UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Desenvolvimento, validação e comparação de métodos analíticos para
determinação de bloqueadores neuromusculares derivados de
esteróides

Pedro López García

Tese para obtenção do grau de

DOUTOR

Orientador:

Profa. Dra. Erika Rosa Maria Kedor-Hackmann

São Paulo
2009

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

L864de López García, Pedro
Desenvolvimento, validação e comparação de métodos analíticos
para determinação de bloqueadores neuromusculares derivados de
esteróides / Pedro López García. -- São Paulo, 2009.
183p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Kedor-Hackmann, Erika Rosa Maria

1. Medicamento : Controle de qualidade 2. Cromatografia em
líquido de alta eficiência : Análise química : Farmacologia
3. Eletroforese capilar : Análise química : Farmacologia I. T. II.
Kedor-Hackmann, Erika Rosa Maria, orientador.

615.19015 CDD

Pedro López García

Desenvolvimento, validação e comparação de métodos analíticos para
determinação de bloqueadores neuromusculares derivados de
esteróides

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Erika Rosa Maria Kedor-Hackmann
orientador/presidente

Profa. Dra. Maria Inês Rocha Miritello Santoro
1º. examinador

Profa. Dra. María Segunda Aurora Prado
2º. examinador

Profa. Dra. Pierina Sueli Bonato
3º. examinador

Prof. Dr. Martin Steppe
4º. examinador

São Paulo, agosto de 2009.

*Meu eterno agradecimento a DEUS
que me deu sabedoria, perseverança e
preparou o caminho para poder
concluir esta etapa da minha vida.*

Aos meus pais e irmã

Pedro, Carmen e Leslie por terem

me ajudado em toda a vida

e por compreenderem a distância.

À minha esposa

Tatiane pela paciência, por todo seu

apoio e pelo seu carinho, muito obrigado.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Titular Dra. Erika Rosa Maria Kedor-Hackmann, pela oportunidade, constante colaboração, incentivo e por ter acreditado no projeto de pesquisa.

À Prof^a. Titular Dra. Maria Inês Rocha Miritello Santoro, pela valiosa colaboração, apoio e sugestões dadas ao longo de todo o trabalho.

Ao Prof^o. Catedrático Dr. Jose Luis Vilchez Quero, pela oportunidade, valiosa colaboração e grande amizade.

À Prof^a. Titular Dra. Elizabeth Igne Ferreira, pelo constante apoio e colaboração.

Aos Prof^{os}. Jorge S. Martins, Anil K. Singh e Maria S. A. Prado, pelas sugestões no transcorrer do trabalho.

À Prof^a. Titular Dra. Marina Tavares, pelas sugestões e pela oportunidade cedida no seu grupo de pesquisa.

A Elizabete Paiva, Jorge Lima, Regina Maura, Elaine Ychico, Iria da Silva, Charles Brito, Kátia, Raquel, Leila Bonadio, pela colaboração, atenção em todos os trâmites e documentações.

Aos meus colegas, Fabio Pereira Gomes, Angel Gaona Galdos, Renata Soares, Ivani Batista, Cibele Lima, Helena Yano, Helen Dutra, Vanessa Tavares, Mariana Mandelli, Daniela Patto e Marcel Alves.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro concedido no desenvolvimento da pesquisa.

Ao Programa de Mobilidade Internacional – Santander (2008) pelo apoio financeiro concedido no estágio na Universidad de Granada, España.

Ao Grupo de Investigación “Química Analítica y Ciencias de la Vida” de la Universidad de Granada, España.

À família Rodrigues Ramos, Angelina Nascimento, Maria José Ribeiro, Paulo Okura e Igreja Batista Philadelphia.

RESUMO

Os relaxantes neuromusculares não despolarizantes são fármacos indispensáveis nos procedimentos cirúrgicos que requerem intubação endotraqueal, visto que diminuem o tônus muscular. Quimicamente são divididos em derivados isoquinolínicos e derivados de esteróides, esses últimos com maior aplicação clínica e comercialização no Brasil. Assim sendo, é importante a validação de métodos analíticos para o controle de qualidade com alternativas confiáveis que garantam sua eficácia e segurança.

Os brometos de vecurônio, de pancurônio e de rocurônio são fármacos relaxantes neuromusculares não despolarizantes derivados de esteróides. As propriedades farmacológicas destes fármacos são significativamente diferentes entre si, porém, as propriedades químicas são bastante similares.

Na presente pesquisa foram desenvolvidos e validados métodos analíticos de separação (cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar) para cada fármaco. Estes métodos foram aplicados a medicamentos comercializados no Brasil. Para todos os métodos cromatográficos foi utilizada uma coluna amino devido a seu caráter polar. Em função da baixa absorção dos três fármacos na região ultravioleta, os métodos eletroforéticos foram aplicados com detecções indiretas utilizando substâncias cromóforas.

Comparando-se as técnicas utilizadas para determinação dos fármacos nos medicamentos isoladamente, não houve diferença significativa com nível de confiança de 95,0%. Nos testes de hipótese aplicados (*F-Snedecor* e *t-Student*), não foram observadas diferenças na precisão (variâncias) e no valor encontrado dos fármacos contidos nas amostras estudadas (comparação de duas médias).

ABSTRACT

The non-depolarizing neuromuscular relaxant drugs are essential in surgical procedures requiring endotracheal intubation, as they decrease muscle tonics. These drugs are chemically divided in isoquinolines derivatives and steroid derivatives, this latter group, with greater clinical application and commercialization in Brazil. Therefore, the study and validation of analytical methods are important for quality control with reliable alternatives to ensure their effectiveness and safety.

The vecuronium, pancuronium and rocuronium bromides are steroid derivatives presenting non-depolarizing neuromuscular relaxant action. Pharmacological properties of these drugs differ significantly, however, its chemical properties are quite similar.

In this research, analytical separation methods (high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis), for each drug, were developed and fully validated. The methods were applied to pharmaceutical formulations commercialized in Brazil. For all chromatographic methods, an amino column was used, due to its polar characteristics. Due to the low absorption of the three drugs in the ultraviolet region, electrophoretic methods has been applied with indirect detection using chromophoric substances.

When comparing both techniques used for quantitative determination of these drugs in pharmaceutical products, no significant difference was observed using a confidence level of 95.0%. By applying hypothesis tests (*F-Snedecor* and *t-Student*), it was not observed difference in precision (variance) and in the found amount of drugs contained in the selected samples (comparison of two means).

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 Historia dos bloqueadores (relaxantes) musculares não-despolarizantes	3
2.2 Mecanismo de ação dos bloqueadores musculares não-despolarizantes	4
2.3 Brometo de vecurônio	5
2.3.1 Metodologias analíticas para determinação de brometo de vecurônio.....	6
2.4 Brometo de pancurônio	7
2.4.1 Metodologias analíticas para determinação de brometo de pancurônio	7
2.5 Brometo de rocurônio	8
2.5.1 Metodologias analíticas para determinação de brometo de rocurônio	9
3. OBJETIVOS	10
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
4.1 Material e métodos para determinação de brometo de vecurônio.....	11
4.1.1 Reagentes, solventes e soluções.....	11
4.1.2 Substâncias empregadas como padrão	11
4.1.3 Amostras	12
4.1.4 Placebo	12
4.1.5 Equipamentos	12
4.1.6 Caracterização da matéria-prima de brometo de vecurônio.....	13

4.1.6.1 Faixa de fusão.....	13
4.1.6.2 Espectrometria no infravermelho.....	13
4.1.7 Desenvolvimento do método cromatográfico para determinação quantitativa de brometo de vecurônio.....	14
4.1.8 Validação do método analítico para determinação quantitativa de brometo de vecurônio por cromatografia líquida de alta eficiência.....	17
4.1.8.1 Conformidade do sistema.....	17
4.1.8.2 Seletividade/especificidade	17
4.1.8.3 Linearidade.....	18
4.1.8.4 Limite de detecção e limite de quantificação	18
4.1.8.5 Repetibilidade e precisão intermediária.....	19
4.1.8.6 Exatidão	20
4.1.8.7 Robustez	21
4.1.8.8 Condições de estresse para formação de produtos de degradação	22
4.1.9 Desenvolvimento do método eletroforético para determinação quantitativa de brometo de vecurônio.....	23
4.1.10 Validação do método analítico para determinação quantitativa de brometo de vecurônio por eletroforese capilar	27
4.1.10.1 Conformidade do sistema.....	27
4.1.10.2 Seletividade/especificidade	27
4.1.10.3 Linearidade.....	28
4.1.10.4 Limite de detecção e limite de quantificação	28
4.1.10.5 Repetibilidade e precisão intermediária.....	29
4.1.10.6 Exatidão	30
4.1.10.7 Robustez	31
4.1.10.8 Condições de estresse para formação de produtos de degradação	33
4.2 Material e método para determinação de brometo de pancurônio	33
4.2.1 Reagentes, solventes e soluções.....	33
4.2.2 Substâncias empregadas como padrão	34

4.2.3 Amostras	34
4.2.4 Placebo	34
4.2.5 Equipamentos	34
4.2.6 Caracterização da matéria-prima de brometo de pancurônio.....	35
4.2.6.1 Faixa de fusão.....	35
4.2.6.2 Espectrometria no infravermelho.....	36
4.2.7 Desenvolvimento do método cromatográfico para determinação quantitativa de brometo de pancurônio	36
4.2.8 Validação do método analítico para determinação quantitativa de brometo de pancurônio por cromatografia líquida de alta eficiência	39
4.2.8.1 Conformidade do sistema.....	39
4.2.8.2 Seletividade/especificidade	39
4.2.8.3 Linearidade.....	40
4.2.8.4 Limite de detecção e limite de quantificação	40
4.2.8.5 Repetibilidade e precisão intermediária.....	41
4.2.8.6 Exatidão	41
4.2.8.7 Robustez	43
4.2.8.8 Condições de estresse para formação de produtos de degradação	45
4.2.9 Desenvolvimento do método eletroforético para determinação quantitativa de brometo de pancurônio	45
4.2.10 Validação do método analítico para determinação quantitativa de brometo de pancurônio por eletroforese capilar	47
4.2.10.1 Conformidade do sistema.....	47
4.2.10.2 Seletividade/especificidade	47
4.2.10.3 Linearidade.....	48
4.2.10.4 Limite de detecção e limite de quantificação	48
4.2.10.5 Repetibilidade e precisão intermediária.....	49
4.2.10.6 Exatidão	49
4.2.10.7 Robustez	51

4.2.10.8 Condições de estresse para formação de produtos de degradação	52
4.3 Material e métodos para determinação de brometo de rocurônio	53
4.3.1 Reagentes, solventes e soluções	53
4.3.2 Substâncias empregadas como padrão	54
4.3.3 Amostras	54
4.3.4 Placebo	54
4.3.5 Equipamentos	54
4.3.6 Caracterização da matéria-prima de brometo de rocurônio	55
4.3.6.1 Faixa de fusão.....	55
4.3.6.2 Espectrometria no infravermelho.....	55
4.3.7 Desenvolvimento do método cromatográfico para determinação quantitativa de brometo de rocurônio	54
4.3.8 Validação do método analítico para determinação quantitativa de brometo de pancurônio por cromatografia líquida de alta eficiência	58
4.3.8.1 Conformidade do sistema.....	58
4.3.8.2 Seletividade/especificidade	58
4.3.8.3 Linearidade.....	59
4.3.8.4 Limite de detecção e limite de quantificação	59
4.3.8.5 Repetibilidade e precisão intermediária.....	60
4.3.8.6 Exatidão	61
4.3.8.7 Robustez	62
4.3.8.8 Condições de estresse para formação de produtos de degradação	63
4.3.9 Desenvolvimento do método eletroforético para determinação quantitativa de brometo de rocurônio	64
4.3.10 Validação do método analítico para determinação quantitativa de brometo de rocurônio por eletroforese capilar.....	72
4.3.10.1 Conformidade do sistema.....	72
4.3.10.2 Seletividade/especificidade	72
4.3.10.3 Linearidade.....	73

4.3.10.4 Limite de detecção e limite de quantificação	73
4.3.10.5 Repetibilidade e precisão intermediária.....	74
4.3.10.6 Exatidão	74
4.3.10.7 Robustez	76
4.3.10.8 Condições de estresse para formação de produtos de degradação	77
 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	 79
 5.1 Resultados e discussão da caracterização da matéria-prima de brometo de vecurônio.....	 79
5.1.1 Faixa de fusão.....	79
5.1.2 Espectrometria no infravermelho.....	79
5.2 Resultados e discussão do método cromatográfico para determinação de brometo de vecurônio.....	80
5.2.1 Desenvolvimento do método analítico para determinação quantitativa de brometo de vecurônio através de cromatografia líquida de alta eficiência	80
5.2.2 Validação do método analítico para determinação quantitativa de brometo de vecurônio através de cromatografia líquida de alta eficiência	81
5.2.2.1 Conformidade do sistema.....	81
5.2.2.2 Seletividade/especificidade	82
5.2.2.3 Linearidade, limite de detecção e limite de quantificação.....	83
5.2.2.4 Repetibilidade e precisão intermediária.....	85
5.2.2.5 Exatidão	87
5.2.2.6 Robustez	88
5.2.2.7 Condições de estresse para formação de produtos de degradação	91
5.3 Resultados e discussão do método eletroforético para determinação de brometo de vecurônio.....	92
5.3.1 Desenvolvimento do método analítico para determinação quantitativa de brometo de vecurônio através de eletroforese capilar.....	92

5.3.2 Validação do método analítico para determinação quantitativa de brometo de vecurônio através de eletroforese capilar.....	92
5.3.2.1 Conformidade do sistema.....	92
5.3.2.2 Seletividade/especificidade	93
5.3.2.3 Linearidade, limite de detecção e limite de quantificação.....	94
5.3.2.4 Repetibilidade e precisão intermediária.....	97
5.3.2.5 Exatidão	99
5.3.2.6 Robustez	100
5.3.2.7 Condições de estresse para formação de produtos de degradação	102
5.4 Comparação entre os métodos cromatográfico e eletroforético	103
5.5 Resultados e discussão da caracterização da matéria-prima de brometo de pancurônio.....	105
5.5.1 Faixa de fusão.....	105
5.5.2 Espectrometria no infravermelho.....	105
5.6 Resultados e discussão do método cromatográfico para determinação de brometo de pancurônio	106
5.6.1 Desenvolvimento do método analítico para determinação quantitativa de brometo de pancurônio através de cromatografia líquida de alta eficiência.....	106
5.6.2 Validação do método analítico para determinação quantitativa de brometo de pancurônio através de cromatografia líquida de alta eficiência.....	107
5.6.2.1 Conformidade do sistema.....	107
5.6.2.2 Seletividade/especificidade	108
5.6.2.3 Linearidade, limite de detecção e limite de quantificação.....	109
5.6.2.4 Repetibilidade e precisão intermediária.....	111
5.6.2.5 Exatidão	113
5.6.2.6 Robustez	114
5.6.2.7 Condições de estresse para formação de produtos de degradação	116
5.7 Resultados e discussão do método eletroforético para determinação de brometo de pancurônio.....	117

5.7.1 Desenvolvimento do método analítico para determinação quantitativa de brometo de pancurônio através de eletroforese capilar	117
5.7.2 Validação do método eletroforético para determinação quantitativa de brometo de pancurônio através de eletroforese capilar.....	117
5.7.2.1 Conformidade do sistema.....	117
5.7.2.2 Seletividade/especificidade	118
5.7.2.3 Linearidade, limite de detecção e limite de quantificação.....	119
5.7.2.4 Repetibilidade e precisão intermediária.....	122
5.7.2.5 Exatidão	124
5.7.2.6 Robustez	124
5.7.2.7 Condições de estresse para formação de produtos de degradação	125
5.8 Comparação entre os métodos cromatográfico e eletroforético	126
5.9 Resultados e discussão da caracterização da matéria-prima de brometo de rocurônio	128
5.9.1 Faixa de fusão.....	128
5.9.2 Espectrometria no infravermelho.....	128
5.10 Resultados e discussão do método eletroforético para determinação de brometo de rocurônio	129
5.10.1 Desenvolvimento do método analítico para determinação quantitativa de brometo de rocurônio através de cromatografia líquida de alta eficiência.....	129
5.10.2 Validação do método analítico para determinação quantitativa de brometo de rocurônio através de cromatografia líquida de alta eficiência.....	130
5.10.2.1 Conformidade do sistema.....	130
5.10.2.2 Seletividade/especificidade	131
5.10.2.3 Linearidade, limite de detecção e limite de quantificação.....	131
5.10.2.4 Repetibilidade e precisão intermediária.....	134
5.10.2.5 Exatidão	136
5.10.2.6 Robustez	136
5.10.2.7 Condições de estresse para formação de produtos de degradação	140

5.11 Resultados e discussão do método eletroforético para determinação de brometo de rocurônio	141
5.11.1 Desenvolvimento do método analítico para determinação quantitativa de brometo de rocurônio através de eletroforese capilar	141
5.11.2 Validação do método eletroforético para determinação quantitativa de brometo de rocurônio através de eletroforese capilar	141
5.11.2.1 Conformidade do sistema.....	141
5.11.2.2 Seletividade/especificidade	142
5.11.2.3 Linearidade, limite de detecção e limite de quantificação.....	143
5.11.2.4 Repetibilidade e precisão intermediária.....	146
5.11.2.5 Exatidão	147
5.11.2.6 Robustez	148
5.11.2.7 Condições de estresse para formação de produtos de degradação	150
5.12 Comparação entre os métodos cromatográfico e eletroforético	151
6. CONCLUSÕES	153
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	154
ANEXOS	168

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Receptores nicotínicos colinérgicos. Sítios da união das subunidades alfa.

Figura 2. Terminação pós-sináptica da placa motora.

Figura 3. Estrutura química do brometo de vecurônio.

Figura 4. Estrutura química do brometo de pancurônio.

Figura 5. Estrutura química do brometo de rocurônio.

Figura 6. Espectro de absorção no infravermelho do brometo de vecurônio em pastilha de KBr.

Figura 7. Sobreposição de cromatogramas da seletividade do método para determinação de brometo de vecurônio.

Figura 8. Curva analítica de brometo de vecurônio obtida através de cromatografia líquida de alta eficiência.

Figura 9. Cromatograma representativo de solução padrão de besilato de anlodipino e solução padrão de brometo de vecurônio.

Figura 10. Avaliação da faixa linear de brometo de vecurônio realizada por cromatografia líquida de alta eficiência.

Figura 11. Cromatograma representativo de uma amostra contendo brometo de vecurônio.

Figura 12. Representação gráfica dos efeitos na avaliação da robustez do método cromatográfico para determinação de brometo de vecurônio obtendo como resposta a resolução.

Figura 13. Superfície de resposta na avaliação da robustez do método cromatográfico para determinação de brometo de vecurônio.

Figura 14. Cromatograma obtido a partir da degradação forçada da matéria-prima de brometo de vecurônio.

Figura 15. Seletividade do método eletroforético. Sobreposição de eletroferogramas de soluções placebo de brometo de vecurônio.

Figura 16. Eletroferograma representativo das soluções padrão de brometo de vecurônio e brometo de tetrabutilamônio.

Figura 17. Curva analítica de brometo de vecurônio através de eletroforese capilar.

Figura 18. Representação gráfica da faixa linear do brometo de vecurônio no método eletroforético.

Figura 19. Eletroferograma representativo de uma amostra contendo brometo de vecurônio.

Figura 20. Gráfico de Pareto dos efeitos no teste de robustez pelo método eletroforético para determinação de brometo de vecurônio.

Figura 21. Eletroferograma de uma solução de brometo de vecurônio hidrolisada misturada com uma solução de brometo de vecurônio não hidrolisada.

Figura 22. Representação gráfica da comparação dos dois métodos analíticos propostos para determinação de brometo de vecurônio em medicamentos.

Figura 23. Espectro de absorção no infravermelho do brometo de pancurônio em pastilha de KBr.

Figura 24. Seletividade do método. Sobreposição de cromatogramas da solução placebo de brometo de pancurônio.

Figura 25. Curva analítica de brometo de pancurônio por cromatografia líquida de alta eficiência.

Figura 26. Cromatograma representativo de solução padrão de brometo de pancurônio.

Figura 27. Avaliação da faixa linear de brometo de pancurônio por cromatografia líquida de alta eficiência.

Figura 28. Cromatograma representativo de uma amostra de brometo de pancurônio.

Figura 29. Superfície de resposta para o estudo da robustez do método cromatográfico para determinação de brometo de pancurônio.

Figura 30. Representação gráfica dos efeitos do estudo de robustez para o método cromatográfico para determinação de brometo de pancurônio.

Figura 31. Cromatograma de uma solução de brometo de pancurônio hidrolisada em meio ácido.

Figura 32. Seletividade do método eletroforético para determinação de brometo de pancurônio.

Figura 33. Eletroferograma de solução padrão de trietilamina (I) e brometo de pancurônio (II).

Figura 34. Curva analítica de brometo de pancurônio por eletroforese capilar. Figura 35. Avaliação da faixa linear de brometo de pancurônio por eletroforese capilar.

Figura 36. Eletroferograma representativo de uma amostra de brometo de pancurônio.

Figura 37. Gráfico de Pareto dos efeitos no teste de robustez pelo método eletroforético para determinação de brometo de pancurônio.

Figura 38. Representação gráfica da comparação dos dois métodos analíticos propostos para determinação de brometo de pancurônio em medicamentos.

Figura 39. Espectro de absorção no infravermelho do brometo de rocurônio em pastilha de KBr.

Figura 40. Sobreposição de cromatogramas da seletividade do método para determinação de brometo de rocurônio.

Figura 41. Curva analítica de brometo de rocurônio obtida através de cromatografia líquida de alta eficiência.

Figura 42. Cromatograma representativo de solução padrão de brometo de rocurônio e solução padrão de ácido salicílico.

Figura 43. Avaliação da faixa linear de brometo de rocurônio realizada por cromatografia líquida de alta eficiência.

Figura 44. Cromatograma representativo de uma amostra contendo brometo de rocurônio.

Figura 45. Representação gráfica de efeitos de cada fator na avaliação da robustez do método cromatográfico para determinação de brometo de rocurônio sendo a resposta a resolução (Rs_1).

Figura 46. Representação gráfica de efeitos de cada fator na avaliação da robustez do método cromatográfico para determinação de brometo de rocurônio sendo a resposta a resolução (Rs_2).

Figura 47. Resposta de superfície na avaliação da robustez do método cromatográfico para determinação de brometo de rocurônio obtendo como resultado Rs_1 e mantendo constante a porcentagem de acetonitrila.

Figura 48. Resposta de superfície na avaliação da robustez do método cromatográfico para determinação de brometo de rocurônio obtendo como resultado Rs_2 e mantendo constante a temperatura.

Figura 49. Cromatograma obtido na degradação forçada da matéria-prima de brometo de rocurônio.

Figura 50. Seletividade do método eletroforético para determinação de brometo de rocurônio.

Figura 51. Eletroferograma de solução padrão de brometo de rocurônio e tetrabutilamônio.

Figura 52. Curva analítica de brometo de rocurônio por eletroforese capilar.

Figura 53. Representação gráfica da faixa linear para o brometo de rocurônio por eletroforese capilar.

Figura 54. Eletroferograma de uma amostra de medicamento contendo brometo de rocurônio.

Figura 55. Gráfico de Pareto dos efeitos no teste de robustez pelo método eletroforético para determinação de brometo de rocurônio.

Figura 56. Eletroferograma obtido na degradação forçada da matéria-prima de brometo de rocurônio.

Figura 57. Representação gráfica da comparação dos dois métodos analíticos propostos para determinação de brometo de rocurônio em medicamentos.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sistemas cromatográficos avaliados para determinação de brometo de vecurônio em medicamentos.

Tabela 2. Preparação das soluções padrão e soluções amostra para os ensaios de recuperação na determinação de brometo de vecurônio através de cromatografia líquida de alta eficiência.

Tabela 3. Fatores, níveis e matriz para os testes de robustez na determinação de brometo de vecurônio por cromatografia líquida de alta eficiência.

Tabela 4. Sistemas eletroforéticos avaliados para determinação de brometo de vecurônio em medicamentos.

Tabela 5. Preparação das soluções padrão e soluções amostra para os ensaios de recuperação na determinação de brometo de vecurônio através de eletroforese capilar.

Tabela 6. Fatores, níveis e matriz para os testes de robustez na determinação de brometo de vecurônio através de eletroforese capilar.

Tabela 7. Sistemas cromatográficos avaliados para determinação de brometo de pancurônio em medicamentos.

Tabela 8. Preparação das soluções padrão e soluções amostra para os ensaios de recuperação na determinação de brometo de pancurônio através de cromatografia líquida de alta eficiência.

Tabela 9. Fatores, níveis e matriz de tratamento para o teste de robustez na determinação de brometo de pancurônio através de cromatografia líquida de alta eficiência.

Tabela 10. Sistemas eletroforéticos avaliados para determinação de brometo de pancurônio em medicamentos.

Tabela 11. Preparação das soluções padrão e soluções amostra para os ensaios de recuperação na determinação de brometo de pancurônio através de eletroforese capilar.

Tabela 12. Fatores, níveis e matriz para os testes de robustez na determinação de brometo de pancurônio através de eletroforese capilar.

Tabela 13. Sistemas cromatográficos avaliados para determinação de brometo de rocurônio em medicamentos.

Tabela 14. Preparação das soluções padrão e soluções amostra para os ensaios de recuperação na determinação de brometo de rocurônio através de cromatografia líquida de alta eficiência.

Tabela 15. Fatores, níveis e matriz para os testes de robustez na determinação de brometo de rocurônio por cromatografia líquida de alta eficiência.

Tabela 16. Sistemas eletroforéticos avaliados para determinação de brometo de rocurônio em medicamentos.

Tabela 17. Preparação das soluções padrão e soluções amostra para os ensaios de recuperação na determinação de brometo de rocurônio através de eletroforese capilar.

Tabela 18. Fatores, níveis e matriz para os testes de robustez na determinação de brometo de rocurônio através de eletroforese capilar.

Tabela 19. Resultados obtidos na determinação da faixa de fusão do brometo de vecurônio.

Tabela 20. Resultados obtidos no primeiro dia da validação do método cromatográfico para determinação de brometo de vecurônio.

Tabela 21. Resultados obtidos da curva analítica pelo método cromatográfico para determinação de brometo de vecurônio.

Tabela 22. Resultados obtidos na avaliação da repetibilidade e precisão intermediária para a determinação quantitativa de brometo de vecurônio através de cromatografia líquida de alta eficiência.

Tabela 23. Resultados obtidos na determinação da porcentagem de recuperação de solução padrão de brometo de vecurônio adicionada, através do método cromatográfico.

Tabela 24. Condições cromatográficas, níveis e resultados obtidos na determinação da robustez do método cromatográfico para determinação de brometo de vecurônio.

Tabela 25. Resultados obtidos no primeiro dia da validação do método eletroforético para determinação de brometo de vecurônio.

Tabela 26. Resultados obtidos da curva analítica através do método eletroforético para determinação de brometo de vecurônio.

Tabela 27. Resultados obtidos na avaliação da repetibilidade e precisão intermediária para a determinação quantitativa de brometo de vecurônio através de eletroforese capilar.

Tabela 28. Resultados obtidos na determinação da porcentagem de recuperação de solução padrão de brometo de vecurônio adicionada, através do método eletroforético.

Tabela 29. Condições eletroforéticas, níveis e resultados obtidos na determinação da robustez do método eletroforético para determinação de brometo de vecurônio.

Tabela 30. Valores obtidos para o teste F e t na comparação dos métodos analíticos propostos para a determinação de brometo de vecurônio em medicamentos.

Tabela 31. Resultados obtidos na determinação da faixa de fusão do brometo de pancurônio

Tabela 32. Resultados obtidos no primeiro dia da validação do método cromatográfico para determinação de brometo de pancurônio.

Tabela 33. Resultados obtidos da linearidade pelo método cromatográfico para determinação de brometo de pancurônio.

Tabela 34. Resultados obtidos na avaliação da repetibilidade e precisão intermediária para a determinação quantitativa de brometo de pancurônio através de cromatografia líquida de alta eficiência.

Tabela 35. Resultados obtidos na determinação da porcentagem de recuperação de solução padrão de brometo de pancurônio adicionada, através do método cromatográfico.

Tabela 36. Condições cromatográficas, níveis e resultados obtidos na determinação da robustez do método cromatográfico para a determinação quantitativa de brometo de pancurônio.

Tabela 37. Resultados obtidos no primeiro dia da validação do método eletroforético para determinação de brometo de pancurônio.

Tabela 38. Resultados obtidos da curva analítica para o brometo de pancurônio por eletroforese capilar.

Tabela 39. Resultados obtidos na avaliação da repetibilidade e precisão intermediária para a determinação quantitativa de brometo de pancurônio através de eletroforese capilar.

Tabela 40. Resultados obtidos na determinação da porcentagem de recuperação de solução padrão de brometo de pancurônio adicionada, através do método eletroforético.

Tabela 41. Valores obtidos para o teste F e t na comparação dos métodos analíticos propostos para a determinação de brometo de pancurônio em medicamentos.

Tabela 42. Resultados obtidos na determinação da faixa de fusão do brometo de rocurônio.

Tabela 43. Resultados obtidos no primeiro dia da validação do método cromatográfico para determinação de brometo de rocurônio.

Tabela 44. Resultados obtidos da linearidade pelo método cromatográfico para determinação de brometo de rocurônio.

Tabela 45. Resultados obtidos na avaliação da repetibilidade e precisão intermediária para a determinação quantitativa de brometo de rocurônio através de cromatografia líquida de alta eficiência.

Tabela 46. Resultados obtidos na determinação da porcentagem de recuperação de solução padrão de brometo de vecurônio adicionada, através do método cromatográfico.

Tabela 47. Condições cromatográficas, níveis e resultados obtidos na determinação da robustez do método cromatográfico para determinação de brometo de rocurônio.

Tabela 48. Resultados obtidos no primeiro dia da validação do método eletroforético para determinação de brometo de rocurônio.

Tabela 49. Resultados obtidos da curva analítica na determinação do brometo de rocurônio por eletroforese capilar.

Tabela 50. Resultados obtidos na avaliação da repetibilidade e precisão intermediária para a determinação quantitativa de brometo de rocurônio através de eletroforese capilar.

Tabela 51. Resultados obtidos na determinação da porcentagem de recuperação de solução padrão de brometo de rocurônio adicionada, através do método eletroforético.

Tabela 52. Condições eletroforéticas, níveis e resultados obtidos na determinação da robustez do método eletroforético para determinação de brometo de rocurônio.

Tabela 53. Valores obtidos para o teste F e t na comparação dos métodos analíticos propostos para a determinação de brometo de rocurônio em medicamentos.

RESUMO

Os bloqueadores (relaxantes) neuromusculares não despolarizantes são fármacos indispensáveis nos procedimentos cirúrgicos que requerem intubação endotraqueal, visto que diminuem o tônus muscular. Quimicamente são divididos em derivados isoquinolínicos e derivados de esteróides, esses últimos com maior aplicação clínica e comercialização no Brasil. Assim sendo, é importante a validação de métodos analíticos para o controle de qualidade ou alternativas confiáveis que garantam sua eficácia e segurança.

O brometo de vecurônio, brometo de pancurônio e brometo de rocurônio são fármacos relaxantes neuromusculares não despolarizantes derivados de esteróides, suas propriedades farmacológicas diferem significativamente, porém, suas propriedades químicas são bastante similares.

Na presente pesquisa foram desenvolvidos e completamente validados métodos analíticos de separação (cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar) para cada fármaco. Estes métodos foram aplicados a medicamentos comercializados no Brasil. Para todos os métodos cromatográficos foi utilizada uma coluna amino devido a seu caráter polar. Em função da baixa absorção dos três fármacos na região ultravioleta, os métodos eletroforéticos foram aplicados com detecções indiretas utilizando substâncias cromóforas.

Quando comparadas as técnicas utilizadas para determinação dos fármacos nos medicamentos isoladamente, não houve diferença significativa com um nível de confiança de 95,0% nos testes de hipótese aplicados (*F-Snedecor* e *t-Student*), quer dizer não diferem em precisão (variâncias) e no valor encontrado como conteúdo (comparação de duas médias), respectivamente.

ABSTRACT

The non-depolarizing neuromuscular relaxants drugs are essential in surgical procedures requiring endotracheal intubation, as reduced muscle tone. Are chemically divided into isoquinolines derivatives and derivatives of steroids, the latter with greater clinical application and commercialization in Brazil. It is important for validation of analytical methods for quality control or reliable alternatives to ensure their effectiveness and safety. The vecuronium bromide, pancuronium bromide and rocuronium bromide are not depolarizing neuromuscular relaxants drugs from steroids, their pharmacological properties differ significantly, however, its chemical properties are quite similar. In this research were developed and fully validated analytical methods of separation (high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis) for each drug. These methods were applied to drugs marketed in Brazil. For all chromatographic methods were used due to a column amino its polar character. In light of the low absorption of the three drugs in the ultraviolet, electrophoretic methods have been applied with indirect detection using chromophoric substances.

When comparing the techniques used for determination of drugs in medicine alone, no significant difference with a confidence level of 95.0% in hypothesis tests applied (F-Snedecor and t-Student), means do not differ in accuracy (variance) and the amount found as content (comparison of two means), respectively.

1. INTRODUÇÃO

Os fármacos bloqueadores neuromusculares são substâncias que provocam o relaxamento da musculatura voluntária. Uma vez que sua atividade é similar à do curare, são também chamados curariformes. Podem ser classificados em despolarizantes e não-despolarizantes. Estes últimos, por sua vez, são divididos em duas categorias químicas: derivados isoquinolínicos e derivados de esteróides. Os bloqueadores neuromusculares não-despolarizantes têm sua principal aplicação clínica como adjuvantes a anestésicos, com a finalidade de produzir relaxamento muscular prolongado durante cirurgias e para facilitar a endoscopia ou intubação endotraqueal. Entretanto, o brometo de pancurônio (bloqueador neuromuscular não-despolarizante derivado de esteróide) possui outra aplicação: é uma das três substâncias empregadas na pena de morte por injeção letal para provocar relaxamento profundo.

Estes fármacos interferem na transmissão na placa terminal neuromuscular e por tanto, não são fármacos ativos no sistema nervoso central. Competem com a acetilcolina pelos receptores colinérgicos da placa motora, mas são incapazes de efetuar a despolarização característica do neuroefetor natural. Estruturalmente são moléculas complexas, volumosas e parcialmente rígidas, tendo um ou dois átomos de nitrogênio quaternário.

Os fármacos utilizados na presente investigação são brometo de pancurônio, brometo de vecurônio e brometo de rocurônio, cada um deles em suas respectivas preparações farmacêuticas. Assim sendo, solução para injeção e pó liofilizado para injeção (brometo de vecurônio). Cada um destes fármacos apresenta características particulares na prática clínica, porém quimicamente são substâncias parecidas, hidrofílicas e sem grupos cromóforos.

O controle de qualidade físico-químico destes medicamentos é de vital importância, já que variações nas concentrações podem estabelecer riscos aos pacientes. Nesta pesquisa serão desafiadas amostras comercializadas no Brasil, especificamente os bloqueadores musculares com mecanismo de ação não-despolarizante da classe

dos derivados de esteróides. Com a finalidade de garantir a dosagem e pela escassa disponibilidade de trabalhos científicos a respeito, é necessário desenvolver e validar metodologias analíticas para determinações quantitativas que sejam simples, de baixo custo, de pouco impacto ambiental e que proporcionem resultados confiáveis, bem como métodos analíticos alternativos para os medicamentos que constam nos compêndios oficiais.

São propostas técnicas instrumentais de separação como a cromatografia líquida de alta eficiência e a eletroforese capilar. Para os métodos analíticos propostos e validados, as características de desempenho avaliadas foram: seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão intra-dia e inter-dia, exatidão, robustez, estresse da matéria-prima (degradação forçada para testes de especificidade).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Historia dos bloqueadores (relaxantes) musculares não-despolarizantes

Curare é um termo genérico para designar diversos venenos que os indígenas sul-americanos aplicavam em suas flechas para matar animais selvagens. A morte destes era consequência da paralisia do músculo estriado. A composição do curare se manteve por muito tempo em segredo e somente era confiada aos bruxos tribais. Após descobrimento do continente americano, Sir Walter Raleigh e outros exploradores e botânicos se interessaram pelo curare e mais tarde, no século XVI, foram enviadas à Europa amostras dos preparados dos nativos para investigação. Em 1805, Von Humboldt seleciona o curare como tema central de investigações de campo. No continente sul-americano, os curares da Amazônia derivavam de diversas espécies de *Strychnos*, sendo que a maior parte destas contém principalmente alcalóides quaternários de bloqueio neuromuscular (HARDMAN, 1996).

A aplicação do curare na clínica moderna remonta à década de 1940, na qual o pesquisador Gill (GRIFFITH, 1942) realizou um estudo prolongado e preciso dos métodos nativos de preparação. Este cientista levou para os Estados Unidos da América uma quantidade suficiente para permitir as investigações químicas e farmacológicas. Assim sendo, a primeira aplicação clínica do curare purificado foi em 1942 por Griffith e Johnson (GRIFFITH, 1942).

Um grande avanço para a anestesiologia foi a introdução do brometo de pancurônio em 1967 por Baird e Reid (BAIRD, 1967). Após o grande aumento no uso dos relaxantes musculares não-despolarizantes, em 1975 havia já uma necessidade caracterizada pelo rápido início e curta ou intermediária duração de ação (SAVARESE, 1975). Um dos primeiros novos fármacos que apareceria com duração intermediária foi o brometo de vecurônio que, em 1990, tinha-se tornado um dos mais frequentemente utilizados no Reino Unido e nos Estados Unidos da América (McKENZIE, 2000). Desde então, outros novos fármacos foram investigados para aplicação clínica. Entre eles encontra-se o brometo de rocurônio, o qual é caracterizado por um rápido início de ação e também curta duração de ação (MEAKIN, 2001).

