugere que o grupo funcional da amida possa estar ionizado nesta faixa de pH, interagindo com silanóis livres da coluna quando os mesmos encontram-se ionizados (pH próximo de 5) e possuindo interação pouco significativa quando os mesmos não estão ionizados (pH próximo de 3) (MCCALLEY, 1997; MCCALLEY, 1998; BUCKENMAIER e MCCALLEY, 2002).

Já a quantidade de solvente orgânico, além da melhora na assimetria do pico, parece agir sobre a seletividade entre o produto de degradação e o bromidrato de darifenacina pois, há nítida diferença de perfil cromatográfico quando se comparam, por exemplo, os experimentos 1 e 2 (Figuras III.I e III.II, em anexo III). A temperatura parece afetar proporcionalmente a transferência de massa que se reflete no alargamento do pico, causando assim modificação na resolução mais pela melhora na assimetria do pico do que por mudança na seletividade entre fármaco e seu produto de degradação. A projeção de afirmações sobre as interações dos fatores do modelo proposto fica comprometida na medida em que não se possuem confirmações a respeito do pKa do fármaco e nem sobre a estrutura exata e as propriedades físico-químicas do produto de degradação. Os demais cromatogramas resultantes do DCC para a CLAE encontram-se no anexo III. A análise de variância para os fatores utilizados no desenho bem como a avaliação da validade dos modelos de DCC podem ser observados pelas Tabelas IV.I a IV.V (anexo IV) e Figuras V.I a V.VI (anexo V), respectivamente.

O método otimizado foi validado com resultados condizentes com o que é preconizado nos compêndios oficiais (ICH, 2005; USP, 2008) 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 (Tabela VI.I, anexo VI).

A aplicação de superfícies de resposta em métodos espectrofotométricos tem pouca utilização em virtude da simplicidade da resposta analítica e dos poucos parâmetros que o método possui. Os trabalhos existentes restringem-se na maior parte das vezes a estudos de robustez, otimização de preparo de amostra e reações de derivatização (PAIM *et al.*, 2008; SOUZA e TARLEY, 2008; DIVRIKLI *et al.*, 2009; IDRIS, 2010). Já a utilização da derivada em análise farmacêutica é aplicada geralmente para quantificar dois ou mais analitos que se encontram misturados em uma matriz, onde a transformação fornece seletividade para quantificá-los individualmente, ou nos casos onde existe interferência da matriz em relação ao espectro do analito de interesse (ROJAS e OJEDA, 2009; DONMEZ *et al.*; 2010; MILLERSHIP e CHIN, 2010).

Como a espectrofotometria ultravioleta derivada (UVD) necessita que seus parâmetros de transformação sejam otimizados (*ordem*, *delta-lambda* ($\Delta\lambda$), *fator de escala* e *velocidade de varredura*), a utilização de desenhos experimentais é viável para o desenvolvimento e validação do método (ROCHA e TEIXEIRA, 2004; ROJAS e OJEDA, 2009; DONATO *et al.*, 2010). No presente trabalho a superfície de resposta foi explorada para diagnosticar a influência dos parâmetros da transformação diferencial do sinal analítico em relação à sensibilidade do método em termos de limite de quantificação e precisão, além do desenho de Plackett-Burman na etapa de robustez.

Na fase exploratória, o fatorial completo 2^4 demonstrou que o principal fator influenciando significativamente o limite de quantificação (LQ) foi a ordem da derivada (Tabela VII.I, anexo VII). Apesar de não ocorrerem interações significativas dos fatores no fatorial exploratório 2^4 , como o fator *ordem* foi utilizado estatisticamente na forma de variável contínua, a possibilidade de interações é pertinente quando se utilizam outros níveis deste fator, já que na prática ele está mais próximo do comportamento de uma variável categórica.

Na fase de otimização foi modificada a faixa de concentração para aplicação dos mínimos quadrados ordinários. Além disso, a avaliação da precisão da

quantificação foi feita a partir do desvio padrão relativo. Os resultados do DCC demonstraram não haver interação entre os fatores e somente a *ordem* e o *fator de escala* influenciaram significativamente as respostas avaliadas (Tabelas VII.I, VII.II, VII.III, VII.IV, VII.V, anexo VII). Os resultados menos favoráveis de ambas as respostas foram verificados quando se utilizou a derivada de terceira ordem. Este fato pode ser atribuído ao aumento do ruído no sinal transformado e ao aumento da complexidade espectral, levando assim a redução na sensibilidade e na precisão do método (WATSON, 2000; DONATO *et al.*, 2010). A avaliação da validade dos modelos de DCC pode ser observada pelas Tabelas VIII.I, VIII.II, VIII.III, VIII.IV, VIII.V, VIII.VI (anexo VIII). Posteriormente o método mostrou robustez frente à avaliação via desenho de Plackett-Burman e foi validado frente às demais especificações.

Como demonstrado no Capítulo 2, ambos os métodos foram considerados equivalentes para quantificação do bromidrato de darifenacina 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.
- BUCKENMAIER, S.M.C.; McCALLEY, D. V. Overloading Study of Bases Using Polymeric RP-HPLC Columns as an Aid to Rationalization of Overloading on Silica-ODS Phases. *Analytical Chemistry*, v. 74, p. 4672–4681, 2002.
- BUCKENMAIER, S.M.C.; McCALLEY, D. V.; M. R.; EUERBY. Rationalisation of unusual changes in efficiency and retention with temperature shown for bases in reversed-phase high-performance liquid chromatography at intermediate pH. *Journal of Chromatography A*, v.1060, p.117–126, 2004.
- CANTWELL, F. F. Retention model for ion-pair chromatography based on double-layer ionic adsorption and exchange. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.2, p. 153–164, 1985.
- CZAJKOWSKA, T.; JARONIEC, M. Selectivity of alkylamide bonded-phase with respect to organic acids under reversed-phase conditions. *Journal of Chromatography A*, v.762, p. 147–158, 1997.
- DEJAEGER, B.; HEYDEN, Y. V. Ruggedness and robustness testing. *Journal of Chromatography A*, n.1158, 2007, p.138–157.
- DIVRIKLI, U.; AKDOGANA, A.; SOYLAKB, M.; ELCI, L. Factorial design for multivariate optimization of preconcentration system for spectrophotometric phosphorus determination. *Talanta*, v. 79, p.1287–1291, 2009.
- DONATO, E.M.; CANEDO, N.A.P.; ADAMS, A.I.H.; FRÖEHLICH, P.E.; BERGOLD, A.M. Espectrofotometria derivada: uma contribuição prática para o desenvolvimento de métodos. *Revista Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v.31, p.125-130, 2010.
- DONMEZ, O. A.; BOZDOGAN, A.; KUNT, G., DIV, Y. Spectrophotometric Multicomponent Analysis of a Mixture of Chlorhexidine Hydrochloride and Lidocaine Hydrochloride in Pharmaceutical Formulation Using Derivative Spectrophotometry and Partial Least Squares Multivariate Calibration. *Journal of Analytical Chemistry*, 2010, v. 65, p. 30–35, 2010.
- GLAJCH, J.L.; KIRKLAND, J.J.; SQUIRE, K.M.; MINOR, J.M. Optimization of solvent strength and selectivity for reversed-phase liquid chromatography using an interactive mixture-design statistical technique. *Journal of Chromatography A*, v.199, p.57-79, 1980.

HAMOIR, T.; MASSART, D. L.; KING, W.; KOKOT, S.; DOUGLAS, K. Prediction of initial chromatographic conditions in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, v.31, p.393–400, 1993.

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

HEINISCH, S.; ROCCA, J. L. Effect of mobile phase composition, pH and buffer type on the retention of ionizable compounds in reversed-phase liquid chromatography: Application to method development. *Journal of Chromatography A*, v.1048, p.183–193, 2004.

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.

IDRIS, A.M. Factorial Design and Response Surface Optimization of Spectrophotometric Sequential Injection Analysis of Olanzapine Formulations. *Journal of Analytical Chemistry*, .v. 65, p. 36–42, 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.; 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.; 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.; 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.

KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R. *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. Hoboken: John Wiley & Sons, 2007, 1135p.

KAZAKEVICH, Y.V.; LOBRUTTO, R.; CHAN, F.; PATEL, T. Interpretation of the excess adsorption isotherms of organic eluent components on the surface of reversed-phase adsorbents: Effect on the analyte retention. *Journal of Chromatography A*, v.913, p.75–87, 2001.

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

LOBRUTTO, R.; JONES, A.; KAZAKEVICH, Y. V.; MCNAIR, H. M. Effect of the eluent pH and acidic modifiers on the HPLC retention of basic analytes. *Journal of Chromatography A*, v. 913, p. 173–187, 2001.

McCALLEY, D. V. Comparative evaluation of bonded-silica reversed-phase columns for high-performance liquid chromatography using strongly basic compounds and alternative organic modifiers buffered at acid pH. *Journal of Chromatography A*, v. 769, p.169–178, 1997.

McCALLEY, D. V. Influence of sample mass on the performance of reversed-phase columns in the analysis of strongly basic compounds by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 793, p. 31–46, 1998.

McCALLEY, D. V. Effect of temperature and flow-rate on analysis of basic compounds in high-performance liquid chromatography using a reversed-phase column. *Journal of Chromatography A*, v.902, p. 311–321, 2000.

McCALLEY, D. V. Rationalization of Retention and Overloading Behavior of Basic Compounds in Reversed-Phase HPLC Using Low Ionic Strength Buffers Suitable for Mass Spectrometric Detection. *Analytical Chemistry*, v. 75, 2003.

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. 243–24, 2004.

MILLERSHIP, J. S., CHIN, J. Determination of Simvastatin in Tablet Formulations by Derivative UV Spectrophotometry. *Journal of Analytical Chemistry*, v. 65, p. 164–168, 2010.

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

NIKITAS, P; PAPPA-LOUISI, A. New equations describing the combined effect of pH and organic modifier concentration on the retention in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 971, p. 47–60, 2001.

