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

Determinação dos enantiômeros da atropina em soluções oftálmicas
empregando a cromatografia líquida de alta eficiência com fase
estacionária quiral

Renata Soares

Dissertação para obtenção de grau de
MESTRE

Orientador:
Profa. Dra. Maria Inês Rocha Miritello
Santoro

São Paulo
2007

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

Soares, Renata
S676d Determinação dos enantiômeros da atropina em soluções
oftálmicas empregando a cromatografia líquida de alta eficiência
com fase estacionária quiral / Renata Soares. -- São Paulo,
2007.
195p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Santoro, Maria Inês Rocha Miritello

1. Medicamento : Controle de qualidade 2. Cromatografia
em líquido de alta eficiência : Isômero : Farmacologia 3. Alcalóide :
Farmacologia I. T. II. Santoro, Maria Inês Rocha Miritello,
orientador.

615.19015 CDD

Renata Soares

Determinação dos enantiômeros da atropina em soluções oftálmicas empregando a cromatografia líquida de alta eficiência com fase estacionária quiral

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Maria Inês Rocha Miritello Santoro
orientador / presidente

Profa. Dra. Pierina Sueli Bonato
1°. examinador

Profa. Dra. Vera Lucia Lanchote
2°. examinador

São Paulo, 08 de novembro de 2007

À minha amada família, que compreendeu com amor todas as minhas ausências para a realização deste trabalho: pais, Antonio e Sebastiana; irmãos, Benedito, Maria, Dalva, Rosana, Iracema e Diorgenes (in memorian); sobrinhos, Daiane, Adan, Mayck, Rafael, Jéssica, Clarice, Gabriel, Letícia e João.

AGRADECIMENTOS

À Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

À Profa. Dra. Maria Inês Rocha Miritello Santoro, que muito admiro e em quem me espelho, por toda dedicação, orientação e confiança depositada para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Anil Kumar Singh pela amizade sincera e conhecimento, que foram guias sempre presente ao longo da pesquisa.

À Profa. Dra. Érika Rosa Maria Kedor-Hackmann pelas sugestões e estímulos, muito importantes para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Antonio Altair M. Oliveira e ao Prof. Dr. Ernani Pinto que me abriram as portas da universidade para que eu começasse a trilhar o caminho acadêmico.

Ao Dr. Jürgen Böckman, que criou meios para viabilizar a realização deste Mestrado e acompanhou confiante, de perto ou de longe, cada difícil etapa.

À Dra. Lílian D. Nunes Nunes e à Dra. Catarina M. H. Nakazaki que, ao começar o Mestrado, forneceram-me apoio em bases sólidas, resistentes aos obstáculos vindouros do tempo e da distância.

Aos grandes amigos Fernanda Camillo, Josie Ferreira, Sandra dos Santos, Clovis Bernardo e Ricardo Leite que, por acreditarem tão forte e incondicionalmente em meus propósitos, criaram uma atmosfera propícia para que fossem alcançados.

A todos os queridos amigos do Laboratório de Controle Físico e Químico de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos da FCF/USP, com os quais compartilhei dificuldades e sucessos ao longo da pesquisa.

À Indústria Farmacêutica Organon do Brasil e a todos os amigos e companheiros de trabalho, onde encontrei ambiente propício para o meu desenvolvimento profissional.

Ao querido Adalberto Baggio que me forneceu amparo e inspiração, quando já me era escassa a energia para a conclusão deste trabalho.

A todos que, de longe, de perto ou mais de perto, estiveram comigo na longa, e muitas vezes dolorosa, jornada para a realização deste Mestrado.