2.2 Mecanismo de ação dos bloqueadores musculares não-despolarizantes

Normalmente os impulsos que alcançam a terminação nervosa produzem liberação de acetilcolina (neurotransmissor muscular), que alcança a placa motora e se une a receptores específicos localizados na membrana do músculo, causando um fluxo de sódio e potássio (despolarização) que logo se traduz em contração muscular. A restauração do tônus muscular (repolarização) se produz através de uma combinação entre a recaptação de acetilcolina e sua degradação por parte de uma enzima específica localizada na placa motora: a *acetil-colina acetil-hidrolase*. Uma segunda enzima inespecífica que circula livremente pelo plasma, a *acilcolina acil-hidrolase* metaboliza a acetilcolina e as moléculas similares que entram na circulação. Os relaxantes musculares não-despolarizantes competem com a acetilcolina pelos sítios da união localizados nas duas subunidades alfa dos receptores nicotínicos colinérgicos (Figura 1), que se encontram principalmente em nível pós-sináptico da placa motora (Figura 2).

Figura 1. Receptores nicotínicos colinérgicos. Sítios da união das subunidades alfa. (fonte: Lee, CH., Pharmacology & Therapeutics, v.98, p.143, 1993).

Figura 2. Terminação pós-sináptica da placa motora. (fonte: Lee, CH., Pharmacology & Therapeutics, v.98, p.143, 1993).

2.3 Brometo de vecurônio

O brometo de vecurônio (Figura 3) desenvolvido por SAVAGE em 1980 é um bloqueador neuromuscular de origem sintética, derivado esteroide com um radical similar à acetilcolina e com um único nitrogênio. É um fármaco de duração intermediária, sendo sua principal vantagem a estabilidade hemodinâmica, que devido a modificações do seu antecessor, o pancurônio, conferiu-lhe perda total do efeito vagolítico e maior duração do efeito farmacológico. O medicamento é comercializado em ampolas como pó liofilizado de 4 e 10 mg. Ao ser dissolvido no meio aquoso, obtém-se uma solução isotônica de pH 4, que pode ser utilizada só ou associada a soluções salinas, glicosadas ou ringer lactato. Após dissolução, o medicamento pode ser usado em até 24 hrs.

Figura 3. Estrutura química do brometo de vecurônio.

O brometo de vecurônio é um fármaco hidrofílico, porém, é mais lipofílico que o brometo de pancurônio, devido à existência de um único nitrogênio quaternário e não dois como no segundo caso. Esta característica proporciona maior penetração nos tecidos lipídicos, alterando sua eliminação, aumentando assim sua seletividade relaxante, diminuindo o tempo de ação e escasso efeito acumulativo (WEINDLAMAYR-GOETTEL, 1993).

2.3.1 Metodologias analíticas para determinação de brometo de vecurônio

Com o aparecimento do brometo de vecurônio na terapêutica no início da década dos anos oitenta, também foram propostas metodologias analíticas para a sua determinação. PAANAKKER e VAN DE LAAR, 1980, desenvolveram um método analítico através de cromatografia de alta eficiência em fase normal com detecção UV a 215 nm. PAANAKKER, 1987, propôs um método analítico para análise em plasma, também utiliza técnica cromatográfica e uma extração pós-coluna por pareador iônico com detecção fluorimétrica. FURUTA, 1988, utilizou a cromatografia em fase gasosa com detector sensível a nitrogênio, pela primeira vez, para análise de brometo de vecurônio. DUCHARME, 1992, também utilizou cromatografia para analisar amostras de plasma humano, porém, a detecção empregada é eletroquímica, possibilitando assim a determinação de todos os metabólitos. WITHINGTON, 2000, realizou experiências com amostras biológicas provenientes

de crianças com doenças cardíacas. As técnicas hífenizadas (cromatografia e espectrometria de massas) foram utilizadas para determinação de brometo de vecurônio e brometo de rocurônio simultaneamente em plasma humano (GUTTECK, 2000). USUI, 2006, desenvolveu um método analítico através do qual determinou simultaneamente brometo de pancurônio e brometo de vecurônio conjuntamente com seus produtos relacionados por cromatografia acoplada a espectrometria de massas.

2.4 Brometo de pancurônio

O brometo de pancurônio (Figura 4) é um bloqueador neuromuscular não-despolarizante de origem sintética. Foi sintetizado pela primeira vez pelo grupo de Savage em 1964 com a ajuda da companhia farmacêutica Organon (McKENZIE, 2000). Este fármaco substituiu a d-tubocuranina que dominava o mercado desde 1942 e foi o primeiro dos esteróides utilizado na clínica. A molécula foi sintetizada pela união de dois fragmentos similares à acetilcolina a um anel esteróide rígido de androstano de 17 átomos de carbono (BROWN, 1997). O medicamento é comercializado na forma de solução estéril para injeção intravenosa.

Figura 4. Estrutura química do brometo de pancurônio.

2.4.1 Metodologias analíticas para determinação de brometo de pancurônio

Desde sua utilização na clínica, várias são as estratégias para a determinação de brometo de pancurônio em medicamentos e amostras biológicas. A cromatografia em camada delgada foi uma das primeiras técnicas a serem utilizadas para a sua determinação juntamente com seus metabólitos (KINGET, 1976; TANAKA, 1974; MICHOEL, 1976; MICHOEL, 1977; WINGARD, 1979). A cromatografia líquida de alta eficiência é uma das técnicas mais empregadas para a determinação de brometo de pancurônio, sendo utilizadas as mais diversas formas de detecção e estratégias de análise (GAZDAG, 1985; GAZDAG, 1985; GAZDAG, 1991; ZECEVIC, 2002; CRIMELE, 2003). Outras técnicas também têm sido utilizadas (URSULA, 1973; AUBECK, 1990; STANKOV-JOVANOVIĆ, 2006). Pelo fato de ser uma substância utilizada na injeção letal, vários casos de suicídio têm sido descobertos após análise de tecidos ou outras matrizes biológicas (BRIGLIA, 1990; KŁYS, 2000; KAŁA, 2004; ANDRESEN, 2005; ANDRESEN, 2005).

2.5 Brometo de rocurônio

O brometo de rocurônio (Figura 5) é um bloqueador neuromuscular não-despolarizante também de origem sintética, está relacionado quimicamente com o brometo de vecurônio e brometo de pancurônio. Possui uma duração de ação similar à de brometo de vecurônio, porém, o tempo de início da ação é significativamente menor, característica muito útil nas emergências clínicas.

Figura 5. Estrutura química do brometo de rocurônio.

O medicamento é comercializado na forma de solução estéril de 5 e 10 mL contendo 50 e 100 mg, respectivamente. Uma característica diferencial deste fármaco é a ausência do radical similar à acetilcolina no anel A do núcleo esteroideal do brometo de vecurônio e brometo de pancurônio, fato que o faz estável em soluções aquosas (MARSHALL, 1995; BEVAN, 1995; BOM, 2007).

2.5.1 Metodologias analíticas para determinação de brometo de rocurônio

As técnicas de separação (cromatografia) até a atualidade são as mais empregadas para a determinação do brometo de rocurônio nas mais diversas matrizes. A cromatografia líquida de alta eficiência, com diferentes sistemas de detecção e fases estacionárias e móveis, é uma das técnicas mais amplamente utilizadas (KLEEF, 1993; FARENC, 2001; EZZINE, 2005; BŁAŻEWICZ, 2007). A cromatografia em fase gasosa é também amplamente usada, porém, requer estágios de derivatização do fármaco para torná-lo mais estável a altas temperaturas (PROBST, 1997; GAO, 2001; GAO, 2002). Outras técnicas de análise também têm sido utilizadas (EZZINE, 2004).

3. OBJETIVOS

- Desenvolver métodos analíticos simples, rápidos e confiáveis para determinação de fármacos bloqueadores neuromusculares derivados de esteróides, utilizando técnicas de separação (cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar).
- Validar as metodologias analíticas previamente desenvolvidas, segundo critérios da “International Conference on Harmonization (ICH)”, a “United States Pharmacopeia (USP)”, a “Association of Official Analytical Chemists (AOAC)” e a RE 899 (ANVISA).
- Aplicar os métodos validados em amostras comercializadas no Brasil.
- Comparar os resultados obtidos na determinação do teor através das metodologias analíticas pelo método análise de variância (ANOVA).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material e métodos utilizados na determinação do brometo de vecurônio

4.1.1 Reagentes, solventes e soluções

- Ácido cítrico monohidrato grau analítico (Merck®).
- Manitol grau analítico (Fisher®).
- Fosfato de sódio dibásico anidro grau analítico (J.T. Baker®).
- Fosfato de sódio monobásico monohidratado grau analítico (J.T. Baker®).
- Hidróxido de sódio grau analítico (Merck®).
- Ácido ortofosforico grau analítico (Merck®).
- Acetonitrila grau cromatográfico (Merck®).
- Metanol grau cromatográfico (Merck®).
- Água destilada e ultra pura Milli-Q® Plus®
- Cloreto de sódio grau analítico (Merck®).
- Sulfato de quinina diidratado (Avocado Organics®).
- Ácido clorídrico grau analítico (Merck®).
- Ácido acético glacial grau analítico (Panreac®).
- Ácido fórmico grau analítico (Panreac®).
- Brometo de 1-hexadecilpiridínio (Sigma®).
- DL-Fenilalanina (Sigma®).

4.1.2 Substâncias empregadas como padrão

- Brometo de vecurônio matéria-prima (lote: 11018/2005), (101,3% de pureza).
- Besilato de anlodipino (lote: AB2182LT05), (100.1% de pureza).
- Brometo de tetrabutilamônio (Sigma® lote: 10K58794), (99,9% de pureza).

4.1.3 Amostras

- Amostra A
Pó liofilizado injetável para administração endovenosa de brometo de vecurônio 4 mg (frasco), fabricante “A”.
- Amostra B
Pó liofilizado injetável para administração endovenosa de brometo de vecurônio 4 mg (frasco), fabricante “B”.
- Amostra C
Pó liofilizado injetável para administração endovenosa de brometo de vecurônio 10 mg (frasco), fabricante “B”.

4.1.4 Placebo

- Foi preparada uma solução placebo para o desenvolvimento, bem como, para testes de pesquisa de interferentes no método analítico. A composição da solução placebo foi baseada nas bulas das duas amostras comercializadas, bem como, na descrita na patente “European Patent EP0682522”. A composição é:

Ácido cítrico monoidrato	25 mg
Fosfato de sódio dibásico	20 mg
Manitol	95 mg
Água bidestilada q.s.p.	10,0 mL

pH 4,0 ajustado com hidróxido de sódio ou ácido fosfórico.

4.1.5 Equipamentos

- Cromatógrafo a líquido Shimadzu® SPD-10AV VP com detector PDA (“photo diode array detector”), sistema controlador SLC-10A VP, injeção automática e sistema desgaseificador DGU-14A. Integração controlada por software Class VP v.5.91 Shimadzu®.

- Equipamento de eletroforese capilar Hewlett Packard ^{3D}CE. Integração controlada por software 3D-CE Chem Station, Rev. A.10.02[1757].
- Espectrofotômetro de infravermelho Bomem[®], modelo Michelson.
- Aparelho para determinação do ponto de fusão Stuart Scientific[®], modelo SMP1.
- Balança analítica Mettler Toledo[®], modelo AB 204.
- Balança analítica A & D[®], modelo GR-200-EC.
- Aparelho para obtenção de água ultra pura Millipore[®], marca Milli-Q[®] Plus.
- pH-metro digital Crison[®], modelo Micro-pH 2000, com eletrodo combinado de vidro e cloreto de prata.
- Banho de ultra-som Thorton[®], modelo T-14.
- pH-metro digital Digimed[®], modelo DM 21 TE 901.
- Colunas cromatográficas: Lichrospher[®] C8 (125 x 4,6) 5 µm Merck[®]; Sinergi-Hydro[®] RP18 (250 x 4,6) 5 µm Phenomenex[®]; LiChrosorb[®] Ciano (250 x 4,0) 10 µm Merck[®]; Luna[®] Amino (150 x 4,6) 5 µm Phenomenex[®].
- Unidades filtrantes de fase móvel e amostra (0,45 µm) Millex[®] HV.

4.1.6 Caracterização da matéria-prima de brometo de vecurônio

4.1.6.1 Faixa de fusão

O padrão de brometo de vecurônio foi colocado em um tubo capilar de vidro com uma das extremidades selada até cerca de 3,0 mm de altura. Começou-se o aquecimento a uma razão de 5°C/min.; quando a temperatura ficou 10°C abaixo do começo da fusão (teórico), reduziu-se a velocidade de aquecimento a cerca de 1°C/min. A temperatura na qual a coluna da amostra funde sobre a parede do tubo em qualquer ponto, é definida como o início de fusão, e a temperatura na qual a amostra torna-se completamente líquida, é definida como o final de fusão ou o ponto de fusão. As duas temperaturas estão dentro dos limites da faixa de fusão (FARMACOPÉIA Brasileira, 1996).

4.1.6.2 Espectrometria no infravermelho

A identificação espectrométrica do brometo de vecurônio foi realizada mediante a espectroscopia no infravermelho. O espectro de absorção foi obtido mediante o preparo de uma dispersão do padrão em brometo de potássio, segundo a Farmacopéia dos Estados Unidos da América do Norte (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2008).

4.1.7 Desenvolvimento do método cromatográfico para determinação quantitativa de brometo de vecurônio

Foi preparada uma solução padrão de brometo de vecurônio para cada sistema avaliado. Foram pesados exatamente cerca de 10,0 mg de brometo de vecurônio e transferidos para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com acetonitrila. Transferiu-se uma alíquota de 1,0 mL para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com fase móvel. Uma alíquota de 3 mL foi filtrada através de filtro 0,45 µm Millipore® (millex HV) e injetada no cromatógrafo. Todas as fases moveis testadas foram preparadas diariamente, filtradas através de membrana hidrofílica 0,45 µm Millipore® (HV) e sonicadas durante 5 minutos. Os sistemas cromatográficos avaliados podem ser vistos na Tabela 1.

Tabela 1. Sistemas cromatográficos avaliados para determinação de brometo de vecurônio em medicamentos.

Sistema	Coluna	Fase móvel		pH	Vazão	Detecção	Temperatura
		% Acetonitrila	% Aquoso	(Unidades)	(mL/min)	(UV nm)	(°C)
1	Lichrospher® C8 (125 x 4,6) 5 µm Merck®	30,0	Octanolsulfonato sódico (100,0 mM) 70,0	5,8	1,0	205 e 210	25
2	Lichrospher® C8 (125 x 4,6) 5 µm Merck®	20,0	Octanolsulfonato sódico (100,0 mM) 80,0	5,8	1,0	205 e 210	25
3	Sinergi-Hydro® RP18 (250 x 4,6) 5 µm Phenomenex®	30,0	Octanolsulfonato sódico (100,0 mM) 70,0	5,8	1,0	205 e 210	25
4	Sinergi-Hydro® RP18 (250 x 4,6) 5 µm Phenomenex®	20,0	Octanolsulfonato sódico (100,0 mM) 80,0	5,8	1,0	205 e 210	25
5	LiChrosorb® Ciano (250 x 4,0) 10 µm Merck®	50,0	50,0	5,5	1,0	205 e 210	25
6	LiChrosorb® Ciano (250 x 4,0) 10 µm Merck®	40,0	60,0	5,5	1,0	205 e 210	25
7	LiChrosorb® Ciano (250 x 4,0) 10 µm Merck®	30,0	70,0	5,5	1,0	205 e 210	25
8	LiChrosorb® Ciano (250 x 4,0) 10 µm Merck®	20,0	80,0	5,5	1,0	205 e 210	25

Tabela 1. Sistemas cromatográficos avaliados para determinação de brometo de vecurônio em medicamentos (continuação).

Sistema	Coluna	Fase móvel		pH	Vazão	Detecção	Temperatura
		% Acetonitrila	% Aquoso	(Unidades)	(mL/min)	(UV nm)	(°C)
9	Luna® Amino (150 x 4,6) 5 µm Phenomenex®	50,0	Fosfato sódico monobásico (50,0 mM) 50,0	4,6	1,0	205 e 210	25
10	Luna® Amino (150 x 4,6) 5 µm Phenomenex®	50,0	Fosfato sódico monobásico (25,0 mM) 50,0	4,6	1,0	205 e 210	25

4.1.8 Validação do método analítico para determinação quantitativa de brometo de vecurônio através de cromatografia líquida de alta eficiência (sistema 10)

4.1.8.1 Conformidade do sistema

- **Preparação da solução padrão**

Foram pesados exatamente cerca de 10,0 mg de brometo de vecurônio e transferidos para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de acetonitrila até dissolução e completou-se com o mesmo solvente. Desta solução, foi transferida uma alíquota de 2,0 mL para balão volumétrico de 10 mL (A). Foram pesados exatamente cerca de 50,0 mg de besilato de anlodipino (padrão interno) e transferidos para balão volumétrico de 50 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de água até dissolução e completou-se o volume com acetonitrila. Desta solução, foi transferida uma alíquota de 1,0 mL para o balão volumétrico de 10 mL anteriormente descrito (A). O volume foi completado com fase móvel.

- **Procedimento**

Uma alíquota de 5 mL foi filtrada através de filtro 0,45 µm Millipore® (millex HV) e 20 µL foram injetados no cromatógrafo cinco vezes.

4.1.8.2 Seletividade/especificidade

- **Preparação do placebo**

Foi preparada uma solução contendo todos os excipientes da formulação exceto o brometo de vecurônio. Foram pesados 25 mg de ácido cítrico, 20 mg de fosfato de sódio monobásico e 95 mg de manitol, adicionou-se aos pós água destilada até completar 10 mL. O pH da solução foi ajustado a 4,0. Desta solução foram transferidas alíquotas de 1,0; 2,0 e 3,0 mL para balões volumétrico de 10 mL. Cada balão foi completado com fase móvel.

- Procedimento

Uma alíquota de 3 mL de cada balão volumétrico contendo solução placebo foi filtrada através de filtro 0,45 μm Millipore® (millex HV) e injetada no cromatógrafo em duplicata, a fim de avaliar a interferência dos excipientes.

4.1.8.3 Linearidade

- Preparação das soluções padrão

Para a construção da curva analítica foram pesadas exatamente cerca de 50,0 mg de brometo de vecurônio e transferidos para balão volumétrico de 50 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de acetonitrila até dissolução e completou-se com o mesmo solvente. Desta solução, foram transferidas sete alíquotas, cujos volumes variavam entre 0,5 e 3,5 mL para balões volumétricos de 10 mL (triplicata). A cada balão volumétrico anteriormente descrito, foram adicionados 1,0 mL da solução estoque de besilato de anlodipino (padrão interno) descrita na seção “conformidade do sistema” (1000,0 $\mu\text{g/mL}$). O volume foi completado com fase móvel.

- Procedimento

Uma alíquota de 3 mL de cada balão volumétrico contendo solução padrão de brometo de vecurônio e besilato de anlodipino foi filtrada através de filtro 0,45 μm Millipore® (millex HV) e injetada no cromatógrafo em duplicata. A linearidade foi avaliada pelo método dos mínimos quadrados plotando a concentração de brometo de vecurônio e a relação das áreas de brometo de vecurônio e besilato de anlodipino.

4.1.8.4 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

- Os cálculos para determinação do limite de detecção e limite de quantificação foram baseados na estimativa do desvio padrão da resposta e a inclinação da curva analítica a partir das formulas:

$$LD = \frac{DP \times 3,3}{b}$$

$$LQ = \frac{DP \times 10}{b}$$

Onde *DP* é a estimativa do desvio padrão da resposta da curva analítica e *b* é a inclinação da curva analítica.

4.1.8.5 Repetibilidade e precisão intermediária

- Preparação do padrão

Foram pesados exatamente cerca de 25,0 mg de brometo de vecurônio e transferidos para balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de acetonitrila até dissolução e completou-se com o mesmo solvente (solução mãe padrão). Desta solução, foi transferida em triplicata uma alíquota de 2,0 mL para balão volumétrico de 10 mL e 1,0 mL da solução estoque de besilato de anlodipino (padrão interno). O volume foi completado com fase móvel.

- Preparação da amostra

Foram misturados em béquer os conteúdos de vinte frascos comerciais de brometo de vecurônio (4 mg) ou dez frascos comerciais de brometo de vecurônio (10 mg). Adicionou-se cerca de 30 mL de água destilada até completa dissolução. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com acetonitrila. Desta solução foram retiradas nove alíquotas de 1,25 mL (amostras contendo 4 mg de brometo de vecurônio) ou nove alíquotas de 1,0 mL (amostra contendo 10 mg de brometo de vecurônio), transferidas para balão volumétrico de 10 mL e foram adicionados 1,0 mL da solução de besilato de anlodipino (padrão interno). Completou-se o volume com fase móvel.

- Procedimento

Uma alíquota de aproximadamente 3 mL de cada balão volumétrico foi filtrada através de filtro 0,45 µm Millipore® (millex HV) e injetada no cromatógrafo em duplicata. O mesmo procedimento repetiu-se durante os dois dias seguintes com

diferentes tomadas de ensaio. A variabilidade intra-dia e inter-dia foi calculada por ANOVA.

4.1.8.6 Exatidão

- Preparação do padrão

Foram pesados exatamente cerca de 80,0 mg de brometo de vecurônio e transferidos para balão volumétrico de 100 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de acetonitrila até completar o volume (solução mãe padrão).

- Preparação da amostra

Foram misturados em béquer os conteúdos de cinco frascos comerciais de brometo de vecurônio (4 mg) ou dois frascos de (10 mg) e transferidos para balões volumétricos de 25 mL. Adicionou-se aproximadamente 15 mL de água destilada. O volume foi completado com acetonitrila (soluções mãe amostra).

- Procedimento

Alíquotas das soluções mãe das amostras e padrão foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL (triplicata). Adicionou-se 1,0 mL de solução estoque de besilato de anlodipino (padrão interno). O volume foi completado com fase móvel conforme o esquema a seguir:

Tabela 2. Preparação das soluções padrão e soluções amostra para os ensaios de recuperação na determinação de brometo de vecurônio através de cromatografia líquida de alta eficiência.

Balão	Solução padrão 800,0 µg/mL (mL)	Solução amostra 800,0 µg/mL (mL)	Solução padrão interno 1000,0 µg/mL (mL)
1	0,5	---	1,0
2	---	0,5	1,0
3	0,5	0,5	1,0
4	2,0	0,5	1,0
5	3,5	0,5	1,0

- Procedimento

Uma alíquota de aproximadamente 3 mL de cada balão volumétrico foi filtrada através de filtro 0,45 µm Millipore® (millex HV) e injetada no cromatógrafo em duplicata. A porcentagem de recuperação do padrão (%RP) foi calculada através da seguinte equação:

$$\%RP = \frac{ca - cna}{cp} \times 100$$

Onde,

%RP = Porcentagem do padrão de brometo de vecurônio recuperada

ca = Concentração de brometo de vecurônio encontrada na amostra adicionada de solução padrão mãe;

cna = Concentração de brometo de vecurônio encontrada na amostra não adicionada de solução padrão mãe;

cp = Concentração do padrão de brometo de vecurônio.

4.1.8.7 Robustez

Foi avaliada mediante um estudo de planejamento fatorial completo 2³. Foram estudados os fatores: concentração de fosfato monobásico monoidratado sódico, porcentagem de solvente orgânico (acetonitrila) e temperatura. Todas as condições analíticas foram preparadas diária e aleatoriamente em separado e em duplicata (BARROS NETO, 2003).

- Procedimento

Foi preparada uma solução como descrita no item “conformidade do sistema”, sendo assim 200,0 µg/mL para brometo de vecurônio e 100,0 µg/mL de besilato de anlodipino em balão volumétrico de 10 mL. Uma alíquota de aproximadamente 3 mL do balão volumétrico foi filtrada através de filtro 0,45 µm Millipore® (millex HV) e injetada no cromatógrafo em duplicata. A resposta avaliada foi a resolução (*Rs*) entre o brometo de vecurônio e o besilato de anlodipino. Os efeitos de cada fator foram calculados conforme o esquema a seguir:

Tabela 3. Fatores, níveis e matriz para os testes de robustez na determinação de brometo de vecurônio por cromatografia líquida de alta eficiência.

Fator			Nível inferior (-)	Nível zero (0)	Nível superior (+)
A)	fosfato monobásico monoidratado sódico (mM)		20,0	25,0	30,0
B)	Acetonitrila (%)		45,0	50,0	55,0
C)	Temperatura (°C)		20,0	25,0	30,0
Matriz					
Exp.no.	Corrida	Fator A	Fator B	Fator C	
1	1	20,0	45,0	20,0	
2	9	30,0	45,0	20,0	
3	11	20,0	55,0	20,0	
4	2	30,0	55,0	20,0	
5	7	20,0	45,0	30,0	
6	14	30,0	45,0	30,0	
7	13	20,0	55,0	30,0	
8	8	30,0	55,0	30,0	
9	12	20,0	45,0	20,0	
10	16	30,0	45,0	20,0	
11	4	20,0	55,0	20,0	
12	5	30,0	55,0	20,0	
13	15	20,0	45,0	30,0	
14	6	30,0	45,0	30,0	
15	10	20,0	55,0	30,0	
16	3	30,0	55,0	30,0	

4.1.8.8 Condições de estresse para formação de produtos de degradação

Foram pesados 10,0 mg de padrão de brometo de vecurônio e transferidos para balões volumétricos de 10 mL. No primeiro balão foi adicionado NaOH 1,0 M, no segundo balão foi adicionado HCl 1,0 M. Após completa dissolução, as soluções foram transferidas para frascos de vidro e ambos foram colocados em um banho-maria durante 6 hrs, a 60 °C. Após resfriamento e neutralização das soluções foi aplicado um volume de 20 µL em uma cromatoplaça de sílica gel GF 254. A fase

móvel foi constituída de iodeto de potássio:acetonitrila:2-propanol (10:20:70) e a revelação foi feita com vapores de iodo (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2008). Após verificação da formação do produto de degradação final e filtração através de unidade filtrante 0,45 µm Millipore® (millex HV), injetou-se no cromatógrafo a solução obtida no tratamento de estresse.

4.1.9 Desenvolvimento do método eletroforético para determinação quantitativa de brometo de vecurônio

As tentativas iniciaram-se com determinações indiretas, pois são indicadas para determinação de fármacos com pouca ou nenhuma absorção no ultravioleta. Pesquisaram-se vários sistemas de eletrólitos, bem como substâncias cromóforas.

Foi preparada uma solução padrão de brometo de vecurônio para cada sistema avaliado. Foram pesados cerca de 10,0 mg de brometo de vecurônio e transferidos para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com água Milli-Q. Transferiu-se uma alíquota de 2,0 mL para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com água Milli-Q. Os sistemas eletroforéticos avaliados constam na Tabela 4.

No início de cada dia de análise o capilar foi acondicionado com hidróxido de sódio 1,0 M durante 30 minutos, logo com água Milli-Q durante 30 minutos e por último com o eletrólito de corrida por 10 minutos. Entre cada corrida analítica o capilar foi lavado com água Milli-Q durante 3 minutos e eletrólito de corrida por 2 minutos. Este mesmo procedimento foi realizado no processo de validação analítica.

Tabela 4. Sistemas eletroforéticos avaliados para determinação de brometo de vecurônio em medicamentos.

			Eletrólito	pH	Injeção	Tensão	Detecção	Temperatura
Sistema	Capilar	% Orgânico	Aquoso	(Unidades)	(hidrodinamica)	(kV)	Indireta (UV nm)	(°C)
1	Sílica fundida: 40 cm de comprimento total, 31,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	4,0 metanol	1,0 mM brometo de 1-hexadecilpiridínio	3,6	5 seg / 50 mbar	- 25	200, 230 e 254	25
2	Sílica fundida: 40 cm de comprimento total, 31,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	2,5 metanol	2,5 mM DL-fenilalanina e 5,0 ou 10 mM ácido fórmico	3,0	5 seg / 50 mbar	+ 25	200, 210, 230 e 254	25
3	Sílica fundida: 40 cm de comprimento total, 31,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	2,5 metanol	5,0 mM DL-fenilalanina e 5,0 ou 10 mM ácido fórmico	3,0	5 seg / 50 mbar	+ 30	210, 230, 254 e 350	25
4	Sílica fundida: 40 cm de comprimento total, 31,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	5,0 metanol	2,5 mM DL-fenilalanina e 5,0 ou 10 mM ácido fórmico	3,5	5 seg / 50 mbar	+ 30	210, 230, 254 e 350	25
5	Sílica fundida: 40 cm de comprimento total, 31,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	5,0 metanol	5,0 mM DL-fenilalanina e 5,0 ou 10 mM ácido fórmico	3,5	5 seg / 50 mbar	+ 30	210, 230, 254 e 350	25

Tabela 4. Sistemas eletroforéticos avaliados para determinação de brometo de vecurônio em medicamentos (continuação).

Sistema	Capilar	% Orgânico	Eletrólito Aquoso	pH (Unidades)	Injeção (hidrodinamica)	Tensão (kV)	Deteção Indireta (UV nm)	Temperatura (°C)
6	Sílica fundida: 40 cm de comprimento total, 31,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	---	5,0 mM sulfato de quinina em água Milli-Q acidificada com H ₂ SO ₄	3,0	5 seg / 50 mbar	+ 30	200, 230 e 254	25
7	Sílica fundida: 40 cm de comprimento total, 31,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	---	3,0 mM sulfato de quinina em água Milli-Q acidificada com H ₂ SO ₄	3,0	5 seg / 50 mbar	+ 30	200, 210, 230 e 254	25
8	Sílica fundida: 40 cm de comprimento total, 31,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	---	1,0 mM sulfato de quinina em água Milli-Q acidificada com H ₂ SO ₄	3,0	5 seg / 50 mbar	+ 30	210, 230, 254 e 350	25
9	Sílica fundida: 40 cm de comprimento total, 31,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	---	1,0 mM sulfato de quinina e 20 mM ácido fórmico em água Milli-Q	2,9	5 seg / 50 mbar	+ 30	210, 230, 254 e 350	25
10	Sílica fundida: 40 cm de comprimento total, 31,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	---	1,0 mM sulfato de quinina em água Milli-Q acidificada com HCl	3,0	5 seg / 50 mbar	+ 30	210, 230, 254 e 350	25

Tabela 4. Sistemas eletroforéticos avaliados para determinação de brometo de vecurônio em medicamentos (continuação).

Sistema	Capilar	% Orgânico	Eletrólito		pH (Unidades)	Injeção (hidrodinamica)	Tensão (kV)	Detecção Indireta (UV nm)	Temperatura (°C)
			Aquoso						
11	Sílica fundida: 40 cm de comprimento total, 31,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	10,0 metanol	1,0 mM sulfato de quinina em água Milli-Q acidificada com HCl		3,5	5 seg / 50 mbar	+ 25	210, 230 e 254	25
12	Sílica fundida: 40 cm de comprimento total, 31,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	10,0 acetonitrila	1,0 mM sulfato de quinina em água Milli-Q acidificada com HCl		3,5	5 seg / 50 mbar	+ 20	210, 230 e 254	25
13	Sílica fundida: 40 cm de comprimento total, 31,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	5,0 acetonitrila	1,0 mM sulfato de quinina em água Milli-Q acidificada com HCl		3,5	5 seg / 50 mbar	+ 17	210, 230 e 254	25
14	Sílica fundida: 40 cm de comprimento total, 31,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	8,0 acetonitrila	1,0 mM sulfato de quinina em água Milli-Q acidificada com HCl		3,3	5 seg / 50 mbar	+ 17,5	210, 230 e 254	25

4.1.10 Validação do método analítico para determinação quantitativa de brometo de vecurônio através de eletroforese capilar (sistema 14)

4.1.10.1 Conformidade do sistema

Foram pesados exatamente cerca de 10,0 mg de brometo de vecurônio e transferidos para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se 0,5 mL de acetonitrila e quantidade suficiente de água Milli-Q até dissolução e completou-se com a mesma. Foram pesados exatamente 10,0 mg de brometo de tetrabutilamônio e transferidos para balão volumétrico de 10 mL, adicionou-se água Milli-Q até completar o volume. Destas soluções foram transferidas alíquotas de 2,0 mL e 1,0 mL, respectivamente, para balões volumétricos de 10 mL. Os volumes foram aferidos com água Milli-Q.

- **Procedimento**

Foram injetadas no equipamento de eletroforese capilar cinco vezes a solução anteriormente descrita, a fim de avaliar a conformidade do sistema antes de cada dia de trabalho.

4.1.10.2 Seletividade/especificidade

- **Preparação do placebo**

Foi preparada uma solução contendo todos os excipientes da formulação, exceto o brometo de vecurônio. Foram pesados 25 mg de ácido cítrico, 20 mg de fosfato de sódio monobásico e 95 mg de manitol; adicionou-se aos pós água destilada até completar 10 mL. O pH da solução foi ajustado a 4,0. Desta solução foram transferidas alíquotas de 1,0, 2,0 e 3,0 mL para balões volumétricos de 10 mL. O volume de cada balão foi completado com água Milli-Q.

- **Procedimento**

As soluções resultantes foram injetadas no equipamento de eletroforese capilar em duplicata, a fim de avaliar a interferência dos excipientes (sobreposição dos picos).

4.1.10.3 Linearidade

- Preparação das soluções padrão

Para a construção da curva analítica foram pesadas exatamente cerca de 50,0 mg de brometo de vecurônio e transferidas para balão volumétrico de 100 mL. Adicionou-se 5 mL de acetonitrila e quantidade suficiente de água Milli-Q até dissolução e completou-se com a mesma. Foi preparada em um balão volumétrico de 50 mL uma solução de brometo de tetrabutylamônio (padrão interno) em concentração de 1000,0 µg/mL. Destas soluções, foram transferidas sete alíquotas, cujos volumes variavam entre 1,0 e 7,0 mL (padrão de brometo de vecurônio) e 1,0 mL de padrão interno (brometo de tetrabutylamônio 1000,0 µg/mL), respectivamente para balões volumétricos de 10 mL (triplicata). O volume foi completado com água Milli-Q.

- Procedimento

As soluções resultantes foram injetadas no equipamento de eletroforese capilar em duplicata e avaliou-se a linearidade pelo método dos mínimos quadrados.

4.1.10.4 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

- Os cálculos para determinação do limite de detecção e limite de quantificação foram baseados na estimativa do desvio padrão da resposta e a inclinação da curva analítica a partir das formulas:

$$LD = \frac{DP \times 3,3}{b}$$

$$LQ = \frac{DP \times 10}{b}$$

Onde *DP* é a estimativa do desvio padrão da resposta da curva analítica e *b* é a inclinação da curva analítica.

4.1.10.5 Repetibilidade e precisão intermediária

- Preparação do padrão

Foi pesado exatamente cerca de 25,0 mg de brometo de vecurônio e transferido para balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se 1,5 mL de acetonitrila e quantidade suficiente de água Milli-Q até dissolução e completou-se com a mesma (solução mãe padrão). Foi preparada em um balão volumétrico de 50 mL uma solução de brometo de tetrabutilamônio (padrão interno) em concentração de 1000,0 µg/mL. Destas soluções, foram transferidas uma alíquota de 2,0 mL e outra de 1,0 mL, respectivamente, para balão volumétrico de 10 mL (triplicata). O volume foi completado com água Milli-Q.

- Preparação da amostra

Foram misturados em béquer os conteúdos de vinte frascos comerciais de brometo de vecurônio (4 mg) ou dez frascos comerciais de brometo de vecurônio (10 mg). Adicionou-se água Milli-Q até completa dissolução. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com água Milli-Q. Desta solução foram retiradas nove alíquotas de 1,25 mL (amostras contendo 4 mg de brometo de vecurônio) ou nove alíquotas de 1,0 mL (amostra contendo 10 mg de brometo de vecurônio), transferidas para balão volumétrico de 10 mL e foi adicionado 1,0 mL da solução de brometo de tetrabutilamônio (padrão interno). Completou-se o volume com água Milli-Q.

- Procedimento

As soluções resultantes foram injetadas no equipamento de eletroforese capilar em duplicata. Repetiu-se o mesmo procedimento durante os dois dias seguintes com diferentes tomadas de ensaio.

4.1.10.6 Exatidão

- Preparação do padrão

Foi pesado exatamente cerca de 80,0 mg de brometo de vecurônio e transferido para balão volumétrico de 100 mL. Adicionou-se 5,0 mL de acetonitrila e quantidade suficiente de água Milli-Q até completar o volume (solução mãe padrão). Foi preparada em um balão volumétrico de 50 mL uma solução de brometo de vecurônio em água Milli-Q (padrão interno) em concentração de 1000,0 µg/mL.

- Preparação da amostra

Foram misturados em béquer os conteúdos de cinco frascos comerciais de brometo de vecurônio (4 mg) ou dois frascos de (10 mg) e transferidos para balões volumétricos de 25 mL. O volume foi completado com água Milli-Q (soluções mãe amostra).

- Procedimento

Alíquotas das soluções mãe das amostras e padrão foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL (triplicata). O volume foi completado com água Milli-Q, conforme o esquema a seguir:

Tabela 5. Preparação das soluções padrão e soluções amostra para os ensaios de recuperação na determinação de brometo de vecurônio através de eletroforese capilar.

Balão	Solução padrão 800,0 µg/mL (mL)	Solução amostra 800,0 µg/mL (mL)	Solução padrão interno 1000,0 µg/mL (mL)
1	0,5	---	1,0
2	---	0,5	1,0
3	0,5	0,5	1,0
4	2,0	0,5	1,0
5	3,5	0,5	1,0

- Procedimento

As soluções resultantes foram injetadas no equipamento de eletroforese capilar em duplicata. A porcentagem de recuperação do padrão (%RP) foi calculada através da seguinte equação:

$$\%RP = \frac{ca - cna}{cp} \times 100$$

Onde,

%RP = Porcentagem do padrão de brometo de vecurônio recuperada

ca = Concentração de brometo de vecurônio encontrada na amostra adicionada de solução padrão mãe;

cna = Concentração de brometo de vecurônio encontrada na amostra não adicionada de solução padrão mãe;

cp = Concentração do padrão de brometo de vecurônio.