PAIM, C. S.; GONÇALVES, H.; LANGE, A., MIRON, D.; STEPPE, M. Validation of UV Spectrophotometric Method for Quantitative Determination of Entacapone in Tablets Using Experimental Design of Plackett-Burman for Robustness Evaluation and Comparison with HPLC. *Analytical Letters*, v. 41, p. 571–581, 2008.

REUBSAET, J.; VIESKAR, R. Characterization of π - π interactions which determine retention of aromatic compounds in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v.841, p.147–154, 1999.

ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G. Estratégias para Aumento de Sensibilidade em Espectrofotometria Uv-Vis. *Química Nova*, v. 27, p. 807-812, 2004.

ROJAS, F. S.; OJEDA, C. B. Recent development in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry: 2004–2008, A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 635, p. 22–44, 2009.

ROSES, M.; BOSCH, E. Influence of mobile phase acid–base equilibria on the chromatographic behavior of protolytic compounds. *Journal of Chromatography A*, v. 982, p.1–30, 2002.

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.

SNYDER, L.R. Classification of the Solvent Properties of Common Liquids. *Journal of Chromatographic Science*, v.16, p.223-234, 1978.

SNYDER, L.R, DOLAN, J.W; GANT, J.R. Gradient elution in high-performance liquid chromatography: I. Theoretical basis for reversed-phase systems. *Journal of Chromatographic Science*, v. 165, p.3-30, 1979.

SOUZA, J. M. O.; TARLEY, C. R. T. Preconcentration and Speciation of Sb(III) and Sb(V) in Water Samples and Blood Serum after Cloud Point Extraction Using Chemometric Tools for Optimization. *Analytical Letters*, v.41, p. 2465–2486, 2008.

STEWART, H.N.M.; PERRY, S.G. A new approach to liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography*, v.37, p.97-98, 1968.

SYKORA, D.; TESAROVA, E.; POPL, M. Interactions of basic compounds in reversed-phase high-performance liquid chromatography: Influence of sorbent character, mobile phase composition, and pH on retention of basic compounds. *Journal of Chromatography A*, v. 758, p. 37-51, 1997.

THEVENON-EMERIC, G.; TCHAPLA, A.; MARTIN, M. Role of π – π interactions in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, v. 550, p. 267–283, 1991.

USP . The United States Pharmacopeia. 31st ed. Rockville. United States Pharmacopeial Convention, 2008. <1225>.

VALKO, K.; SIEGEL, P. New chromatographic hydrophobicity index (ϕ_0) based on the slope and the intercept of the $\log k'$ versus organic phase concentration plot. *Journal of Chromatography*, v. 631, p.49–61, 1993.

VALKO, K.; SNYDER, L. R.; GLAJCH, J. Retention in reversed-phase liquid chromatography as a function of mobile phase composition. *Journal of Chromatography*, v.656, p. 501–520, 1993.

VCCLAB. Alogps 2.1 Program. *Virtual computational chemistry laboratory*. 2007. Disponível em <<http://www.vcclab.org/lab/alogsps/start.html>>. Acesso em 25/01/09.

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.

WEST, S. D. The prediction of reversed-phase HPLC retention indices and resolution as a function of solvent strength and selectivity. *Journal of Chromatographic Science*, v. 25, p.122–129, 1987.

WEST, S. D. Correlation of retention indices with resolution and selectivity in reversed-phase HPLC and GC. *Journal of Chromatographic Science* v. 27, p.2–12, 1989.

- Os métodos qualitativos desenvolvidos (CLAE, CCD, espectrofotometria no ultravioleta) demonstraram-se adequados para a identificação do bromidrato de darifenacina na forma farmacêutica comprimido;
- A utilização de desenhos experimentais permitiu avaliar de forma mais eficiente os fatores na CLAE por meio de um número relativamente pequeno de experimentos quando comparado com as modelagens matemáticas tradicionais;
- O método de CLAE foi validado perante os parâmetros requeridos pelos compêndios oficiais sendo específico frente aos excipientes e ao produto de degradação obtido;
- A espectrofotometria UV, utilizando transformação derivada permitiu desenvolver um método sensível e seletivo para quantificação do fármaco na forma farmacêutica comprimido;
- Os métodos de espectrofotometria UV derivada e CLAE podem ser utilizados para o doseamento do fármaco na forma farmacêutica comprimido, sendo intercambiáveis, nas condições testadas.

Tabela I.I. Áreas obtidas com a curva de regressão utilizada para a quantificação das amostras na avaliação da solubilidade.

Curvas	Áreas ¹				
	5,0µg/mL	10,0µg/mL	15,0µg/mL	20,0µg/mL	25,0µg/mL
Curva 1	348550	701230	1050369	1392508	1749965
Curva 2	349233	702555	1049852	1413916	1750021
Curva 3	350749	699221	1058220	1428710	1739613
Média	349511	701002	1052814	1411711	1746533
DPR (%)	0,32	0,24	0,45	1,29	0,34

¹Em triplicata para cada concentração de cada curva.

Tabela I.II. Resultados dos testes de premissas para avaliação da linearidade e confecção da curva analítica a partir dos dados da Tabela 16.

Parâmetro	Valor	Estatística	Valor calculado	Valor crítico
R ²	0,999	-	-	-
R ² ajustado	0,999	-	-	-
Intercepto	887,93	$t^1; p^2$	0,88	0,05
Coeficiente angular	70095	$t; p$	<0,001	0,05
Regressão	-	ANOVA; p	<0,001	0,05
Falta de ajustamento	-	ANOVA; p	0,355	0,05

¹teste *t de Student*; ²valor de p considerando um $\alpha=0,05$

Tabela I.III Análise de variância para o teste de solubilidade.

Fontes de variação	SQ ¹	GL ²	QM ³	F	
				F	crítico ⁴
Entre grupos	0,44	5	0,089	0,27	4,39
Dentro	1,93	6	0,322		
Total	2,37	11			

¹Soma dos quadrados; ²graus de liberdade; ³quadrado médio; ⁴ $p = 0,05$.

Tabela II.I. Matriz do fatorial 2⁵ para o da CLAE.

Experimento	Solvente ¹	Concentração ²	pH	Fluxo ³	Temperatura ⁴	k ⁵	R ⁶
1	MeCN	20	2,5	0,9	25	12,05	3,95
2	THF	20	2,5	0,9	25	7,00	2,50
3	MeCN	40	2,5	0,9	25	1,75	1,10
4	THF	40	2,5	0,9	25	1,30	1,10
5	MeCN	20	5,0	0,9	25	17,00	2,00
6	THF	20	5,0	0,9	25	9,00	2,00
7	MeCN	40	5,0	0,9	25	3,86	1,90
8	THF	40	5,0	0,9	25	3,00	1,80
9	MeCN	20	2,5	1,2	25	8,75	3,95
10	THF	20	2,5	1,2	25	4,75	2,50
11	MeCN	40	2,5	1,2	25	1,15	1,10
12	THF	40	2,5	1,2	25	0,81	1,00
13	MeCN	20	5,0	1,2	25	13,20	2,00
14	THF	20	5,0	1,2	25	6,89	2,00
15	MeCN	40	5,0	1,2	25	2,80	1,90
16	THF	40	5,0	1,2	25	2,15	1,80
17	MeCN	20	2,5	0,9	50	8,52	3,50
18	THF	20	2,5	0,9	50	5,07	1,90
19	MeCN	40	2,5	0,9	50	1,36	0,90
20	THF	40	2,5	0,9	50	0,87	1,00
21	MeCN	20	5,0	0,9	50	12,45	0,70
22	THF	20	5,0	0,9	50	7,19	1,80
23	MeCN	40	5,0	0,9	50	2,50	1,40
24	THF	40	5,0	0,9	50	1,93	1,80
25	MeCN	20	2,5	1,2	50	6,51	3,48
26	THF	20	2,5	1,2	50	4,22	1,90
27	MeCN	40	2,5	1,2	50	1,15	0,90
28	THF	40	2,5	1,2	50	0,76	1,00
29	MeCN	20	5,0	1,2	50	11,49	0,70
30	THF	20	5,0	1,2	50	2,11	1,80
31	MeCN	40	5,0	1,2	50	2,30	1,40
32	THF	40	5,0	1,2	50	1,85	1,80

¹Tipo de solvente, acetonitrila (MeCN) ou tetraidrofurano (THF); ²Porcentagem do solvente na fase móvel em v/v; ³fluxo da fase móvel em mL/min, ⁴temperatura do forno da coluna em °C; ⁵fator de retenção, ⁶resolução entre produto de degradação e o fármaco.

Tabela II.II. Análise de variância para os efeitos do fatorial 2^5 da CLAE sobre o k.

Fonte	SQ ¹	GL ²	QM ³	p ⁴
Modelo	594,55	29	20,50	<0,001
A (Tipo de solvente orgânico) ⁵	71,82	1	71,82	<0,001
B (Porcentagem de solvente orgânico) ⁶	355,51	1	355,51	<0,001
C (pH) ⁷	35,49	1	35,49	<0,001
D (fluxo) ⁸	17,94	1	17,94	<0,001
E (temperatura) ⁹	19,81	1	19,81	<0,001
AB ¹⁰	48,86	1	48,86	<0,001
AC	7,05	1	7,05	<0,001
AE	0,36	1	0,36	0,005
BC	3,93	1	3,93	<0,001
BD	8,78	1	8,78	<0,001
BE	9,01	1	9,01	<0,001
CD	0,58	1	0,58	0,003
CE	1,52	1	1,52	<0,001
DE	0,77	1	0,77	0,002
ABC	5,53	1	5,53	<0,001
ABE	0,21	1	0,21	0,009
ACD	0,64	1	0,64	0,003
ACE	0,29	1	0,29	0,007
ADE	1,05	1	1,05	0,002
BCD	0,24	1	0,24	0,008
CDE	0,12	1	0,12	0,016
ABCD	0,71	1	0,71	0,003
ABCE	0,56	1	0,56	0,004
ABDE	0,98	1	0,98	0,002
ACDE	1,13	1	1,13	0,002
ABCDE	1,07	1	1,07	0,001
Resíduo	0,004	2	0,002	
Total	594,55	31		

¹Soma dos quadrados; ²Graus de liberdade; ³quadrado médio; ⁴p = 0,05; ⁵Acetonitrila ou tetrahydrofurano; ⁶20 ou 40% v/v; ⁷2,5 ou 5,0; ⁸0,9 ou 1,2mL/min; ⁹25 ou 50°C; ¹⁰interação entre fatores.

Tabela II.III. Análise de variância para os efeitos do fatorial 2⁵ da CLAE sobre a R.

Fonte	SQ ¹	GL ²	QM ³	p ⁴
Modelo	23,85	15	1,59	<0,001
A (Tipo de solvente orgânico) ⁵	0,32	1	0,32	<0,001
B (Porcentagem de solvente orgânico) ⁶	6,83	1	6,83	<0,001
C (pH ⁷)	0,78	1	0,78	<0,001
E (temperatura) ⁸	1,37	1	1,37	<0,001
AB ⁹	0,66	1	0,66	<0,001
AC	2,41	1	2,41	<0,001
AE	0,32	1	0,32	<0,001
BC	8,38	1	8,38	<0,001
BE	0,41	1	0,41	<0,001
CE	0,060	1	0,06	<0,001
ABC	1,89	1	1,89	<0,001
ABE	0,01	1	0,01	<0,001
ACE	0,32	1	0,32	<0,001
BCE	0,004	1	0,004	0,002
ABCE	0,10	1	0,10	<0,001
Resíduo	0,005	16	0,003	
Total	23,86	31		

¹Soma dos quadrados; ²Graus de liberdade; ³quadrado médio; ⁴p = 0,05; ⁵acetonitrila ou tetraidrofurano; ⁶20 ou 40% v/v; ⁷2,5 ou 5,0; ⁸25 ou 50°C; ⁹interação entre fatores.

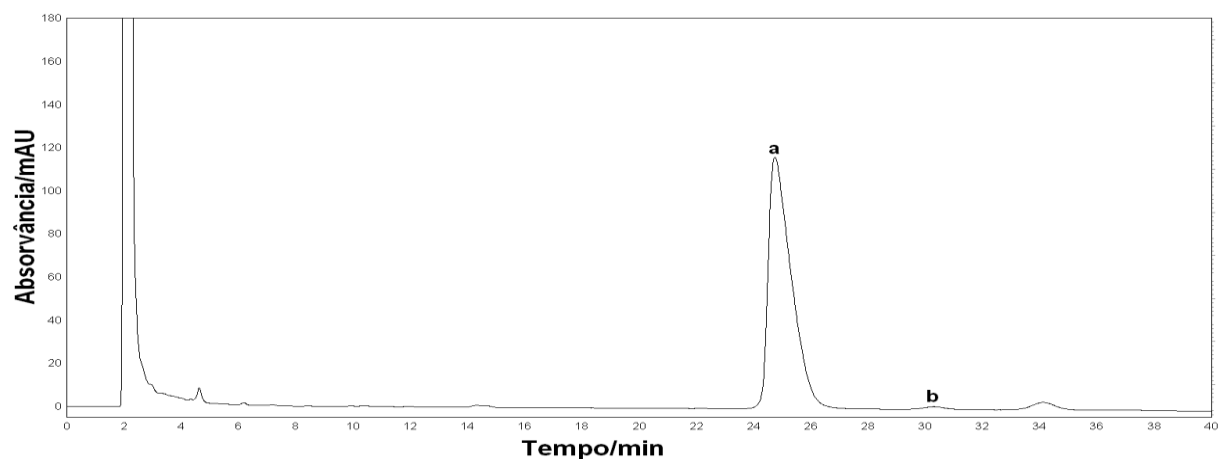


Figura III.I. Cromatograma do *experimento 1* (22,0%; pH 3,0; 26 °C) do DCC da CLAE para SQR após degradação forçada por 72h em H₂O₂ 13% (v/v), onde *a* representa o pico do fármaco e *b* do seu respectivo produto de degradação.

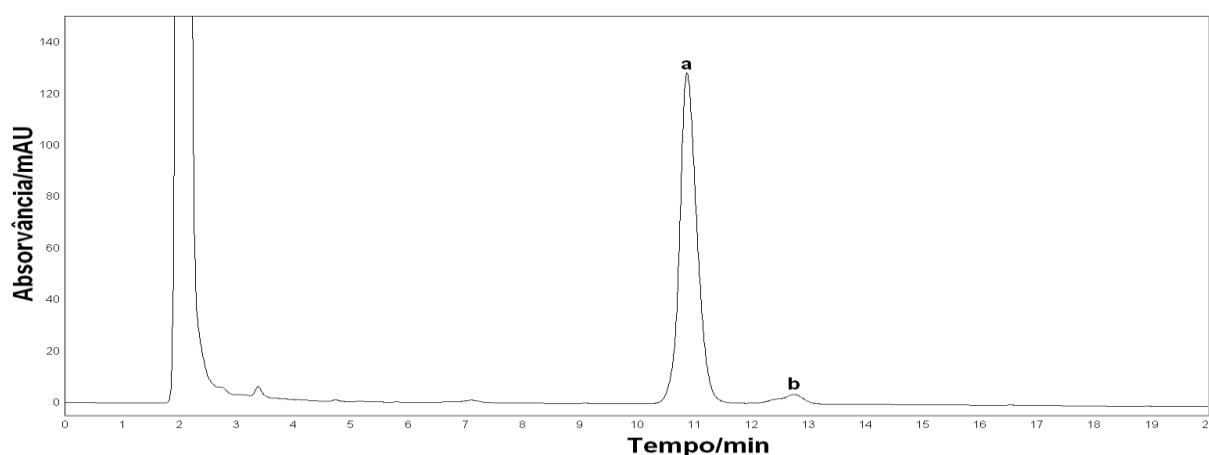


Figura III.II. Cromatograma do *experimento 2* (28,0 %; pH 3,0; 26,0°C) do DCC da CLAE para SQR após degradação forçada por 72h em H₂O₂ 13% (v/v), onde *a* representa o pico do fármaco e *b* do seu respectivo produto de degradação.

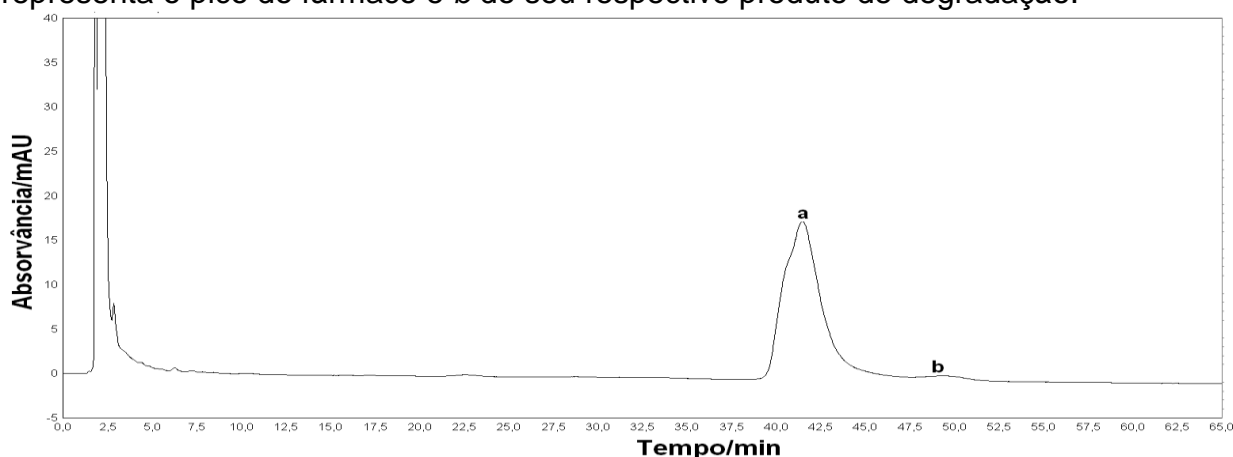


Figura III.III. Cromatograma do *experimento 3* (22,0 %; pH 5,0; 26°C) do DCC da CLAE para SQR após degradação forçada por 72h em H₂O₂ 13% (v/v), onde *a* representa o pico do fármaco e *b* do seu respectivo produto de degradação.

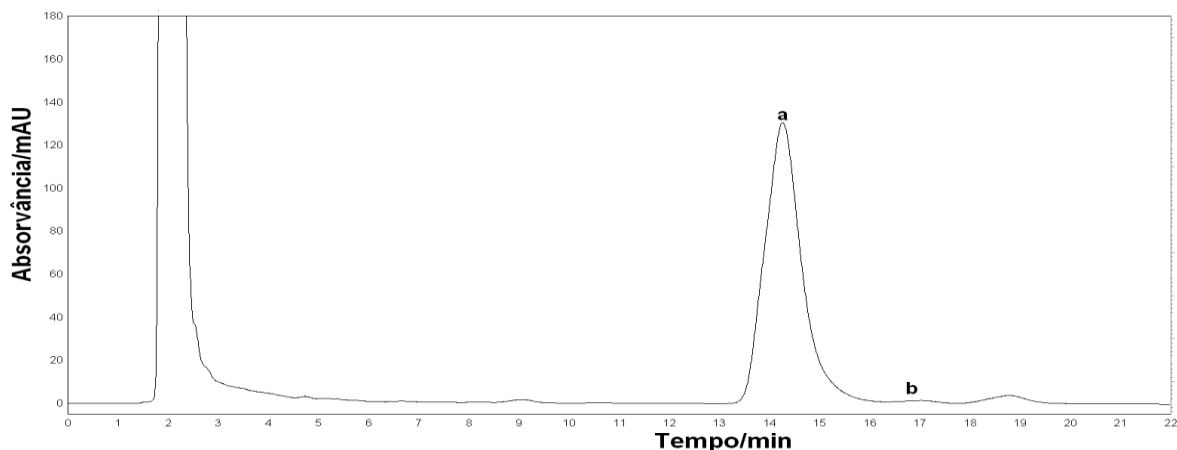


Figura III.IV. Cromatograma do *experimento 4* (28,0%; pH 5,0; 26,0 °C) do DCC da CLAE para SQR após degradação forçada por 72h em H₂O₂ 13% (v/v), onde *a* representa o pico do fármaco e *b* do seu respectivo produto de degradação.