4.1.10.7 Robustez

A robustez do método foi avaliada mediante um estudo de planejamento fatorial fracionado resolução III (2^{7-4}). Foram estudados os fatores: porcentagem de solvente orgânico (acetonitrila), concentração de sulfato de quinina, pH, temperatura e tensão. Foram também introduzidas no planejamento duas variáveis fantasma para calcular o erro total. Todas as condições analíticas foram preparadas diária e aleatoriamente em separado e em duplicata.

- Procedimento

Foi preparada uma solução como descrita no item “conformidade do sistema”; sendo assim, 200,0 µg/mL para brometo de vecurônio e 100,0 µg/mL de brometo de tetrabutylamônio em balão volumétrico de 10 mL. A resposta avaliada foi a resolução (R_s) entre o brometo de vecurônio e o brometo de tetrabutylamônio. Os efeitos de cada fator foram calculados conforme o esquema constante na Tabela 6.

Tabela 6. Fatores, níveis e matriz para os testes de robustez na determinação de brometo de vecurônio através de eletroforese capilar.

Fator	Nível inferior (-)	Nível zero (0)	Nível superior (+)
A) Acetonitrila (%)	6,0	8,0	10,0
B) Sulfato de quinina (mM)	0,7	1,0	1,3
C) pH	3,0	3,3	3,6
D) Temperatura (°C)	20,0	25,0	30,0
E) Fantasma	---	---	---
F) Tensão (Kv)	17,0	17,5	18,0
G) Fantasma	---	---	---

Matriz								
Exp. no.	Corrida	Fator A	Fator B	Fator C	Fator D	Fator E	Fator F	Fator G
1	3	6,0	0,7	3,0	30,0	+	18,0	-
2	5	10,0	0,7	3,0	20,0	-	18,0	+
3	6	6,0	1,3	3,0	20,0	+	17,0	+
4	4	10,0	1,3	3,0	30,0	-	17,0	-
5	10	6,0	0,7	3,6	30,0	-	17,0	+
6	1	10,0	0,7	3,6	20,0	+	17,0	-
7	16	6,0	1,3	3,6	20,0	-	18,0	-
8	2	10,0	1,3	3,6	30,0	+	18,0	+
9	7	6,0	0,7	3,0	30,0	+	18,0	-
10	9	10,0	0,7	3,0	20,0	-	18,0	+
11	12	6,0	1,3	3,0	20,0	+	17,0	+
12	11	10,0	1,3	3,0	30,0	-	17,0	-
13	15	6,0	0,7	3,6	30,0	-	17,0	+
14	13	10,0	0,7	3,6	20,0	+	17,0	-
15	14	6,0	1,3	3,6	20,0	-	18,0	-
16	8	10,0	1,3	3,6	30,0	+	18,0	+

4.1.10.8 Condições de estresse para formação de produtos de degradação

Foram pesados 10,0 mg de padrão de brometo de vecurônio e transferidos para dois diferentes balões volumétricos de 10 mL. No primeiro balão foi adicionado NaOH 1,0 M, no segundo balão foi adicionado HCl 1,0 M. Após completa dissolução, as soluções foram transferidas para frascos de vidro e ambos foram colocados em um banho-maria durante 6 hrs. a 60 °C. Após resfriamento e neutralização das soluções, foi aplicado um volume de 20 µL em uma cromatoplaça de sílica gel GF 254. A fase móvel foi constituída de iodeto de potássio:acetonitrila:2-propanol (10:20:70). A revelação foi feita com vapores de iodo (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2008). Após verificação da formação do produto de degradação final, injetou-se no equipamento de eletroforese capilar a solução obtida no tratamento de estresse.

4.2 Material e métodos utilizados na determinação de brometo de pancurônio

4.2.1 Reagentes, solventes e soluções

- Octanosulfonato sódico grau cromatográfico (Sigma®).
- Acetonitrila grau cromatográfico (Merck®).
- Fosfato de sódio monobásico monoidratado grau analítico (J.T. Baker®).
- Acetato de sódio triidratado grau analítico (Merck®).
- Cloreto de sódio grau analítico (Merck®).
- Ácido acético glacial grau analítico (Merck®).
- Hidróxido de sódio grau analítico (Merck®).
- Ácido clorídrico grau analítico (Merck®).
- L-Histidina grau analítico (Aldrich®).
- Imidazol grau analítico (Merck®).
- Ácido 2-hidroxi-isobutírico grau analítico (Aldrich®).
- Trietilamina (Merck®).
- Água destilada e ultra pura Milli-Q® Plus®

4.2.2 Substâncias empregadas como padrão

- Brometo de pancurônio matéria-prima (lote: A60235001), (100,6% de pureza).
- Trietilamina (Merck® lote LO2589), (99,9% de pureza).

4.2.3 Amostras

- Amostra A
Solução injetável de brometo de pancurônio 2 mg/mL ampola de 2 mL, fabricante “A”.
- Amostra B
Solução injetável de brometo de pancurônio 2 mg/mL ampola de 2 mL, fabricante “B”.

4.2.4 Placebo

- Foi preparada uma solução placebo para os testes de pesquisa de interferentes no método analítico. A composição da solução placebo foi baseada nas bulas das duas amostras comercializadas, bem como, na realizada em pesquisas anteriores (ZECEVIC, M. et al., 2002). A composição é:

Acetato de sódio triidratado	800 mg
Cloreto de sódio	200 mg
Ácido acético glacial	300 µL
Água destilada q.s.p.	50,0 mL

4.2.5 Equipamentos

- Cromatógrafo a líquido Shimadzu® SPD-10AV VP com detector PDA (“photo diode array detector”), sistema controlador SLC-10A VP, injeção automática e

sistema desgaseificador DGU-14A. Integração controlada por software Class VP v.5.91 Shimadzu®.

- Aparelho de eletroforese capilar Beckmann® MDQ. Integração controlada por software 32 karat.
- Espectrofotômetro de infravermelho Bomem®, modelo Michelson.
- Aparelho para determinação do ponto de fusão Stuart Scientific®, modelo SMP1.
- Balança analítica Mettler Toledo®, modelo AB 204.
- Banho de ultra-som Thorton®, modelo T-14.
- pH-metro digital Digimed®, modelo DM 21 TE 901.
- Colunas cromatográficas: μ Bondapak® C18 (150 x 3,9) 10 μ m Waters®, LiChrosorb® Ciano (250 x 4,0) 10 μ m Merck®; Luna® Amino (150 x 4,6) 5 μ m Phenomenex®.
- Unidades filtrantes de fase móvel e amostra (0,45 μ m) Millex® HV.

4.2.6 Caracterização da matéria-prima de brometo de pancurônio

4.2.6.1 Faixa de fusão

Foi colocado o padrão de brometo de pancurônio em um tubo capilar de vidro com uma das extremidades selada até cerca de 3,0 mm de altura. Começou-se o aquecimento a uma razão de 5°C/min. e quando a temperatura ficou 10°C abaixo do começo da fusão (teórico), reduziu-se a velocidade de aquecimento a cerca de 1°C/min. A temperatura na qual a coluna da amostra funde sobre a parede do tubo em qualquer ponto, é definida como o início de fusão, e a temperatura na qual a amostra torna-se completamente líquida, é definida como o final de fusão ou o ponto de fusão. As duas temperaturas caem dentro dos limites da faixa de fusão (FARMACOPÉIA Brasileira, 1996).

4.2.6.2 Espectrometria no infravermelho

A identificação espectrométrica do brometo de pancurônio foi realizada mediante a espectroscopia no infravermelho. O espectro de absorção foi obtido mediante o preparo de uma dispersão do padrão em brometo de potássio, segundo a Farmacopéia dos Estados Unidos da América do Norte (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2008).

4.2.7 Desenvolvimento do método cromatográfico para determinação quantitativa de brometo de pancurônio

Foi preparada uma solução padrão de brometo de pancurônio para cada sistema avaliado. Foram pesados exatamente cerca de 10,0 mg de brometo de pancurônio e transferidos para balão volumétrico de 10 mL. O volume de cada balão volumétrico foi completado com as diferentes fases móveis. Transferiu-se uma alíquota de 1,0 mL para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com fase móvel. Uma alíquota de 3 mL foi filtrada através de filtro 0,45 μm Millipore[®] (millex HV) e injetada no cromatógrafo. Todas as fases moveis foram preparadas diariamente, filtradas através de membrana hidrofílica 0,45 μm Millipore[®] (HV) e sonicadas durante 5 minutos. Os sistemas cromatográficos avaliados constam na Tabela 7.

Tabela 7. Sistemas cromatográficos avaliados para determinação de brometo de pancurônio em medicamentos.

Sistema	Coluna	Fase móvel		pH	Vazão	Detecção	Temperatura
		% Acetonitrila	% Aquoso	(Unidades)	(mL/min)	(UV nm)	(°C)
1	μBondapak® C18 (150 x 3,9) 10 μm Waters®	50,0	50,0	5,5	1,0	210	22
2	μBondapak® C18 (150 x 3,9) 10 μm Waters®	40,0	60,0	5,5	1,0	210	22
3	μBondapak® C18 (150 x 3,9) 10 μm Waters®	30,0	70,0	5,5	1,0	210	22
4	μBondapak® C18 (150 x 3,9) 10 μm Waters®	20,0	80,0	5,5	1,0	210	22
5	μBondapak® C18 (150 x 3,9) 10 μm Waters®	10,0	90,0	5,5	1,0	210	22
6	μBondapak® C18 (150 x 3,9) 10 μm Waters®	50,0	Octanolsulfonato sódico (100 mM) 50,0	5,9	1,0	210	22
7	μBondapak® C18 (150 x 3,9) 10 μm Waters®	40,0	Octanolsulfonato sódico (100 mM) 60,0	5,9	1,0	210	22
8	μBondapak® C18 (150 x 3,9) 10 μm Waters®	30,0	Octanolsulfonato sódico (100 mM) 70,0	5,9	1,0	210	22
9	μBondapak® C18 (150 x 3,9) 10 μm Waters®	20,0	Octanolsulfonato sódico (100 mM) 80,0	5,9	1,0	210	22
10	μBondapak® C18 (150 x 3,9) 10 μm Waters®	10,0	Octanolsulfonato sódico (100 mM) 90,0	5,9	1,0	210	22

Tabela 7. Sistemas cromatográficos avaliados para determinação de brometo de pancurônio em medicamentos (continuação).

Sistema	Coluna	Fase móvel		pH	Vazão	Detecção	Temperatura
		% Acetonitrila	% Aquoso	(Unidades)	(mL/min)	(UV nm)	(°C)
11	LiChrosorb® Ciano (250 x 4,0) 10 µm Merck®	50,0	50,0	5,5	1,0	210	22
12	LiChrosorb® Ciano (250 x 4,0) 10 µm Merck®	40,0	60,0	5,5	1,0	210	22
13	LiChrosorb® Ciano (250 x 4,0) 10 µm Merck®	30,0	70,0	5,5	1,0	210	22
14	LiChrosorb® Ciano (250 x 4,0) 10 µm Merck®	20,0	80,0	5,5	1,0	210	22
15	LiChrosorb® Ciano (250 x 4,0) 10 µm Merck®	10,0	90,0	5,5	1,0	210	22
16	Luna® Amino (150 x 4,6) 5 µm Phenomenex®	50	Fosfato sódico monobásico (25 mM) 50	4,8	1,0	210	22
17	Luna® Amino (150 x 4,6) 5 µm Phenomenex®	50	Octanolsulfonato sódico (100 mM) 50	6,0	1,0	210	22
18	Luna® Amino (150 x 4,6) 5 µm Phenomenex®	20	Octanolsulfonato sódico (50 mM) 80	6,0	1,0	210	22

4.2.8 Validação do método analítico para determinação quantitativa de brometo de pancurônio através de cromatografia líquida de alta eficiência (sistema 18)

4.2.8.1 Conformidade do sistema

Foi pesado exatamente cerca de 10,0 mg de brometo de pancurônio e transferido para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de uma mistura de acetonitrila:água 50 mM de octanosulfonato de sódio (50:50) até dissolução e completou-se com o mesmo solvente. Desta solução, foi transferida uma alíquota de 1,0 mL para balão volumétrico de 5 mL. O volume foi completado com uma mistura de acetonitrila:água 50 mM de octanosulfonato de sódio (50:50).

- Procedimento

Uma alíquota de 3 mL do balão volumétrico foi filtrada através de filtro 0,45 µm Millipore® (millex HV) e injetada no cromatógrafo cinco vezes, a fim de avaliar a conformidade do sistema.

4.2.8.2 Seletividade/especificidade

- Preparação do placebo

Foi preparada uma solução contendo todos os componentes da formulação exceto o brometo de pancurônio. Foram pesados 800 mg de acetato de sódio triidratado e 200 mg de cloreto de sódio e transferidos para um balão volumétrico de 50 mL, adicionou-se 10 mL de água destilada e 0,3 mL de ácido acético glacial. Completou-se o volume com água destilada. Desta solução foram transferidas alíquotas de 0,5, 1,0 e 1,5 mL para balões volumétrico de 10 mL. Cada balão foi completado com uma mistura de acetonitrila:água 50 mM de octanosulfonato de sódio (50:50).

- Procedimento

Uma alíquota de 3 mL de cada balão volumétrico contendo solução placebo foi filtrada através de filtro 0,45 µm Millipore® (millex HV) e injetada no cromatógrafo em duplicata, a fim de avaliar a interferência dos excipientes.

4.2.8.3 Linearidade

- Preparação das soluções padrão

Para a construção da curva analítica foram pesadas exatamente cerca de 50,0 mg de brometo de pancurônio e transferidas para balão volumétrico de 100 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de uma mistura de acetonitrila:água 50 mM de octanosulfonato de sódio (50:50) até dissolução e completou-se com o mesmo solvente. Desta solução, foram transferidas sete alíquotas, cujos volumes variavam entre 1,0 e 7,0 mL, para balões volumétricos de 10 mL (triplicata). O volume foi completado com uma mistura de acetonitrila:água 50 mM de octanosulfonato de sódio (50:50).

- Procedimento

Uma alíquota de 3 mL de cada balão volumétrico contendo solução padrão de brometo de pancurônio foi filtrada através de filtro 0,45 µm Millipore® (millex HV) e injetada no cromatógrafo em duplicata. A linearidade foi avaliada pelo método dos mínimos quadrados.

4.2.8.4 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

- Os cálculos para determinação do Limite de detecção e Limite de quantificação foram baseados na estimativa do desvio padrão da resposta e a inclinação da curva analítica a partir das formulas:

$$LD = \frac{DP \times 3,3}{b}$$

$$LQ = \frac{DP \times 10}{b}$$

Onde *DP* é a estimativa do desvio padrão da resposta da curva analítica e *b* é a inclinação da curva analítica.

4.2.8.5 Repetibilidade e precisão intermediária

- Preparação do padrão

Foi pesado exatamente cerca de 25,0 mg de brometo de pancurônio e transferido para balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de uma mistura de acetonitrila:água 50 mM de octanosulfonato de sódio (50:50) até dissolução e completou-se com o mesmo solvente (solução mãe padrão). Desta solução, foi transferida uma alíquota de 2,0 mL para balão volumétrico de 10 mL (triplicata). O volume foi completado com uma mistura de acetonitrila:água 50 mM de octanosulfonato de sódio (50:50).

- Preparação da amostra

Foram misturados em frasco âmbar os conteúdos de quatorze ampolas comerciais de brometo de pancurônio, dando um total de 28 mL. Desta solução foram retiradas nove alíquotas de 1,0 mL e transferidas para balões volumétricos de 10 mL. Adicionou-se uma mistura de acetonitrila:água 50 mM de octanosulfonato de sódio (50:50) até completar o volume.

- Procedimento

Uma alíquota de aproximadamente 3 mL de cada balão volumétrico foi filtrada através de filtro 0,45 µm Millipore® (millex HV) e injetada no cromatógrafo em duplicata. O mesmo procedimento repetiu-se durante os dois dias seguintes com diferentes tomadas de ensaio.

4.2.8.6 Exatidão

- Preparação do padrão

Foi pesado exatamente cerca de 25,0 mg de brometo de pancurônio e transferido para balão volumétrico de 50 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de uma mistura de acetonitrila:água 50 mM de octanosulfonato de sódio (50:50) até completar (solução mãe padrão).

- Preparação da amostra

Foram misturados em bquer os contedos de sete ampolas comerciais de brometo de pancurnio, dando um total de 14 mL. Desta soluo foi medida uma alquota de 12,5 mL e transferida para balo volumtrico de 50 mL. Adicionou-se uma mistura de acetonitrilagua 50 mM de octanosulfonato de sdio (50:50) at completar (soluo me amostra).

- Procedimento

Alquotas das solues me das amostras e padro foram transferidas para bales volumtricos de 10 mL (triplicata). O volume foi completado com uma mistura de acetonitrilagua 50 mM de octanosulfonato de sdio (50:50), conforme o esquema a seguir:

Tabela 8. Preparo das solues padro e solues amostra para os ensaios de recuperao na determinao de brometo de pancurnio atravs de cromatografia lquida de alta eficincia.

Balão	Solução padrão 500,0 �g/mL (mL)	Solução amostra 500,0 �g/mL (mL)
1	1,0	---
2	---	1,0
3	1,0	1,0
4	3,0	1,0
5	5,0	1,0

- Procedimento

Uma alquota de aproximadamente 3 mL de cada balo volumtrico foi filtrada atravs de filtro 0,45 m Millipore (millex HV) e injetada no cromatgrafo em duplicata. A porcentagem de recuperao do padro (%RP) foi calculada atravs da seguinte equao:

$$\%RP = \frac{ca - cna}{cp} \times 100$$

Onde,

%RP = Porcentagem do padro de brometo de pancurnio recuperada

ca = Concentração de brometo de pancurônio encontrada na amostra adicionada de solução padrão mãe;

cna = Concentração de brometo de pancurônio encontrada na amostra não adicionada de solução padrão mãe;

cp = Concentração do padrão de brometo de pancurônio.

4.2.8.7 Robustez

A robustez do método foi avaliada mediante um planejamento fatorial completo 2^3 . A resposta avaliada foi o fator de capacidade (k). Foram estudados os fatores: concentração de octanosulfonato sódico (mM), porcentagem de solvente orgânico (acetonitrila) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$). Todas as corridas analíticas foram preparadas diária e aleatoriamente em separado e em duplicata, conforme o esquema da Tabela 9: (BARROS NETO, 2003).

Tabela 9. Fatores, níveis e matriz de tratamento para o teste de robustez na determinação de brometo de pancurônio através de cromatografia líquida de alta eficiência.

Fator	Nível inferior (-)	Nível zero (0)	Nível superior (+)
A) Octanosulfonato de sódio (mM)	45,0	50,0	55,0
B) Acetonitrila (%)	15,0	20,0	25,0
C) Temperatura (°C)	19,0	22,0	25,0

Matriz				
Exp.no.	Corrida	Fator A	Fator B	Fator C
1	13	45,0	15,0	19,0
2	15	55,0	15,0	19,0
3	14	45,0	25,0	19,0
4	8	55,0	25,0	19,0
5	10	45,0	15,0	25,0
6	12	55,0	15,0	25,0
7	4	45,0	25,0	25,0
8	11	55,0	25,0	25,0
9	5	45,0	15,0	19,0
10	2	55,0	15,0	19,0
11	7	45,0	25,0	19,0
12	9	55,0	25,0	19,0
13	3	45,0	15,0	25,0
14	16	55,0	15,0	25,0
15	1	45,0	25,0	25,0
16	6	55,0	25,0	25,0

- Procedimento

Foi preparada uma solução como descrita no item “conformidade do sistema”, sendo assim 200,0 µg/mL de padrão de brometo de pancurônio em balão volumétrico de 5 mL. Uma alíquota de aproximadamente 3 mL do balão foi filtrada através de filtro 0,45 µm Millipore® (millex HV) e injetada no cromatógrafo em duplicata. A resposta avaliada foi o fator de capacidade (*k*) e os efeitos de cada fator foram calculados.

4.2.8.8 Condições de estresse para formação de produtos de degradação

Foram pesados 10,0 mg de padrão de brometo de pancurônio e transferidos para dois diferentes balões volumétricos de 10 mL. No primeiro balão foi adicionado NaOH 1,0 M e no segundo balão foi adicionado HCl 1,0 M até completar o volume. Após dissolução, as soluções resultantes foram transferidas para frascos de vidro com tampa. Ambos foram colocados em um banho-maria durante 6 hrs., a 60 °C. Após resfriamento e neutralização das soluções, foi aplicado um volume de 20 µL em uma cromatoplaça de sílica gel GF 254. A fase móvel foi constituída de iodeto de potássio:acetonitrila:2-propanol (10:20:70) e a revelação foi feita com vapores de iodo (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2008). Após verificação da formação do produto de degradação final, injetou-se no cromatografo a solução obtida no tratamento de estresse.

4.2.9 Desenvolvimento do método eletroforético para determinação quantitativa de brometo de pancurônio

Utilizou-se uma estratégia direcionada para determinação de fármacos com pouca absorção no ultravioleta e com carga neta positiva (cátions). Pesquisaram-se dois sistemas de eletrólitos, o imidazol e histidina como substâncias cromóforas.

Foi preparada uma solução padrão de brometo de pancurônio para cada sistema avaliado. Os sistemas avaliados são vistos na Tabela 10. Foram pesados exatamente cerca de 10,0 mg de brometo de pancurônio e transferidos para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com água Milli-Q. Transferiu-se uma alíquota de 2,0 mL para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com água Milli-Q. Uma alíquota de aproximadamente 250 µL foi transferida para o vial do equipamento e injetada.

No início de cada dia de análise o capilar foi acondicionado com hidróxido de sódio 1,0 M durante 30 minutos, logo com água Milli-Q durante 30 minutos e por último com o eletrólito de corrida por 10 minutos. Entre cada corrida analítica o capilar foi lavado com água Milli-Q durante 3 minutos e eletrólito de corrida por 2 minutos. Este mesmo procedimento foi realizado no processo de validação analítica.

Tabela 10. Sistemas eletroforéticos avaliados para determinação de brometo de pancurônio em medicamentos.

Sistema	Capilar	Eletrólito	pH (Unidades)	Injeção (hidrodinâmica)	Tensão (kV)	Deteção Indireta (UV nm)	Temperatura (°C)
1	Sílica fundida: 47 cm de comprimento total, 39,4 cm de comprimento efetivo, 75 µm diâmetro interno.	5 mM imidazol e 5 mM de ácido 2-hidroxi-isobutírico em água milli-Q.	3,5	5 seg / 20 psi	+ 30	214	25
2	Sílica fundida: 50 cm de comprimento total, 40,0 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno.	5 mM L-histidina e 5 mM de ácido 2-hidroxi-isobutírico em água Milli-Q.	3,5	5 seg / 0,5 psi	+ 25	214	25

4.2.10 Validação do método analítico para determinação quantitativa de brometo de pancurônio através de eletroforese capilar (sistema 2)

4.2.10.1 Conformidade do sistema

Foi pesado exatamente cerca de 10,0 mg de brometo de pancurônio e transferido para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de água Milli-Q até dissolução e completou-se com a mesma. Foi preparada em um balão volumétrico de 50 mL uma solução de trietilamina em concentração de 1000,0 µg/mL. Destas soluções, foi transferida uma alíquota de 2,0 mL e 1,0 mL respectivamente, para balão volumétrico de 10 mL. O volume foi completado com água Milli-Q.

- **Procedimento**

Foram injetadas no equipamento de eletroforese capilar cinco vezes a solução antes descrita, a fim de avaliar a conformidade do sistema durante cada dia de análise.

4.2.10.2 Seletividade/especificidade

- **Preparação do placebo**

Foi preparada uma solução contendo todos os componentes da formulação, exceto o brometo de pancurônio. Foram pesados 800 mg de acetato de sódio triidratado e 200 mg de cloreto de sódio e transferidos para um balão de 50 mL, adicionou-se 10 mL de água destilada e 0,3 mL de ácido acético glacial. Completou-se o volume com água destilada. O pH da solução foi de 4,5. Desta solução foram transferidas alíquotas de 0,5, 1,0 e 1,5 mL para balões volumétrico de 10 mL. Cada balão foi completado com água Milli-Q.

- **Procedimento**

As soluções resultantes foram injetadas no equipamento de eletroforese capilar em duplicata, a fim de avaliar a interferência dos excipientes.

4.2.10.3 Linearidade

- Preparação das soluções padrão

Para a construção da curva analítica foram pesados exatamente cerca de 50,0 mg de brometo de pancurônio e transferidos para balão volumétrico de 100 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de água Milli-Q até dissolução e completou-se com a mesma. Foi preparada em um balão volumétrico de 50 mL uma solução de trietilamina (padrão interno) em concentração de 1000,0 µg/mL. Destas soluções, foram transferidas sete alíquotas, cujos volumes variavam entre 1,0 e 7,0 mL (padrão de brometo de pancurônio) e 1,0 mL de padrão interno (trietilamina 1000,0 µg/mL) respectivamente, para balões volumétricos de 10 mL (triplicata). O volume foi completado com água Milli-Q.

- Procedimento

As soluções resultantes foram injetadas no equipamento de eletroforese capilar em duplicata e avaliou-se a linearidade pelo método dos mínimos quadrados.

4.2.10.4 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

- Os cálculos para determinação do limite de detecção e limite de quantificação foram baseados na estimativa do desvio padrão da resposta e a inclinação da curva analítica a partir das formulas:

$$LD = \frac{DP \times 3,3}{b}$$

$$LQ = \frac{DP \times 10}{b}$$

Onde *DP* é a estimativa do desvio padrão da resposta da curva analítica e *b* é a inclinação da curva analítica.

4.2.10.5 Repetibilidade e precisão intermediária

- Preparação do padrão

Foi pesado exatamente cerca de 25,0 mg de brometo de pancurônio e transferido para balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de água Milli-Q até dissolução e completou-se com a mesma (solução mãe padrão). Foi preparada em um balão volumétrico de 50 mL uma solução de trietilamina (padrão interno) em concentração de 1000,0 µg/mL. Destas soluções, foram transferidas uma alíquota de 2,0 mL e outra de 1,0 mL, respectivamente, para balão volumétrico de 10 mL (triplicata). O volume foi completado com água Milli-Q.

- Preparação da amostra

Foram misturados em frasco âmbar os conteúdos de quatorze ampolas comerciais de brometo de pancurônio, dando um total de 28 mL. Desta solução foram retiradas nove alíquotas de 1,0 mL, transferidas para balão volumétrico de 10 mL e foi adicionado 1,0 mL de padrão interno (trietilamina 1000,0 µg/mL). Adicionou-se água Milli-Q até completar o volume.

- Procedimento

As soluções resultantes foram injetadas no equipamento de eletroforese capilar em duplicata. Repetiu-se o mesmo procedimento durante os dois dias seguintes, com diferentes tomadas de ensaio.

4.2.10.6 Exatidão

- Preparação do padrão

Foi pesado exatamente cerca de 25,0 mg de brometo de pancurônio e transferido para balão volumétrico de 50 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de água Milli-Q até completar (solução mãe padrão). Foi preparada em um balão volumétrico de 50 mL uma solução de trietilamina em água Milli-Q (padrão interno) em concentração de 1000,0 µg/mL.

- Preparação da amostra

Foram misturados em bquer os contedos de sete ampolas comerciais de brometo de pancurnio, dando um total de 14 mL. Desta soluo foi medida uma alquota de 12,5 mL e transferida para balo volumtrico de 50 mL. Adicionou-se gua Milli-Q at completar (soluo me amostra).

- Procedimento

Alquotas das solues me das amostras e padro foram transferidas para bales volumtricos de 10 mL (triplicata). O volume foi completado com gua Milli-Q conforme o esquema a seguir:

Tabela 11. Preparo das solues padro e solues amostra para os ensaios de recuperao na determinao de brometo de pancurnio atravs de eletroforese capilar.

Balão	Solução padrão 500,0 �g/mL (mL)	Solução amostra 500,0 �g/mL (mL)	Solução padrão interno 1000,0 �g/mL (mL)
1	1,0	---	1,0
2	---	1,0	1,0
3	1,0	1,0	1,0
4	3,0	1,0	1,0
5	5,0	1,0	1,0

- Procedimento

As solues resultantes foram injetadas no equipamento de eletroforese capilar em duplicata. A porcentagem de recuperao do padro (%RP) foi calculada atravs da seguinte equao:

$$\%RP = \frac{ca - cna}{cp} \times 100$$

Onde,

%RP = Porcentagem do padro de brometo de pancurnio recuperada

ca = Concentrao de brometo de pancurnio encontrada na amostra adicionada de soluo padro me;

cna = Concentração de brometo de pancurônio encontrada na amostra não adicionada de solução padrão mãe;

cp = Concentração do padrão de brometo de pancurônio.

4.2.10.7 Robustez

A robustez do método foi avaliada mediante um estudo de planejamento fatorial fracionado resolução III (2^{6-3}). Foram estudados os fatores: concentração de ácido hidroxibutírico, concentração de histidina, pH e tempo de injeção. Foram também introduzidas no planejamento duas variáveis fantasma para calcular o erro total. Todas as condições analíticas foram preparadas diária e aleatoriamente em separado e em duplicata.

- Procedimento

Foi preparada uma solução como descrita no item “conformidade do sistema”; sendo assim, 200,0 µg/mL para brometo de pancurônio e 100,0 µg/mL de trietilamina em balão volumétrico de 10 mL. A resposta avaliada foi a resolução (R_s) entre o brometo de pancurônio e a trietilamina. Os efeitos de cada fator foram calculados conforme o esquema constante na Tabela 12.

Tabela 12. Fatores, níveis e matriz para os testes de robustez na determinação de brometo de pancurônio através de eletroforese capilar.

Fator	Nível inferior (-)	Nível zero (0)	Nível superior (+)
A) Fantasma	---	---	---
B) Ácido hidroxiisobutírico (mM)	4,0	5,0	6,0
C) Fantasma	---	---	---
D) Histidina (mM)	4,0	5,0	6,0
E) Tempo (seg)	4,0	5,0	6,0
F) pH	3,2	3,5	3,8

Exp. no.	Corrida	Matriz					
		Fator A	Fator B	Fator C	Fator D	Fator E	Fator F
1	16	+	6,0	+	6,0	6,0	3,8
2	14	+	4,0	-	6,0	6,0	3,2
3	2	+	4,0	-	4,0	4,0	3,8
4	10	+	4,0	-	4,0	4,0	3,8
5	9	-	4,0	+	4,0	6,0	3,8
6	5	-	4,0	+	6,0	4,0	3,2
7	6	+	4,0	-	6,0	6,0	3,2
8	12	+	6,0	+	4,0	4,0	3,2
9	15	-	6,0	-	6,0	4,0	3,8
10	3	-	6,0	-	4,0	6,0	3,2
11	13	-	4,0	+	6,0	4,0	3,2
12	8	+	6,0	+	6,0	6,0	3,8
13	11	-	6,0	-	4,0	6,0	3,2
14	7	-	6,0	-	6,0	4,0	3,8
15	1	-	4,0	+	4,0	6,0	3,8
16	4	+	6,0	+	4,0	4,0	3,2

4.2.10.8 Condições de estresse para formação de produtos de degradação

Foram pesados 10,0 mg de padrão de brometo de pancurônio e transferidos para dois diferentes balões volumétricos de 10 mL. No primeiro balão foi adicionado

NaOH 1,0 M, no segundo balão foi adicionado HCl 1,0 M. Após completa dissolução, as soluções foram transferidas para frascos de vidro e ambos foram colocados em um banho-maria durante 6 hrs. a 60 °C. Após resfriamento e neutralização das soluções, foi aplicado um volume de 20 µL em uma cromatoplaça de sílica gel GF 254. A fase móvel foi constituída de iodeto de potássio:acetonitrila:2-propanol (10:20:70). A revelação foi feita com vapores de iodo (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2008). Após verificação da formação do produto de degradação final, injetou-se no equipamento de eletroforese capilar a solução obtida no tratamento de estresse.

4.3 Material e métodos utilizados na determinação de brometo de rocurônio

4.3.1 Reagentes, solventes e soluções

- Acetato de sódio triidratado (Merck®)
- Ácido 4-aminobenzoico (Fluka®)
- Brij 35 (Fluka®)
- Cloridrato de tiamina (Sigma®)
- Hidróxido de sódio grau analítico ((Merck®)
- Acetonitrila grau cromatográfico (Merck®)
- Fosfato de sódio monobásico monoidratado grau analítico (J.T. Baker®)
- Metanol grau cromatográfico (Merck®)
- Isopropanol grau cromatográfico (Merck®)
- Água destilada e ultra pura Milli-Q® Plus®
- Cloreto de sódio grau analítico (Merck®)
- Sulfato de quinina diidratada (Avocado Organics®)
- Ácido clorídrico grau analítico (Merck®)
- Ácido acético glacial grau analítico (Panreac®)
- Brometo de 1-hexadecilpiridínio (Sigma®)
- DL-Fenilalanina (Sigma®)

4.3.2 Substâncias empregadas como padrão

- Brometo de rocurônio matéria-prima (lote: 0600000943/2009), (100,2% pureza).
- Ácido salicílico (Sigma-Aldrich® lote 2K189), (99,9% de pureza).
- Brometo de tetrabutílamônio (Sigma® lote 10K58794), (99,9% de pureza).

4.3.3 Amostras

- Amostra A
Solução injetável para administração endovenosa de brometo de rocurônio 10 mg/mL (frasco de 5 mL), fabricante “A”.
- Amostra B
Solução injetável para administração endovenosa de brometo de rocurônio 10 mg/mL (frasco de 5 mL), fabricante “A”.

4.3.4 Placebo

- Foi preparada uma solução placebo para o desenvolvimento, bem como, para testes de pesquisa de interferentes no método analítico. A composição da solução placebo foi baseada nas bulas das amostras comercializadas, bem como, na descrita na patente US 2007/0299035 A1. A composição é:
 - Acetato de sódio triidratado 50 mg
 - Cloreto de sódio 82,5 mg
 - Ácido acético glacial pH 4,0
 - Água destilada q.s.p. 25,0 mL

4.3.5 Equipamentos

- Cromatógrafo a líquido Shimadzu® SPD-10AV VP com detector PDA (“photo diode array detector”), sistema controlador SLC-10A VP, injeção automática e

sistema desgaseificador DGU-14A. Integração controlada por software Class VP v.5.91 Shimadzu®.

- Equipamento de eletroforese capilar Hewlett Packard 3DCE. Integração controlada por software 3D-CE Chem Station, Rev. A.10.02[1757].
- Espectrofotômetro de infravermelho Bomem®, modelo Michelson
- Aparelho para determinação do ponto de fusão Stuart Scientific®, modelo SMP1.
- Balança analítica A & D®, modelo GR-200-EC.

4.3.6 Caracterização da matéria-prima de brometo de rocurônio

4.3.6.1 Faixa de fusão

Foi colocado o padrão de brometo de rocurônio em um tubo capilar de vidro com uma das extremidades selada até cerca de 3,0 mm de altura. Iniciou-se o aquecimento a uma razão de 5°C/min. e quando a temperatura ficou 10°C abaixo do começo da fusão (téorico), reduziu-se a velocidade de aquecimento à cerca de 1°C/min. A temperatura na qual a coluna da amostra funde sobre a parede do tubo em qualquer ponto é definida como o início de fusão, e a temperatura na qual a amostra torna-se completamente líquida é definida como o final de fusão ou o ponto de fusão. As duas temperaturas caem dentro dos limites da faixa de fusão (FARMACOPÉIA Brasileira, 1996).

4.3.6.2 Espectrometria no infravermelho

A identificação espectrométrica do brometo de rocurônio foi realizada mediante a espectroscopia no infravermelho. O espectro de absorção foi realizado mediante o preparo de uma dispersão do padrão em brometo de potássio, segundo a Farmacopéia dos Estados Unidos da América do Norte (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2008).

4.3.7 Desenvolvimento do método cromatográfico para determinação quantitativa de brometo de rocurônio

Foi preparada uma solução padrão de brometo de rocurônio para cada sistema cromatográfico avaliado. Foram pesados exatamente cerca de 10,0 mg de brometo de rocurônio e transferidos para balão volumétrico de 10 mL. O volume de cada balão volumétrico foi completado com uma mistura de acetonitrila:água (50:50 v/v). Transferiu-se uma alíquota de 2,0 mL para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com as diferentes fases móveis. Uma alíquota de 3 mL foi filtrada através de filtro 0,45 μm Millipore[®] (millex HV) e injetada no cromatógrafo. As fases móveis foram preparadas diariamente, filtradas através de membrana hidrofílica 0,45 μm Millipore[®] (HV) e sonicadas durante 5 minutos. Os sistemas cromatográficos avaliados constam na Tabela 13.

Tabela 13. Sistemas cromatográficos avaliados para determinação de brometo de rocurônio em medicamentos.