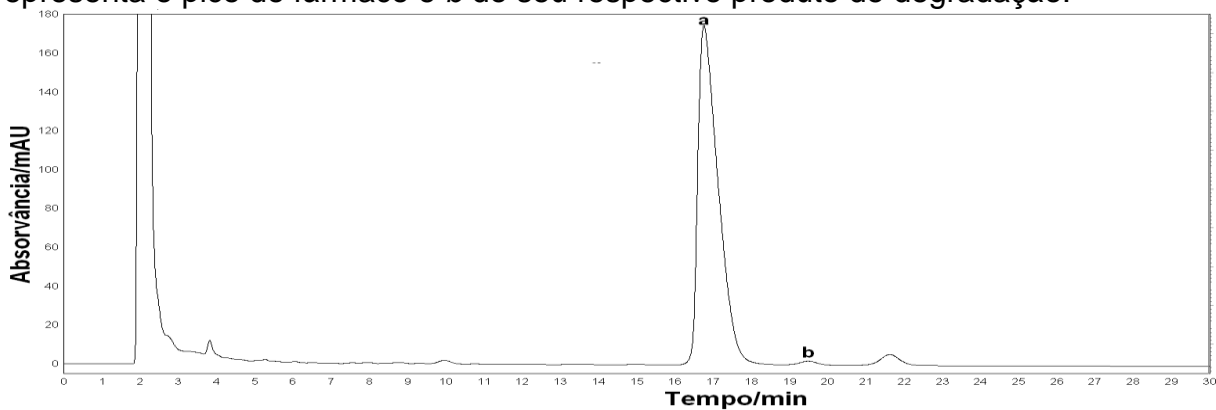


Figura III.V. Cromatograma do *experimento 5* (22,0%; pH 3,0; 45 °C) do DCC da CLAE para SQR após degradação forçada por 72h em H₂O₂ 13% (v/v), onde *a* representa o pico do fármaco e *b* do seu respectivo produto de degradação.

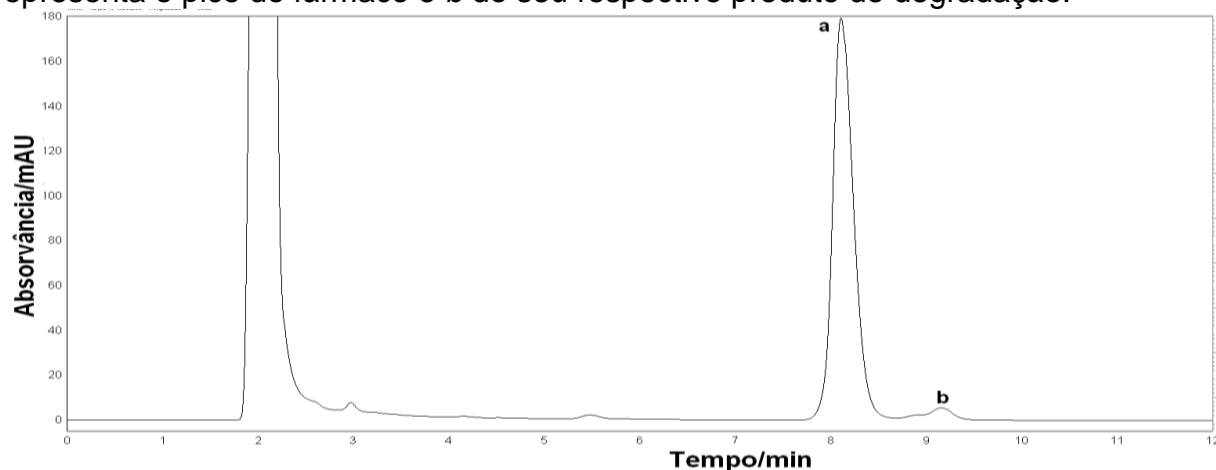


Figura III.VI. Cromatograma do *experimento 6* (28,0%; pH 3,0; 45 °C) do DCC da CLAE para SQR após degradação forçada por 72h em H₂O₂ 13% (v/v), onde *a* representa o pico do fármaco e *b* do seu respectivo produto de degradação.

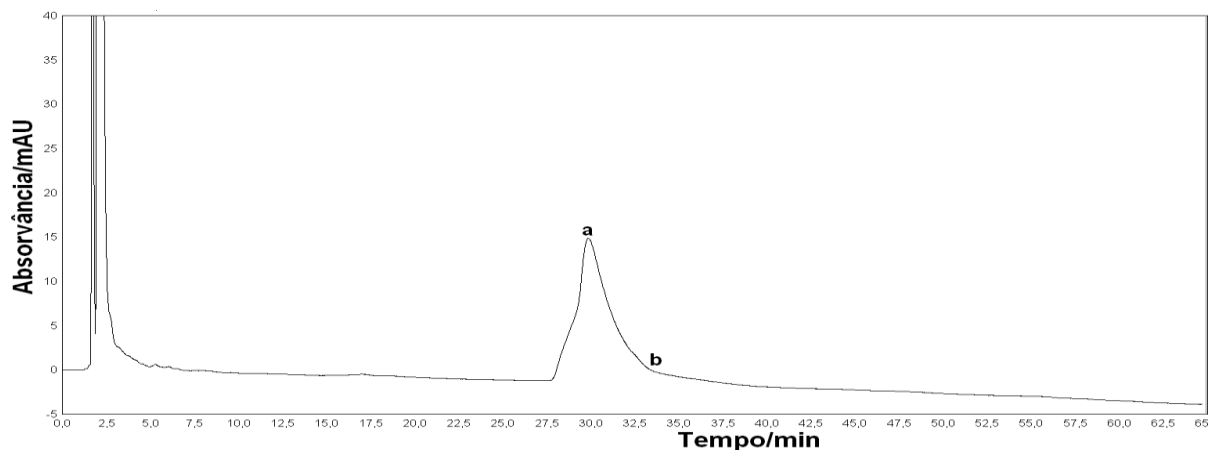


Figura III.VII. Cromatograma do *experimento 7* (22,0%; pH = 5,0; 45 °C) do DCC da CLAE para SQR após degradação forçada por 72h em H₂O₂ 13% (v/v), onde *a* representa o pico do fármaco e *b* do seu respectivo produto de degradação.

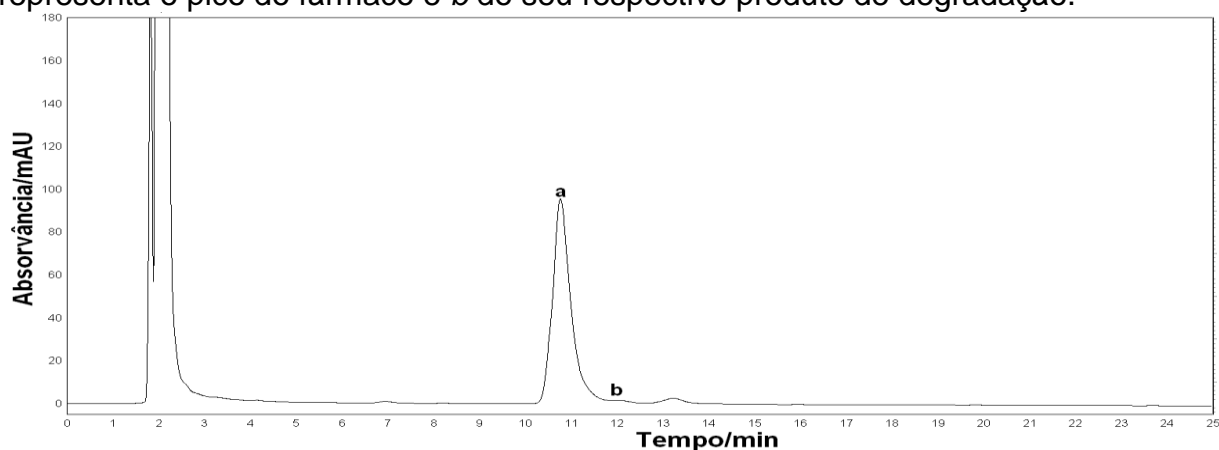


Figura III.VIII. Cromatograma do *experimento 8* (28,0%; pH = 5,0; 45 °C) do DCC da CLAE para SQR após degradação forçada por 72h em H₂O₂ 13% (v/v), onde *a* representa o pico do fármaco e *b* do seu respectivo produto de degradação.

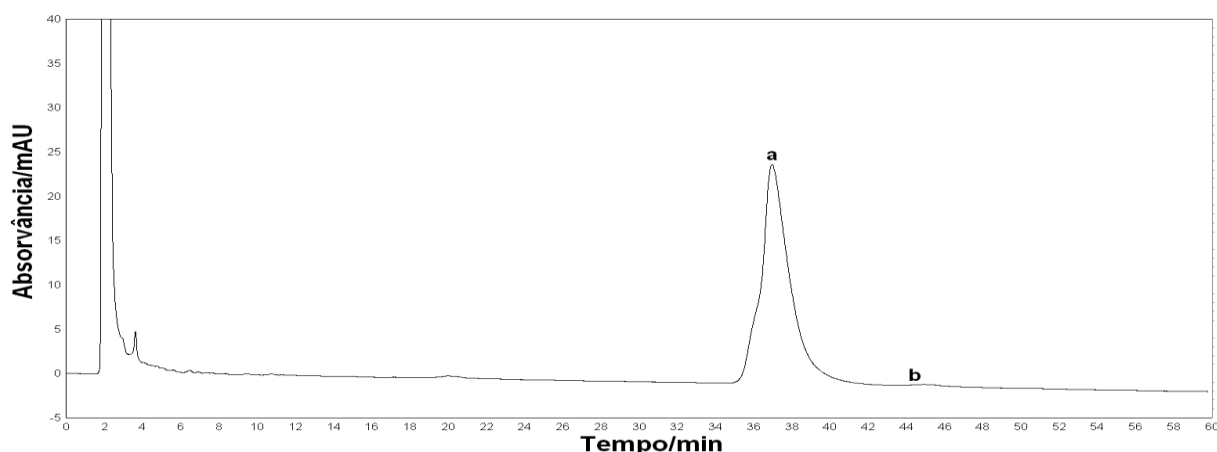


Figura III.IX. Cromatograma do *experimento 9* (20,0%; pH = 4,0; 35,5°C) do DCC da CLAE para SQR após degradação forçada por 72h em H₂O₂ 13% (v/v), onde *a* representa o pico do fármaco e *b* do seu respectivo produto de degradação.

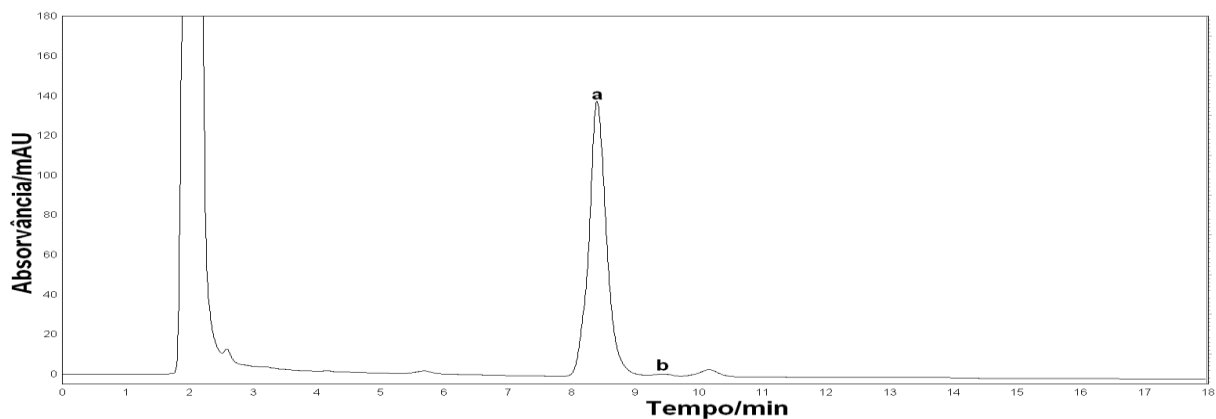


Figura III.X. Cromatograma do *experimento 10* (30,0%; pH = 4,0; 35,5°C) do DCC da CLAE para SQR após degradação forçada por 72h em H₂O₂ 13% (v/v), onde *a* representa o pico do fármaco e *b* do seu respectivo produto de degradação.

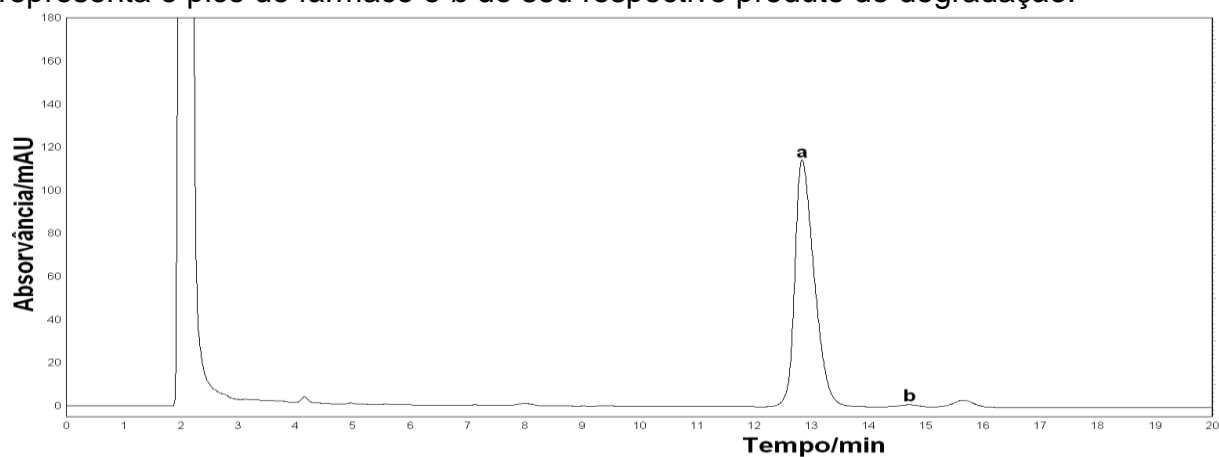


Figura III.XI. Cromatograma do *experimento 11* (25,0%; pH = 2,3; 35,5 °C) do DCC da CLAE para SQR após degradação forçada por 72h em H₂O₂ 13% (v/v), onde *a* representa o pico do fármaco e *b* do seu respectivo produto de degradação.

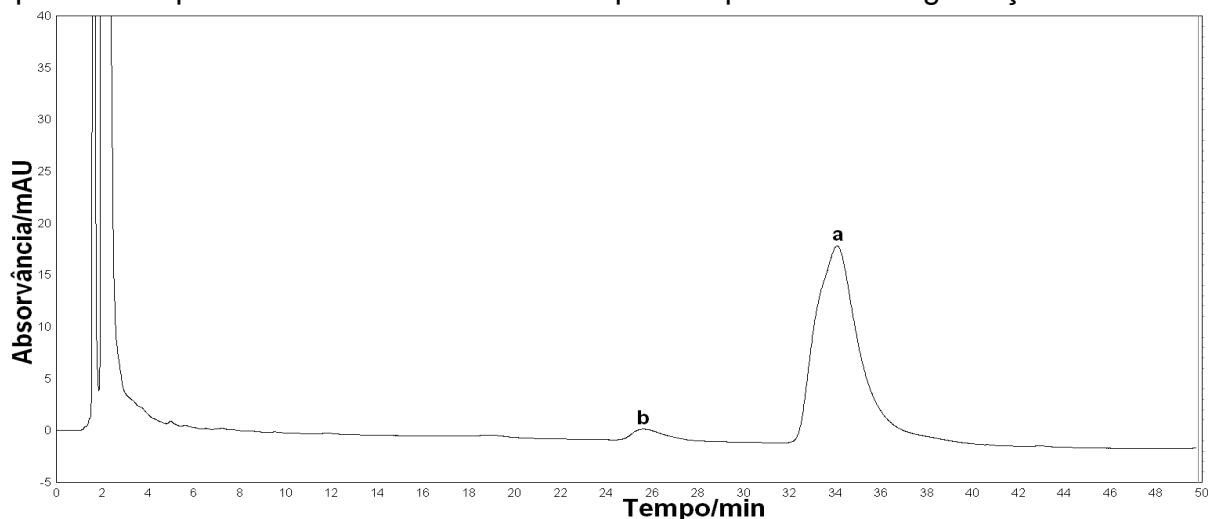


Figura III.XII. Cromatograma do *experimento 12* (25,0%; pH = 5,7; 35,5 °C) do DCC da CLAE para SQR após degradação forçada por 72h em H₂O₂ 13% (v/v), onde *a* representa o pico do fármaco e *b* do seu respectivo produto de degradação.

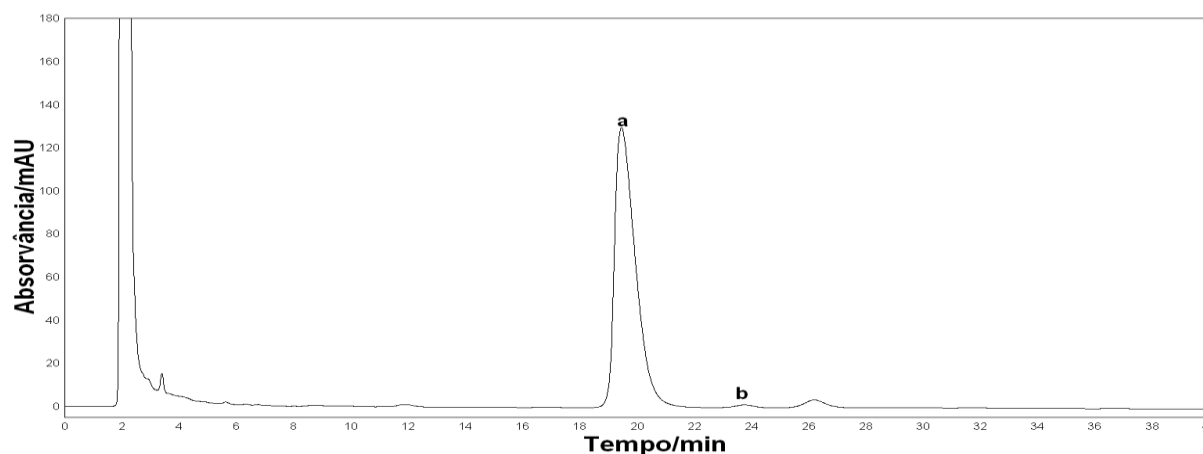


Figura III. XIII. Cromatograma do *experimento 13* (25,0%; pH = 4,0; 19,5 °C) do DCC da CLAE para SQR após degradação forçada por 72h em H₂O₂ 13% (v/v), onde *a* representa o pico do fármaco e *b* do seu respectivo produto de degradação.