Sistema	Coluna	Fase móvel		pH	Vazão	Detecção	Temperatura
		% Acetonitrila	% Aquoso	(Unidades)	(mL/min)	(UV nm)	(°C)
1	μBondapak® C18 (150 x 3,9) 10 μm Waters®	20,0	80,0	5,5	1,0	205	25
2	μBondapak® C18 (150 x 3,9) 10 μm Waters®	10,0	90,0	5,5	1,0	205	25
3	μBondapak® C18 (150 x 3,9) 10 μm Waters®	20,0	Octanolsulfonato sódico (100 mM) 80,0	5,9	1,0	205	25
4	μBondapak® C18 (150 x 3,9) 10 μm Waters®	10,0	Octanolsulfonato sódico (100 mM) 90,0	5,9	1,0	205	25
5	Luna® HILIC (150 x 4,6) 5 μm Phenomenex®	50,0	50,0	5,5	1,0	205	25
6	Luna® HILIC (150 x 4,6) 5 μm Phenomenex®	40,0	Fosfato sódico monobásico (25 mM) 60,0	4,6	1,0	205	25
7	Luna® Amino (150 x 4,6) 5 μm Phenomenex®	50	Fosfato sódico monobásico (25 mM) 50,0	4,6	1,0	205	25
8	Luna® Amino (150 x 4,6) 5 μm Phenomenex®	30	Fosfato sódico monobásico (50 mM) 70,0	4,6	1,0	205	25

4.3.8 Validação do método analítico para determinação quantitativa de brometo de rocurônio através de cromatografia líquida de alta eficiência (sistema 8)

4.3.8.1 Conformidade do sistema

- Preparação da solução padrão

Foram pesados exatamente cerca de 10,0 mg de brometo de rocurônio e transferidos para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de uma mistura de acetonitrila:água (50:50 v/v) até dissolução e completou-se com o mesmo solvente. Desta solução, foi transferida uma alíquota de 2,0 mL para balão volumétrico de 10 mL (A). Foram pesados exatamente cerca de 40,0 mg de ácido salicílico (padrão interno) e transferidos para balão volumétrico de 100 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de uma mistura de acetonitrila:água (50:50 v/v) até dissolução e completou-se com o mesmo solvente. Desta solução, foi transferida uma alíquota de 1,0 mL para o balão volumétrico de 10 mL que anteriormente foi descrito (A). O volume foi completado com uma mistura de acetonitrila:água (50:50 v/v).

- Procedimento

Uma alíquota de 5 mL foi filtrada através de filtro 0,45 µm Millipore® (millex HV) e 20 µL foram injetados no cromatógrafo cinco vezes.

4.3.8.2 Seletividade/especificidade

- Preparação do placebo

Foi preparada uma solução contendo todos os excipientes da formulação exceto o brometo de rocurônio. Foram pesados 50 mg de acetato de sódio triidratado e 82,5 mg de cloreto de sódio e transferidos para um balão volumétrico de 25 mL, adicionou-se 10 mL de água destilada e 0,3 mL de ácido acético glacial. Completou-se o volume com água destilada. Desta solução foram transferidas alíquotas de 1,0; 1,5 e 2,0 mL para balões volumétrico de 10 mL. Cada balão foi completado com uma mistura de acetonitrila:água (50:50 v/v).

- Procedimento

Uma alíquota de 3 mL de cada balão volumétrico contendo solução placebo foi filtrada através de filtro 0,45 µm Millipore® (millex HV) e injetada no cromatógrafo em duplicata, a fim de avaliar a interferência dos excipientes.

4.3.8.3 Linearidade

- Preparação das soluções padrão

Para a construção da curva analítica foram pesadas exatamente cerca de 50,0 mg de brometo de rocurônio e transferidos para balão volumétrico de 50 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de uma mistura de acetonitrila:água (50:50 v/v) até dissolução e completou-se com o mesmo solvente. Desta solução, foram transferidas sete alíquotas, cujos volumes variavam entre 0,5 e 3,5 mL para balões volumétricos de 10 mL (triplicata). A cada balão volumétrico anteriormente descrito, foram adicionados 1,0 mL da solução estoque de ácido salicílico (padrão interno) descrita na seção “conformidade do sistema” (400,0 µg/mL). O volume foi completado com uma mistura de acetonitrila:água (50:50 v/v).

- Procedimento

Uma alíquota de 3 mL de cada balão volumétrico contendo solução padrão de brometo de rocurônio e ácido salicílico foi filtrada através de filtro 0,45 µm Millipore® (millex HV) e injetada no cromatógrafo em duplicata. A linearidade foi avaliada pelo método dos mínimos quadrados plotando a concentração de brometo de rocurônio e a relação das áreas de brometo de rocurônio e ácido salicílico.

4.3.8.4 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

- Os cálculos para determinação do limite de detecção e limite de quantificação foram baseados na estimativa do desvio padrão da resposta e a inclinação da curva analítica a partir das formulas:

$$LD = \frac{DP \times 3,3}{b}$$

$$LQ = \frac{DP \times 10}{b}$$

Onde *DP* é a estimativa do desvio padrão da resposta da curva analítica e *b* é a inclinação da curva analítica.

4.3.8.5 Repetibilidade e precisão intermediária

- Preparação do padrão

Foram pesados exatamente cerca de 25,0 mg de brometo de rocurônio e transferidos para balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de uma mistura de acetonitrila:água (50:50 v/v) até dissolução e completou-se com o mesmo solvente (solução mãe padrão). Desta solução, foi transferida em triplicata uma alíquota de 2,0 mL para balão volumétrico de 10 mL e 1,0 mL da solução estoque de ácido salicílico (padrão interno). O volume foi completado com uma mistura de acetonitrila:água (50:50 v/v).

- Preparação da amostra

Foram misturados em béquer os conteúdos de cinco frascos comerciais de brometo de rocurônio (10 mg/mL). Foi retirada uma alíquota de 10,0 mL e transferida para balão volumétrico de 50 mL. Adicionou-se uma mistura de acetonitrila:água (50:50 v/v) até o menisco. Desta solução foram retiradas nove alíquotas de 1,0 mL, transferidas para balão volumétrico de 10 mL e foram adicionados 1,0 mL da solução de ácido salicílico (padrão interno). Completou-se o volume com uma mistura de acetonitrila:água (50:50 v/v).

- Procedimento

Uma alíquota de aproximadamente 3 mL de cada balão volumétrico foi filtrada através de filtro 0,45 µm Millipore® (millex HV) e injetada no cromatógrafo em duplicata. O mesmo procedimento repetiu-se durante os dois dias seguintes com

diferentes tomadas de ensaio. A variabilidade intra-dia e enter-dia foi calculada por ANOVA.

4.3.8.6 Exatidão

- Preparação do padrão

Foram pesados exatamente cerca de 25,0 mg de brometo de vecurônio e transferidos para balão volumétrico de 50 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de uma mistura de acetonitrila:água (50:50 v/v) até completar (solução mãe padrão).

- Preparação da amostra

Foram misturados em béquer os conteúdos de cinco frascos comerciais de brometo de rocurônio. Foi retirada uma alíquota de 2,5 mL e transferida para balão volumétrico de 50 mL. Adicionou-se uma mistura de acetonitrila:água (50:50 v/v) até o menisco (soluções mãe amostra).

- Procedimento

Alíquotas das soluções mãe das amostras e padrão foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL (triplicata). Adicionou-se 1,0 mL de solução estoque de ácido salicílico (padrão interno). O volume foi completado com uma mistura de acetonitrila:água (50:50 v/v) conforme o esquema a seguir:

Tabela 14. Preparação das soluções padrão e soluções amostra para os ensaios de recuperação na determinação de brometo de rocurônio através de cromatografia líquida de alta eficiência.

Balão	Solução padrão 500,0 µg/mL (mL)	Solução amostra 500,0 µg/mL (mL)	Solução padrão interno 400,0 µg/mL (mL)
1	1,0	---	1,0
2	---	1,0	1,0
3	1,0	1,0	1,0
4	3,0	1,0	1,0
5	5,0	1,0	1,0

- Procedimento

Uma alíquota de aproximadamente 3 mL de cada balão volumétrico foi filtrada através de filtro 0,45 µm Millipore® (millex HV) e injetada no cromatógrafo em duplicata. A porcentagem de recuperação do padrão (%RP) foi calculada através da seguinte equação:

$$\%RP = \frac{ca - cna}{cp} \times 100$$

Onde,

%RP = Porcentagem do padrão de brometo de rocurônio recuperada

ca = Concentração de brometo de rocurônio encontrada na amostra adicionada de solução padrão mãe;

cna = Concentração de brometo de rocurônio encontrada na amostra não adicionada de solução padrão mãe;

cp = Concentração do padrão de brometo de rocurônio.

4.3.8.7 Robustez

O parâmetro da robustez foi avaliado através um estudo de planejamento fatorial completo 2³. Foram estudados os fatores: concentração de fosfato monobásico monoidratado sódico, porcentagem de solvente orgânico (acetonitrila) e temperatura. Todas as condições analíticas foram preparadas diária e aleatoriamente em separado e em duplicata (BARROS NETO, 2003).

- Procedimento

Foi preparada uma solução como descrita no item “conformidade do sistema”, sendo assim 200,0 µg/mL para brometo de rocurônio e 40,0 µg/mL de ácido salicílico em balão volumétrico de 10 mL. Uma alíquota de aproximadamente 3 mL do balão volumétrico foi filtrada através de filtro 0,45 µm Millipore® (millex HV) e injetada no cromatógrafo em duplicata. A resposta avaliada foi a resolução entre o placebo e brometo de rocurônio (*R1*); bem como a resolução entre brometo de rocurônio e ácido salicílico (*R2*). Os efeitos de cada fator foram calculados conforme o esquema a seguir:

Tabela 15. Fatores, níveis e matriz para os testes de robustez na determinação de brometo de rocurônio por cromatografia líquida de alta eficiência.

Fator		Nível inferior (-)	Nível zero (0)	Nível superior (+)
A)	fosfato monobásico monoidratado sódico (mM)	45,0	50,0	55,0
B)	Acetonitrila (%)	25,0	30,0	35,0
C)	Temperatura (°C)	20,0	25,0	30,0
Matriz				
Exp.no.	Corrida	Fator A	Fator B	Fator C
1	16	45,0	25,0	20,0
2	8	55,0	25,0	20,0
3	9	45,0	35,0	20,0
4	14	55,0	35,0	20,0
5	2	45,0	25,0	30,0
6	11	55,0	25,0	30,0
7	13	45,0	35,0	30,0
8	12	55,0	35,0	30,0
9	6	45,0	25,0	20,0
10	3	55,0	25,0	20,0
11	4	45,0	35,0	20,0
12	15	55,0	35,0	20,0
13	10	45,0	25,0	30,0
14	1	55,0	25,0	30,0
15	7	45,0	35,0	30,0
16	5	55,0	35,0	30,0

4.3.8.8 Condições de estresse para formação de produtos de degradação

Foram pesados 10,0 mg de padrão de brometo de rocurônio e transferidos para balões volumétricos de 10 mL. No primeiro balão foi adicionado NaOH 1,0 M, no segundo balão foi adicionado HCl 1,0 M. Após completa dissolução, as soluções foram transferidas para frascos de vidro e ambos foram colocados em um banho-

maria durante 6 hrs, a 60 °C. Após resfriamento e neutralização das soluções foi aplicado um volume de 20 µL em uma cromatoplaça de sílica gel GF 254. A fase móvel foi constituída de iodeto de potássio:acetonitrila:2-propanol (10:20:70) e a revelação foi feita com vapores de iodo (UNITED STATES PHARMACOPÉIA, 2008). Após verificação da formação do produto de degradação final e filtração através de unidade filtrante 0,45 µm Millipore® (millex HV), injetou-se no cromatógrafo a solução obtida no tratamento de estresse.

4.3.9 Desenvolvimento do método eletroforético para determinação quantitativa de brometo de rocurônio

As determinações foram baseadas em detecções indiretas, pois são indicadas para determinação de fármacos com pouca ou nenhuma absorção no ultravioleta. Pesquisaram-se vários sistemas de eletrólitos, substâncias cromóforas, pH, tensões, entre outras.

Foi preparada uma solução padrão de brometo de rocurônio para cada sistema avaliado. Os sistemas constam na Tabela 16. Foram pesados cerca de 10,0 mg de brometo de rocurônio e transferidos para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com água Milli-Q. Transferiu-se uma alíquota de 2,0 mL para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com água Milli-Q.

No início de cada dia de análise o capilar foi acondicionado com hidróxido de sódio 1,0 M durante 30 minutos, logo com água Milli-Q durante 30 minutos e por último com o eletrólito de corrida por 10 minutos. Entre cada corrida analítica o capilar foi lavado com água Milli-Q durante 3 minutos e eletrólito de corrida por 2 minutos. Este mesmo procedimento foi realizado no processo de validação analítica.

Tabela 16. Sistemas eletroforéticos avaliados para determinação de brometo de rocurônio em medicamentos.

Sistema	Capilar	% Orgânico	Eletrólito Aquoso	pH (Unidades)	Injeção (hidrodinâmica)	Tensão (kV)	Deteção Indireta (UV nm)	Temperatura (°C)
1	Sílica fundida: 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	---	2,5 mM DL-fenilalanina	3,0; 3,5 e 4,0	5 seg / 50 mbar	+ 20, +25 e + 30	200, 220 e 254	25
2	Sílica fundida: 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	5,0 metanol	5,0 mM DL-fenilalanina	3,0; 3,5 e 4,0	5 seg / 50 mbar	+ 20, +25 e + 30	200, 210, 230 e 254	25
3	Sílica fundida: 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	10,0 metanol	5,0 mM DL-fenilalanina	3,0; 3,5 e 4,0	5 seg / 50 mbar	- 20, -25 e - 30	210, 230, 240 e 254	25
4	Sílica fundida: 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	---	2,5 mM DL-fenilalanina	3,0; 3,5 e 4,0	5 seg / 50 mbar	+ 20, +25 e + 30	210, 230, 240 e 254	25
5	Sílica fundida: 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	5,0 isopropanol	5,0 mM DL-fenilalanina	3,0; 3,5 e 4,0	5 seg / 50 mbar	+ 20, +25 e + 30	210, 220, 240 e 254	25
6	Sílica fundida: 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	10,0 isopropanol	5,0 mM DL-fenilalanina	3,0; 3,5 e 4,0	5 seg / 50 mbar	+ 20, +25 e + 30	210, 220, 240 e 254	25

Tabela 16. Sistemas eletroforéticos avaliados para determinação de brometo de rocurônio em medicamentos (continuação).

Sistema	Capilar	% Orgânico	Eletrólito Aquoso	pH (Unidades)	Injeção (hidrodinâmica)	Tensão (kV)	Deteção Indireta (UV nm)	Temperatura (°C)
7	Sílica fundida: 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	---	2,5 mM DL-fenilalanina	3,0; 3,5 e 4,0	5 seg / 50 mbar	+ 20, +25 e + 30	200, 220 e 254	25
8	Sílica fundida: 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	5,0 acetonitrila	5,0 mM DL-fenilalanina	3,0; 3,5 e 4,0	5 seg / 50 mbar	+ 20, +25 e + 30	200, 210, 230 e 254	25
9	Sílica fundida: 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	10,0 acetonitrila	5,0 mM DL-fenilalanina	3,0; 3,5 e 4,0	5 seg / 50 mbar	- 20, -25 e - 30	210, 230, 240 e 254	25
10	Sílica fundida: 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	---	2,0 mM de ácido 4-aminobenzoico	2,8 - 4,0 a cada 0,4	5 seg / 50 mbar	+ 20, +25 e + 30	200, 210, 230 e 254	25
11	Sílica fundida: 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	---	3,5 mM de ácido 4-aminobenzoico	2,8 - 4,0 a cada 0,4	5 seg / 50 mbar	+ 20, +25 e + 30	200, 210, 230 e 254	25
12	Sílica fundida: 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	---	5,0 mM de ácido 4-aminobenzoico	2,8 - 4,0 a cada 0,4	5 seg / 50 mbar	+ 20, +25 e + 30	200, 210, 230 e 254	25

Tabela 16. Sistemas eletroforéticos avaliados para determinação de brometo de rocurônio em medicamentos (continuação).

Sistema	Capilar	% Orgânico	Eletrólito Aquoso	pH (Unidades)	Injeção (hidrodinâmica)	Tensão (kV)	Deteção Indireta (UV nm)	Temperatura (°C)
13	Sílica fundida: 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	5,0 metanol	5,0 mM de ácido 4-aminobenzoico	2,8 - 4,0 a cada 0,4	5 seg / 50 mbar	+ 20, +25 e + 30	200, 210, 230 e 254	25
14	Sílica fundida: 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	5,0 acetonitrila	5,0 mM de ácido 4-aminobenzoico	2,8 - 4,0 a cada 0,4	5 seg / 50 mbar	+ 20, +25 e + 30	200, 210, 230 e 254	25
15	Sílica fundida: 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	---	2,0 mM de ácido 4-aminobenzoico e 0,1 mM de 1-hexadecilpiridínio	3,5 e 4,0	5 seg / 50 mbar	- 20, -25 e - 30	210, 230, 240 e 254	25
16	Sílica fundida: 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	---	3,5 mM de ácido 4-aminobenzoico e 0,1 mM de 1-hexadecilpiridínio	3,5 e 4,0	5 seg / 50 mbar	- 20, -25 e - 30	210, 230, 240 e 254	25
17	Sílica fundida: 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	---	5,0 mM de ácido 4-aminobenzoico e 0,1 mM de 1-hexadecilpiridínio	3,5 e 4,0	5 seg / 50 mbar	- 20, -25 e - 30	210, 230, 240 e 254	25
18	Sílica fundida: 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	---	2,0 mM de ácido 4-aminobenzoico e 0,5 mM de 1-hexadecilpiridínio	3,5 e 4,0	5 seg / 50 mbar	- 20, -25 e - 30	210, 230, 240 e 254	25

Tabela 16. Sistemas eletroforéticos avaliados para determinação de brometo de rocurônio em medicamentos (continuação).

Sistema	Capilar	% Orgânico	Eletrólito Aquoso	pH (Unidades)	Injeção (hidrodinâmica)	Tensão (kV)	Deteção Indireta (UV nm)	Temperatura (°C)
19	Sílica fundida: 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	---	3,5 mM de ácido 4-aminobenzoico e 0,5 mM de 1-hexadecilpiridínio	3,5 e 4,0	5 seg / 50 mbar	- 20, -25 e - 30	210, 230, 240 e 254	25
20	Sílica fundida: 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	---	5,0 mM de ácido 4-aminobenzoico e 0,5 mM de 1-hexadecilpiridínio	3,5 e 4,0	5 seg / 50 mbar	- 20, -25 e - 30	210, 230, 240 e 254	25
21	Sílica fundida: 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	---	2,0 mM ácido 4-aminobenzoico e 0,25 mM cloridrato de tiamina	2,8 - 4,0 a cada 0,4	5 seg / 50 mbar	+ 20, +25 e + 30	210, 230, 240 e 254	25
22	Sílica fundida: 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	---	5,0 mM ácido 4-aminobenzoico e 0,25 mM cloridrato de tiamina	2,8 - 4,0 a cada 0,4	5 seg / 50 mbar	+ 20, +25 e + 30	210, 230, 240 e 254	25
23	Sílica fundida: 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	---	2,0 mM ácido 4-aminobenzoico e 0,5 mM cloridrato de tiamina	2,8 - 4,0 a cada 0,4	5 seg / 50 mbar	+ 20, +25 e + 30	210, 230, 240 e 254	25
24	Sílica fundida: 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	---	5,0 mM ácido 4-aminobenzoico e 0,5 mM cloridrato de tiamina	2,8 - 4,0 a cada 0,4	5 seg / 50 mbar	+ 20, +25 e + 30	210, 230, 240 e 254	25

Tabela 16. Sistemas eletroforéticos avaliados para determinação de brometo de rocurônio em medicamentos (continuação).

Sistema	Capilar	% Orgânico	Eletrólito Aquoso	pH (Unidades)	Injeção (hidrodinâmica)	Tensão (kV)	Deteção Indireta (UV nm)	Temperatura (°C)
25	Sílica fundida: 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	---	1,0 mM de cloridrato de tiamina	3,5, 3,7 e 4,0	5 seg / 50 mbar	+ 20, +25 e + 30	210, 220, 240 e 254	25
26	Sílica fundida: 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	---	3,0 mM de cloridrato de tiamina	3,5, 3,7 e 4,0	5 seg / 50 mbar	+ 20, +25 e + 30	210, 220, 240 e 254	25
27	Sílica fundida: 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	---	0,5 mM de sulfato de quinina acidificado com HCl e 2,0 mM de sulfato de magnésio	3,0, 3,3 e 3,6	5 seg / 50 mbar	+ 25	210, 230, e 254	25
28	Sílica fundida: 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	---	1,0 mM de sulfato de quinina acidificado com HCl e 2,0 mM de sulfato de magnésio	3,0, 3,3 e 3,6	5 seg / 50 mbar	+ 25	210, 230, e 254	25
29	Sílica fundida: 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	---	0,5 mM de sulfato de quinina acidificado com HCl e 4,0 mM de sulfato de magnésio	3,0, 3,3 e 3,6	5 seg / 50 mbar	+ 25	210, 230, e 254	25
30	Sílica fundida: 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	---	1,0 mM de sulfato de quinina acidificado com HCl e 4,0 mM de sulfato de magnésio	3,0, 3,3 e 3,6	5 seg / 50 mbar	+ 25	210, 230, e 254	25

Tabela 16. Sistemas eletroforéticos avaliados para determinação de brometo de rocurônio em medicamentos (continuação).

Sistema	Capilar	% Orgânico	Eletrólito Aquoso	pH (Unidades)	Injeção (hidrodinâmica)	Tensão (kV)	Deteção Indireta (UV nm)	Temperatura (°C)
31	Sílica fundida: 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	---	0,5 mM de sulfato de quinina acidificado com HCl e 10 mM de brij 35	3,0, 3,3 e 3,6	5 seg / 50 mbar	+ 25	210, 230 e 254	25
32	Sílica fundida: 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	---	0,5 mM de sulfato de quinina acidificado com HCl e 20 mM de brij 35	3,0, 3,3 e 3,6	5 seg / 50 mbar	+ 25	210, 230 e 254	25
33	Sílica fundida: 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	---	0,5 mM de sulfato de quinina acidificado com HCl e 30 mM de brij 35	3,0, 3,3 e 3,6	5 seg / 50 mbar	+ 25	210, 230 e 254	25
34	Sílica fundida: 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	---	1,0 mM de sulfato de quinina acidificado com HCl e 10 mM de brij 35	3,0, 3,3 e 3,6	5 seg / 50 mbar	+ 25	210, 230 e 254	25
35	Sílica fundida: 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	---	1,0 mM de sulfato de quinina acidificado com HCl e 20 mM de brij 35	3,0, 3,3 e 3,6	5 seg / 50 mbar	+ 25	210, 230 e 254	25
36	Sílica fundida: 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	---	1,0 mM de sulfato de quinina acidificado com HCl e 30 mM de brij 35	3,0, 3,3 e 3,6	5 seg / 50 mbar	+ 25	210, 230 e 254	25

Tabela 16. Sistemas eletroforéticos avaliados para determinação de brometo de rocurônio em medicamentos (continuação).

Sistema	Capilar	Eletrólito		pH (Unidades)	Injeção (hidrodinâmica)	Tensão (kV)	Detecção Indireta (UV nm)	Temperatura (°C)
		% Orgânico	Aquoso					
37	Sílica fundida: 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	6,0 acetonitrila	1,0 mM de sulfato de quinina acidificada com HCl	3,2	5 seg / 50 mbar	+ 25	210, 230 e 254	25
38	Sílica fundida: 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	14,0 acetonitrila	1,0 mM de sulfato de quinina acidificada com HCl	3,2	5 seg / 50 mbar	+ 25	210, 230 e 254	25
39	Sílica fundida: 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm diâmetro interno	10,0 acetonitrila	1,0 mM de sulfato de quinina acidificada com HCl	3,2	5 seg / 50 mbar	+ 25	210, 230 e 254	25

4.3.10 Validação do método analítico para detecção quantitativa de brometo de rocurônio através de eletroforese capilar (sistema 39)

4.3.10.1 Conformidade do sistema

Foi pesado exatamente cerca de 10,0 mg de brometo de rocurônio e transferido para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de água Milli-Q até dissolução e completou-se com a mesma. Foram pesados exatamente 10,0 mg de brometo de tetrabutilamônio, transferidos para balão volumétrico de 10 mL e adicionou-se água Milli-Q até completar. Destas soluções, foram transferidas alíquotas de 2,0 mL e 1,0 mL, respectivamente, para um balão volumétrico de 10 mL. O volume foi completado com água Milli-Q.

- **Procedimento**

Foram injetadas no equipamento de eletroforese capilar cinco vezes a solução antes descrita, a fim de avaliar a conformidade do sistema antes de cada dia de trabalho.

4.3.10.2 Seletividade/especificidade

- **Preparação do placebo**

Foi preparada uma solução contendo todos os componentes da formulação, exceto o brometo de rocurônio. Foram pesados 50 mg de acetato de sódio triidratado e 82,5 mg de cloreto de sódio, adicionou-se água destilada até cerca de 20 mL e ácido acético glacial. O pH da solução foi ajustado a 4,0 em 25 mL. Desta solução foram transferidas alíquotas de 1,0, 2,0 e 3,0 mL para balões volumétricos de 10 mL. Cada balão foi completado com água Milli-Q.

- **Procedimento**

As soluções resultantes foram injetadas no equipamento de eletroforese capilar em duplicata, a fim de avaliar a interferência dos excipientes (sobreposição dos picos).

4.3.10.3 Linearidade

- Preparação das soluções padrão

Para a construção da curva analítica foram pesados exatamente cerca de 50,0 mg de brometo de rocurônio e transferidos para balão volumétrico de 100 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de água Milli-Q até dissolução e completou-se com a mesma. Foi preparada em um balão volumétrico de 50 mL uma solução de brometo de tetrabutilamônio (padrão interno) em concentração de 1000,0 µg/mL. Destas soluções, foram transferidas sete alíquotas, cujos volumes variavam entre 1,0 e 7,0 mL (padrão de brometo de rocurônio) e 1,0 mL de padrão interno (brometo de tetrabutilamônio 1000,0 µg/mL), respectivamente, para balões volumétricos de 10 mL (triplicata). O volume foi completado com água Milli-Q.

- Procedimento

As soluções resultantes foram injetadas no equipamento de eletroforese capilar em duplicata e avaliou-se a linearidade pelo método dos mínimos quadrados.

4.3.10.4 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

- Os cálculos para determinação do limite de detecção e limite de quantificação foram baseados na estimativa do desvio padrão da resposta e a inclinação da curva analítica a partir das formulas:

$$LD = \frac{DP \times 3,3}{b}$$

$$LQ = \frac{DP \times 10}{b}$$

Onde DP é a estimativa do desvio padrão da resposta da curva analítica e b é a inclinação da curva analítica.

4.3.10.5 Repetibilidade e precisão intermediária

- Preparação do padrão

Foi pesado exatamente cerca de 25,0 mg de brometo de rocurônio e transferido para balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de água Milli-Q até dissolução e completou-se com a mesma (solução mãe padrão). Foram pesados exatamente cerca de 50,0 mg de brometo de tetrabutilamônio e transferidos para balão volumétrico de 50 mL (padrão interno em concentração de 1000,0 $\mu\text{g/mL}$). Destas soluções, foram transferidas uma alíquota de 2,0 mL e outra de 1,0 mL, respectivamente, para balão volumétrico de 10 mL (triplicata). O volume foi completado com água Milli-Q.

- Preparação da amostra

Foram misturados quatro frascos em um béquer de 25 mL. Retirou-se uma alíquota de 10,0 mL, que foi transferida para balão volumétrico de 50 mL e o volume completado com água Milli-Q. Desta solução foram retiradas nove alíquotas de 1,0 mL, transferidas para balões volumétricos de 10 mL e adicionados 1,0 mL de padrão interno (brometo de tetrabutilamônio 1000,0 $\mu\text{g/mL}$). Adicionou-se água Milli-Q até completar o volume.

- Procedimento

As soluções resultantes foram injetadas no equipamento de eletroforese capilar em duplicata. Repetiu-se o mesmo procedimento durante os dois dias seguintes com diferentes tomadas de ensaio.

4.3.10.6 Exatidão

- Preparação do padrão

Foram pesados exatamente cerca de 25,0 mg de brometo de rocurônio e transferido para balão volumétrico de 50 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de água Milli-Q até completar (solução mãe padrão). Foi preparada em um balão volumétrico de 50

mL uma solução de brometo de tetrabutilamônio em água Milli-Q (padrão interno) em concentração de 1000,0 µg/mL.

- Preparação da amostra

Foram misturados em béquer os conteúdos de três frascos comerciais de brometo de rocurônio. Retirou-se uma alíquota 5,0 mL e foi transferida para balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com água Milli-Q (solução mãe amostra).

- Procedimento

Alíquotas das soluções mãe das amostras e padrão foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL (triplicata). O volume foi completado com água Milli-Q, conforme o esquema a seguir:

Tabela 17. Preparação das soluções padrão e soluções amostra para os ensaios de recuperação na determinação de brometo de rocurônio através de eletroforese capilar.

Balão	Solução padrão 500,0 µg/mL (mL)	Solução amostra 500,0 µg/mL (mL)	Solução padrão interno 1000,0 µg/mL (mL)
1	1,0	---	1,0
2	---	1,0	1,0
3	1,0	1,0	1,0
4	3,0	1,0	1,0
5	5,0	1,0	1,0

- Procedimento

As soluções resultantes foram injetadas no equipamento de eletroforese capilar em duplicata. A porcentagem de recuperação do padrão (%RP) foi calculada através da seguinte equação:

$$\%RP = \frac{ca - cna}{cp} \times 100$$

Onde,

%RP = Porcentagem do padrão de brometo de rocurônio recuperada

ca = Concentração de brometo de rocurônio encontrada na amostra adicionada de solução padrão mãe;

cna = Concentração de brometo de rocurônio encontrada na amostra não adicionada de solução padrão mãe;

cp = Concentração do padrão de brometo de rocurônio.

4.3.10.7 Robustez

A robustez do método foi avaliada mediante um estudo de planejamento fatorial Plackett Burmann. Foram estudados os fatores: porcentagem de solvente orgânico (acetonitrila), concentração de sulfato de quinina, pH, temperatura e tensão. Foram também introduzidas no planejamento duas variáveis fantasma para calcular o erro total. Todas as condições analíticas foram preparadas diária e aleatoriamente em separado e em duplicata.

- **Procedimento**

Foi preparada uma solução como descrita no item “conformidade do sistema”, sendo assim, 200,0 µg/mL para brometo de rocurônio e 100,0 µg/mL de brometo de tetrabutílamônio, em balão volumétrico de 10 mL. A resposta avaliada foi a resolução entre o brometo de rocurônio e o brometo de tetrabutílamônio. Os efeitos de cada fator foram calculados conforme o esquema constante na Tabela 18.

Tabela 18. Fatores, níveis e matriz para os testes de robustez na determinação de brometo de rocurônio através de eletroforese capilar.

Fator		Nível inferior (-)	Nível zero (0)	Nível superior (+)
A) Acetonitrila (%)		8,0	10,0	12,0
B) Fantasma		---	---	---
C) Sulfato de quinina (mM)		0,7	1,0	1,3
D) pH		3,0	3,2	3,4
E) Fantasma		---	---	---
F) Temperatura (°C)		20,0	25,0	30,0
G) Tensão (kV)		22,5	25,0	27,5

		Matriz						
Exp. no.	Corrida	Fator A	Fator B	Fator C	Fator D	Fator E	Fator F	Fator G
1		12,0	-	0,7	3,4	-	30,0	27,5
2		12,0	+	0,7	3,0	+	20,0	27,5
3		12,0	+	1,3	3,0	-	30,0	22,5
4		8,0	+	1,3	3,4	-	20,0	27,5
5		12,0	-	1,3	3,4	+	20,0	22,5
6		8,0	+	0,7	3,4	+	30,0	22,5
7		8,0	-	1,3	3,0	+	30,0	27,5
8		8,0	-	0,7	3,0	-	20,0	22,5
9		12,0	-	0,7	3,4	-	30,0	27,5
10		12,0	+	0,7	3,0	+	20,0	27,5
11		12,0	+	1,3	3,0	-	30,0	22,5
12		8,0	+	1,3	3,4	-	20,0	27,5
13		12,0	-	1,3	3,4	+	20,0	22,5
14		8,0	+	0,7	3,4	+	30,0	22,5
15		8,0	-	1,3	3,0	+	30,0	27,5
16		8,0	-	0,7	3,0	-	20,0	22,5

4.3.10.8 Condições de estresse para formação de produtos de degradação

Em dois diferentes balões volumétricos de 10 mL foram pesados 10,0 mg de padrão de brometo de rocurônio. No primeiro balão foi adicionado NaOH 1,0 M e no segundo balão foi adicionado HCl 1,0 M até completar o volume. Ambas as soluções

foram transferidas para frascos de vidro e colocados em um banho-maria, durante 6 hrs., a 60 °C. Após resfriamento e neutralização das soluções, foi aplicado um volume de 20 µL em uma cromatoplaça de sílica gel GF 254. A fase móvel foi constituída de iodeto de potássio:acetonitrila:2-propanol (10:20:70) e a revelação foi feita com vapores de iodo (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2008). Após confirmação do produto de degradação final, procedeu-se à injeção das soluções descrita acima no equipamento de eletroforese capilar.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Resultados e discussão da caracterização da matéria-prima de brometo de vecurônio

5.1.1 Faixa de fusão

Tabela 19. Resultados obtidos na determinação da faixa de fusão do brometo de vecurônio.

Determinação	Faixa de fusão
A	228 °C -231 °C
B	227 °C -231 °C
C	228 °C -230 °C
Média	228 °C – 231 °C

5.1.2 Espectrometria no infravermelho

Figura 6. Espectro de absorção no infravermelho do brometo de vecurônio em pastilha de KBr.

A determinação da faixa de fusão do brometo de vecurônio apresentou resultados compreendidos em um intervalo entre 228 °C e 231 °C (Tabela 19) tendo um intervalo de 1,0 °C mais amplo do que o encontrada na literatura (MERCK, 2006). É importante salientar que a determinação é visual, e não é tão confiável quanto uma técnica totalmente automatizada. O espectro de absorção no infravermelho (Figura 6) apresenta as bandas características para ésteres a 1228,3 cm^{-1} e compostos nitrogenados quaternários e terciários a 1740,8 e 2932,3 cm^{-1} (SILVERSTEIN, 2000), assim sendo uma confirmação da estrutura química. Em 3419,9 apresenta a banda característica de grupos hidroxila.

5.2 Resultados e discussão do método cromatográfico para determinação de brometo de vecurônio

5.2.1 Desenvolvimento do método analítico para determinação quantitativa de brometo de vecurônio através de cromatografia líquida de alta eficiência

A cronologia do desenvolvimento do método cromatográfico esta resumida na Tabela 1. Os testes preliminares iniciaram-se com colunas cromatográficas apolares (C8 e C18). Porém, em todas as tentativas não se obtiveram resultados satisfatórios (o tempo de retenção foi sempre igual ao tempo do solvente, sistemas 1, 2, 3 e 4). Nos primeiros quatro sistemas avaliados, foi adicionado um agente pareador iônico (octanosulfonato de sódio) para promover uma interação, mas em nenhuma concentração testada obtiveram-se resultados satisfatórios. Foram avaliadas as colunas ciano (sistemas 5, 6, 7, e 8), porém, em nenhuma concentração avaliada do modificador orgânico (acetonitrila) obtiveram-se resultados satisfatórios ($k = 0$). Devido à insuficiente interação cromatográfica entre as colunas C8, C18 e ciano com o brometo de vecurônio, procedeu-se a avaliar a retenção com coluna amino. No sistema 9 a retenção é atingida, porém, a concentração de fosfato foi diminuída pela metade do sistema 9 para o sistema 10, sendo, o pH da fase móvel ajustado sempre em 4,6 com ácido fosfórico diluído. Nestas condições obteve-se um k_1 de 1,88 para o padrão interno (anlodipino) e $k_2 = 2,75$ para o brometo de vecurônio, com resolução entre estas duas substâncias de 4,95.

5.2.2 Validação do método analítico para determinação quantitativa de brometo de vecurônio através de cromatografia líquida de alta eficiência

5.2.2.1 Conformidade do sistema

Toda técnica instrumental empregada para o controle de qualidade físico-químico de medicamentos deve proporcionar resultados confiáveis para poder ser utilizada de maneira rotineira.

A Tabela 20 apresenta os resultados característicos de um dia de trabalho no processo de validação, estes valores não tiveram mudanças significativas nos demais dias. Observa-se que nenhum valor de desvio padrão relativo (DPR) é maior do que 2,00%, confirmando-se assim a baixa variabilidade do equipamento. A separação do brometo de vecurônio e o padrão interno (besilato de anlodipino) sempre foi total, verificando-se pelo resultado de resolução ($R_s > 2,00$). O tempo de retenção, a altura e os pratos teóricos apresentados na Tabela 20 correspondem ao brometo de vecurônio e a resolução corresponde à separação entre o anlodipino e o brometo de vecurônio.

Tabela 20. Resultados obtidos no primeiro dia da validação do método cromatográfico para determinação de brometo de vecurônio.

Injeção	Tempo de retenção	Altura	Pratos teóricos	Resolução
1	5,61	180550	6687,64	4,94
2	5,62	178568	6675,48	4,93
3	5,64	175552	6687,26	4,96
4	5,64	176262	6600,46	4,97
5	5,64	177880	6628,34	4,94
Média	5,63	177762,4	6655,8	4,95
DP	0,01	1972,9	39,39	0,02
DPR	0,21	1,11	0,59	0,32

5.2.2.2 Seletividade/especificidade

A seletividade de um método cromatográfico é avaliada pela interferência da matriz (RIBANI, 2004). A Figura 7 mostra a sobreposição de cromatogramas correspondentes a soluções placebo preparadas em concentrações crescentes equivalentes a 100,0, 200,0 e 300,0 µg/mL de brometo de vecurônio. Observa-se que independentemente da concentração das soluções placebo, o sinal instrumental do cromatografo não interfere no tempo de retenção do brometo de vecurônio e nem do padrão interno (besilato de anlodipino), verificando-se assim a seletividade do método. Unicamente é observada na Figura 7 uma perturbação correspondente ao tempo morto (sinal instrumental da fase móvel em 1,8 minutos), visto que os excipientes não possuem características de absorvância no comprimento de onda utilizado.