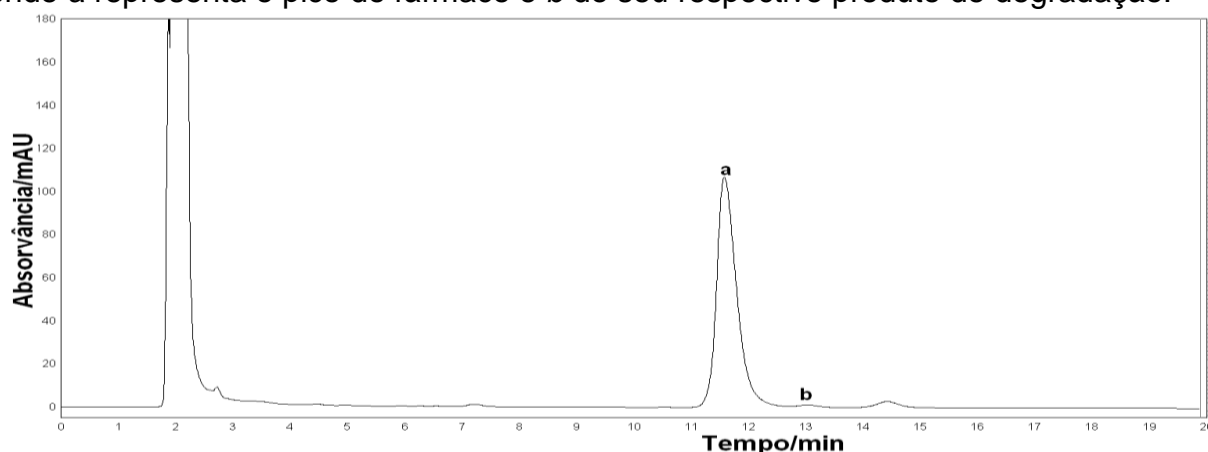


Figura III.XIV. Cromatograma do *experimento 14* (25,0%; pH = 4,0; 51,5 °C) do DCC da CLAE para SQR após degradação forçada por 72h em H₂O₂ 13% (v/v), onde *a* representa o pico do fármaco e *b* do seu respectivo produto de degradação.

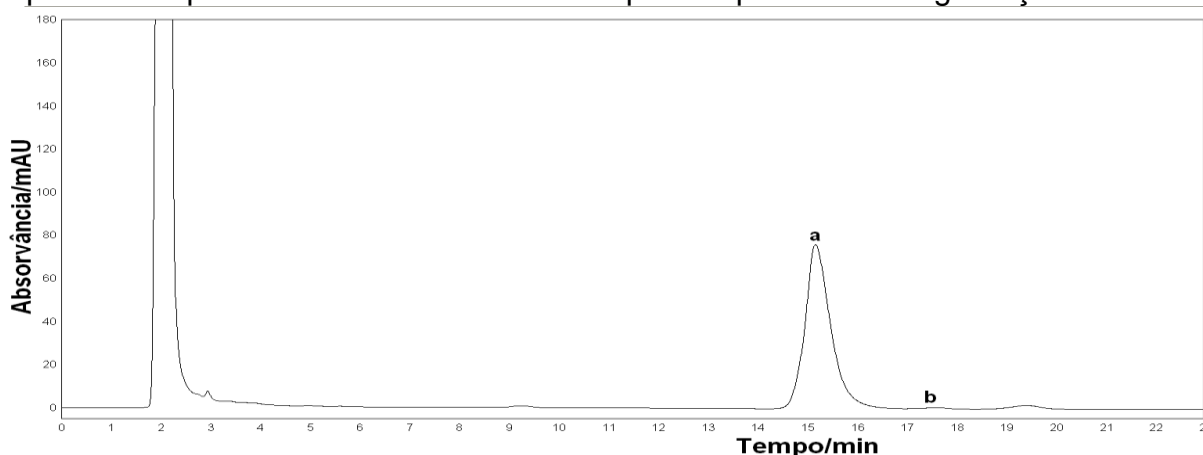


Figura III.XV. Cromatograma do experimento referente ao *ponto central* (25,0%; pH = 4,0; 35,5 °C) do DCC da CLAE para SQR após degradação forçada por 72h em H₂O₂ 13% (v/v), onde *a* representa o pico do fármaco e *b* do seu respectivo produto de degradação.

Tabela III.I. Parâmetros cromatográficos para o DCC da CLAE¹.

Experimento	MeCN²	pH³	Temperatura⁴	Tr⁵	T⁶	Largura⁷
1	22,0 (-1)	3,0(-1)	26,0(-1)	24,74	1,99	3,44
2	28,0(+1)	3,0(-1)	26,0(-1)	10,87	1,16	1,54
3	22,0(-1)	5,0(+1)	26,0(-1)	41,49	1,53	13,08
4	28,0(+1)	5,0(+1)	26,0(-1)	14,25	1,25	3,76
5	22,0(-1)	3,0(-1)	45,0(+1)	16,75	1,96	2,47
6	28,0(+1)	3,0(-1)	45,0(+1)	8,11	1,23	1,30
7	22,0(-1)	5,0(+1)	45,0(+1)	27,78	1,48	6,77
8	28,0(+1)	5,0(+1)	45,0(+1)	10,82	1,38	2,23
9	20,0(-1,681)	4,0(0)	35,5(0)	37,20	1,32	9,16
10	30,0(+1,681)	4,0(0)	35,5(0)	8,39	1,11	1,33
11	25,0 (0)	2,3(-1,681)	35,5(0)	12,87	1,25	2,07
12	25,0(0)	5,7(+1,681)	35,5(0)	34,06	1,55	9,51
13	25,0(0)	4,0(0)	19,5(-1,681)	19,48	1,40	3,74
14	25,0(0)	4,0(0)	51,5(+1,681)	11,57	1,40	1,78
15 ⁸	25,0(0)	4,0(0)	35,5(0)	15,10	1,39	2,69

¹Fatores em valores reais e entre parênteses o valor codificado; ²valor real da quantidade de acetonitrila na fase móvel em % (v/v); ³pH da fase móvel; ⁴temperatura da coluna em °C; ⁵tempo de retenção em minutos; ⁶fator de cauda; ⁷largura do pico; ⁸média da sextuplicata para o ponto central.

Tabela IV.I. Análise de variância para o k no DCC da CLAE.

Fonte	SQ ^a	GL ^b	QM ^c	p ^d
Modelo	0,33	9	0,036	< 0,001
B (porcentagem de solvente orgânico)	0,23	1	0,228	< 0,001
C (pH)	0,04	1	0,044	< 0,001
D (temperatura)	0,04	1	0,038	< 0,001
AB ^e	0,0009	1	0,0009	< 0,001
AC	0,00	1	0,003	< 0,001
BC	0,00	1	0,001	< 0,001
A ²	0,00	1	0,005	< 0,001
B ²	0,00	1	0,003	< 0,001
C ²	0,00	1	0,002	< 0,001
Resíduo	0,00	50	0,0004	
Falta de ajustamento	0,00	5	0,00008	0,088
Erro puro	0,00	45	0,00003	
Total	0,33	59		

^aSoma dos quadrados; ^bGraus de liberdade; ^cquadrado médio; ^dp = 0,05; ^einteração entre fatores.

Tabela IV.II. Polinômio obtido para a superfície de resposta do k no DCC para CLAE e medidas da qualidade da regressão múltipla.

Polinômio	
$k^a = 0,15 - 0,075\text{MeCN}^b + 0,600\text{pH} + 0,03\text{Temp}^c - 0,00604\text{MeCN.pH}^d + 0,011\text{MeCN.Temp} + - 0,007\text{pH.Temp} - 0,011\text{MeCN}^2 + 0,0082\text{pH}^2 + 0,0075\text{Temp}^2$	
Medida	Valor
R ²	0,993
R ² ajustado	0,992
PRESS	0,003

^aFator de retenção (parâmetro de CLAE); ^bacetonitrila; ^ctemperatura; ^dfatores inseridos em um termo que representa interação.

Tabela IV.III. Análise de variância para a R no DCC da CLAE.

Fonte	SQ ^a	GL ^b	QM ^c	p ^d
Modelo	24,21	7	3,46	< 0,001
B (porcentagem de solvente orgânico)	0,23	1	0,23	0,008
C (pH)	11,62	1	11,62	< 0,001
D (temperatura)	3,99	1	3,99	< 0,001
AB ^e	5,52	1	5,52	< 0,001
BC	0,56	1	0,56	< 0,001
A ²	2,04	1	2,04	< 0,001
B ²	0,39	1	0,39	< 0,001
Resíduo	1,59	52	0,031	
Falta de ajustamento	0,39	7	0,056	0,080
Erro puro	1,19	45	0,027	
Total	25,80	59	3,46	

^aSoma dos quadrados; ^bGraus de liberdade; ^cquadrado médio; ^dp = 0,05; ^einteração entre fatores.

Tabela IV.IV. Polinômio obtido para a superfície de resposta da R no DCC para CLAE e medidas da qualidade da regressão múltipla.

Polinômio	
$\sqrt{R^a} = 3,71 - 0,043\text{MeCN}^b - 3,20\text{pH} + 0,03\text{Temp}^c - 0,016\text{MeCN} \cdot \text{pH}^d + 0,16\text{pH} \cdot \text{Temp} + 0,0094\text{pH}^2$	
Medida	Valor
R ²	0,988
R ² ajustado	0,980
PRESS	1,961

^aResolução; ^bacetonitrila; ^ctemperatura; ^dfatores inseridos em um termo que representa interação.

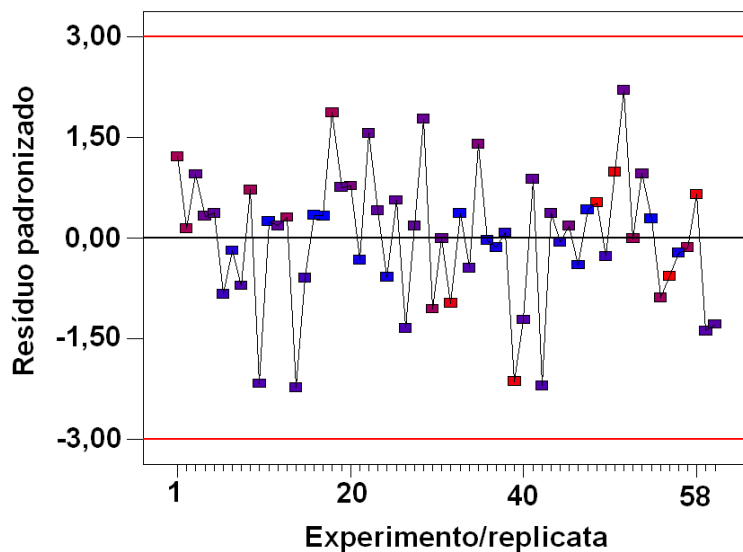


Figura V.I. Gráfico dos resíduos para o DCC da CLAE com o k.