Figura 7. Sobreposição de cromatogramas da seletividade do método para determinação de brometo de vecurônio. Condições analíticas: coluna cromatográfica amino (Luna® 150 x 4,6 cm) 5µm (Phenomenex®); fase móvel: acetonitrila:fosfato sódico monobásico 25 mM (50:50 v/v); pH: 4,6; vazão: 1,0 mL/min; detecção UV a 205 nm e temperatura de 25 °C.

5.2.2.3 Linearidade, limite de detecção e limite de quantificação

Tabela 21. Resultados obtidos da curva analítica pelo método cromatográfico para determinação de brometo de vecurônio.

Parâmetro estatístico	Brometo de vecurônio
Intervalo de concentração (µg/mL)	50,0 – 350,0
Intercepto	-0,0151
Inclinação	0,0077
Coeficiente de correlação (<i>r</i>)	0,9999
Desvio padrão da curva analítica	0,0018
Limite de detecção (µg/mL)	0,76
Limite de quantificação (µg/mL)	2,31
Teste <i>F</i>	1313128,64

$$F_{(0,05, 1,5)} = 6,61$$

Como é observado na Tabela 21, o *r* apresenta um valor muito próximo da unidade, indicando excelente proporcionalidade entre o intervalo de concentração avaliado e a resposta instrumental. Outro teste estatístico que confirma a proporcionalidade é o teste *F*, resultante da análise de variância. O valor experimental deve ser pelo menos 10 vezes maior que o valor tabelado para um nível de confiança de 95% (PIMENTEL, 1996). O valor obtido é muito maior do que 10 vezes o valor tabelado para 1 e 5 graus de liberdade bicaudal (6,61), concluindo-se, assim, proporção linear e validade da regressão para o nível de confiança selecionado. A Figura 8 mostra a representação gráfica da curva analítica, o eixo das ordenadas corresponde a razão de áreas do brometo de vecurônio e besilato de anlodipino, o eixo das abscissas indica a concentração em µg/mL.

Figura 8. Curva analítica de brometo de vecurônio obtida através de cromatografia líquida de alta eficiência. Condições analíticas: coluna cromatográfica amino (Luna® 150 x 4,6 cm) 5µm (Phenomenex®); fase móvel: acetonitrila:fosfato sódico monobásico 25 mM (50:50 v/v); pH: 4,6; vazão: 1,0 mL/min; detecção UV a 205 nm e temperatura de 25 °C.

Figura 9. Cromatograma representativo de solução padrão de besilato de anlodipino (100,0 µg/mL) e solução padrão de brometo de vecurônio (200,0 µg/mL). I) íon besilato. II) anlodipino. III) brometo de vecurônio. Condições analíticas: coluna cromatográfica amino (Luna® 150 x 4,6 cm) 5µm (Phenomenex®); fase móvel: acetonitrila:fosfato sódico monobásico 25 mM (50:50 v/v); pH: 4,6; vazão: 1,0 mL/min; detecção UV a 205 nm e temperatura de 25 °C.

Figura 10. Avaliação da faixa linear de brometo de vecurônio realizada por cromatografia líquida de alta eficiência. Linhas pontilhadas representam o limite superior e inferior a 95% de confiança.

A Figura 9 mostra um cromatograma representativo da mistura de solução padrão de besilato de anlodipino e brometo de vecurônio. Observa-se que existe uma total separação entre os padrões, resolução (R_s) > 2,00, bem como um confiável tempo de separação entre o volume morto e o anlodipino ($k_1 = 1,88$). A distribuição normal dos níveis da curva analítica é apresentada na Figura 10. Observa-se que nenhum ponto avaliado ultrapassa os limites superior e inferior, verificando assim a confiabilidade dos resultados (NETO, 2002).

5.2.2.4 Repetibilidade e precisão intermediária

A repetibilidade foi avaliada pelas análises realizadas em cada dia (nove). A precisão intermediária foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) de uma via. Foi realizada em três dias consecutivos pelo mesmo analista. O objetivo principal foi avaliar a variabilidade intra-dia e inter-dia (ARUGA, 2004). Também foi determinado o teor do fármaco no medicamento. A Tabela 22 apresenta os resultados obtidos para a precisão intermediária.

Tabela 22. Resultados obtidos na avaliação da repetibilidade e precisão intermediária para a determinação quantitativa de brometo de vecurônio através de cromatografia líquida de alta eficiência.

	Precisão intermediária*		
	Amostra A**	Amostra B**	Amostra C**
Inter-dia	4,17 ± 0,02 (104,2%)	3,88 ± 0,02 (97,0%)	9,90 ± 0,05 (99,0%)
DP	0,0028	0,0008	0,0010
DPR	1,27	0,73	0,32
Intra-dia			
Dia 1	4,15 ± 0,02	3,85 ± 0,02	9,91 ± 0,06
DP	0,03	0,02	0,08
DPR	0,76	0,59	0,85
Dia 2	4,13 ± 0,02	3,89 ± 0,02	9,86 ± 0,04
DP	0,03	0,03	0,05
DPR	0,65	0,88	0,55
Dia 3	4,23 ± 0,02	3,91 ± 0,02	9,93 ± 0,06
DP	0,03	0,03	0,07
DPR	0,72	0,84	0,72

* n = 9/dia

** = mg/frasco

DP = Desvio padrão

DPR = Desvio padrão relativo (%)

Os teores de brometo de vecurônio no medicamento estão dentro de um intervalo de 95,0% - 105,0%. Os desvios padrão relativo tanto intra-dia como inter-dia, foram menores do que 2%, indicando assim pouca variabilidade do método durante três dias consecutivos, quando executado pelo mesmo analista. Cabe salientar que as soluções se mantiveram estáveis desde que armazenadas em geladeira durante os experimentos.

A Figura 11 mostra um cromatograma representativo de uma amostra de brometo de vecurônio na precisão intermediária. Observa-se que este é muito parecido ao cromatograma dos padrões devido a inexistência de interferência da matriz comprovada no teste de seletividade.

Figura 11. Cromatograma representativo de uma amostra contendo brometo de vecurônio. I) íon besilato. II) anlodipino (100,0 µg/mL). III) brometo de vecurônio (200,0 µg/mL). Condições analíticas: coluna cromatográfica amino (Luna® 150 x 4,6 cm) 5µm (Phenomenex®); fase móvel: acetonitrila:fosfato sódico monobásico 25 mM (50:50 v/v); pH: 4,6; vazão: 1,0 mL/min; detecção UV a 205 nm e temperatura de 25 °C.

5.2.2.5 Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo teste de recuperação (THOMPSON, 1999). A Tabela 23 mostra os resultados obtidos nos três níveis avaliados para as três amostras (A, B e C). Pode ser observado que o intervalo de recuperação não é inferior a 98,0% e não é superior a 102,0%, indicando assim boa concordância entre as quantidades adicionadas de solução padrão e as quantidades recuperadas nas soluções amostra de medicamento fortificado. Cada determinação foi realizada em triplicata para calcular o intervalo de confiança e desvio padrão relativo. Com os resultados obtidos, pode-se concluir que o método é exato sem perda de solução padrão adicionada nas amostras testadas.

Tabela 23. Resultados obtidos na determinação da porcentagem de recuperação de solução padrão de brometo de vecurônio adicionada, através do método cromatográfico.

Amostra	Teste de recuperação		Recuperação (%)*
	Quantidade (µg)		
	Adicionada	Recuperada	
A	400	405,2 ± 1,6	101,3
	1600	1622,4 ± 1,8	101,4
	2800	2844,8 ± 4,5	101,6
B	400	394,0 ± 0,8	98,5
	1600	1612,8 ± 3,1	100,8
	2800	2867,2 ± 1,7	102,4
C	400	392,0 ± 1,1	98,0
	1600	1628,8 ± 3,5	101,8
	2800	2833,6 ± 4,9	101,2

* n = 3

5.2.2.6 Robustez

Os testes da robustez foram projetados por um planejamento fatorial completo a dois níveis (RODRIGUEZ, 2005). A Tabela 24 mostra os resultados obtidos em função da resolução (*Rs*). Tendo em consideração que o valor nominal é 4,95, outros valores se obtiveram com as modificações dos fatores, porém, em nenhum dos dois níveis avaliados de nenhum fator a resolução se observa comprometida, sempre foi maior do que 2,00, indicando com isto que o método é capaz de suportar mudanças provenientes de erros aleatórios e erros de analista. Assim sendo, considera-se o método proposto robusto nas condições analíticas avaliadas para a resposta resolução.

Tabela 24. Condições cromatográficas, níveis e resultados obtidos na determinação da robustez do método cromatográfico para determinação de brometo de vecurônio.

Condições cromatográficas				
Fatores	Nível inferior (-)	Nível zero (0)	Nível superior (+)	
A) Fosfato sódico monobásico (mM)	20,0	25,0	30,0	
B) Acetonitrila (%)	45,0	50,0	55,0	
C) Temperatura (°C)	20,0	25,0	30,0	
Modelo da matriz e resultados				
Exp. No.	Fator A	Fator B	Fator C	<i>Rs</i>
1	-	-	-	4,60
2	+	-	-	3,36
3	-	+	-	5,10
4	+	+	-	4,05
5	-	-	+	4,08
6	+	-	+	3,44
7	-	+	+	4,50
8	+	+	+	4,18
9	-	-	-	4,36
10	+	-	-	3,37
11	-	+	-	5,04
12	+	+	-	4,14
13	-	-	+	4,06
14	+	-	+	3,48
15	-	+	+	4,84
16	+	+	+	4,12

A Figura 12 mostra o impacto de cada fator ensaiado. Quando a concentração de fosfato de sódio aumenta de 20,0 para 30,0 mM, a *Rs*, diminui aproximadamente de 4,60 para 3,80 sem causar sobreposição e quando a proporção de acetonitrila aumenta de 45,0 para 55,0%, a *Rs* aumenta nas mesmas proporções que no caso do fosfato de sódio. A temperatura não tem efeito significativo na *Rs*, sendo o fator menos crítico na separação.

Figura 12. Representação gráfica dos efeitos na avaliação da robustez do método cromatográfico para determinação de brometo de vecurônio obtendo como resposta a resolução.

A Figura 13 mostra a representação em 3D da avaliação da robustez mantendo constante a temperatura (fator menos crítico). Pode ser observado que a R_s nunca alcança o valor mínimo para obter total separação ($R_s < 2,00$).

Figura 13. Superfície de resposta na avaliação da robustez do método cromatográfico para determinação de brometo de vecurônio.

5.2.2.7 Condições de estresse para formação de produtos de degradação

Figura 14. Cromatograma obtido a partir da degradação forçada da matéria-prima. I) brometo de vecurônio. II) produto de degradação final. Condições analíticas: coluna cromatográfica amino (Luna® 150 x 4,6 cm) 5µm (Phenomenex®); fase móvel: acetonitrila:fosfato sódico monobásico 25 mM (50:50 v/v); pH: 4,6; vazão: 1,0 mL/min; detecção UV a 205 nm e temperatura de 25 °C.

Como é observado na Figura 14, o método proposto é capaz de separar o brometo de vecurônio do produto de degradação final. Isto é importante, pois confere à metodologia analítica utilidade para poder determinar prazo de validade no medicamento avaliando a hidrólise no decorrer do tempo. Com este resultado se alcança especificidade unicamente para o produto de degradação final, visto que existem outros produtos intermediários de cinética dificilmente controlável (KINGET, 1976). A especificidade não deve ser confundida com a seletividade. Entretanto, como no caso do vocabulário sugerido pela ICH e alguns outros órgãos esta nomenclatura ainda não está bem definida. Desde o ponto de vista de química analítica são duas avaliações diferentes que são confundidas freqüentemente (VESSMAN, 1996). No vocabulário da “Pure and Applied Chemistry” faz-se menção a esta diferença conceitual (VESSMAN, 2001), indicando a especificidade como o último nível da seletividade.

5.3 Resultados e discussão do método eletroforético para determinação de brometo de vecurônio

5.3.1 Desenvolvimento do método analítico para determinação quantitativa de brometo de vecurônio através de eletroforese capilar

Como é observado na Figura 3, o brometo de vecurônio é um fármaco que não possui grupos cromóforos, motivo pelo qual se procedeu às determinações indiretas no ultravioleta. Foram testadas várias substâncias cromóforas e como mostra a Tabela 4, iniciou-se com o brometo de 1-hexadecilpiridínio, entretanto não foram obtidos resultados satisfatórios, pois se observava instabilidade na linha de base e baixa resposta instrumental. Do sistema 2 ao sistema 5 foi testada a DL-fenilalanina como substância cromófora. Obteve-se significativa melhora na linha de base quando comparada ao sistema 1, porém, a separação com os padrões internos era insatisfatória (deficiente resolução). Do sistema 6 ao sistema 14 utilizou-se sulfato de quinina em diferentes concentrações, comprimentos de onda, intervalos de pH, com ou sem adição de solventes orgânicos e soluções acidificadas com diferentes ácidos. O sistema 14 foi o que melhor resultado apresentou em função de tempo de análise, resolução, simetria dos picos, intensidade da resposta instrumental e foi escolhido para validação e aplicação em medicamentos.

5.3.2 Validação do método analítico para determinação quantitativa de brometo de vecurônio através de eletroforese capilar

5.3.2.1 Conformidade do sistema

Da mesma forma que em cromatografia líquida de alta eficiência, o método eletroforético era avaliado no começo de cada dia de trabalho a fim de detectar qualquer desvio da resposta instrumental (CHAN, 2004). Na Tabela 25 são apresentados os resultados obtidos no primeiro dia da validação e estes não apresentaram mudanças significativas em todo o processo da validação analítica. O valor da *Rs* apresenta um resultado capaz de produzir separação total e número de pratos teóricos suficientes para se obter uma eficiência aceitável na determinação de

brometo de vecurônio. Os valores de desvio padrão relativo não ultrapassam 3,00%, evidenciando, assim, que o equipamento trabalha com conformidade recomendável para técnicas eletroforéticas. Foram aplicadas no máximo dez injeções por cada conjunto de vials que contém o eletrólito de corrida.

Tabela 25. Resultados obtidos no primeiro dia da validação do método eletroforético para determinação de brometo de vecurônio.

Injeção	Tempo de migração	Altura	Pratos teóricos	Resolução
1	2,64	36,42	31580,65	7,70
2	2,64	36,33	31066,07	7,74
3	2,64	36,54	31567,77	7,68
4	2,64	35,22	30373,18	7,72
5	2,65	36,44	32037,96	7,75
Média	2,64	36,19	31325,13	7,72
DP	0,003	0,55	633,56	0,03
DPR	0,14	1,51	2,02	0,38

O tempo de migração, altura e pratos teóricos correspondem ao brometo de vecurônio. A resolução corresponde à separação entre o brometo de vecurônio e o brometo de tetrabutilamônio. Embora o valor da resolução seja 7,72 o tempo total da análise não ultrapassa 7 minutos.

5.3.2.2 Seletividade/especificidade

A seletividade do método foi avaliada pela pesquisa de interferentes (excipientes da formulação). Um placebo da formulação foi preparado em laboratório com as mesmas quantidades dos medicamentos comercializados da mesma forma da preparada no mesmo teste na técnica cromatográfica. Unicamente é observado um sinal negativo correspondente ao íon sódio presente na formulação.

Figura 15. Seletividade do método eletroforético. Sobreposição de eletroferogramas de soluções placebo de brometo de vecurônio. Condições analíticas: capilar de sílica fundida de 40 cm de comprimento total, 31,5 cm de comprimento efetivo e 50 μm de diâmetro interno; eletrólito: sulfato de quinina 1,0 mM, acetonitrila 8,0%; pH; 3,3 (acidificado com HCl); injeção: hidrodinâmica de 5 seg/50 mbar; tensão: +17,5 kV; detecção indireta UV a 230 nm e temperatura de 25 °C.

Como mostra a Figura 15, na medida em que se aumenta a concentração da solução placebo, aumenta-se a resposta instrumental, porém, nenhuma concentração avaliada compromete ou interfere na determinação do brometo de vecurônio ou no padrão interno (brometo de tetrabutylamônio) (HORWITZ, 1995).

5.3.2.3 Linearidade, limite de detecção e limite de quantificação

Utilizou-se o método dos mínimos quadrados e análise de variância para demonstrar estatisticamente que o método proposto apresenta concentração diretamente proporcional à resposta instrumental. Foram avaliados sete níveis de concentração em triplicata (entre 50,0% e 150,0% do valor nominal, isto é, de 50,0 a 350,0 $\mu\text{g/mL}$). O resumo dos resultados é mostrado na Tabela 26. O coeficiente de correlação (r) é próximo da unidade (0,9998), indicando boa proporcionalidade, porém este valor não é conclusivo para afirmar uma função linear, procedendo-se assim à comparação de variâncias.

Tabela 26. Resultados obtidos da curva analítica através do método eletroforético para determinação de brometo de vecurônio.

Parâmetro estatístico	Brometo de vecurônio
Intervalo de concentração ($\mu\text{g/mL}$)	50,0 – 350,0
Intercepto	-0,1035
Inclinação	0,0071
Coeficiente de correlação (r)	0,9998
Desvio padrão da curva analítica	0,0107
Limite de detecção ($\mu\text{g/mL}$)	4,99
Limite de quantificação ($\mu\text{g/mL}$)	15,12
Teste F	30620,78

$$F_{(0,05, 1,5)} = 6,61$$

Da mesma forma que no método cromatográfico, foi calculado o valor F , dando um resultado satisfatório para concluir estatisticamente que a medida instrumental é diretamente proporcional à concentração de brometo de vecurônio. Isto significa que a inclinação da função linear obtida não é nula (inclinação $\neq 0$). (WEISBERG, 2005; GONZÁLEZ, 2006; CHATTERJEE, 2006).

Como era de se esperar, os valores para o limite de detecção e o limite de quantificação, foram maiores no método eletroforético que no método cromatográfico; isto é devido à pequena região de detecção na eletroforese capilar com detecção ultravioleta. No caso, o diâmetro interno do capilar utilizado foi de 50 μm (ALTRIA, 1996). Sendo assim, uma das desvantagens do método proposto, porém, cabe salientar o alcance exclusivo do método para determinação de brometo de vecurônio em medicamentos. Se o método proposto for se estender a outras matrizes, será necessaria a avaliação de técnicas de pré-concentração, seja ou não em linha, para se obter um ganho na concentração.

Figura 16. Eletroferograma representativo das soluções padrão de brometo de vecurônio (200,0 $\mu\text{g/mL}$) e brometo de tetrabutilamônio (100,0 $\mu\text{g/mL}$). I) brometo de vecurônio. II) brometo de tetrabutilamônio. III) fluxo eletroosmótico. Condições analíticas: capilar de sílica fundida de 40 cm de comprimento total, 31,5 cm de comprimento efetivo e 50 μm de diâmetro interno; eletrólito: sulfato de quinina 1,0 mM, acetonitrila 8,0%; pH; 3,3 (acidificado com HCl); injeção: hidrodinâmica de 5 seg/50 mbar; tensão: +17,5 kV; detecção indireta UV a 230 nm e temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$.

Figura 17. Curva analítica de brometo de vecurônio através de eletroforese capilar. Condições analíticas: capilar de sílica fundida de 40 cm de comprimento total, 31,5 cm de comprimento efetivo e 50 μm de diâmetro interno; eletrólito: sulfato de quinina 1,0 mM, acetonitrila 8,0%; pH; 3,3 (acidificado com HCl); injeção: hidrodinâmica de 5 seg/50 mbar; tensão: +17,5 kV; detecção indireta UV a 230 nm e temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$.

As Figuras 16 e 17 mostram o eletroferograma representativo de soluções padrão de brometo de vecurônio e brometo de tetrabutilamônio e a representação gráfica da curva analítica, respectivamente. Os picos invertidos indicam a determinação indireta.

Figura 18. Representação gráfica da faixa linear do brometo de vecurônio no método eletroforético. Linhas pontilhadas representam o limite superior e inferior a 95% de confiança.

Na Figura 18 observa-se uma distribuição normal em cada nível da linearidade. Nenhum dos pontos ultrapassa o limite superior e inferior. Esta observação garante que não existe saturação na detecção (BARROS NETO, 2003).

5.2.2.4 Repetibilidade e precisão intermediária

A precisão intermediária do método eletroforético também foi avaliada pela variabilidade intra-dia e inter-dia. Usou-se ANOVA no tratamento estatístico e os resultados são apresentados na Tabela 27. Observa-se que nenhum valor supera 2,00% de desvio padrão relativo nos ensaios intra-dia e inter-dia. Os teores dos medicamentos encontram-se no intervalo entre 95,0% e 105,0%, encontrando-se dentro das especificações.

Tabela 27. Resultados obtidos na avaliação da repetibilidade e precisão intermediária para a determinação quantitativa de brometo de vecurônio através de eletroforese capilar.

	Precisão intermediária*		
	Amostra A**	Amostra B**	Amostra C**
Inter-dia	4,15 ± 0,02 (103,8%)	3,90 ± 0,02 (97,5%)	9,91 ± 0,03 (99,1%)
DP	0,0025	0,0046	0,00003
DPR	1,20	1,74	0,06
Intra-dia			
Dia 1	4,17 ± 0,02	3,87 ± 0,02	9,91 ± 0,04
DP	0,02	0,03	0,06
DPR	0,58	0,75	0,59
Dia 2	4,13 ± 0,02	3,91 ± 0,02	9,89 ± 0,03
DP	0,02	0,03	0,04
DPR	0,51	0,67	0,45
Dia 3	4,16 ± 0,02	3,92 ± 0,02	9,93 ± 0,03
DP	0,02	0,02	0,04
DPR	0,56	0,66	0,45

* n = 9/dia

** = mg/frasco

DP = Desvio padrão

DPR = Desvio padrão relativo (%)

A Figura 19 mostra um eletroferograma representativo de uma amostra do medicamento contendo brometo de vecurônio. Observa-se uma boa separação entre os excipientes da formulação farmacêutica e o brometo de vecurônio (picos negativos I e II), bem como separação do brometo de vecurônio e o brometo de tetrabutilamônio (picos negativos II e III). O tempo de retenção é aproximadamente 5 minutos possibilitando assim análises de rotina para o controle de qualidade de produto final. Durante os três dias de análise, não foi observada nenhuma mudança do sinal instrumental, indicando boa estabilidade das soluções. É importante salientar que todas as soluções são dissolvidas em água ultrapura, contribuindo assim com o cuidado do meio ambiente.

Figura 19. Eletroferograma representativo de uma amostra contendo brometo de vecurônio. I) excipientes. II) brometo de vecurônio (200,0 µg/mL). III) brometo de tetrabutilamônio (100,0 µg/mL). IV) fluxo eletroosmótico. Condições analíticas: capilar de sílica fundida de 40 cm de comprimento total, 31,5 cm de comprimento efetivo e 50 µm de diâmetro interno; eletrólito: sulfato de quinina 1,0 mM, acetonitrila 8,0%; pH; 3,3 (acidificado com HCl); injeção: hidrodinâmica de 5 seg/50 mbar; tensão: +17,5 kV; detecção indireta UV a 230 nm e temperatura de 25 °C.

5.2.2.5 Exatidão

Para determinação da exatidão do método eletroforético, usaram-se as diretrizes da AOAC International (AOAC INTERNATIONAL, 2003). A Tabela 28 mostra os resultados obtidos na recuperação de solução padrão de brometo de vecurônio adicionada às amostras de medicamentos. O intervalo da porcentagem de recuperação foi de 97,9% a 102,7%. Os resultados foram mais amplos no método eletroforético quando comparados no método cromatográfico. Foi observado que na determinação dos desvios padrão relativos de cada nível avaliado, o valor não ultrapassa 2,0%, indicando baixa variabilidade, obtendo assim baixo intervalo de confiança a 95,0%. Estes valores variam entre 0,4 e 5,6 mg (amostra A), 0,5 e 2,0 mg (amostra B) e 0,5 e 2,8 mg (amostra C).

Tabela 28. Resultados obtidos na determinação da porcentagem de recuperação de solução padrão de brometo de vecurônio adicionada, através do método eletroforético.

Amostra	Teste de recuperação		Recuperação (%)*
	Quantidade (µg)		
	Adicionada	Recuperada	
A	400	400,0 ± 0,4	100,0
	1600	1628,8 ± 1,1	101,8
	2800	2842,0 ± 5,6	101,5
B	400	391,6 ± 0,5	97,9
	1600	1633,6 ± 0,8	102,1
	2800	2875,6 ± 2,0	102,7
C	400	407,2 ± 0,5	101,8
	1600	1622,4 ± 2,0	101,4
	2800	2839,2 ± 2,8	101,4

* n = 3

5.3.2.6 Robustez

Quando é desenvolvido um novo método analítico entram em estudo algumas variáveis as quais devem ser controladas cuidadosamente; no caso da técnica de eletroforese capilar isto apresenta dificuldades para o planejamento da avaliação da robustez, visto que é necessário manter sob controle todas as condições analíticas. Quando o número de variáveis a estudar é elevado, é recomendável realizar um planejamento fatorial fracionado (SENDRA, 1999; WATERS, 2003; DEJAEGER, 2007). Para a avaliação da robustez foi utilizado um planejamento fatorial fracionado 2^{7-4} de resolução III. A Tabela 29 apresenta os resultados obtidos para a resposta R_s , onde também se observam o modelo da matriz e os valores de cada nível.

Tabela 29. Condições eletroforéticas, níveis e resultados obtidos na determinação da robustez do método eletroforético para determinação de brometo de vecurônio.

Condições eletroforéticas								
Fatores		Nível inferior (-)		Nível zero (0)		Nível superior (+)		
A (%)	Acetonitrila	6,0		8,0		10,0		
B (mM)	Sulfato de quinina	0,7		1,0		1,3		
C (Unidades)	pH	3,0		3,3		3,6		
D (°C)	Temperatura	20,0		25,0		30,0		
E	Fantasma	---		---		---		
F (kV)	Tensão	17,0		17,5		18,0		
G	Fantasma	---		---		---		
Modelo da matriz e resultados								
Exp. No.	A	B	C	D	E	F	G	Resolução
1	-	-	-	+	+	+	-	9,34
2	+	-	-	-	-	+	+	10,79
3	-	+	-	-	+	-	+	11,39
4	+	+	-	+	-	-	-	9,16
5	-	-	+	+	-	-	+	5,42
6	+	-	+	-	+	-	-	6,17
7	-	+	+	-	-	+	-	10,39
8	+	+	+	+	+	+	+	9,14
9	-	-	-	+	+	+	-	10,11
10	+	-	-	-	-	+	+	10,99
11	-	+	-	-	+	-	+	10,93
12	+	+	-	+	-	-	-	9,13
13	-	-	+	+	-	-	+	5,31
14	+	-	+	-	+	-	-	6,90
15	-	+	+	-	-	+	-	10,02
16	+	+	+	+	+	+	+	9,02

Em nenhum dos casos ensaiados o valor da R_s é menor que 2,00, mostrando assim que o método é robusto para R_s nos valores dos fatores avaliados. A Figura 20

mostra o gráfico de Pareto para o teste de robustez. Este gráfico é muito útil para uma rápida e fácil visualização dos efeitos em uma determinada avaliação (ARMSTRONG, 2006). Observa-se que os três principais fatores que causam impacto na análise estão em ordem descendente: pH, tensão, concentração de sulfato de quinina e temperatura.

Figura 20. Gráfico de Pareto dos efeitos no teste de robustez pelo método eletroforético para determinação de brometo de vecurônio.

5.3.2.7 Condições de estresse para formação de produtos de degradação

A Figura 21 mostra o eletroferograma característico de uma solução de brometo de vecurônio hidrolisada em meio ácido misturada com uma solução sem hidrolisar do brometo de vecurônio. Não foi possível obter a separação total do produto de degradação final, porém, conseguiu-se visualizar com clareza o pico correspondente ao produto de degradação final e o pico correspondente ao brometo de vecurônio. Isto é importante para a verificação da hidrólise do fármaco no medicamento no decorrer do tempo.

Figura 21. Eletroferograma de uma solução de brometo de vecurônio hidrolisada misturada com uma solução de brometo de vecurônio não hidrolisada. I) íon sódio. II) produto de degradação final. III) brometo de vecurônio. IV) brometo de tetrabutylamônio. V) fluxo eletroosmótico. Condições analíticas: capilar de sílica fundida de 40 cm de comprimento total, 31,5 cm de comprimento efetivo e 50 μ m de diâmetro interno; eletrólito: sulfato de quinina 1,0 mM, acetonitrila 8,0%; pH; 3,3 (acidificado com HCl); injeção: hidrodinâmica de 5 seg/50 mbar; tensão: +17,5 kV; detecção indireta UV a 230 nm e temperatura de 25 °C.

5.4 Comparação entre os métodos cromatográfico e eletroforético

Tabela 30. Valores obtidos para o teste F e t na comparação dos métodos analíticos propostos para a determinação de brometo de vecurônio em medicamentos.

Dia / Amostra	Teste F^*			Teste t^{**}		
	A	B	C	A	B	C
1	1,72	1,64	2,06	-1,18	-1,56	-0,14
2	1,60	1,74	1,49	-1,20	-1,59	-1,50
3	1,69	1,60	2,56	6,24	-0,56	0,33

* Valor crítico F - Snedecor com $P = 95,0\%$; $F_{8/8} = 4,43$

** Valor crítico t - Student's com $P = 95,0\%$ e 16 graus de liberdade; $t = 2,12$

É observado que o teste F que avalia as variâncias apresenta valores inferiores ao valor crítico tabelado ($F_{8/8} = 4,43$). Demonstrando com isto que os dois métodos

propostos não têm diferença significativa quanto à precisão (desvios padrão) nos três dias ensaiados. Foram avaliadas também as médias dos dois métodos, sendo que uma única média correspondente ao terceiro dia da amostra A apresentou diferença significativa. Está se considera a erros aleatórios fora de controle de analista e equipamento, visto que todos os outros valores apresentaram resultados por debaixo do valor critico tabelado a 95% de confiança ($t = 2,12$). Uma representação gráfica desta comparação de métodos é observada na Figura 22.

Figura 22. Representação gráfica da comparação dos dois métodos analíticos propostos para determinação de brometo de vecurônio em medicamentos. Condições analíticas cromatográficas: coluna cromatográfica amino (Luna® 150 x 4,6 cm) 5µm (Phenomenex®); fase móvel: acetonitrila:fosfato sódico monobásico 25 mM (50:50 v/v); pH: 4,6; vazão: 1,0 mL/min; detecção UV a 205 nm e temperatura de 25 °C. Condições analíticas eletroforéticas: capilar de sílica fundida de 40 cm de comprimento total, 31,5 cm de comprimento efetivo e 50 µm de diâmetro interno; eletrólito: sulfato de quinina 1,0 mM, acetonitrila 8,0%; pH: 3,3 (acidificado com HCl); injeção: hidrodinâmica de 5 seg/50 mbar; tensão: +17,5 kV; detecção indireta UV a 230 nm e temperatura de 25 °C.

5.5 Resultados e discussão da caracterização da matéria-prima de brometo de pancurônio

5.5.1 Faixa de fusão

Tabela 31. Resultados obtidos na determinação da faixa de fusão do brometo de pancurônio.

Determinação	Faixa de fusão
A	218 - 221 °C
B	218 - 220 °C
C	217 - 219 °C
Média	218-220 °C

5.5.2 Espectrometria no infravermelho

Figura 23. Espectro de absorção no infravermelho do brometo de pancurônio em pastilha de KBr.

A determinação da faixa de fusão do brometo de pancurônio apresentou resultados compreendidos em um intervalo entre 218 °C e 220 °C (Tabela 31); estes resultados são mais amplos quando comparados com os reportados na literatura (MERCK,

2006). Algumas das causas poderiam ser as discutidas na determinação de brometo de vecurônio descrita anteriormente.

A Figura 23 mostra o espectro de absorção no infravermelho do brometo de pancurônio, nela são observadas as bandas de absorção características para o fármaco. São pronunciadas as bandas de absorções em $1231,8\text{ cm}^{-1}$, $1737,0\text{ cm}^{-1}$ e $3421,0\text{ cm}^{-1}$. Estas bandas são características para os grupos éster, nitrogênio quaternário e grupos hidroxila, respectivamente. Desta forma, caracterizou-se o material utilizado como padrão no processo de validação analítica (SILVERSTEIN, 2000). Em $3421,0$ observa-se a banda característica de grupos hidroxila.

5.6 Resultados e discussão do método cromatográfico para determinação de brometo de pancurônio

5.6.1 Desenvolvimento do método analítico para determinação quantitativa de brometo de pancurônio através de cromatografia líquida de alta eficiência

O desenvolvimento do método cromatográfico teve sua cronologia como apresentado na Tabela 7. O objetivo principal foi desenvolver um método simples, confiável e dentro do possível, de baixo impacto ambiental. Em termos cromatográficos, o objetivo foi baseado na obtenção de um fator de capacidade (k) maior que 1,00 para o brometo de pancurônio, bem como uma resolução (R_s) maior que 2,00 para o sinal entre os excipientes e o brometo de pancurônio no menor tempo de análise. Nas primeiras tentativas foram utilizadas colunas C18 e acetonitrila como solvente orgânico (sistemas do 1 ao 5). Nestes sistemas, a coluna cromatográfica não teve interação suficiente para reter o brometo de pancurônio, motivo pelo qual nos sistemas do 6 ao 10 foi adicionado um pareador iônico (octanosulfonato de sódio). Sempre foi mantida a acetonitrila como solvente orgânico, devido à possibilidade de medir a resposta instrumental em comprimentos de onda baixo. Nos primeiros 10 sistemas o k foi nulo. Do sistema 11 ao sistema 15 (coluna cromatográfica ciano) apresentam maior polaridade da fase estacionária, porém, os resultados não foram satisfatórios, obtendo-se k também nulos em todas as proporções de acetonitrila testadas. Estes resultados eram esperados devido às

características de polaridade elevada do brometo de pancurônio. Este fármaco é um sal de diamônio quaternário (Figura 4) que está ionizado em todo o intervalo de pH. A retenção do brometo de pancurônio aumentou com a mudança para uma coluna polar (sistema 16), porém, o tempo de retenção varia em função de análises repetitivas. Os sistemas 17 e 18 reproduzem o tempo de retenção e o k é maior do que 1,00. Foi escolhido para validação analítica o sistema 18, devido à menor concentração de octanosulfonato de sódio.

5.6.2 Validação do método analítico para determinação quantitativa de brometo de pancurônio através de cromatografia líquida de alta eficiência

5.6.2.1 Conformidade do sistema

Com o propósito de verificar a adequação do sistema cromatográfico, ao início de cada dia de trabalho foram injetadas cinco preparações de solução padrão de brometo de pancurônio, os resultados são apresentados na Tabela 32. Observa-se que de todas as variáveis avaliadas, nenhuma ultrapassa um desvio padrão relativo (DPR) de 2,00%, confirmando-se assim a confiabilidade na resposta instrumental. O valor de pratos teóricos é satisfatório para se obter uma eficiência aceitável.

Tabela 32. Resultados obtidos no primeiro dia da validação do método cromatográfico para determinação de brometo de pancurônio.

Injeção	Tempo de retenção	Altura	Pratos teóricos	Fator de capacidade
1	4,39	169271	8613,35	1,06
2	4,39	170844	8611,75	1,06
3	4,39	170298	8602,6	1,06
4	4,39	172100	8636,88	1,06
5	4,39	168700	8593,87	1,06
Média	4,39	170242,60	8611,69	1,06
DP	0,001	1335,88	16,10	0,00
DPR	0,02	0,78	0,19	0,00

5.6.2.2 Seletividade/especificidade

A seletividade do método foi avaliada pela pesquisa de interferentes. Um placebo da formulação foi preparado no laboratório com as mesmas proporções dos excipientes presentes nas amostras industrializadas. O produto resultante foi uma solução transparente de pH 4,3. Desta solução foram realizadas sucessivas diluições a fim de obter concentrações equivalentes de 100,0, 200,0 e 300,0 µg/mL de brometo de pancurônio.

Figura 24. Seletividade do método. Sobreposição de cromatogramas da solução placebo. I) volume morto. II) resposta instrumental correspondente aos excipientes da formulação. Condições analíticas: coluna cromatográfica amino (Luna[®] 150 x 4,6 cm) 5µm (Phenomenex[®]); fase móvel: acetonitrila:octanosulfonato sódico 50 mM (20:80 v/v); pH: 6,0; vazão: 1,0 mL/min; detecção UV a 210 nm e temperatura de 22 °C.

A Figura 24 mostra a sobreposição dos cromatogramas das três distintas concentrações de solução placebo. Pode ser observado que independentemente da concentração, os excipientes da formulação não interferem na determinação do brometo de pancurônio, isto é muito importante, pois não existe o efeito matriz (ABOUL-ENEIN, 2000). Observa-se também um pico em cerca de 2 minutos: este é correspondente à fase móvel (volume morto).

5.6.2.3 Linearidade, limite de detecção e limite de quantificação

Na Tabela 33 observam-se os resultados dos parâmetros estatísticos avaliados para a linearidade, limite de detecção e limite de quantificação. O valor obtido para o coeficiente de correlação (r) representa boa proporcionalidade entre concentração de brometo de pancurônio e área do pico correspondente ao brometo de pancurônio. THOMPSON, 2000, propõe o teste estatístico F para a confirmação do teste de validade da regressão de uma curva analítica. O valor obtido é muito maior do que 10 vezes o valor tabelado (6,61), concluindo-se assim direta proporção entre as duas variáveis.

Tabela 33. Resultados obtidos da linearidade pelo método cromatográfico para determinação de brometo de pancurônio.