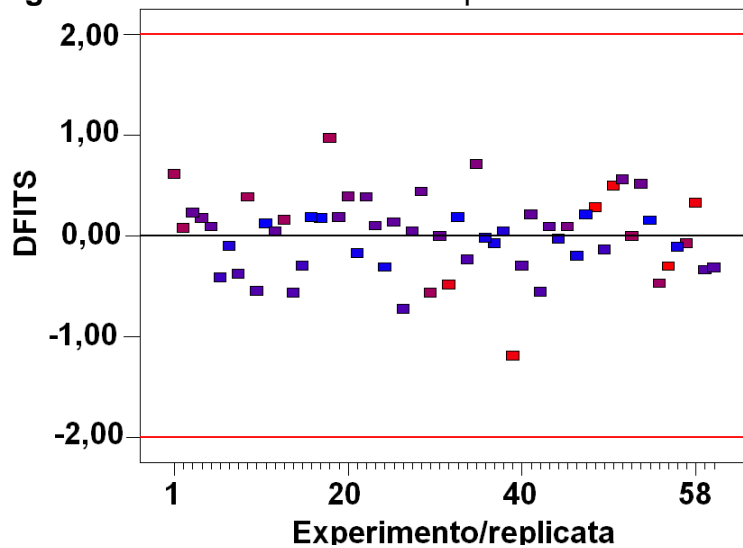


Figura V.II. Gráfico de *DFITS* para o DCC da CLAE com o k.

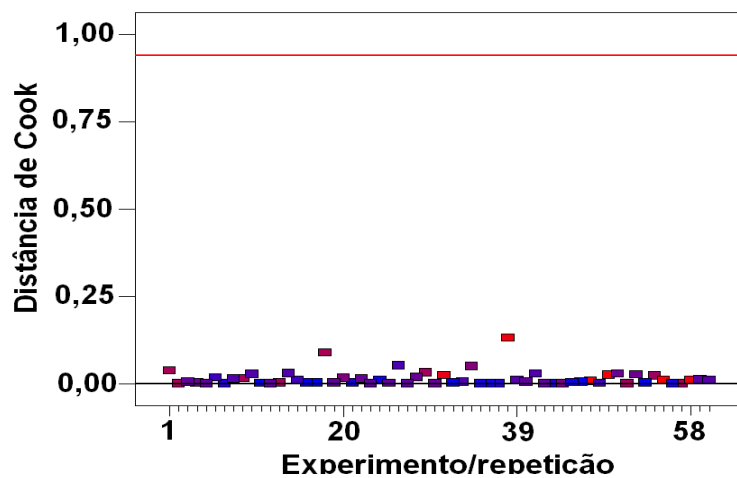


Figura V.III. Gráfico da *distância de Cook* para o DCC da CLAE com o k.

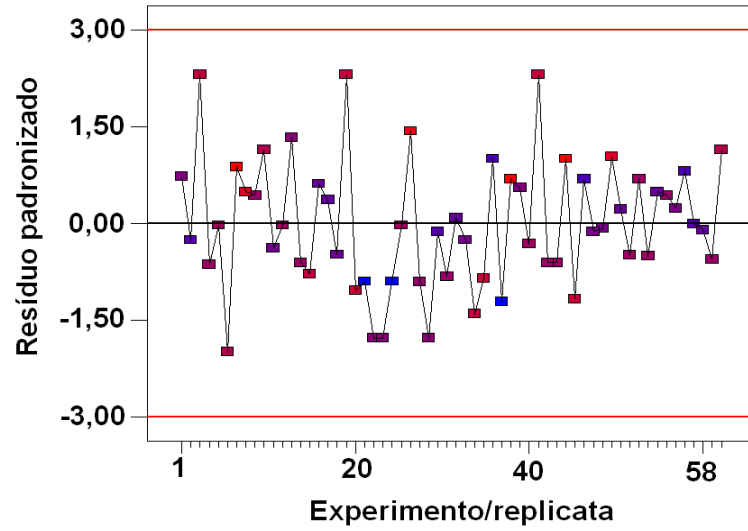


Figura V.IV. Gráfico dos resíduos padronizados para o DCC da CLAE com a R.

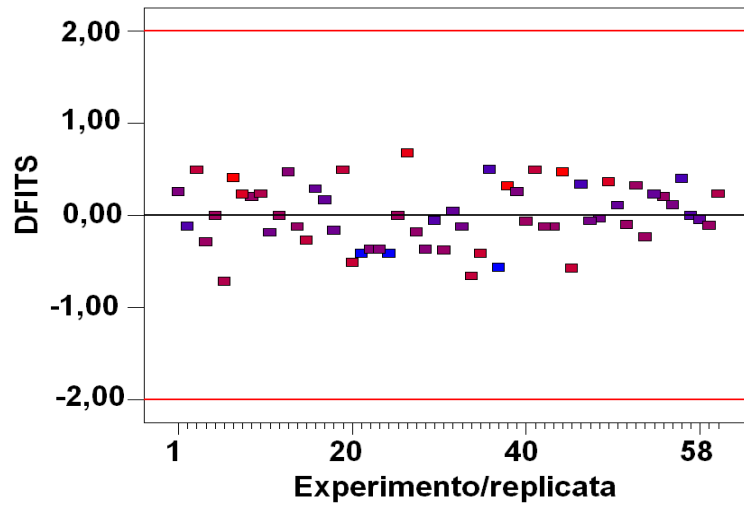


Figura V.V. Gráfico de *DFFITS* para o DCC da CLAE com a R.

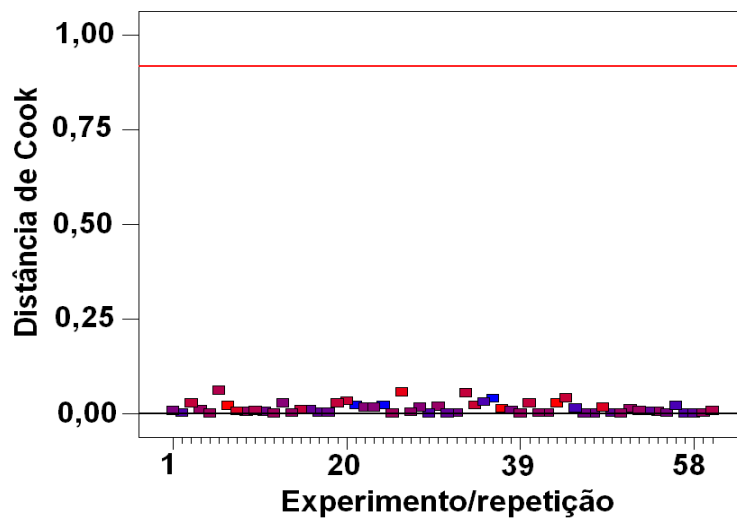


Figura V.VI. Gráfico da *distância de Cook* para o DCC da CLAE com a R.

Tabela VI.I. Resultados para a robustez da CLAE pelo desenho de Plackett-Burman.

Exp. ^a	MeCN ^b	pH ^c	F ^d	λ ^e	Inj. ^f	t ^g	Ácido ^h	Col. ⁱ	Teor. ^j	T ^l	Tr ^m	N ⁿ	k ^o
1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	99,12	1,78	8,33	3259	4,21
2	-1	1	1	1	1	1	1	-1	99,02	1,82	9,25	3569	4,85
3	1	1	1	-1	-1	1	1	1	99,11	1,72	18,50	4498	7,04
4	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	98,10	1,88	20,10	4195	7,93
5	-1	1	1	1	1	1	-1	1	99,69	1,82	21,15	4426	9,47
6	-1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	98,56	1,75	7,96	3628	4,31
7	1	1	-1	1	1	-1	1	1	98,25	1,73	22,26	3364	9,55
8	1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	98,51	1,65	8,12	3329	2,76
9	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	99,05	1,71	15,47	3725	5,79
10	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	98,67	1,85	16,58	3658	6,18
11	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	98,37	1,70	6,52	3698	3,50
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	98,96	1,63	6,96	3296	3,35
13 ^p	0	0	0	0	0	0	0	0	98,47	1,16	8,39	4532	3,26

^aExperimento; ^bconcentração de acetonitrila na fase móvel, em % (v/v), com 27 e 29% para -1 e 1, respectivamente; ^cpH da fase móvel com 2,9 e 3,10 para -1 e 1, respectivamente; ^dfluxo da fase móvel em mL/min com 1,2 e 1,0 para -1 e 1, respectivamente; ^ecomprimento de onda de quantificação, em nm com 203 e 207 para -1 e 1, respectivamente; ^fvolume de injeção, em μ L, com 10 e 30 para -1 e 1, respectivamente; ^gtemperatura do forno da coluna, em $^{\circ}$ C, com 27 e 29 para -1 e 1, respectivamente; ^htipo de ácido, sendo ácido acético e ácido fórmico para -1 e 1, respectivamente; ⁱtipo da coluna, sendo Merck de 12cm e Merck de 25cm para para -1 e 1, respectivamente; ^jteor para quantificação de uma amostra de bromidrato de darifenacina comprimido 15 mg; ^lfator de cauda; ^mtempo de retenção para o fármaco; ⁿnúmero de pratos teóricos, ^ofator de retenção; ^prepresenta a média da repetição, em quadruplicata, do ponto central, com "0" representado as condições experimentais dos parâmetros utilizados na validação.

Tabela VII.I. Análise de variância para os efeitos do fatorial 2^4 da UVD sobre o LQ.

Fonte	SQ ¹	GL ²	QM ³	p ⁴
A (ordem) ⁵	6,54	10	0,65	0,002
B ($\Delta\lambda$)	6,40	1	6,40	<0,001
C (fator de escala) ⁶	0,03	1	0,03	0,39
D (Velocidade) ⁷	0,04	1	0,04	0,33
AB ⁸	0,00	1	0,0004	0,91
AC	0,00	1	0,0012	0,86
AD	0,01	1	0,01	0,70
BC	0,00	1	0,00	0,82
BD	0,02	1	0,02	0,45
CD	0,01	1	0,01	0,55
Residual	0,03	1	0,03	
Total	0,16	5		

¹Soma dos quadrados; ²graus de liberdade; ³quadrado médio; ⁴p = 0,05; ⁵Ordem da derivada; ⁶fator de escala; ⁷velocidade de varredura; ⁸interação entre fatores.