Parâmetro estatístico	Brometo de pancurônio
Intervalo de concentração ($\mu\text{g/mL}$)	50,0 – 350,0
Intercepto	21304,3
Inclinação	6680,8
Coeficiente de correlação (r)	0,9999
Desvio padrão da curva analítica	8964,3
Limite de detecção ($\mu\text{g/mL}$)	4,4
Limite de quantificação ($\mu\text{g/mL}$)	13,4
Teste F	38880,08

$$F_{(0,05, 1,5)} = 6,61$$

No teste da linearidade foram representadas graficamente a curva analítica (Figura 25), o cromatograma da solução padrão de brometo de pancurônio (Figura 26) e a faixa linear (Figura 27). A curva analítica foi desenvolvida em microsoft Excel 2007® e seguiram-se as recomendações propostas por LEVIE em 2004. No cromatograma apresentado na Figura 26, observa-se uma boa simetria do pico e um tempo de retenção do brometo de pancurônio aceitável para análises de rotina. Na faixa linear (Figura 27), pode ser observado que nenhum dos pontos avaliados ultrapassa os valores críticos inferior e superior e encontram-se distribuídos de uma forma aleatória dentro de 95% de confiança, isto é, pontos cujas razões sinal/concentração não diferem mais do que 5% da inclinação da curva analítica.

Figura 25. Curva analítica de brometo de pancurônio por cromatografia líquida de alta eficiência. Condições analíticas: coluna cromatográfica amino (Luna® 150 x 4,6 cm) 5µm (Phenomenex®); fase móvel: acetonitrila:octanosulfonato sódico 50 mM (20:80 v/v); pH: 6,0; vazão: 1,0 mL/min; detecção UV a 210 nm e temperatura de 22 °C.

Figura 26. Cromatograma representativo de solução padrão de brometo de pancurônio. I) volume morto. II) brometo de pancurônio (200,0 µg/mL). Condições analíticas: coluna cromatográfica amino (Luna® 150 x 4,6 cm) 5µm (Phenomenex®); fase móvel: acetonitrila:octanosulfonato sódico 50 mM (20:80 v/v); pH: 6,0; vazão: 1,0 mL/min; detecção UV a 210 nm e temperatura de 22 °C.

Figura 27. Avaliação da faixa linear de brometo de pancurônio por cromatografia líquida de alta eficiência. Linhas pontilhadas representam o limite superior e inferior a 95% de confiança.

5.6.2.4 Repetibilidade e precisão intermediária

Foram testadas duas amostras de formulações farmacêuticas industrializadas (ampolas de 2,0 mL contendo 2,0 mg/mL de brometo de pancurônio) de diferentes fabricantes. A variabilidade intra-dia e inter-dia foi avaliada por ANOVA. Todas as determinações foram utilizadas para a quantificação do brometo de pancurônio nos medicamentos. Na tabela 34 observa-se que em uma amostra o valor encontrado de fármaco ultrapassa o 105,0%; isto preocupa, pois são medicamentos de administração parenteral e podem provocar efeitos adversos. No pior dos casos poderia causar maior relaxação muscular que a desejada já que a dose é administrada em função do peso corpóreo do paciente. A variabilidade obtida nos ensaios tanto intra-dia como inter-dia, não ultrapassa 2,00%, demonstrando assim a confiabilidade do sistema e pouca imprecisão em função de análises repetitivas em curto e médio prazo de tempo (3 dias consecutivos).

Tabela 34. Resultados obtidos na avaliação da repetibilidade e precisão intermediária para a determinação quantitativa de brometo de pancurônio através de cromatografia líquida de alta eficiência.

Precisão intermediária*		
	Amostra A**	Amostra B**
Inter-dia	2,12 ± 0,01 (106,0%)	2,03 ± 0,02 (101,5%)
DP	0,0038	0,0041
DPR	0,18	0,20
Intra-dia		
Dia 1	2,11 ± 0,01	2,04 ± 0,01
DP	0,01	0,01
DPR	0,44	0,53
Dia 2	2,12 ± 0,01	2,03 ± 0,02
DP	0,01	0,01
DPR	0,59	0,59
Dia 3	2,12 ± 0,01	2,03 ± 0,02
DP	0,01	0,02
DPR	0,65	0,97

* n = 9/dia

** = mg/mL

DP = Desvio padrão

DPR = Desvio padrão relativo (%)

A Figura 28 apresenta um cromatograma representativo de uma solução do medicamento contendo brometo de pancurônio. Observa-se que os excipientes (representados pelo número II) não interferem na determinação. O k para o brometo de pancurônio foi 1,06. Segundo Snyder (SNYDER, 1997) é recomendável que os métodos cromatográficos possuam k maior do que 1,00 para que haja interação da fase estacionária (coluna cromatográfica) com o analito em questão.

Figura 28. Cromatograma representativo de uma amostra de brometo de pancurônio. I) volume morto. II) excipientes. III) brometo de pancurônio (200,0 µg/mL). Condições analíticas: coluna cromatográfica amino (Luna® 150 x 4,6 cm) 5µm (Phenomenex®); fase móvel: acetonitrila:octanosulfonato sódico 50 mM (20:80 v/v); pH: 6,0; vazão: 1,0 mL/min; detecção UV a 210 nm e temperatura de 22 °C.

5.6.2.5 Exatidão

Tabela 35. Resultados obtidos na determinação da porcentagem de recuperação de solução padrão de brometo de pancurônio adicionada, através do método cromatográfico.

Teste de recuperação			
Amostra	Quantidade (µg)		Recuperação (%)*
	Adicionada	Recuperada	
A	500	507,6 ± 3,3	101,52
	1500	1522,6 ± 5,3	101,51
	2500	2506,6 ± 4,1	100,26
B	500	496,8 ± 2,8	99,36
	1500	1479,6 ± 3,9	98,64
	2500	2472,2 ± 2,2	98,89

* n = 3

A exatidão do método é resumida na Tabela 35. Pode ser observado que os valores obtidos estão dentro do intervalo de 98,0% a 102,0%, faixa que é tomada como aceita na maioria dos métodos analíticos com aplicações farmacêuticas (JENKE, 1996, BLIESNER, 2006).

5.6.2.6 Robustez

Tabela 36. Condições cromatográficas, níveis e resultados obtidos na determinação da robustez do método cromatográfico para a determinação quantitativa de brometo de pancurônio.

Condições cromatográficas				
Fatores	Nível inferior (-)	Nível zero (0)	Nível superior (+)	
A) Octanolsulfonato de sódio (mM)	45,0	50,0	55,0	
B) Acetonitrila (%)	15,0	20,0	25,0	
C) Temperatura (°C)	19,0	22,0	25,0	
Modelo da matriz e resultados				
Exp. No.	Fator A	Fator B	Fator C	k
1	-	-	-	0,9268
2	+	-	-	0,7760
3	-	+	-	1,7618
4	+	+	-	1,4930
5	-	-	+	0,9504
6	+	-	+	0,7830
7	-	+	+	1,8326
8	+	+	+	1,5212
9	-	-	-	0,9316
10	+	-	-	0,7783
11	-	+	-	1,7759
12	+	+	-	1,4906
13	-	-	+	0,9551
14	+	-	+	0,7806
15	-	+	+	1,8302
16	+	+	+	1,5212

A robustez foi avaliada conforme um planejamento fatorial completo a dois níveis e a resposta determinada foi o k . A Tabela 36 apresenta os valores obtidos em todos os tratamentos realizados. Observam-se valores de k menor que 1,0 isto poderia comprometer o desempenho do método proposto, desde que se considera o valor de 1,0 como indicativo de limite. A Figura 29 e Figura 30 mostram o gráfico de resposta de superfície e efeitos para o estudo da robustez. No gráfico dos efeitos (Figura 30) é importante salientar que o fator da proporção de acetonitrila é quem mais afeta o valor de k : quando a proporção diminui de 25,0% para 15,0%, o resultado obtido é um valor de k menor que 1,0. A temperatura não tem efeito estatisticamente significativo no método proposto.

Figura 29. Superfície de resposta para o estudo da robustez do método cromatográfico para determinação de brometo de pancurônio.

A Figura 31 mostra um cromatograma típico da degradação forçada da matéria-prima. Este ensaio é de vital importância, pois métodos com fins farmacêuticos devem proporcionar informação dos possíveis produtos de degradação (ICH, 2005; CHANDRAN, 2007). Previamente à injeção no cromatografo, o produto de degradação final foi verificado por cromatografia em camada delgada. Conseguiu-se com isto especificidade para o produto de degradação final do brometo de pancurônio.

Figura 30. Representação gráfica dos efeitos do estudo de robustez para o método cromatográfico para determinação de brometo de pancurônio.

5.6.2.7 Condições de estresse para formação de produtos de degradação

Figura 31. Cromatograma de uma solução de brometo de pancurônio hidrolisada em meio ácido. I) volume morto. II) brometo de pancurônio. III) produto de degradação final. Condições analíticas: coluna cromatográfica amino (Luna® 150 x 4,6 cm) 5µm (Phenomenex®); fase móvel: acetonitrila:octanosulfonato sódico 50 mM (20:80 v/v); pH: 6,0; vazão: 1,0 mL/min; detecção UV a 210 nm e temperatura de 22 °C.

5.7 Resultados e discussão do método eletroforético para determinação de brometo de pancurônio

5.7.1 Desenvolvimento do método analítico para determinação quantitativa de brometo de pancurônio através de eletroforese capilar

Como é apresentado na Tabela 10, os primeiros testes foram direcionados à análise de substâncias de pouca absorção no UV. Utilizaram-se dois sistemas cromóforos, no sistema 1 foi utilizado o imidazol porém, apresentou resultados pouco satisfatórios, observando-se muita instabilidade na linha de base. O sistema 2 apresenta melhor estabilidade da linha de base e boa simetria dos picos, visto que a histidina apresenta similar mobilidade eletroforetica com o brometo de pancurônio. Foi utilizado também no sistema 2 um contra-íon o qual confere um equilíbrio de cargas, melhorando a simetria dos picos e foi escolhido para a validação analítica (TAVARES, 2001).

5.7.2 Validação do método eletroforético para determinação quantitativa de brometo de pancurônio através de eletroforese capilar

5.7.2.1 Conformidade do sistema

Na Tabela 37 se apresentam os resultados obtidos no primeiro dia da validação. A conformidade do sistema foi aplicada em todos os dias seguintes do processo de validação analítica. Estes valores eram indicativos do que o sistema eletroforético estava adequado para a realização das análises de desempenho. Observa-se que nenhum dos valores de desvio padrão relativo (DPR) ultrapassa 3,0%. O valor de pratos teóricos é o que apresenta maior variabilidade pelo fato de ter mais variáveis inclusas no cálculo (ALTRIA, 2001). O tempo de migração, altura e pratos teóricos, correspondem ao sinal do brometo de pancurônio; enquanto que a resolução corresponde à separação entre o padrão interno (trietilamina) e o brometo de pancurônio. Foram aplicadas no máximo dez injeções por cada conjunto de vials que contém o eletrólito de corrida.

Tabela 37. Resultados obtidos no primeiro dia da validação do método eletroforético para determinação de brometo de pancurônio.

Injeção	Tempo de migração	Altura	Pratos teóricos	Resolução
1	4,08	18588	91107	4,50
2	4,11	18025	94147	4,53
3	4,13	18381	95910	4,48
4	4,15	17981	91848	4,55
5	4,18	18200	92152	4,41
Média	4,13	18235	93032,80	4,49
DP	0,04	252,87	1962,65	0,05
DPR	0,92	1,38	2,11	1,20

5.7.2.2 Seletividade/especificidade

A Figura 32 mostra uma montagem dos eletroferogramas de soluções placebo de brometo de pancurônio. Observa-se um claro aumento do sinal instrumental a medida em que se aumenta a concentração de solução placebo (picos negativos), porém, por se tratar de um método separativo, isto não afeta as determinações do brometo de pancurônio nos medicamentos avaliados. A seletividade é parte integral no protocolo de validação analítica, pois informa acerca de interferências ou efeitos da matriz (EURACHEM, 1998). O maior pico negativo observado corresponde ao equivalente de 300,0 µg/mL de brometo de pancurônio, quer dizer que ainda no nível mais concentrado o ensaio garante total separação. Foi observado que este pico deve-se principalmente ao íon sódio, o qual foi verificado pela injeção de uma solução padrão deste cátion. Este elemento é utilizado para manter a isotonia da formulação farmacêutica, característica de vital importância em medicamentos para administração parenteral.

Figura 32. Seletividade do método eletroforético. Sobreposição de eletroferogramas de soluções placebo de brometo de pancurônio. Condições analíticas: capilar de sílica fundida de 50 cm de comprimento total, 40 cm de comprimento efetivo e 50 μm de diâmetro interno; eletrólito: 5 mM L-histidina e 5 mM de ácido 2-hidroxi-isobutírico; pH 3,5; injeção: hidrodinâmica de 5 seg/0,5 psi; tensão: +25,0 kV; detecção indireta UV a 214 nm e temperatura de 25 °C.

5.7.2.3 Linearidade, limite de detecção e limite de quantificação

A linearidade é uma característica analítica muito importante no processo de validação, esta garante proporcionalidade no intervalo de concentração estudado. Na Tabela 38 observam-se os testes estatísticos r (coeficiente de correlação) e F (gerado pela análise de variância da regressão) (SAYAGO, 2004). Os resultados destes últimos suportam a proporcionalidade e validade da função linear do método proposto. Derivada da curva analítica foram obtidos os limites de detecção e quantificação, os valores foram superiores quando comparados ao método cromatográfico (VOGELGESANG, 1998; MILLER, 2002).

Na Figura 33 observa-se um eletroferograma de uma solução padrão de trietilamina (padrão interno) e brometo de pancurônio. Observa-se separação total dos picos em um curto tempo de análise, bem como, boa simetria e elevado sinal instrumental.

Tabela 38. Resultados obtidos da curva analítica para o brometo de pancurônio por eletroforese capilar.

Parâmetro estatístico	Brometo de pancurônio
Intervalo de concentração (µg/mL)	50,0 – 350,0
Intercepto	-0,0035
Inclinação	0,0068
Coeficiente de correlação (<i>r</i>)	0,9999
Desvio padrão da curva analítica	0,0113
Limite de detecção (µg/mL)	5,5
Limite de quantificação (µg/mL)	16,6
Teste <i>F</i>	67225,54

$$F_{(0,05, 1,5)} = 6,61$$

A solução é feita em água ultra pura, contribuindo assim para a preservação do meio ambiente. A Figura 34 representa graficamente a curva analítica (de três medições) do método eletroforetico para determinação de brometo de pancurônio.

Figura 33. Eletroferograma de solução padrão de trietilamina (100,0 µg/mL) (I) e brometo de pancurônio (200,0 µg/mL) (II). Condições analíticas: capilar de sílica fundida de 50 cm de comprimento total, 40 cm de comprimento efetivo e 50 µm de diâmetro interno; eletrólito: 5 mM L-histidina e 5 mM de ácido 2-hidroxi-isobutírico; pH 3,5; injeção: hidrodinâmica de 5 seg/0,5 psi; tensão: +25,0 kV; detecção indireta UV a 214 nm e temperatura de 25 °C.

Figura 34. Curva analítica de brometo de pancurônio por eletroforese capilar. Condições analíticas: capilar de sílica fundida de 50 cm de comprimento total, 40 cm de comprimento efetivo e 50 µm de diâmetro interno; eletrólito: 5 mM L-histidina e 5 mM de ácido 2-hidroxi-isobutírico; pH 3,5; injeção: hidrodinâmica 5 seg/0,5 psi; tensão: +25,0 kV; detecção indireta UV a 214 nm e temperatura de 25 °C

Figura 35. Avaliação da faixa linear de brometo de pancurônio por eletroforese capilar. Linhas pontilhadas representam o limite superior e inferior a 95,0% de confiança.

A Figura 35 mostra a distribuição dos pontos de cada nível da curva analítica. Observa-se aleatoriedade para todos sem tendências ou próximos dos limites. Assim sendo, pode-se concluir que os pontos seguem uma distribuição normal ao longo de todo o intervalo avaliado.

5.7.2.4 Repetibilidade e precisão intermediária

O teor dos medicamentos e a variabilidade intra-dia e inter-dia foram verificados pelos testes de precisão. A Figura 36 e a Tabela 39 mostram eletroferograma típico de uma amostra comercializada no Brasil e o resumo das variabilidades, respectivamente. O teor está dentro do intervalo de 95,0% e 105,0%. As variabilidades intra-dia e inter-dia são representadas pelo desvio padrão relativo (DPR) menores que 3,00% (KADIS, 2002). Destaca-se que no método proposto existe maior variabilidade intra-dia do que inter-dia; isto possivelmente é devido a diferentes medidas de alíquotas no mesmo dia.

Figura 36. Eletroferograma representativo de uma amostra de brometo de pancurônio. I) excipientes. II) trietilamina (100,0 µg/mL). III) brometo de pancurônio (200,0 µg/mL). Condições analíticas: capilar de sílica fundida de 50 cm de comprimento total, 40 cm de comprimento efetivo e 50 µm de diâmetro interno; eletrólito: 5 mM L-histidina e 5 mM de ácido 2-hidroxi-isobutírico; pH 3,5; injeção: hidrodinâmica de 5 seg/0,5 psi; tensão: +25,0 kV; detecção indireta UV a 214 nm e temperatura de 25 °C.

Tabela 39. Resultados obtidos na avaliação da repetibilidade e precisão intermediária para a determinação quantitativa de brometo de pancurônio através de eletroforese capilar.

Precisão intermediária*		
	Amostra A**	Amostra B**
Inter-dia	2,10 ± 0,01 (105,0%)	2,02 ± 0,02 (101,0%)
DP	0,0040	0,0044
DPR	0,1905	0,2178
Intra-dia		
Dia 1	2,10 ± 0,01	2,02 ± 0,02
DP	0,02	0,02
DPR	0,77	0,78
Dia 2	2,11 ± 0,02	2,02 ± 0,01
DP	0,02	0,0
DPR	0,77	0,72
Dia 3	2,11 ± 0,01	2,02 ± 0,02
DP	0,01	0,02
DPR	0,47	1,26

* n = 9/dia

** = mg/mL

DP = Desvio padrão

DPR = Desvio padrão relativo (%)

Como descrito anteriormente, a variabilidade intra-dia (repetibilidade) é maior do que a variabilidade inter-dia, porém, o valor ainda é baixo indicando variabilidade aceitável. A média geral e o DPR inter-dia foram calculados por análise de variância (ANOVA). É importante ressaltar que foi observada uma diferença entre as duas formulações comercializadas quando comparadas nas respostas dos excipientes, visto que na amostras A o sinal era maior do que na amostra B, isto gera uma incerteza quanto ao preparo do produto.

5.7.2.5 Exatidão

Tabela 40. Resultados obtidos na determinação da porcentagem de recuperação de solução padrão de brometo de pancurônio adicionada, através do método eletroforético.

Amostra	Teste de recuperação		Recuperação (%)*
	Quantidade (µg)		
	Adicionada	Recuperada	
A	500	506,2 ± 2,2	101,24
	1500	1514,9 ± 8,9	100,99
	2500	2570,5 ± 9,3	102,82
B	500	513,2 ± 3,4	102,64
	1500	1529,8 ± 8,1	101,99
	2500	2572,0 ± 9,6	102,88

* n = 3

A exatidão do método foi avaliada pela porcentagem de recuperação de solução padrão de brometo de pancurônio. A distribuição das concentrações avaliadas foram de 50,0%, 100,0% e 150,0%. Obtiveram-se resultados acima de 102,0%, porém se tomam como aceitos desde que a eletroforese capilar é uma técnica instrumental que sofre variações e possui limitações de reprodutibilidade (RILEY, 1996; ERMER, 2001; ALI, 2006).

5.7.2.6 Robustez

A robustez foi avaliada por um planejamento fatorial fracionado com seis fatores de resolução III (2^{6-3}). A resposta avaliada foi a resolução entre o padrão interno (trietilamina) e o brometo de pancurônio. A Figura 37 mostra o gráfico de Pareto para todos os fatores avaliados. Observa-se que nenhum fator supera a linha de

efeito padronizado crítico, indicando que mesmo o fator F (pH) que apresenta maior influência, não compromete a separação com um nível de confiança de 95,0%.

Figura 37. Gráfico de Pareto dos efeitos no teste de robustez pelo método eletroforético para determinação de brometo de pancurônio.

5.7.2.7 Condições de estresse para formação de produtos de degradação

Após neutralização e verificação da formação do produto de degradação final por cromatografia de camada delgada, procedeu-se a injetar a solução de estresse no sistema eletroforético. Foi observado que tanto no tratamento de hidrólise ácida quanto no tratamento de hidrólise básica, o método proposto não consegue discriminar o pico do princípio ativo e o pico correspondente ao produto de degradação. Este fato é uma desvantagem visto que hoje em dia é de importância monitorar tanto o princípio ativo quanto os possíveis produtos de degradação.

5.8 Comparação entre os métodos cromatográfico e eletroforético

Todos os resultados obtidos no teste F apresentam valores inferiores ao valor crítico tabelado ($F_{8/8} = 4,43$). Demonstrando que não existe diferença significativa quanto à precisão nos três dias ensaiados. Foram avaliadas também as médias dos dois métodos pelo teste t , e não foi observada diferença significativa (Tabela 41). Uma representação gráfica desta comparação de métodos é observada na Figura 38.

Tabela 41. Valores obtidos para o teste F e t na comparação dos métodos analíticos propostos para a determinação de brometo de pancurônio em medicamentos.

Dia / Amostra	Teste F^*		Teste t^{**}	
	A	B	A	B
1	3,06	2,16	1,46	2,00
2	1,70	1,45	1,90	1,75
3	1,92	1,68	0,72	0,89

* Valor crítico F - Snedecor com $P = 95,0\%$; $F_{8/8} = 4,43$

** Valor crítico t - Student's com $P = 95,0\%$ e 16 graus de liberdade; $t = 2,12$

Figura 38. Representação gráfica da comparação dos dois métodos analíticos propostos para determinação de brometo de pancurônio em medicamentos. Condições analíticas cromatográficas: coluna cromatográfica amino (Luna[®] 150 x 4,6 cm) 5 μ m (Phenomenex[®]); fase móvel: acetonitrila:octanosulfonato sódico 50 mM (20:80 v/v); pH: 6,0; vazão: 1,0 mL/min; detecção UV a 210 nm e temperatura de 22 °C. Condições analíticas eletroforéticas: capilar de sílica fundida de 50 cm de comprimento total, 40 cm de comprimento efetivo e 50 μ m de diâmetro interno; eletrólito: 5 mM L-histidina e 5 mM de ácido 2-hidroxi-isobutírico; pH 3,5; injeção: hidrodinâmica de 5 seg/0,5 psi; tensão: +25,0 kV; detecção indireta UV a 214 nm e temperatura de 25 °C.

5.9 Resultados e discussão da caracterização da matéria-prima de brometo de rocurônio

5.9.1 Faixa de fusão

Tabela 42. Resultados obtidos na determinação da faixa de fusão do brometo de rocurônio.

Determinação	Faixa de fusão
A	160 - 168 °C
B	160 - 169 °C
C	161 - 170 °C
Média	160 - 169 °C

5.9.2 Espectrometria no infravermelho

Figura 39. Espectro de absorção no infravermelho do brometo de rocurônio em pastilha de KBr.

O intervalo de fusão observado foi entre 160 °C e 169 °C (Tabela 42) sendo 1,0 °C mais amplo do que o encontrada na literatura (MERCK, 2006). A observação e avaliação do começo da fusão foram feita a olho nu, isto conseqüentemente introduz

erros do analista, fato que deve ser considerado ao comparar com os resultados reportados em compêndios oficiais. O espectro de absorção no infravermelho (Figura 39) apresenta as bandas características para ésteres a $1223,3\text{ cm}^{-1}$ e compostos nitrogenados quaternários e terciários a $1747,3$ e $2928,2\text{ cm}^{-1}$ (SILVERSTEIN, 2000), assim sendo uma confirmação da estrutura química. Em $3415,8$ observa-se uma banda característica de grupos hidroxila.

5.10 Resultados e discussão do método cromatográfico para determinação de brometo de rocurônio

5.10.1 Desenvolvimento do método analítico para determinação quantitativa de brometo de rocurônio através de cromatografia líquida de alta eficiência

Da mesma maneira que se iniciaram os testes cromatográficos dos fármacos brometo de vecurônio e brometo de pancurônio, foram executadas as análises do brometo de rocurônio. A Tabela 13 apresenta todos os sistemas avaliados. Não foram obtidos resultados satisfatórios com as tentativas realizadas na coluna C18 (sistemas 1 ao 4) com ou sem adição de um pareador iônico. Sabendo da polaridade do princípio ativo, foram direcionadas tentativas com coluna HILIC "*Hydrophilic interaction liquid chromatography*" (colunas cromatográficas de sílica quimicamente ligadas a grupos funcionais diol), sistemas 5 e 6, porém, para alcançar um bom resultado de fator de capacidade a concentração de acetonitrila na fase móvel teria que estar em concentrações superiores a 70%, elevando com isto o custo do método e perdendo sua utilidade prática, visto que se tem como objetivo propor métodos simples, confiáveis, de baixo custo e impacto ambiental. No sistema 7 e sistema 8, foi usada uma coluna amino. No sistema 8 foi observado que aumentando a concentração do sal (fosfato sódico monobásico) e diminuindo a concentração de acetonitrila, obtêm-se resultados otimizados em relação ao fator de capacidade e resolução entre o brometo de rocuroônio e o padrão interno (ácido salicílico). Estas condições foram escolhidas para o processo de validação (sistema 8).

5.10.2 Validação do método analítico para determinação quantitativa de brometo de rocurônio através de cromatografia líquida de alta eficiência

5.10.2.1 Conformidade do sistema

Após ter selecionado as condições ideais para a determinação de brometo de rocurônio (sistema 8), deu-se início ao processo de validação analítica. É recomendável que toda técnica instrumental seja verificada antes de ser aplicada para o controle de qualidade de medicamentos. A fim de demonstrar a confiabilidade do sistema cromatográfico escolhido, todos os dias eram injetadas amostras de verificação. A Tabela 43 apresenta os resultados característicos de um dia de trabalho típico.

Os parâmetros avaliados foram: tempo de retenção, altura e pratos teóricos do brometo de rocurônio, bem como a resolução (R_s) entre o brometo de rocurônio e o ácido salicílico (padrão interno). Observa-se que nenhum resultado ultrapassa 2,00% de desvio padrão relativo (DPR). O valor da R_s demonstra que existe total separação entre o fármaco e o padrão interno. Também foi observado o fator de capacidade (k) para o brometo de rocurônio, obtendo-se uma média de 2,41.

Tabela 43. Resultados obtidos no primeiro dia da validação do método cromatográfico para determinação de brometo de rocurônio.

Injeção	Tempo de retenção	Altura	Pratos teóricos	Resolução
1	5,39	166666,01	4327,9	2,93
2	5,44	165689,35	4347,5	2,98
3	5,41	166114,28	4402,2	2,90
4	5,40	163425,98	4374,3	2,90
5	5,41	168708,33	4266,9	2,91
Média	5,41	166120,79	4343,74	2,92
DP	0,0187	1900,05	51,27	0,0336
DPR	0,34	1,14	1,18	1,15

5.10.2.2 Seletividade/especificidade

RIBANI em 2004 sugere a utilização de placebos para avaliar a interferência da matriz no método analítico. A Figura 40 mostra a sobreposição de cromatogramas correspondentes a soluções placebo preparadas no laboratório em concentrações crescentes. A finalidade do teste foi observar que independentemente da concentração, o sinal instrumental não interfere no tempo de retenção do brometo de rocurônio e nem do padrão interno (ácido salicílico), verificando-se assim a seletividade do método.

Figura 40. Sobreposição de cromatogramas da seletividade do método para determinação de brometo de rocurônio. Condições analíticas: coluna cromatográfica amino (Luna[®] 150 x 4,6 cm) 5 μ m (Phenomenex[®]); fase móvel: acetonitrila:fosfato sódico monobásico 50 mM (30:70 v/v); pH: 4,6; vazão: 1,0 mL/min; detecção UV a 205 nm e temperatura de 25 °C.

5.10.2.3 Linearidade, limite de detecção e limite de quantificação

Os testes estatísticos utilizados para verificar o modelo linear foram o coeficiente de correlação r , obtido pelo método dos mínimos quadrados e o teste F , obtido da análise de variância. Como é observado na Tabela 44, o r apresenta um valor muito próximo de 1,0000 indicando excelente proporcionalidade entre concentração e razão da resposta instrumental. O teste F apresentou um valor experimental muito grande (45884,57) demonstrando alta significância de correlação. Para que o

modelo linear tenha utilidade prática, o valor deve ser pelo menos 10 vezes maior que o valor tabelado para o nível de confiança de selecionado (PIMENTEL, 1996). A Figura 41 mostra a representação gráfica da curva analítica.

Tabela 44. Resultados obtidos da linearidade pelo método cromatográfico para determinação de brometo de rocurônio.

Parâmetro estatístico	Brometo de rocurônio
Intervalo de concentração (µg/mL)	50,0 – 350,0
Intercepto	0,0044
Inclinação	0,0018
Coeficiente de correlação (<i>r</i>)	0,9999
Desvio padrão da curva analítica	0,0022
Limite de detecção (µg/mL)	4,1
Limite de quantificação (µg/mL)	12,4
Teste <i>F</i>	45884,57

$$F_{(0,05, 1,5)} = 6,61$$

Figura 41. Curva analítica de brometo de rocurônio obtida através de cromatografia líquida de alta eficiência. Condições analíticas: coluna cromatográfica amino (Luna® 150 x 4,6 cm) 5µm (Phenomenex®); fase móvel: acetonitrila:fosfato sódico monobásico 50 mM (30:70 v/v); pH: 4,6; vazão: 1,0 mL/min; detecção UV a 205 nm e temperatura de 25 °C.

Figura 42. Cromatograma representativo de solução padrão de brometo de rocurônio (200,0 $\mu\text{g/mL}$) e solução padrão de ácido salicílico (40,0 $\mu\text{g/mL}$). I) brometo de rocurônio. II) ácido salicílico. Condições analíticas: coluna cromatográfica amino (Luna[®] 150 x 4,6 cm) 5 μm (Phenomenex[®]); fase móvel: acetonitrila:fosfato sódico monobásico 50 mM (30:70 v/v); pH: 4,6; vazão: 1,0 mL/min; detecção UV a 205 nm e temperatura de 25 °C.

Figura 43. Avaliação da faixa linear de brometo de rocurônio realizada por cromatografia líquida de alta eficiência. Linhas pontilhadas representam o limite superior e inferior a 95,0% de confiança.

A Figura 42 mostra o cromatograma do ponto nominal da curva analítica. Observa-se que existe uma total separação entre os padrões bem como, um confiável tempo de separação entre o volume morto e o brometo de rocurônio. Na Figura 43 observa-se que nenhum ponto da curva analítica ultrapassa os limites superior e inferior, verificando assim a confiabilidade dos resultados (NETO, 2002).

5.10.2.4 Repetibilidade e precisão intermediária

A precisão intermediária foi realizada em três dias consecutivos pelo mesmo analista, no mesmo equipamento e com replicas verdadeiras na tomada de ensaio. O objetivo principal foi avaliar a variabilidade intra-dia e inter-dia (ARUGA, 2004).

Tabela 45. Resultados obtidos na avaliação da repetibilidade e precisão intermediária para a determinação quantitativa de brometo de rocurônio através de cromatografia líquida de alta eficiência.

Precisão intermediária*		
	Amostra A**	Amostra B**
Inter-dia	50,44 ± 0,4 (100,9%)	49,59 ± 0,5 (99,2%)
DP	0,15	0,04
DPR	0,77	0,40
Intra-dia		
Dia 1	50,73 ± 0,3	49,62 ± 0,4
DP	0,42	0,60
DPR	0,84	1,20
Dia 2	49,94 ± 0,5	49,66 ± 0,4
DP	0,70	0,66
DPR	1,46	1,12
Dia 3	50,64 ± 0,5	49,50 ± 0,5
DP	0,54	0,78
DPR	1,07	1,57

* n = 9/dia

** = mg/5 mL

DP = Desvio padrão

DPR = Desvio padrão relativo (%)

Também foi determinado o teor do brometo de rocurônio no medicamento. A Tabela 45 apresenta os resultados obtidos em cada dia durante os três dias de ensaio. Os desvios padrão relativo (DPR) tanto intra-dia como inter-dia, foram menores do que 2,00%, indicando assim boa precisão do método (baixa imprecisão). Cabe salientar que as soluções se mantiveram estáveis desde que armazenadas em geladeira durante os três dias de experimentos. Os teores de brometo de vecurônio estão dentro de um intervalo de 95% - 105%.

A Figura 44 mostra um cromatograma representativo de uma amostra de brometo de rocurônio na precisão intermediária. Existe uma perturbação no sinal por volta de 1,5 minutos, observada em todos os cromatogramas; esta corresponde à fase móvel. Sempre foi observada separação total entre os componentes da matriz e o brometo de rocurônio, e entre o brometo de rocurônio e o padrão interno (ácido salicílico). Observa-se que este cromatograma é muito parecido ao cromatograma dos padrões devido à inexistência de interferência da matriz.

Figura 44. Cromatograma representativo de uma amostra contendo brometo de rocurônio. I) matriz da amostra. II) brometo de rocurônio (200,0 $\mu\text{g/mL}$). III) ácido salicílico (40,0 $\mu\text{g/mL}$). Condições analíticas: coluna cromatográfica amino (Luna[®] 150 x 4,6 cm) 5 μm (Phenomenex[®]); fase móvel: acetonitrila:fosfato sódico monobásico 50 mM (30:70 v/v); pH: 4,6; vazão: 1,0 mL/min; detecção UV a 205 nm e temperatura de 25 °C.

5.10.2.5 Exatidão

A Tabela 46 mostra os resultados obtidos para os testes de recuperação. Pode ser observado que o intervalo de recuperação não é inferior a 98,0% e não é superior a 102,0%, indicando assim boa concordância entre as quantidades adicionadas de solução padrão e as quantidades recuperadas nas amostras fortificadas. Cada determinação foi realizada em triplicata para calcular o intervalo de confiança em cada nível avaliado. Com os resultados obtidos, pode-se concluir que o método é exato sem perda de solução padrão nas amostras testadas.

Tabela 46. Resultados obtidos na determinação da porcentagem de recuperação de solução padrão de brometo de vecurônio adicionada, através do método cromatográfico.

Teste de recuperação			
Amostra	Quantidade (µg)		Recuperação (%)*
	Adicionada	Recuperada	
A	500	406,5 ± 2,3	101,3
	1500	1491,4 ± 4,1	99,4
	2500	2497,5 ± 6,9	99,9
B	500	505,0 ± 2,8	101,0
	1500	1521,8 ± 5,1	101,4
	2500	2535,0 ± 7,5	101,4

* n = 3

5.10.2.6 Robustez

O estudo da robustez foi projetado por um planejamento fatorial completo a dois níveis (RODRIGUEZ, 2005). A Tabela 47 mostra os resultados obtidos em função das resoluções (*Rs1 = separação entre a matriz e o brometo de rocurônio e Rs2 = separação entre o brometo de rocurônio e o ácido salicílico*). Tendo em consideração que o valor nominal é *Rs1 = 3,45* e *Rs2 = 2,91*.

Tabela 47. Condições cromatográficas, níveis e resultados obtidos na determinação da robustez do método cromatográfico para determinação de brometo de rocurônio.

Condições cromatográficas					
Fatores	Nível inferior (-)	Nível zero (0)	Nível superior (+)		
A) Fosfato sódico monobásico (mM)	45,0	50,0	55,0		
B) Acetonitrila (%)	25,0	30,0	35,0		
C) Temperatura (°C)	20,0	25,0	30,0		
Modelo da matriz e resultados					
Exp. No.	Fator A	Fator B	Fator C	R1	R2
1	-	-	-	4,04	5,27
2	+	-	-	2,33	4,62
3	-	+	-	3,32	1,43
4	+	+	-	1,62	1,32
5	-	-	+	3,60	4,76
6	+	-	+	3,06	4,52
7	-	+	+	4,30	1,34
8	+	+	+	2,70	1,27
9	-	-	-	3,76	5,21
10	+	-	-	2,36	4,63
11	-	+	-	3,42	1,42
12	+	+	-	1,65	1,32
13	-	-	+	3,55	4,69
14	+	-	+	3,06	4,51
15	-	+	+	4,40	1,33
16	+	+	+	2,93	1,26

As Figuras 45 e 46 mostram o impacto de cada fator sobre a *Rs1* e *Rs2*, respectivamente. Observa-se que na *Rs1*, independentemente do fator e concentração, a separação se vê comprometida. Na *Rs2*, o fator acetonitrila torna-se crítico na separação, pois um aumento de 25,0% para 35,0% resulta em sobreposição de picos. Isto se deve enfatizar para evitar resultados insatisfatórios nas análises.

Figura 45. Representação gráfica de efeitos de cada fator na avaliação da robustez do método cromatográfico para determinação de brometo de rocurnônio sendo a resposta a resolução ($Rs1$).

Figura 46. Representação gráfica de efeitos de cada fator na avaliação da robustez do método cromatográfico para determinação de brometo de rocurnônio sendo a resposta a resolução ($Rs2$).

Figura 47. Resposta de superfície na avaliação da robustez do método cromatográfico para determinação de brometo de rocurnônio obtendo como resultado R_s1 e mantendo constante a porcentagem de acetonitrila.

A Figura 47 e Figura 48 mostram a representação em 3D da avaliação da robustez mantendo constante a porcentagem de acetonitrila e temperatura, respectivamente. Foram mantidos esses fatores constantes visto que não foram observados efeitos significativos. Pode ser observado que a R_s2 se compromete com o aumento da porcentagem de acetonitrila.