Tabela VII.II. Polinômio obtido para a superfície de resposta do LQ no DCC para o método de UVD e medidas da qualidade da regressão múltipla

Polinômio	
LQ = 0,56Ordem – 0,005Fator de Escala	
Medida	Valor
R ²	0,968
R ² ajustado	0,952
PRESS	0,406

Tabela VII.III. Análise de variância para o LQ no DCC do método de UVD.

Fonte	SQ	GL	QM	p
Modelo	2,36	2	1,18	< 0,001
Ordem	1,91	1	1,91	< 0,001
Fator de escala	0,45	1	0,45	< 0,001
Resíduo	0,21	10	0,02	
Falta de ajustamento	0,17	6	0,03	0,182
Erro puro	0,04	4	0,01	
Total	2,57	12		

Tabela VII.IV. Polinômio obtido para a superfície de resposta do DPR no DCC para o método de UVD e medidas da qualidade da regressão múltipla.

Polinômio	
DPR = -10,37+ 15,12Ordem – 0,002Fator de Escala – 3,38 Ordem ²	
Medida	Valor
R ²	0,991
R ² ajustado	0,988
PRESS	0,983

Tabela VII.V. Análise de variância para o DPR no DCC do método de UVD.

Fonte	SQ	GL	QM	p
Modelo	52,37	3	17,46	< 0,001
Ordem	15,36	1	15,36	< 0,001
Fator de Escala	0,08	1	0,08	0,008
Ordem ²	36,93	1	36,93	< 0,001
Residual	0,44	9	0,05	
Lack of Fit	0,29	5	0,06	0,353
Pure Error	0,15	4	0,04	
Cor Total	52,81	12		

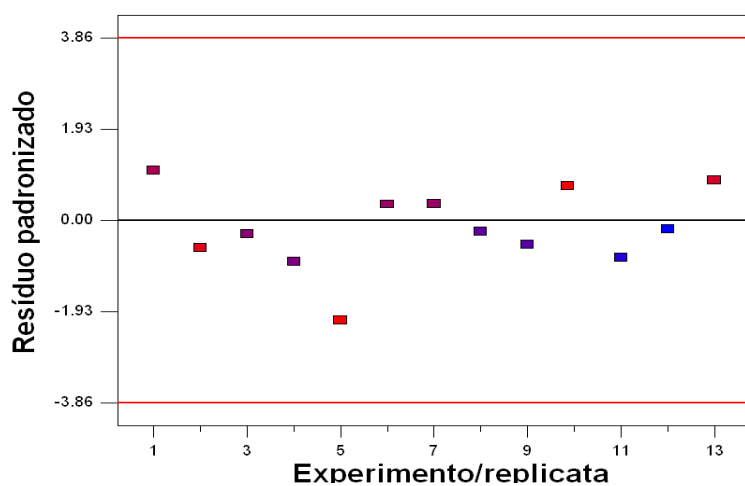


Figura VIII.I. Gráfico dos resíduos padronizados para o DCC da UVD com o LQ.

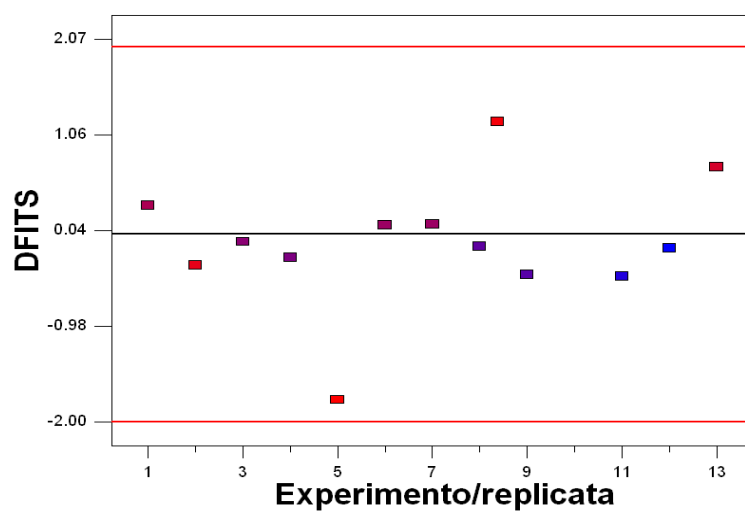


Figura VIII.II. Gráfico de $DFFITS$ para o DCC da UVD com o LQ.

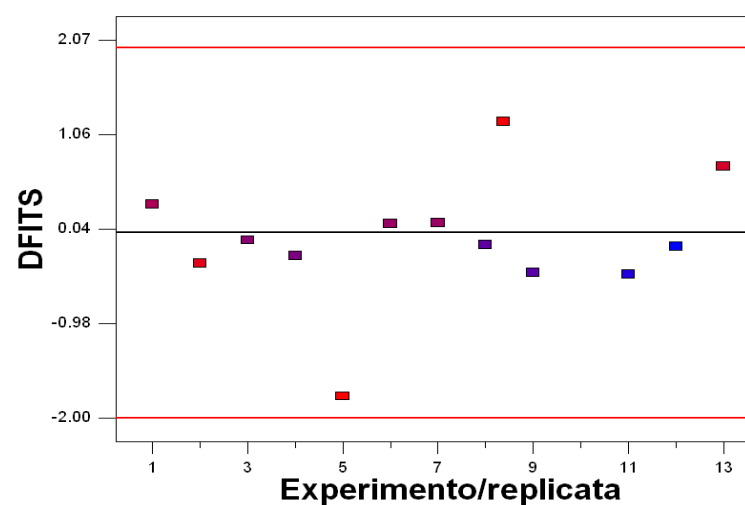


Figura VIII.III. Gráfico da distância de Cook para o DCC da UVD com o LQ.

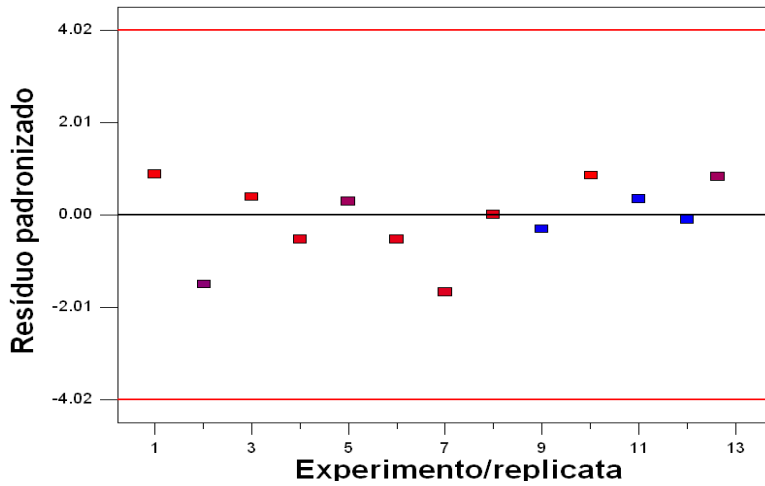


Figura VIII.IV. Gráfico dos resíduos padronizados para o DCC da UVD com o DPR.

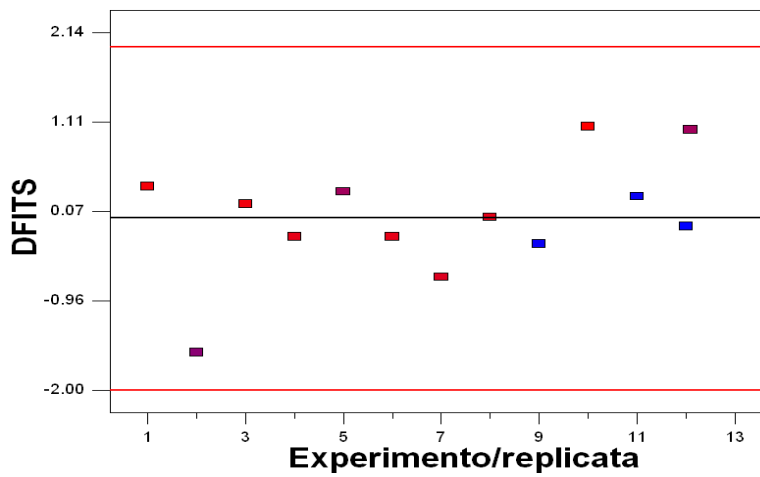


Figura VIII.V. Gráfico de *DFFITS* para o DCC da UVD com o DPR.

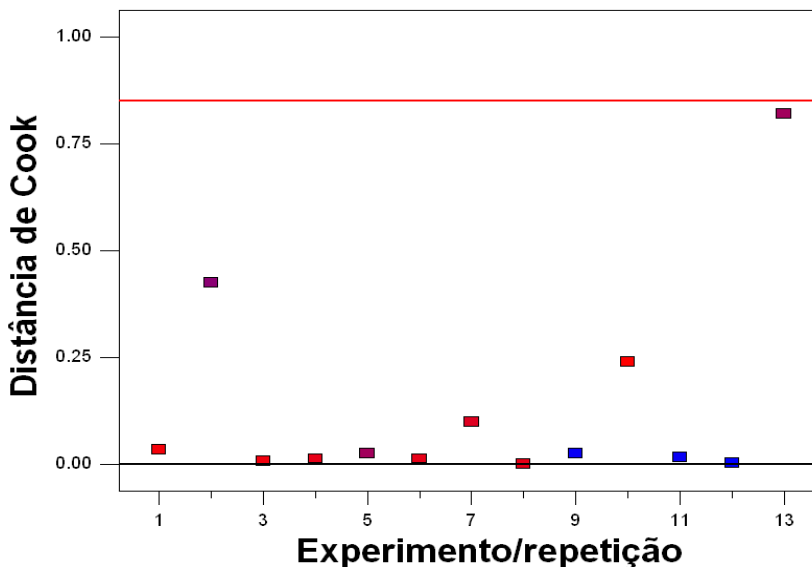


Figura VIII.VI. Gráfico da *distância de Cook* para o DCC da UVD com o DPR.