Figura 48. Resposta de superfície na avaliação da robustez do método cromatográfico para determinação de brometo de rocurnônio obtendo como resultado R_s2 e mantendo constante a temperatura.

5.10.2.7 Condições de estresse para formação de produtos de degradação

Figura 49. Cromatograma obtido na degradação forçada da matéria-prima. I) brometo de rocurônio. II) produto de degradação final. III) ácido salicílico. Condições analíticas: coluna cromatográfica amino (Luna[®] 150 x 4,6 cm) 5 μ m (Phenomenex[®]); fase móvel: acetonitrila:fosfato sódico monobásico 50 mM (30:70 v/v); pH: 4,6; vazão: 1,0 mL/min; detecção UV a 205 nm e temperatura de 25 °C.

Nos estudos de degradação forçada da matéria-prima, foi observado que o método cromatográfico é capaz de separar o brometo de rocurônio e o produto de degradação final, porém, até uma determinada concentração, visto que: quando a concentração de um desses analitos ultrapassa 150 μ g/mL, o sistema sobrepõe os picos obtendo resolução de aproximadamente 0,64. Na Figura 49 observa-se o cromatograma do tratamento de estresse da matéria-prima em concentrações finais de 50 μ g/mL para cada analito. Isto deve se levar em consideração pois preparações de análise em concentrações elevadas poderiam encobrir o aparecimento do pico do produto de degradação final nas execuções rotineiras. Com este resultado se alcança especificidade para o produto de degradação final.

5.11 Resultados e discussão do método eletroforético para determinação de brometo de rocurônio

5.11.1 Desenvolvimento do método analítico para determinação quantitativa de brometo de rocurônio através de eletroforese capilar

A estratégia para determinação de brometo de rocurônio baseou-se nas experiências executadas no brometo de vecurônio e brometo de pancurônio. A Tabela 16 mostra todos os sistemas eletroforéticos testados. Os sistemas que contém DL-fenilalanina e ácido 4-aminobenzóico (sistemas 1 ao 24) apresentaram boa intensidade instrumental e estabilidade da linha de base, porém, em uma mistura de brometo de rocurônio com os padrões internos testados, não se obteve separação dos picos, mesmo observando-se separação quando injetados isoladamente. O sistema que avaliou o cloridrato de tiamina (sistemas 25 e 26) apresenta um tempo de retenção muito longo e com baixa intensidade na resposta instrumental, bem como, picos assimétricos. Os sistemas que avaliaram o sulfato de quinina ofereceram melhores resultados. Para melhorar a simetria dos picos foram testados diferentes aditivos (sais de metais e tensoativos neutros), porém, nenhum deles conseguiu resultados satisfatórios. O sistema 39 proporcionou os melhores resultados em função de tempo de análise, simetria dos picos e resolução entre o brometo de rocurônio e o brometo de tetrabutylamônio (padrão interno) sendo escolhido para a validação analítica.

5.11.2 Validação do método eletroforético para determinação quantitativa de brometo de rocurônio

5.11.2.1 Conformidade do sistema

Para garantir resultados reprodutíveis e observar a adequação do sistema eletroforético, foi realizado sempre antes de qualquer análise uma avaliação da conformidade. Realizaram-se cinco injeções de soluções padrão e os resultados obtidos no primeiro dia do processo de validação analítica são apresentados na Tabela 48. Foram aplicadas no máximo dez injeções por cada conjunto de vials que contém o eletrólito de corrida.

Tabela 48. Resultados obtidos no primeiro dia da validação do método eletroforético para determinação de brometo de rocurônio.

Injeção	Tempo de migração	Altura	Pratos teóricos	Resolução
1	2,85	30,36	52126,68	6,12
2	2,89	30,65	52909,82	6,14
3	2,91	31,57	54720,03	6,22
4	2,93	31,62	57275,61	6,50
5	2,95	32,23	54863,04	6,03
Média	2,91	31,29	54379,04	6,20
DP	0,04	0,77	1998,27	0,18
DPR	1,36	2,45	3,67	2,88

5.11.2.2 Seletividade/especificidade

Figura 50. Seletividade do método eletroforético. Sobreposição de eletroferogramas de soluções placebo de brometo de rocurônio. I) matriz da formulação. II) fluxo eletroosmótico. Condições analíticas: capilar de sílica fundida de 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento efetivo e 50 μm de diâmetro interno; eletrólito: sulfato de quinina 1,0 mM, acetonitrila 10,0%; pH; 3,2 (acidificado com HCl); injeção: hidrodinâmica de 5 seg/50 mbar; tensão: +25,0 kV; detecção indireta UV a 230 nm e temperatura de 25 °C.

Na Figura 50 observa-se a sobreposição de três eletroferogramas correspondentes a soluções placebo. É evidente que existe um aumento na resposta instrumental quando a concentração de solução placebo aumenta. O importante desta observação é que por se tratar de uma técnica separativa, o pico do brometo de rocurônio não se sobrepõe com os excipientes, garantindo assim sua quantificação em medicamentos.

5.11.2.3 Linearidade

Da mesma forma que nos métodos anteriores, o presente método também foi avaliado através de parâmetros estatísticos (Tabela 49). Os resultados são satisfatórios e os valores de r e F apresentam evidência objetiva de proporcionalidade (HIBBERT, 2005). Os valores obtidos de limite de detecção e limite de quantificação foram mais elevados do que os obtidos nos métodos anteriormente descritos, isto devido ao maior valor do desvio padrão da curva analítica e a uma diminuição da intensidade da resposta instrumental causada pelo ruído de fundo.

Tabela 49. Resultados obtidos da curva analítica na determinação do brometo de rocurônio por eletroforese capilar.

Parâmetro estatístico	Brometo de rocurônio
Intervalo de concentração ($\mu\text{g/mL}$)	50,0 – 350,0
Intercepto	-0,0363
Inclinação	0,0037
Coeficiente de correlação (r)	0,9997
Desvio padrão da curva analítica	0,0103
Limite de detecção ($\mu\text{g/mL}$)	9,1
Limite de quantificação ($\mu\text{g/mL}$)	27,6
Teste F	9202,55

$$F_{(0,05, 1,5)} = 6,61$$

Figura 51. Eletroferograma de solução padrão de brometo de rocurônio (200,0 $\mu\text{g/mL}$) e tetrabutylamônio (100,0 $\mu\text{g/mL}$). I) brometo de rocurônio. II) brometo de tetrabutylamônio. III) fluxo eletroosmótico. Condições analíticas: capilar de sílica fundida de 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento efetivo e 50 μm de diâmetro interno; eletrólito: sulfato de quinina 1,0 mM, acetonitrila 10,0%; pH; 3,2 (acidificado com HCl); injeção: hidrodinâmica de 5 seg/50 mbar; tensão: +25,0 kV; detecção indireta UV a 230 nm e temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$.

A Figura 51 e Figura 52 mostram o eletroferograma de solução padrão de brometo de rocurônio e tetrabutylamônio e o gráfico da curva analítica, respectivamente. Na curva analítica observa-se que a razão 1,0 (área rocurônio/área tetrabutylamônio) está próxima de 275 $\mu\text{g/mL}$, bem acima dos outros métodos. Sempre foi observado um sinal positivo por volta de 2 minutos, esse sinal deve-se a algum componente do eletrólito, visto que foi detectado quando injetado o mesmo. O desvio padrão relativos entre as análises do mesmo nível de concentração sempre foi menor do que 3,0%.

A distribuição dos pontos é normal em toda a faixa testada. Cabe salientar que os pontos estão mais próximos dos limites porem dentro do intervalo de 95,0% de confiança (Figura 53).

Figura 52. Curva analítica de brometo de rocurônio por eletroforese capilar. Condições analíticas: capilar de sílica fundida de 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento efetivo e 50 µm de diâmetro interno; eletrólito: sulfato de quinina 1,0 mM, acetonitrila 10,0%; pH; 3,2 (acidificado com HCl); injeção: hidrodinâmica de 5 seg/50 mbar; tensão: +25,0 kV; detecção indireta UV a 230 nm e temperatura de 25 °C.

Figura 53. Representação gráfica da faixa linear para o brometo de rocurônio por eletroforese capilar. Linhas pontilhadas representam o limite superior e inferior a 95,0% de confiança.

5.11.2.4 Repetibilidade e precisão intermediária

Figura 54. Eletroferograma de uma amostra de medicamento contendo brometo de rocurônio. I) excipientes. II) brometo de rocurônio (200,0 µg/mL). III) brometo de tetrabutylamônio (100,0 µg/mL). IV) fluxo eletroosmótico. Condições analíticas: capilar de sílica fundida de 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento efetivo e 50 µm de diâmetro interno; eletrólito: sulfato de quinina 1,0 mM, acetonitrila 10,0%; pH; 3,2 (acidificado com HCl); injeção: hidrodinâmica de 5 seg/50 mbar; tensão: +25,0 kV; detecção indireta UV a 230 nm e temperatura de 25 °C.

A Figura 54 apresenta um eletroferograma representativo de uma amostra de brometo de rocurônio. Observa-se sempre separação total entre a matriz e o brometo de rocurônio e entre o brometo de rocurônio e o brometo de tetrabutylamônio. Uma característica que foi observada durante a validação do método é que a linha de base apresentava muito ruído, isto foi minimizado com a calibração da lâmpada, porém, o processo tinha sido concluído e decidiu-se por manter os resultados. A Tabela 50 resume o tratamento estatístico de ANOVA nos resultados obtidos na precisão intermediária da amostra A e amostra B. Observa-se que a variabilidade, tanto intra-dia como inter-dia, é inferior a 3,0% demonstrando a capacidade do método em reproduzir resultados com aceitável desvio padrão relativo (baixo nível de imprecisão). O teor de brometo de rocurônio encontrado nas duas amostras de medicamentos encontra-se no intervalo de 95,0% a 105,0%, valor aceito como especificação para liberação de lote.

Tabela 50. Resultados obtidos na avaliação da repetibilidade e precisão intermediária para a determinação quantitativa de brometo de rocurônio através de eletroforese capilar.

Precisão intermediária*		
	Amostra A**	Amostra B**
Inter-dia	50,51 ± 0,5 (101,0%)	49,36 ± 0,6 (98,7%)
DP	0,02	0,03
DPR	0,30	0,35
Intra-dia		
Dia 1	50,70 ± 0,4	49,51 ± 0,6
DP	0,49	0,81
DPR	0,97	1,63
Dia 2	50,46 ± 0,6	49,12 ± 0,5
DP	0,79	0,67
DPR	1,57	1,36
Dia 3	50,37 ± 0,6	49,41 ± 0,7
DP	0,74	0,92
DPR	1,47	1,86

* n = 9/dia

** = mg/5 mL

DP = Desvio padrão

DPR = Desvio padrão relativo (%)

5.11.2.5 Exatidão

Como é observado na Tabela 51, as porcentagens de recuperação estão compreendidas entre 98,0% e 102,0%, intervalo aceita para determinações em formulações farmacêuticas (ROZET, 2007; SHABIR, 2007). Os níveis avaliados foram em 50,0%, 100,0% e 150,0% da concentração nominal de análise. Os resultados de recuperação são expressos em massa adicionada, porém, está contida em um volume determinado (10,0 mL).

Tabela 51. Resultados obtidos na determinação da porcentagem de recuperação de solução padrão de brometo de rocurônio adicionada, através do método eletroforético.

Teste de recuperação			
Amostra	Quantidade (µg)		Recuperação (%)*
	Adicionada	Recuperada	
A	500,0	508,0 ± 1,12	101,6
	1500,0	14,79 ± 0,7	98,6
	2500,0	2542,5 ± 1,4	101,7
B	500,0	507,5 ± 1,1	101,5
	1500,0	1518,0 ± 2,5	101,2
	2500,0	2520,0 ± 3,1	100,8

*n = 3

5.11.2.6 Robustez

A robustez do método foi avaliada por um estudo fatorial fracionado de Plackett Burmann. A resposta determinada foi a R_s , observando-se que não seja menor do que 2,0, para que não ocorra sobreposição dos picos do brometo de rocurônio e brometo de tetrabutilamônio. A Tabela 52 mostra os resultados obtidos dos 16 ensaios, bem como, a matriz de tratamento, as variáveis e os níveis. É muito importante a réplica independente e aleatorização de cada ensaio para se obter valores reais de respostas (MASON, 2003; LAZIĆ, 2004 GOUPY, 2005; ROWE, 2007).

Foi decidida a avaliação da robustez pelo estudo de Plackett Burmann como alternativa ao tradicional planejamento fatorial fracionado. Os planejamentos de Plackett Burmann são experimentações baseadas no uso de matrizes que se constroem a partir de uma primeira fila. As filas sucessivas se constroem por permutação circular, deslocando ciclicamente os códigos uma posição à direita (ROWE, 2007).

Tabela 52. Condições eletroforéticas, níveis e resultados obtidos na determinação da robustez do método eletroforético para determinação de brometo de rocurônio.

Condições eletroforéticas								
Fatores		Nível inferior (-)		Nível zero (0)		Nível superior (+)		
A (%)	Acetonitrila	8,0		10,0		12,0		
B Fantasma		---		---		---		
C (mM)	Sulfato de quinina	0,7		1,0		1,3		
D (Unidades)	pH	3,0		3,2		3,4		
E Fantasma		---		---		---		
F (°C)	Temperatura	20,0		25,0		30,0		
G (kV)	Tensão	22,5		25,0		27,5		
Modelo da matriz e resultados								
Exp. No.	A	B	C	D	E	F	G	Resolução
1	+	-	-	+	-	+	+	4,64
2	+	+	-	-	+	-	+	7,58
3	+	+	+	-	-	+	-	6,83
4	-	+	+	+	-	-	+	8,37
5	+	-	+	+	+	-	-	7,73
6	-	+	-	+	+	+	-	3,86
7	-	-	+	-	+	+	+	7,29
8	-	-	-	-	-	-	-	8,32
9	+	-	-	+	-	+	+	4,22
10	+	+	-	-	+	-	+	8,03
11	+	+	+	-	-	+	-	6,70
12	-	+	+	+	-	-	+	8,47
13	+	-	+	+	+	-	-	7,32
14	-	+	-	+	+	+	-	3,80
15	-	-	+	-	+	+	+	7,10
16	-	-	-	-	-	-	-	8,95

Observa-se claramente na Figura 55 que as variáveis que têm maior impacto no método eletroforético para quantificação do brometo de rocurônio são: temperatura, pH e concentração de sulfato de quinina.

Figura 55. Gráfico de Pareto dos efeitos no teste de robustez pelo método eletroforético para determinação de brometo de rocurônio.

5.11.2.7 Condições de estresse para formação de produtos de gradação

Figura 56. Eletroferograma obtido na degradação forçada da matéria-prima. I) íon hidrônio. II) produto de degradação final. III) brometo de rocurônio. IV) brometo de tetrabutilamônio. V) fluxo eletroosmótico. Condições analíticas: capilar de sílica fundida de 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento efetivo e 50 μm de diâmetro interno; eletrólito: sulfato de quinina 1,0 mM, acetonitrila 10,0%; pH; 3,2 (acidificado com HCl); injeção: hidrodinâmica de 5 seg/50 mbar; tensão: +25,0 kV; detecção indireta UV a 230 nm e temperatura de 25 °C.

Para atingir especificidade no método proposto, utilizou-se a degradação forçada da matéria-prima. A Figura 56 mostra um eletroferograma obtido da hidrólise ácida do brometo de rocurônio. Observa-se separação total de todas as substâncias presentes em curto tempo de análise.

5.12 Comparação entre os métodos cromatográfico e eletroforético

Pelo teste F foi demonstrando que não existe diferença significativa quanto à precisão nos três dias ensaiados (Tabela 53), visto que o valor crítico é de 4,43 para um nível de confiança de 95,0%. Foram avaliadas também as médias dos dois métodos pelo teste t , e não foi observada diferença significativa (Tabela 53). Uma representação gráfica desta comparação de métodos é observada na Figura 57.

Tabela 53. Valores obtidos para o teste F e t na comparação dos métodos analíticos propostos para a determinação de brometo de rocurônio em medicamentos.

Dia / Amostra	Teste F^*		Teste t^{**}	
	A	B	A	B
1	1,34	1,85	0,11	0,31
2	1,19	1,44	1,31	1,55
3	1,87	1,39	0,76	0,21

* Valor crítico F - Snedecor com $P = 95,0\%$; $F_{8/8} = 4,43$

** Valor crítico t - Student's com $P = 95,0\%$ e 16 graus de liberdade; $t = 2,12$

Com estes resultados pode-se concluir que os métodos não são significativamente diferentes, quer dizer são equivalentes em termos de precisão e determinação de conteúdo de princípio ativo, porém o método eletroforético é uma técnica alternativa de separação à tradicional cromatografia líquida de alta eficiência.

Cromatografia líquida de alta eficiência

Eletroforese capilar

Figura 57. Representação gráfica da comparação dos dois métodos analíticos propostos para determinação de brometo de rocurônio em medicamentos. Condições analíticas cromatográficas: coluna cromatográfica amino (Luna® 150 x 4,6 cm) 5µm (Phenomenex®); fase móvel: acetonitrila:fosfato sódico monobásico 50 mM (30:70 v/v); pH: 4,6; vazão: 1,0 mL/min; detecção UV a 205 nm e temperatura de 25 °C. Condições analíticas eletroforéticas: capilar de sílica fundida de 50 cm de comprimento total, 41,5 cm de comprimento efetivo e 50 µm de diâmetro interno; eletrólito: sulfato de quinina 1,0 mM, acetonitrila 10,0%; pH: 3,2 (acidificado com HCl); injeção: hidrodinâmica de 5 seg/50 mbar; tensão: +25,0 kV; detecção indireta UV a 230 nm e temperatura de 25 °C.

6. CONCLUSÕES

Os métodos propostos para determinação de brometo de vecurônio são simples, confiáveis e relativamente econômicos. Podem ser utilizados em análise de rotina já que os excipientes do medicamento e o produto de degradação final não interferem na quantificação nas duas técnicas (cromatográfica e eletroforética). Os resultados demonstram robustez sem perda da resolução dos excipientes em relação ao brometo de vecurônio e do brometo de vecurônio ao padrão interno.

Os métodos propostos para determinação de brometo de pancurônio são de fácil transferência para análise de rotina e foram satisfatoriamente aplicados a amostras comercializadas no Brasil. Demonstraram ser simples, confiáveis e robustos. O método cromatográfico tem a capacidade de separar o produto de degradação final do princípio ativo. O método eletroforético não poderia ser utilizado como método indicativo de estabilidade visto que não foi possível separar o brometo de pancurônio do produto de degradação final.

Os métodos propostos para análise de brometo de rocurônio proporcionam resultados confiáveis e de fácil aplicabilidade. São específicos para o produto de degradação final e os excipientes da formulação. A robustez foi demonstrada e não ocorre sobreposição dos picos (brometo de rocurônio e padrão interno).

Os métodos propostos para cada fármaco avaliado são estatisticamente equivalentes quanto à precisão e determinação de teor com um nível de confiança de 95,0%. Foi observado que os métodos cromatográficos quando comparados aos métodos eletroforéticos, possuem menor limite de detecção e quantificação. Os métodos eletroforéticos consomem menor quantidade de reagentes, solventes e soluções, tornando-os economicamente atrativos a longo prazo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUL-ENEIN, H.Y. Selectivity versus specificity in chromatographic analytical methods. **Accreditation and Quality Assurance**, v.5, n.5, p.180-181, 2000.

ALI, I.; ABOUL-ENEIN, H.Y.; GUPTA, V.K. Precision in capillary electrophoresis. **Analytical Letters**, v.39, n.11, p.2345-2357, 2006.

ALTRIA, K.D., ed. **Capillary electrophoresis guidebook**: principles, operation, and applications. Totowa: Humana Press, 1996. 349p. (Methods in Molecular Biology, 52).

ALTRIA, K.D.; CHEN, A.B.; CLOHS, L. Capillary electrophoresis as a routine analytical tool in pharmaceutical analysis. **LCGC North America**, v.19, n.9, p.972-985, 2001.

ANDRESEN, B.D.; ALCARAZ, A.; GRANT, P.M. Pancuronium bromide (Pavulon) isolation and identification in aged autopsy tissues and fluids. **Journal of Forensic Sciences**, v.50, n.1, p.196-203, 2005.

ANDRESEN, B.D.; ALCARAZ, A.; GRANT, P.M. The application of pancuronium bromide (Pavulon) forensic analyses to tissue samples from an “angel of death” investigation. **Journal of Forensic Sciences**, v.50, n.1, p.2215-2219, 2005.

ARMSTRONG, N.A.; JAMES, K.C. **Pharmaceutical experimental design and interpretation**. 2.ed. London, Briston: Taylor & Francis, 2006. 232p. (Taylor & Francis series in pharmaceutical sciences).

ARUGA, R. A possible proposition of work in analytical method validation. **Annales de Chimie**, v.94, n.1/2, p.101-105, 2004.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analytical Chemists of AOAC International**. 17.ed. Gaithersburg: AOAC International, 2003. XX. pag

AUBECK, R.; BRÄUCHLE, C.; HAMPP, N. Íon selective membrane electrodes for the determination of the muscle relaxants pancuronium, tubocurarine, gallamine and succinylcholine. **Analytica Chimica Acta**, v.238, n.1, p.405-410, 1990.

BAIRD, W.L.M.; REID, A.M. The neuromuscular blocking properties of a new steroid compound, pancuronium bromide: a pilot study in a man. **British Journal of Anaesthesia**, v.39, n.10, p.775-780, 1967.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2.ed. Campinas: UNICAMP, 2003. 401p. (Coleção Livro-Texto).

BEVAN, D.R. Rocuronium. **Seminars in Anesthesia, Perioperative Medicine and Pain**, v.41, n.4, p.257-263, 1995.

BŁAŻEWICZ, A.; FIJAŁEK, Z.; WAROWNA-GRZEŚKIEWICZ, M.; BORUTA, M. Simultaneous determination of rocuronium and its eight impurities in pharmaceutical preparation using high performance liquid chromatography with amperometric detection. **Journal of Chromatography, A**, v.1149, n.1, p.66-72, 2007.

BLIESNER, D.M. **Validating chromatographic methods**: practical guide. Hoboken: John Wiley, 2006. 285p.

BOM, A.H.D.; MUIR, A.W.; REES, D. **Use of chemical chelators as reversal agents for drug-induced neuromuscular block**. US Pat. 0.299.035, 18 jul 2007. 8p.

BRASIL. Resolução RE n.899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 de junho de 2003.

BRIGLIA, E.J.; DAVIS, P.L.; KATZ, M.; DAL CORTIVO, L.A. Attempted murder with pancuronium. **Journal of Forensic Sciences**, v.35, n.6, p.1468-1476, 1990.

BROWN, D.L.; BROCK-UTNE, J.G. The first structure function approach to drug design in anaesthesia. "Dr. David S. Savage and pancuronium bromide". **Anaesthesia**, v.52, n.12, p.1202-1204, 1997.

CHAN, C.C.; LAM, H.; LEE, Y.C.; ZHANG, X.M. **Analytical method validation and instrument performance verification**. Hoboken: John Wiley, 2004. 303p.

CHANDRAN, S.; SINGH, R.S.P. Comparison of various international guidelines for analytical method validation. **Pharmazie**, v.62, n.1, p.4-14, 2007.

CHATTERJEE, S.; HADI, A.S. **Regression analysis by example**. 4.ed. Hoboken: Wiley Interscience, 2006. 375p. (Wiley series in probability and statistics).

CRIMELE, V.; VILLAIN, M.; PÉPIN, G.; LUDÉS, B.; KINTZ, P. Screening procedure for eight quaternary nitrogen muscle relaxants in blood by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.789, n.1, p.107-113, 2003.

DEJAEGHER, B.; HEYDEN, Y. Ruggedness and robustness testing. **Journal of Chromatography, A**, v.1158, n.1/2, p.138-157, 2007.

DUCHARME, J.; VARIN, F.; BEVAN, D.R.; DONATI, F. THÉORÊT, Y. High-performance liquid chromatography electrochemical detection of vecuronium and its metabolites in human plasma. **Journal of Chromatography**, v.573, n.1, p.79-86, 1992.

ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An integrated approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.24, n.5/6, p.755-767, 2001.

EURACHEM. **Métodos analíticos adecuados a su propósito**. Madrid: EURACHEM, 1998. 79p. (CNM-MRD-PT-030).

EZZINE, S.; VARIN F. Interstitial muscle concentrations of rocuronium under steady-state conditions in anaesthetized dogs: actual versus predicted values. **British Journal of Anaesthesia**, v.94, n.1, p.49-56, 2005.

EZZINE, S.; YAMAGUCHI, M.; VARIN, F. Determination of interstitial rocuronium concentrations in the muscle tissue of anesthetized dogs by microdialysis. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v.49, n.2, p.121-129, 2004.

FARENC, C.; ENJALBAL, C.; SANCHEZ, P.; BRESSOLLE, F.; AUDRAN, M.; MARTINEZ, J.; AUBAGNAC, J.L. Quantitative determination of rocuronium in human plasma by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography, A**, v.910, n.1, p.61-67, 2001.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1996. pt.1, pt.2.

FURUTA, T.; CANFELL, P.C.; CASTAGNOLI, K.P.; SHARMA, M.L.; MILLER, R.D. Quantitation of pancuronium, 3-desacetylpancuronium, vecuronium, 3-desacetylvecuronium, pipecuronium and 3-desacetylpipecuronium in biological fluids by capillary gas chromatography using nitrogen sensitive detection. **Journal of Chromatography, Biomedical Applications**, v.427, n.1, p.41-53, 1988.

GAO, L.; RAMZAN, I.; BAKER, B. Gas chromatographic–mass spectrometric assay for rocuronium with potential for quantifying its metabolite, 17 desacetylrocuronium, in human plasma. **Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications**, v.757, n.2, p.207-214, 2001.

GAO, L.; RAMZAN, I.; BAKER, B. Rocuronium plasma concentrations during three phases of liver transplantation: relationship with early postoperative graft liver function. **British Journal of Anaesthesia**, v.88, n.6, p.764-770, 2002.

GAZDAG, M.; BABJÁK, M.; KEMENES-BAKOS, P.; GÖRÖG, S. Analysis of steroids. XLI. Lon-pair high-performance liquid chromatographic separation of quaternary ammonium steroids on silica. **Journal of Chromatography**, v.550, n.1/2, p.639-644, 1991.

GAZDAG, M.; SZEPESEI, G.; VARSANYI-RIEDL, K.; VÉGH, Z.; PAP-SZIKLAY, Z. Chromatography of bis-quaternary amino steroids. I. Separation on silica by thin-layer and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v.328, n.1, p.279-287, 1985.

GAZDAG, M.; VARSÁNYI-RIEDL, K.; SZEPESEI, G. Chromatography of bis-quaternary amino steroids. II. Separation on chemically bonded silica phases. **Journal of Chromatography**, v.347, n.1, p.284-290, 1985.

GONZÁLEZ, A.G.; HERRADOR, M.A.; ASUERO, A.G.; SAYAGO, A. The correlation coefficient attacks again. **Accreditation and Quality Assurance**, v.11, n.5, p.256-258, 2006.

GOUPY, J. What kind of experimental design for finding and checking robustness of analytical methods? **Analytica Chimica Acta**, v.544, n.1/2, p.184-190, 2005.

GRIFFITH, H.R.; JOHNSON, G.E. The use of curare in general anesthesia. **Anesthesiology**, v.3, n.4, p.418-420, 1942.

GUTTECK, A.U.; RENTSCH, K. Quantification of the aminosteroidal non-depolarizing neuromuscular blocking agents rocuronium and vecuronium in plasma with liquid chromatography tandem mass spectroscopy. **Clinical Chemistry**, v.46, n.9, p.1413-1414, 2000.

HARDMAN, J.G.; LIMBARD, L.E.; MOLINOFF, P.B.; RUDDON, R.W.; GILMAN, A.G., eds. **Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapeutica**. 9.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana, 1996. p.189-202.

HIBBERT, D.B. Further comments on the (miss-) use of r for testing the linearity of calibration functions. **Accreditation and Quality Assurance**, v.10, n.6, p.300-301, 2005.

HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies. **Pure and Applied Chemistry**, v.67, n.2, p.331-343, 1995.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. **Validation of analytical procedures**: text and methodology: Q2(R1). 2005. (ICH harmonized tripartite guideline). Disponível em: <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>. Acesso em: 18 jan. 2008.

JANSEN, F.H.J. **Process to prepare pharmaceutical compositions containing vecuronium bromide**. EP Pat. 0,682,522, 11 jul 1996. 5p.

JENKE, D.R. Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. II. Guidelines for primary validation parameters. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.19, n.5, p.737-757, 1996.

KADIS, R. Analytical procedure in terms of measurement (quality) assurance. **Accreditation and Quality Assurance**, v.7, n.7, p.294-298, 2002.

KAŁA, M.; LECHOWICZ, W. Instability of pancuronium in postmortem blood and liver taken after a fatal intramuscular Pavulon injection. **Forensic Science International**, v.143, n.2/3, p.191-198, 2004.

KINGET, M.A. *In situ* quantitation of pancuronium bromide and hydrolysis products by spectrodensitometry of thin-layer chromatograms. **Farmaco, Edizione Pratica**, v.31, n.7, p.352-358, 1976.

KINGET, R.; MICHOL, A. Kinetic study of the hydrolysis of pancuronium bromide. II. Specific and general base catalysis. **Acta Pharmaceutica Suecica**, v.13, n.4, p.321-330, 1976.

KINGET, R.; MICHOL, A. Thin layer chromatography of pancuronium bromide and its hydrolysis products. **Journal of Chromatography**, v.120, n.1, p.234-238, 1976.

KLEEF, I.W.; PROOST, J.H.; ROGGEVELD, J.; WIERDA, J.M.K.H. Determination of rocuronium and its putative metabolites in body fluids and tissue homogenates. **Journal of Chromatography**, v.621, n.1, p.65-76, 1993.

KŁYS, M.; BIAŁKA, J.; BUJAK-GIŻYGKA, B. A case of suicide by intravenous injection of pancuronium. **Legal Medicine**, v.2, n.2, p.93-100, 2000.

KONARIS, L.G.; ZIMMERS, T.A.; LUBARSKY, D.A.; SHELDON, J.P. Inadequate anaesthesia in lethal injection for execution. **Lancet**, v.365, n.9468, p.1412-1414, 2005.

LANDERS, J.P., ed. **Handbook of capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques**. 3.ed. Boca Raton: CRC Press; London: Taylor & Francis, 2008. 1567p.

LAZIĆ, Z.R. **Design of experiments in chemical engineering**: a practical guide. Weinheim: Wiley-VCH, 2004. 610p.

LEVIE, R. **How to use excel® in analytical chemistry and in general scientific data analysis**. Cambridge: Cambridge University Press, 2004. 487p.

MARINA, M.L.; RÍOS, A.; VALCÁRCEL, M., eds. **Analysis and detection by capillary electrophoresis**. Amsterdam, Oxford: Elsevier, 2005. 796p. (Wilson & Wilson's comprehensive analytical chemistry, v.45).

MARSHALL, R.J.; MUIR, A.W.; SLEIGH, T.Y.; SAVAGE, D.S. Research and development of aminosteroid neuromuscular blocking agents: past and future. **European Journal of Anaesthesiology**, v.12, suppl.11, p.5-10, 1995.

MASON, R.L.; GUNST, R.F.; HESS, J.L. **Statistical design and analysis of experiments**: with applications to engineering and science. 2.ed. Hoboken: Wiley Interscience, 2003. 728p. (Wiley series in probability and statistics).

MAYER, B.X. How to increase precision in capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography, A**, v.907, n.1/2, p.21-37, 2001.

McKENZIE, A.G. Prelude to pancuronium and vecuronium. **Anaesthesia**, v.55, n.6, p.551-556, 2000.

MEAKIN, G.H. Recent advances in myorelaxant therapy. **Paediatric Anaesthesia**, v.11, n.5, p.523-531, 2001.

MERCK Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 14.ed. Withehouse Station: Merck, 2006. p.1208, 1423-1424, 1708-1709.

MICHOEL, A.; KINGET, R. Kinetic study of the hydrolysis of pancuronium bromide. I. Specific acid catalysis. **Acta Pharmaceutica Suecica**, v.13, n.3, p.267-276, 1976.

MICHOEL, A.; KINGET, R. Kinetic study of the hydrolysis of pancuronium bromide. III. Media effects. **Acta Pharmaceutica Suecica**, v.14, n.3, p.255-266, 1977.

MILLER, J.N.; MILLER, J.C. **Estadística y quimiometría para química analítica**. 4.ed. Madrid: Prentice Hall, 2002. 278p.

NETO, B.B.; PIMENTEL, M.F.; ARAÚJO, M.C.U. Recomendações para calibração em química analítica parte I: fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). **Química Nova**, v.25, n.5, p.856-865, 2002.

PAANAKKER, J.E.; THIO, J.M.; VAN DEN WILDENBERG, H.M.; KASPERSEN, F.M. Assay of vecuronium in plasma using solid-phase extraction, high-performance liquid chromatography and post-column ion-pair extraction with fluorimetric detection. **Journal of Chromatography**, v.421, n.2, p.327-335, 1987.

PAANAKKER, J.E.; VAN DE LAAR, G.L.M. Determination of ORG NC 45 (a myoneural blocking agent) in human plasma using high-performance normal-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v.183, n.4, p.459-466, 1980.

PIMENTEL, M.F.; NETO, B.B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**, v.19, n.3, p.268-277, 1996.

PROBST, R.; BLOBNER, M.; LUPPA, P.; NEUMEIR, D. Quantification of the neuromuscular blocking agent rocuronium and its putative metabolite 17-desacetylrocuronium in heparinized plasma by capillary gas chromatography using a nitrogen-sensitive detector. **Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications**, v.702, n.1/2, p.111-117, 1997.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; FONTES JARDIM, I.C.S.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n.5, p.771-780, 2004.

RILEY, C.M.; ROSANSKE, T.W. **Development and validation of analytical methods**. New York: Pergamon; Oxford: Elsevier, 1996. 352p. (Progress in pharmaceutical and biomedical analysis, v.3).

RODRÍGUEZ, L.C.; ROMERO, R.; SENDRA, J.M.B. The role of the robustness/ruggedness and inertia studies in research and development of analytical processes. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v.35, n.1, p.57-69, 2005.

ROWE, P. **Essential statistics for the pharmaceutical sciences**. Chichester: John Wiley, 2007. 287p.

ROZET, E.; CECCATO, A.; HUBERT, C.; ZIEMONS, E.; OPREAN, R.; RUDAZ, S.; BOULANGER, B.; HUBERT, P. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. **Journal of Chromatography, A**, v.1158, n.1/2, p.111-125, 2007.

SAVAGE, D.S.; SLEIGH, T.; CARLYLE, I. The emergence of Org NC 45, 1-[(2b,3a,5a,16b,17b) - 3,17 - bis(acetoxi) - 2 - (1-piperidiny)] - androstan - 16yl] - 1 methylpiperidinium bromide, from the pancuronium series. **British Journal of Anaesthesia**, v.52, 3S-9S, 1980.

SAVARESE, J.J.; KITZ, R.J. Does clinical anesthesia need new neuromuscular blocking agents? **Anesthesiology**, v.42, n.3, p.236-239, 1975.

SAYAGO, A.; BOCCIO, M.; ASUERO, A.G. Fitting straight lines with replicated observations by linear regression: the least squares postulates. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v.34, n.1, p.39-50, 2004.

SENDRA, J.M.B.; NECHAR, M.; RODRÍGUEZ, L.C. Decision protocol for checking robustness with previous outlier detection in the validation of analytical methods. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v.365, n.6, p.480-488, 1999.

SHABIR, G.A.; LOUGH, W.J.; ARAIN, S.A.; BRADSHAW, T.K. Evaluation and application of best practice in analytical method validation. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.30, n.3, p.311-333, 2007.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000. p.67-101.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. **Practical HPLC method development**. 2.ed. New York: Wiley, 1997. 765p.

STANKOV-JOVANOVIĆ, V.P.; NICOLIĆ-MANDIĆ, S.D.; MANDIĆ, L.M.; MITIĆ, V.D. Cholinesterase inhibition based determination of pancuronium bromide in biological samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.385, n.8, p.1462-1469, 2006.

TANAKA, K.; HIOKI, M.; SHINDO, H. Determination of pancuronium bromide and its metabolites in human urine by dye-extraction method-relation between the extractability and structure of quaternary ammonium ions. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.22, n.11, p.2599-2606, 1974.

TAVARES, M.F.M.; JAGER, A.V. Determinação simultânea de cátions por eletroforese capilar: fundamentos e aplicações. **Química Nova**, v.24, n.3, p.363-373, 2001.

THOMPSON, M. Towards a unified model of errors in analytical measurement. **Analyst**, v.125, n.11, p.2020-2025, 2000.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.R.L.; FAJGELJ, A.; WILLETTS, P.; WOOD, R. Harmonized guidelines for the use of recovery information in analytical measurement. **Pure and Applied Chemistry**, v.71, n.2, p.337-348, 1999.

UNITED States pharmacopeia. 31.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2008. p.2909-2910, 3503-3504.

URSULA, W.; KERSTEN, D.; MEIJER, K.F.; AGOSTON, S. Fluorimetric and chromatographic determination of pancuronium bromide and its metabolites in biological materials. **Clinica Chimica Acta**, v.44, n.1, p.59-66, 1973.

USUI, K.; HISHINUMA, T.; YAMAGUCHI, H.; SAGA, T.; WAGATSUMA, T.; HOSHI, K.; TACHIIRI, N.; MIURA, K.; GOTO, J. Simultaneous determination of pancuronium, vecuronium and their related compounds using LC–ESI-MS. **Legal Medicine**, v.8, n.3, p.166-171, 2006.

VESSMAN, J. Selectivity or specificity? Validation of analytical methods from the perspective of an analytical chemist in the pharmaceutical industry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.14, n.8/10, p.867-869, 1996.

VESSMAN, J.; STEFAN, R.I.; VAN STADEN, J.F.; DANZER, K.; LINDNER, W.; BURNS, D.T.; FAGJELJ, A.; MÜLLER, H. Selectivity in analytical chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v.73, n.8, p.1381-1386, 2001.

VOGELGESANG, J.; HÄDRICH, J. Limits of detection, identification and determination: a statistical approach for practitioners. **Accreditation and Quality Assurance**, v.3, n.6, p.242-255, 1998.

WATERS, R.B.; DOVLETOGLOU, A. Evaluating HPLC assay robustness with experimental design. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.26, n.18, p.2975-2985, 2003.

WEINBERGER, R. **Practical capillary electrophoresis**. 2.ed. San Diego: Academic Press, 2000. 462p.

WEINDLAMAYR-GOETTEL, M.; GILLEY, H.; SIPOS, E.; STEINBEREITHNER, K. Lipid solubility of pancuronium and vecuronium determined by n-octanol/water partitioning. **British Journal of Anaesthesia**, v.70, n.5, p.579-580, 1993.

WEISBERG, S. **Applied linear regression**. 3.ed. Hoboken: Wiley-Interscience, 2005. 310p. (Wiley series in probability and statistics).

WINGARD, L.B.; ABOULEISH, E.; WEST, D.C.; GOEHL, T.J. Modified fluorometric quantitation of pancuronium bromide and metabolites in human material and umbilical serums. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.68, n.7, p.914-915, 1979.

WITHINGTON, D.; MENARD, G.; HARRIS, J.; KULKARNI, P.; DONATI, F.; VARIN, F. Vecuronium pharmacokinetics and pharmacodynamics during hypothermic cardiopulmonary bypass in infants and children. **Canadian Journal of Anesthesia**, v.47, n.12, p.1188-1195, 2000.

ZECEVIC, C.; ZIVANOVIC, L.; STOJKOVIC, A. Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of pancuronium in Pavulon injections. **Journal of Chromatography, A**, v.949, n.1/2, p.61-64, 2002.

ANEXOS

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.
2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.
 - 2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.
3. A sessão de defesa será aberta ao público.
4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.
 - 4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.
 - 4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.
5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 18 de março de 2005.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP

Currículo Lattes

Pedro Lopez Garcia

Bolsista de Doutorado do CNPq

Possui graduação em Químico Farmacêutico - Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala (1998) e Mestrado em Produção e Controle Farmacêuticos pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Brasil (2004). Tem experiência na área de Farmácia, com ênfase em controle de qualidade físicoquímico de medicamentos e cosméticos: Desenvolvimento e validação de métodos analíticos.

(Texto informado pelo autor)

Última atualização do currículo em 10/11/2008

Endereço para acessar este CV:

<http://lattes.cnpq.br/1498459150315652>

**Certificado
pelo autor em
25/05/09**

Links para Outras Bases:

[Diretório de grupos](#)

[de pesquisa](#)

[SciELO - artigos em](#)

[texto completo](#)

SciELO

Dados pessoais

Nome Pedro Lopez Garcia

**Nome em citações
bibliográficas** GARCIA, P. L.

Sexo Masculino

**Endereço
profissional** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia.
AV Prof Lineu Prestes 580
Butantã
05508-900 - São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (011) 30913655 Fax: (011) 38154418

Formação acadêmica/Titulação

2005 - 2009 Doutorado em Fármacos e Medicamentos.
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Desenvolvimento, validação e comparação de métodos analíticos para quantificação de fármacos relaxantes musculares, *Orientador:* Erika Rosa Maria Kedor.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

2002 - 2004 Mestrado em Fármacos e Medicamentos.
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Desenvolvimento de metodologias analíticas para determinação de hidroquinona em cosméticos e medicamentos, *Ano de Obtenção:* 2004.
Orientador: Erika Rosa Maria Kedor.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.
Palavras-chave: hidroquinone.
Grande área: Ciências da Saúde / *Área:* Farmácia / *Subárea:* Análise e Controle de Medicamentos.

1994 - 1998 Graduação em Químico Farmacêutico. Universidad de San Carlos de Guatemala, USAC, Guatemala.
Título: Tamizaje fitoquímico cuatro especies del subgénero Trichosalpinx y cuatro del subgénero Tubella existentes en Guatemala.
Orientador: Licda. Beatriz Medinilla.

Formação complementar

- 2007 - 2007** Testes de Dissolução - Gerenciamento e Técnicas. (Carga horária: 16h).
Federação Brasileira de Industrias Farmacêuticas, FEBRAFARMA, Brasil.
- 2007 - 2007** Atualizações sobre garantia de qualidade. (Carga horária: 8h).
Federação Brasileira de Industrias Farmacêuticas, FEBRAFARMA, Brasil.
- 2007 - 2007** Validação de sistemas críticos purificação de água. (Carga horária: 16h).
Federação Brasileira de Industrias Farmacêuticas, FEBRAFARMA, Brasil.
- 2007 - 2007** Boas Práticas Laboratoriais NBR ISO/IEC 17025:2005. (Carga horária: 16h).
Federação Brasileira de Industrias Farmacêuticas, FEBRAFARMA, Brasil.
- 2007 - 2007** Desenvolvimento de métodos analíticos por HPLC. (Carga horária: 16h).
Federação Brasileira de Industrias Farmacêuticas, FEBRAFARMA, Brasil.
- 2006 - 2006** Estudo de Estabilidade de Medicamentos. (Carga horária: 16h).
Federação Brasileira de Industrias Farmacêuticas, FEBRAFARMA, Brasil.
- 2001 - 2001** Curso de espectroscopia infravermelha. (Carga horária: 40h).
Laboratorio Nacional de Salud, LNS, Guatemala.

Atuação profissional

AstraZeneca do Brasil, AZB, Brasil.

Vínculo institucional

2009 - Atual Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Colaborador, Carga horária: 40

Outras informações Validação de métodos analíticos.

Grupo Formulas, Guatemala, GF, Guatemala.

Vínculo institucional

2004 - 2004 Vínculo: Servidor Público, Enquadramento Funcional: Supervisor de controle de qualidade, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva.

Outras informações Atualização da empresa perante a norma ISO 17025 Supervisor da empresa da norma cGMP

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional

2005 - 2009 Vínculo: Pós-Graduação, Enquadramento Funcional: Doutorando, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva.

Vínculo institucional

2007 - 2007 Vínculo: Servidor Público, Enquadramento Funcional: Monitor PAE, Carga horária: 6

Outras informações Monitor do programa de aperfeiçoamento de ensino junto à disciplina "Controle de qualidade físico-químico de medicamentos e cosméticos"

Vínculo institucional

2006 - 2006 Vínculo: Servidor Público, Enquadramento Funcional: Monitor PAE, Carga horária: 6

Outras informações Monitor do programa de aperfeiçoamento de ensino junto à disciplina "Controle de qualidade físico-químico de medicamentos e cosméticos"

Vínculo institucional

2006 - 2006 Vínculo: Servidor Público, Enquadramento Funcional: Monitor PAE, Carga horária: 6

Outras informações Monitor do programa de aperfeiçoamento de ensino junto à disciplina "Química farmacêutica I"

Vínculo institucional

2002 - 2004 Vínculo: Bolsista PEC-PG, Enquadramento Funcional: Pós-Graduação de Intercâmbio Internacional, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva.

Outras informações Aluno de Pós-Graduação Internacional, bolsista PEC-PG (programa estudante convênio-pós-graduação).

Atividades

02/2002 - 04/2009 Pesquisa e desenvolvimento, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, .

Linhas de pesquisa

Desenvolvimento e validação de métodos analíticos

2007 – 2007

Outras informações Monitor do programa de aperfeiçoamento de ensino junto à disciplina "Controle de qualidade físico-químico de medicamentos e cosméticos"

Laboratorio Nacional de Salud, LNS, Guatemala.

Vínculo institucional

2000 - 2001 Vínculo: Servidor Público, Enquadramento Funcional: Analista profissional, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva.

Outras informações Analista profissional de desenvolvimento e validação de métodos analíticos para medicamentos, cosméticos e alimentos

Linhas de Pesquisa

1. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos

Membro de corpo editorial

2006 - Atual Periódico: Analytical Chemistry: An Indian Journal

2006 - Atual Periódico: Medicinal Chemistry: An Indian Journal

Revisor de periódico

2008 - Atual Periódico: Chromatographia (Wiesbaden)

Áreas de atuação

1. *Grande área:* Ciências da Saúde / *Área:* Farmácia / *Subárea:* Análise e Controle de Medicamentos.
2. *Grande área:* Ciências Exatas e da Terra / *Área:* Química / *Subárea:* Química Analítica /

Especialidade: Métodos Óticos de Análise.

3. *Grande área: Ciências Exatas e da Terra / Área: Química / Subárea: Química Analítica / Especialidade: Separação.*

Idiomas

Espanhol Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Português Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Inglês Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Lê Razoavelmente, Escreve Razoavelmente.

Italiano Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Razoavelmente, Escreve Razoavelmente.

Prêmios e títulos

- 1996 Máxima calificação na disciplina bioquímica I, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

Produção em C,T & A

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

- GOMES, F. P. ; GARCIA, P. L. ; ALVES, J. M. P. ; SINGH, A. K. ; KEDOR-HACKMANN, E. R. M. ; SANTORO, M. I. R. M. . UV-Derivative Spectrophotometric and Stability-Indicating High-Performance Liquid Chromatographic Methods for Determination of Simvastatin in Tablets. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, v. 28, p. 261-269, 2009.
- TSUBONE, C. ; GARCIA, P. L. ; GOMES, F. P. ; KEDOR-HACKMANN, E. R. M. ; SANTORO, M. I. R. M. . Quantitative determination of nadolol in tablets by high-performance liquid chromatography and UV-derivative spectrophotometry. *Analytical Letters*, v. 41, p. 424-436, 2008.
- SINGH, A. K. ; GARCIA, P. L. ; GOMES, F. P. ; YANO, H. M. ; AURICCHIO, MARIANGELA ; KEDOR-HACKMANN, E. R. M. ; SANTORO, M. I. R. M. . Development and Validation of Sensitive Methods for Determination of Sibutramine Hydrochloride Monohydrate and Direct Enantiomeric Separation on a Protein-Based Chiral Stationary Phase. *Journal of AOAC International*, v. 91, p. 572-579, 2008.
- SANTORO, M. I. R. M. ; TSUBONE, C. ; GOMES, F. P. ; KEDOR-HACKMANN, E. R. M. ; GARCIA, P. L. . Development and Validation of High Performance Liquid Chromatographic and UV-Derivative Spectrophotometric Methods for the Determination of Sotalol Hydrochloride in Tablets. *Analytical Letters*, v. 41, p. 2044-2057, 2008.
- ★ GARCIA, P. L. ; GOMES, F. P. ; SANTORO, M. I. R. M. ; KEDOR-HACKMANN, E. R. M. . Validation of an HPLC Analytical Method for Determination of Pancuronium Bromide in Pharmaceutical Injections. *Analytical Letters*, v. 41, p. 1895-1908, 2008.
- GALDOS, A. A. G. ; GARCIA, P. L. ; AURORA-PRADO, M. S. ; SANTORO, M. I. R. M. ; KEDOR-HACKMANN, E. R. M. . Simultaneous determination of econazole nitrate, main impurities and preservatives in cream formulation by high performance liquid chromatography. *Talanta (Oxford)*, v. 77, p. 673-678, 2008.
- ★ CONSIGLIERI, V. O. ; FERRAZ, H. G. ; GRANIZO, P. R. ; GARCIA, P. L. . Desarrollo de granulados de fluconazol obtenidos en lecho fluido para producción de cápsulas y tabletas. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, v. 26, p. 20-25, 2007.
- ★ GARCIA, P. L. ; SANTORO, M. I. R. M. ; SINGH, A. K. ; KEDOR-HACKMANN, E. R. M. . Determination of optimum wavelength and derivative order in spectrophotometry for quantitation of hydroquinone in creams. *RBCF. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 43, p. 397-404, 2007.

9. SINGH, A. K. ; GARCIA, P. L. ; GOMES, F. P. ; KEDOR-HACKMANN, E. R. M. ; SANTORO, M. I. R. M. . Comparative study on two rapid and sensitive methods for quantitative determination of tenoxicam. RBCF. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 43, p. 615-622, 2007.
10. ★ GARCIA, P. L. ; KEDOR-HACKMANN, E. R. M. ; SANTORO, M. I. R. M. ; SINGH, A. K. . Development and validation of a HPLC and a UV derivative spectrophotometric methods for determination of hydroquinone in gel and cream preparations. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Amsterdam, v. 39, n. 3-4, p. 764-768, 2005.

Resumos publicados em anais de congressos

1. GARCIA, P. L. ; GOMES, F. P. ; SANTORO, M. I. R. M. ; KEDOR-HACKMANN, E. R. M. . Quantitative determination of vecuronium bromide in pharmaceuticals by high performance liquid chromatography. In: 122 nd. AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting and Exposition, 2008, Dallas, Texas. 122 nd. AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting and Exposition, 2008. p. 137-137.
2. PERGAMO, A. ; ALVES, J. M. P. ; GARCIA, P. L. ; KEDOR-HACKMANN, E. R. M. ; SANTORO, M. I. R. M. ; AURORA-PRADO, M. S. . Simultaneous determination of lamivudine and zidovudine in binary mixtures using derivative spectrophotometry. In: 122 nd. AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting and Exposition, 2008, Dallas, Texas. 122 nd. AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting and Exposition, 2008. p. 137-137.
3. ROJAS, R. M. ; GARCIA, P. L. ; GOMES, F. P. ; AURORA-PRADO, M. S. ; SINGH, A. K. ; MARTINS, J. S. ; SANTORO, M. I. R. M. ; KEDOR-HACKMANN, E. R. M. . A simple analytical method for the determination of haloperidol in tablets by derivative spectrophotometry. In: 122 nd. AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting and Exposition, 2008, Dallas, Texas. 122 nd. AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting and Exposition, 2008. p. 138-138.
4. GALDOS, A. A. G. ; GARCIA, P. L. ; AURORA-PRADO, M. S. ; SANTORO, M. I. R. M. ; KEDOR-HACKMANN, E. R. M. . Validation of a HPLC method for determination of econazole nitrate and impurities in the presence of preservatives in cream formulations. In: 122 nd. AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting and Exposition, 2008, Dallas, Texas. 122 nd. AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting and Exposition, 2008. p. 138-138.
5. LEITE, H. D. ; GARCIA, P. L. ; ALVES, J. M. P. ; SANTORO, M. I. R. M. ; KEDOR-HACKMANN, E. R. M. . Determination of amlodipine besylate in tablets by spectrophotometry and high performance liquid chromatography. In: 122 nd. AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting and Exposition, 2008, Dallas, Texas. 122 nd. AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting and Exposition, 2008. p. 137-137.
6. ERDELYI, M. C. ; GARCIA, P. L. ; GOMES, F. P. ; KEDOR-HACKMANN, E. R. M. ; SANTORO, M. I. R. M. ; FISCHER, D. C. H. . Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for determination of the aporphine isocorydine in Annona squamosa L.(Annonaceae). In: AOAC Europe Section, International Workshop, 2008, Lisboa. Abstracts Book of AOAC Europe Section International Workshop, 2008. p. 11-11.
7. QUENCA-GUILLEN J. ; GUIMARÃES, C.A. ; GARCIA, P. L. ; SANTORO, M. I. R. M. ; KEDOR-HACKMANN, E. R. M. ; MATOS, J.R. ; MERCURI L.P. . Avaliação termoanalítica do ascorbato de monometilsilanol em formulações cosméticas, utilizando a calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria. In: 21o.Congresso Brasileiro de Cosmetologia, 2007, São Paulo. Cosmetis and Toiletries Ed. Brasileira. São Paulo : Tecnopress, 2007. v. 19. p. 88-88.
8. ★ GARCIA, P. L. ; GOMES, F. P. ; SINGH, A. K. ; SANTORO, M. I. R. M. ; KEDOR-HACKMANN, E. R. M. . Validation of a novel and efficient analytical method for the quantitative determination of pancuronium bromide in injections by high-performance liquid chromatography. In: 121st AOAC Annual Meeting & Exposition, 2007, Anaheim, California. 121st AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting & Exposition, 2007.
9. GOMES, F. P. ; GARCIA, P. L. ; SINGH, A. K. ; ALVES, J. M. P. ; SANTORO, M. I. R. M. ; KEDOR-HACKMANN, E. R. M. . Quantitative Determination of Fluvastatin and Atorvastatin Calcium in Tablets. In: 121st AOAC Annual Meeting & Exposition, 2007, Anaheim, California. 121st AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting & Exposition, 2007.
10. GOMES, F. P. ; GARCIA, P. L. ; SINGH, A. K. ; ALVES, J. M. P. ; KEDOR-HACKMANN, E. R. M. ; SANTORO, M. I. R. M. . Quantitative Determination of Rosuvastatin and Pravastatin Sodium in Tablets. In: 121st AOAC Annual Meeting & Exposition, 2007, Anaheim, California. 121st AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting & Exposition, 2007.

11. SANTORO, M. I. R. M. ; GARCIA, P. L. ; TSUBONE, C. ; GOMES, F. P. ; KEDOR-HACKMANN, E. R. M. . Development and validation of HPLC and UVDS methods for quantitative determination of sotalol in tablets. In: 121st AOAC Annual Meeting & Exposition, 2007, Anaheim, California. 121st AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting & Exposition, 2007.
12. SANTORO, M. I. R. M. ; TSUBONE, C. ; GARCIA, P. L. ; KEDOR-HACKMANN, E. R. M. ; GOMES, F. P. . Determinação quantitativa de nadolol e sotalol em comprimidos por espectrofotometria derivada no UV. In: XII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, XLII Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica, XXII Seminário de Pós-Graduação, 2007, São Paulo. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. São Paulo, 2007.
13. ALVES, J. M. P. ; GOMES, F. P. ; GARCIA, P. L. ; KEDOR-HACKMANN, E. R. M. ; SANTORO, M. I. R. M. . Desenvolvimento, validação e comparação de método cromatográfico e espectrofotométrico para quantificação de sinvastatina em medicamentos. In: XII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, XLII Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica, XXII Seminário de Pós-Graduação, 2007, São Paulo. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. São Paulo, 2007.
14. GARCIA, P. L. ; GOMES, F. P. ; ZANOLLI FILHO, L. A. ; TAVARES, M. F. M. ; SANTORO, M. I. R. M. ; KEDOR-HACKMANN, E. R. M. . Validation of a capillary electrophoretic method for the quantitative determination of pancuronium bromide in injectable formulations. In: 13th Latin-American Symposium on Biotechnology, Biomedical, Biopharmaceutical and Industrial Applications of Capillary Electrophoresis and Microchip Technology, 2007, Santiago. 13th Latin-American Symposium on Biotechnology, Biomedical, Biopharmaceutical and Industrial Applications of Capillary Electrophoresis and Microchip Technology, 2007. p. PP-A-37-PP-A-37.
15. QUENCA-GUILLEN J. ; GUIMARÃES, C. A. ; GARCIA, P. L. ; SANTORO, M. I. R. M. ; MATOS, J. R. ; MERCURI L. P. ; KEDOR-HACKMANN, E. R. M. . Validação de metodologia analítica para determinação do ascorbato de monometilsilanotriol em formulações cosméticas empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa com pareamento iônico. In: XVIII Congresso Latinoamericano de Ibérico de Químicos Cosméticos, 2007, Guatemala. COLAMIQC XVIII, 2007.
16. GOMES, F. P. ; GARCIA, P. L. ; SINGH, A. K. ; KEDOR-HACKMANN, E. R. M. ; SANTORO, M. I. R. M. . Development and validation of a UV derivative spectrophotometric method for quantitative determination of pravastatin sodium in tablets. In: 120th AOAC Annual Meeting & Exposition, 2006, Minneapolis, Minnesota. 120th AOAC Annual Meeting & Exposition, 2006.
17. GARCIA, P. L. ; GOMES, F. P. ; SINGH, A. K. ; SANTORO, M. I. R. M. ; YANO, H. M. ; KEDOR-HACKMANN, E. R. M. . Development and validation of sensitive methods for quantitative determination of Sibutramine HCl and direct enantiomeric separation on protein based CSP. In: Congresso SIMCRO 2006, 2006, São Pedro, SP. Anais do Congresso SIMCRO 2006, 2006.
18. GARCIA, P. L. ; GOMES, F. P. ; SINGH, A. K. ; SANTORO, M. I. R. M. ; KEDOR-HACKMANN, E. R. M. . Comparative study on two rapid and sensitive methods for quantitative determination of tenoxicam. In: XI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, XLI Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica, XXI Seminário de Pós-Graduação, 2006, São Paulo, SP. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 2006.
19. YANO, H. M. ; GARCIA, P. L. ; SINGH, A. K. ; SANTORO, M. I. R. M. ; KEDOR-HACKMANN, E. R. M. . Determinação de isoflavonas por cromatografia líquida de alta eficiência em formulações farmacêuticas. In: XI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, XLI Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica, XXI Seminário de Pós-Graduação, 2006, São Paulo, SP. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 2006.
20. GARCIA, P. L. ; SINGH, A. K. ; KEDOR-HACKMANN, E. R. M. ; SANTORO, M. I. R. M. . Development and validation of a HPLC and a UV derivative spectrophotometric methods for determination of hydroquinone in gel and cream preparations. In: 118 AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting and Exposition, 2004, Saint Louis, Missouri. The 118 AOAC International Annual Meeting and Exposition. Final Program. Poster Session, General Analytical Methods, 2004. p. 162-162.

Artigos aceitos para publicação

1. GOMES, F. P. ; GARCIA, P. L. ; ALVES, J. M. P. ; SINGH, A. K. ; KEDOR-HACKMANN, E. R. M. ; SANTORO, M. I. R. M. . Development and validation of stability-indicating HPLC methods for quantitative determination of pravastatin, fluvastatin, atorvastatin and rosuvastatin in pharmaceuticals. Analytical Letters, 2009.

Eventos**Participação em eventos**

1. III Jornadas sobre ciencias analíticas en el laboratorio clínico. 2008. (Participações em eventos/Outra).
2. Analítica South America. 2002. (Participações em eventos/Congresso).
3. XXVII Congreso Centroamericano y el Caribe de Ciencias Farmacéuticas. 2001. (Participações em eventos/Congresso).
4. IV Congreso Latinoamericano de Estudiantes de Farmacia. 1998. (Participações em eventos/Congresso).

Outras informações relevantes

Estagio supervisionado (maio-outubro, 2008) na "Universidad de Granada, España" junto ao departamento de química analítica, laboratório de química analítica y ciencias de la vida. Bolsa obtida através do "Programa de Movilidad Internacional Santander 2008".

Ficha do aluno (histórico escolar parcial) emitido pelo FenixWeb

Usuário - 3766445

Pedro López García

Ficha Aluno

Pós-Graduação

Apresentação
 Ajuda
 Período de matrícula
 Disciplinas oferecidas
 Catálogo de disciplinas
 Orientadores

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

9139 - 3766445/2 - Pedro López García
Acesso Restrito

Alterar Senha
 Alterar Email
 Pré-matrícula
 Solicitar matrícula de
 acompanhamento
 Ficha do aluno
 Cancelamento de matrícula
 Carteira USP

Sair

Email:	pedrolog@usp.br
Data de Nascimento:	24/07/1976
Cédula de Identidade:	RNE - V337334-J - DF
Local Nascimento:	Guatemala
Nacionalidade:	Guatemalteca
Graduação:	Químico Farmacêutico - Universidad de San Carlos de Guatemala - - Guatemala - 2001
Mestrado:	Mestre em Fármaco e Medicamentos - Área: Produção e Controle Farmacêuticos - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2004

Curso:	Doutorado em Fármaco e Medicamentos
Área:	Produção e Controle Farmacêuticos
Data da Matrícula:	24/08/2005
Início da Contagem de Prazo:	24/08/2005
Data Limite:	24/08/2009
Orientador(es):	Prof(a). Dr(a). Erika Rosa Maria Kedor - 24/08/2005 a -- E.Mail: ermkedor@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 23/09/2005
Exame de Qualificação:	
Data do Depósito do Trabalho:	
Data máxima para aprovação da Banca:	
Título do Trabalho:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Ocorrência:	Última matrícula em 24/07/2008

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Hor.	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Sit. Matric.
FBF5731-5	Formas Farmacêuticas Sólidas	15/09/2005	23/11/2005	90	6	89.00	A	N	Concluída
QFL5711-4	Técnicas Analíticas de Separação em Fase Líquida Parte I. Cromatografia de Alta Eficiência	08/03/2006	20/04/2006	90	6	90.00	A	N	Concluída
FBF5767-2	Determinação de Enantiômeros: Modos e Mecanismos de Separação	09/03/2006	19/04/2006	60	4	100.00	A	N	Concluída
EDM5015-2	Ensino e Aprendizagem dos Conceitos Científicos em Sala de Aula.	13/03/2006	19/06/2006	120	0	0.00	-	N	Matrícula cancelada
ICB5700-5	Estratégias Pedagógicas no Ensino em Ciências Biomédicas	04/04/2006	16/05/2006	30	2	85.00	A	N	Concluída
QFL5707-4	Técnicas Analíticas de Separação. Parte II. Eletroforese Capilar	26/04/2006	08/06/2006	90	6	90.00	B	N	Concluída
FBA5728-2	Aprimoramento Didático	06/06/2006	03/07/2006	60	0	0.00	-	N	Turma cancelada
FBC5741-5	Análise Toxicológica de Fármacos e Drogas que Causam Dependência	08/08/2006	12/09/2006	60	4	100.00	A	N	Concluída
FBF5777-1	Seminários Gerais	12/03/2007	24/06/2007	45	3	100.00	A	N	Concluída
FBF5730-5	Esterilidade e Potência Microbiológica de Medicamentos	02/08/2007	24/10/2007	60	4	92.00	A	N	Concluída

Créditos mínimos exigidos	Para Exame de Qualificação	Para Depósito de Dissertação/Tese	Créditos obtidos	
Disciplinas:	20	20	Disciplinas:	35
Atividades Programadas:	0	0	Atividades Programadas:	0
Seminários:	0	0	Seminários:	0
Estágios:	0	0	Estágios:	0
Total:	20	20		35

Créditos Atribuídos à Tese : 167

Conceito até 31/12/1996:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; D - Insuficiente, sem direito a crédito; E - Reprovado, sem direito a crédito; I - Incompleto; J - Abandono Justificado; T - Transferência.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a (15) horas de atividade programada.

Situação em: 01/06/2008 21:42

Créditos | Fale conosco

© 1999 - 2007 - Departamento de Informática da Codage/USP

ARTIGOS PUBLICADOS EM REVISTAS:

GOMES, F. P.; GARCIA, P. L.; ALVES, J. M. P.; SINGH, A. K.; KEDOR-HACKMANN, E. R. M.; SANTORO, M. I. R. M. UV-Derivative Spectrophotometric and Stability-Indicating High-Performance Liquid Chromatographic Methods for Determination of Simvastatin in Tablets. **Acta Farm. Bonaer**, v. 28, p. 261-269, 2009.

GARCIA, P.L.; GOMES, F.P.; SANTORO, M.I.R.M.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M. Validation of an HPLC analytical method for determination of pancuronium bromide in pharmaceutical injections. **Anal. Lett.** New York. v.41, n.10, p.1895-1908, 2008.

GAONA-GALDOS, A.A; GARCIA, P.L.; AURORA-PRADO, M.S.; SANTORO, M.I.R.M.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M. Simultaneous determination of econazole nitrate, main impurities and preservatives in cream formulation by high performance liquid chromatography. **Talanta**. Oxford. v.77, n.2, p.673-678, 2008.

SANTORO, M.I.R.M.; TSUBONE, C.; GOMES, F.P.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M.; GARCIA, P.L. Development and validation of high performance liquid chromatographic and UV-derivative spectrophotometric methods for the determination of sotalol hydrochloride in tablets. **Anal. Lett.** New York. v.41, n.11, p.2044-2057, 2008.

TSUBONE, C.; GARCIA, P.L.; GOMES, F.P.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M.; SANTORO, M.I.R.M. Quantitative determination of nadolol in tablets by high-performance liquid chromatography and UV-derivative spectrophotometry. **Anal. Lett.** New York. v.41, n.3, p.424-436, 2008.

SINGH, A.K.; GARCIA, P.L.; GOMES, F.P.; YANO, H.M.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M.; AURICCHIO, M.; SANTORO, M.I.R.M. Development and validation of sensitive methods for quantitative determination of sibutramine hydrochloride monohydrate and direct enantiomeric separation on protein based CSP. **J. AOAC Int.** Arlington. v.91, n.3, p.572-579, 2008.

SINGH, A.K.; GARCIA, P.L.; GOMES, F.P.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M.; SANTORO, M.I.R.M. Comparative study on two rapid and sensitive methods for quantitative determination of tenoxicam. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.** São Paulo. v.43, n.4, p.615-622, 2007.

GARCIA, P.L.; SANTORO, M.I.R.M.; SINGH, A.K.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M. Determination of optimum wavelength and derivative order in spectrophotometry for quantitation of hydroquinone in creams. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.** São Paulo. v.43, n.3, p.397-404, 2007.

CONSIGLIERI, V.O.; FERRAZ, H.G.; GRANIZO, P.R.; GARCIA, P.L. Desarrollo de granulados de fluconazol obtenidos en lecho fluido para producción de cápsulas y tabletas. **Acta Farm. Bonaer.** Buenos Aires. v.26, n.1, p.20-25, 2007.

APRESENTAÇÃO DE PÔSTERES EM CONGRESSOS:

GARCIA, P.L.; GOMES, F.P.; SANTORO, M.I.R.M.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M. Quantitative determination of vecuronium bromide in pharmaceuticals by high performance liquid chromatography. In: **122st AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting & Exposition**, 2008, pag. 137, Dallas, Texas.

ROJAS, R.M.; GARCIA, P.L.; YANO, H.M.; GOMES, F.P.; PRADO, M.S.A.; SANTORO, M.I.R.M.; SINGH, A.K.; MARTINS, J.L.S.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M. A simple analytical method for the quantitative determination of haloperidol in tablets by derivative spectrophotometry. In: **122st AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting & Exposition**, 2008, pag. 138, Dallas, Texas.

GALDOS, G.A.A.; GARCIA, P.L.; PRADO, M.S.A.; SANTORO, M.I.R.M.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M. Validation of a HPLC method for determination of econazole nitrate and impurities in the presence of preservatives in cream formulations. In: **122st AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting & Exposition**, 2008, pag. 138, Dallas, Texas.

LEITE, H.D.; GARCIA, P.L.; ALVES, J.M.P.; SANTORO, M.I.R.M.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M. Determination of amlodipine besylate in tablets by spectrophotometry and high performance liquid chromatography. In: **122st AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting & Exposition**, 2008, pag. 137, Dallas, Texas.

PERGAMO, A.M.; ALVES, J.M.P.; GARCIA, P.L.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M.; SANTORO, M.I.R.M.; PRADO, M.S.A. Simultaneous determination of lamivudine and zidovudine in binary mixtures using derivative spectrophotometry. In: **122st AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting & Exposition**, 2008, pag. 137, Dallas, Texas.

ERDELYI, M.C.; GARCIA, P.L.; GOMES, F.P.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M.; SANTORO, M.I.R.M.; FISCHER, D.C.H. Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for determination of the aporphine isocorydine in *Annona squamosa* L. (Annonaceae). In: **AOAC Europe Section International Workshop and the II Encontro Nacional de Bromatologia, Hidrologia e Toxicologia**, 2008, Lisboa, Portugal. p.111.

GARCIA, P.L.; GOMES, F.P.; ZANOLLI FILHO, L.A.; TAVARES, M.F.M.; SANTORO, M.I.R.M.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M. Validation of a capillary electrophoretic method for the quantitative determination of pancuronium bromide in injectable formulations. In: **13th Latin-American Symposium on Biotechnology, Biomedical, Biopharmaceutical and Industrial Applications of Capillary Electrophoresis and Microchip Technology**, 2007, Santiago. p.PP-A-37.

GOMES, F.P.; ALVES, J.M.P.; GARCIA, P.L.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M.; SANTORO, M.I.R.M. Desenvolvimento, validação e comparação de método cromatográfico e espectrofotométrico para quantificação de sinvastatina em medicamentos. In: **XII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, XLII Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica, XXII Seminário de Pós-Graduação**, 2007, São Paulo. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. v.43, supl.1, p.72.

GARCIA, P.L.; TSUBONE, C.; GOMES, F.P.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M.; SANTORO, M.I.R.M. Determinação quantitativa de nadolol e sotalol em comprimidos por espectrofotometria derivada no UV. In: **XII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, XLII Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica, XXII Seminário de Pós-Graduação**, 2007, São Paulo. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. v.43, supl.1, p.66.

ALVES, J.M.P.; GOMES, F.P.; GARCIA, P.L.; SANTORO, M.I.R.M. Validação de métodos para análise de estatinas em medicamentos. In: **Simposio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo**, 2007, Ribeirão Preto. Resumos, São Paulo, 2007. Compact Disk, file://D:\ficha 568.htm.

QUENCA-GUILLEN, J.; GUIMARÃES, C.A.; GARCIA, P.L.; SANTORO, M.I.R.M.; MATOS, J.R.; MERCURI, L.P.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M. Validação de metodologia analítica para determinação do ascorbato de monometilsilanotriol em formulações cosméticas empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa com pareamento iônico. In: **XVIII Congresso Latinoamericano de Ibérico de Químicos Cosméticos**, 2007, Guatemala. COLAMIQC XVIII, 2007. Cosmetics & Toiletries ed. Bras. v.19, n.6, p.57-58.

SANTORO, M.I.R.M.; GARCIA, P.L.; TSUBONE, C.; GOMES, F.P.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M. Development and validation of HPLC and UVDS methods for quantitative determination of sotalol in tablets. In: **121st AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting & Exposition**, 2007, p.157. Anaheim, California.

GOMES, F.P.; GARCIA, P.L.; SINGH, A.K.; ALVES, J.M.P.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M.; SANTORO, M.I.R.M. Quantitative Determination of Rosuvastatin and Pravastatin Sodium in Tablets. In: **121st AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting & Exposition**, 2007, p.157. Anaheim, California.

GOMES, F.P.; GARCIA, P.L.; SINGH, A.K.; ALVES, J.M.P.; SANTORO, M.I.R.M.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M. Quantitative Determination of Fluvastatin and Atorvastatin Calcium in Tablets. In: **121st AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting & Exposition**, 2007, p.158. Anaheim, California.

GARCIA, P.L.; GOMES, F.P.; SINGH, A.K.; SANTORO, M.I.R.M.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M. Validation of a novel and efficient analytical method for the quantitative determination of pancuronium bromide in injections by high-performance liquid chromatography. In: **121st AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting & Exposition**, 2007, p.152. Anaheim, California.

QUENCA-GUILLEN, J.; GUIMARÃES, C.A.; GARCIA, P.L.; SANTORO, M.I.R.M.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M.; MATOS, J.R.; MERCURI, L.P. Avaliação termoanalítica do ascorbato de monometilsilanotriol em formulações cosméticas, utilizando a calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria. In: **21o. Congresso Brasileiro de Cosmetologia**, 2007, São Paulo. Cosmetis & Toiletries Ed. Bras. v.19, n.3, p.88.

YANO, H.M.; GARCIA, P.L.; SINGH, A.K.; SANTORO, M.I.R.M.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M. Determinação de isoflavonas por cromatografia líquida de alta eficiência em formulações farmacêuticas. In: **XI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, XLI Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica, XXI Seminário de Pós-Graduação**, 2006, São Paulo. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. v.42, supl.1, p.38.

GARCIA, P.L.; GOMES, F.P.; SINGH, A.K.; SANTORO, M.I.R.M.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M. Comparative study on two rapid and sensitive methods for quantitative determination of tenoxicam. In: **XI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, XLI Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica, XXI Seminário de Pós-Graduação**, 2006, São Paulo. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. v.42, supl.1, p.17.

GARCIA, P.L.; GOMES, F.P.; SINGH, A.K.; SANTORO, M.I.R.M.; YANO, H.M.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M. Development and validation of sensitive methods for quantitative determination of Sibutramine HCl and direct enantiomeric separation on protein based CSP. In: **Congresso SIMCRO 2006**, São Pedro. Anais do Congresso SIMCRO 2006. p.130/247.

GOMES, F.P.; GARCIA, P.L.; SINGH, A.K.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M.; SANTORO, M.I.R.M. Development and validation of a UV derivative spectrophotometric method for quantitative determination of pravastatin sodium in tablets. In: **120th AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting & Exposition**, 2006, p.153. Minneapolis, Minnesota.

ATIVIDADES EXTRA CURRICULARES

Participação como bolsista no Programa de Aperfeiçoamento ao Ensino (PAE) da Universidade de São Paulo junto à disciplina **“Controle de Qualidade Físico e Químico de Medicamentos e Cosméticos”** do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas durante o primeiro semestre de 2006.

Participação como bolsista no Programa de Aperfeiçoamento ao Ensino (PAE) da Universidade de São Paulo junto a disciplina **“Química Farmacêutica”** do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas durante o segundo semestre de 2006.

Participação como bolsista no Programa de Aperfeiçoamento ao Ensino (PAE) da Universidade de São Paulo junto à disciplina **“Controle de Qualidade Físico e Químico de Medicamentos e Cosméticos”** do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas durante o primeiro semestre de 2007.

Participação como voluntario no Programa de Aperfeiçoamento ao Ensino (PAE) da Universidade de São Paulo junto à disciplina **“Controle de Qualidade Físico e Químico de Medicamentos e Cosméticos”** do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas durante o primeiro semestre de 2009.