*“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a Lua toda
Brilha, porque alta vive.”*

Ricardo Reis (heterônimo de Fernando Pessoa)

RESUMO

Há muitos agentes terapêuticos comercializados sob forma racêmica. Os enantiômeros podem apresentar diferenças significativas nos perfis farmacocinético e farmacodinâmico. O uso do enantiômero puro em formulações farmacêuticas pode resultar em melhor ajuste de dose e menos efeitos adversos. A atropina, um alcalóide natural da *Atropa belladonna*, é a mistura racêmica de l-hiosciamina e d-hiosciamina. Este fármaco é principalmente utilizado para dilatar a pupila e como um antiespasmódico. Para quantificar estes enantiômeros, foram desenvolvidos métodos analíticos utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com as fases estacionárias quirais Chiralcel-OD® e Chiral-AGP®. Para quantificar estes enantiômeros em soluções oftálmicas, foi realizada a validação com sucesso de um método por CLAE, empregando uma coluna Chiral-AGP®, a 20 °C. A fase móvel foi uma solução tampão fosfato (contendo 10 mM de 1-octanosulfonato de sódio e 7,5 mM de trietilamina, ajustada para pH 7,0 com ácido fosfórico) e acetonitrila (99:1 v/v). A vazão foi de 0,6 mL/min, com detecção ultravioleta em 205 nm. No intervalo de concentração de 14,0 µg/mL a 26,0 µg/mL, o método é linear ($r > 0,9999$), exato (100,1% - 100,5%) e preciso ($RSD_{\text{sistema}} \leq 0,6\%$; $RSD_{\text{intra-dia}} \leq 1,1\%$; $RSD_{\text{entre-dias}} \leq 0,9\%$). O método é específico e os testes de validação asseguram que as soluções de padrão e amostra são estáveis até 72 horas. O planejamento fatorial assegura a robustez com variação de $\pm 10\%$ nos componentes da fase móvel e 2 °C na temperatura da coluna.

Palavras-chave: Atropina. Hiosciamina. Chiral AGP®. Chiralcel OD®. CLAE com fase quiral.

ABSTRACT

There are many therapeutic agents commercialized under racemic form. The enantiomers can show significant differences in the pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles. The use of pure enantiomer in pharmaceutical formulations can result in better adjustment of dose and less adverse effects. Atropine, an alkaloid of the *Atropa belladonna*, is a racemic mixture of l-hyoscyamine and d-hyoscyamine. This drug is mainly used to dilate the pupil and as an antispasmodic agent. To quantify these enantiomers analytical methods were developed, using high performance liquid chromatography (HPLC) with chiral stationary phases Chiralcel OD® and Chiral AGP®. To quantify these enantiomers in ophthalmic solutions the validation of a HPLC method was performed using a Chiral AGP® column at 20 °C. The mobile phase consisted of a buffered phosphate solution (containing 10 mM 1-octanesulfonic acid sodium salt and 7.5 mM triethylamine, adjusted to pH 7.0 with ortho-phosphoric acid) and acetonitrile (99:1 v/v). The flow rate was 0.6 mL/min, with ultraviolet detection at 205 nm. In the concentration range from 14.0 mg/mL to 26.0 mg/mL, the method is linear ($r > 0.9999$), exact (100.1% - 100.5%) and precise ($RSD_{\text{system}} \leq 0.6\%$; $RSD_{\text{intra-day}} \leq 1.1\%$; $RSD_{\text{inter day}} \leq 0.9\%$). The method is specific and the validation tests assure that standard and sample solutions are stable for up to 72 hours. The factorial design assures the robustness with variation of $\pm 10\%$ in the mobile phase components and 2 °C of column temperature.

Keyword: Atropine. Hyoscyamine. Chiral AGP®. Chiralcel OD®. Chiral HPLC.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Cromatograma obtido com Chiralcel OD®, método n.º 18.....	108
FIGURA 2 - Cromatograma obtido com Chiralcel OD®, método n.º 22.....	108
FIGURA 3 - Cromatograma obtido com Chiralcel OD®, método n.º 24.....	108
FIGURA 4 - Cromatograma obtido com Chiralcel OD®, método n.º 23.....	109
FIGURA 5 - Cromatograma obtido com Chiralcel OD®, método n.º 25.....	109
FIGURA 6 - Cromatograma obtido com Chiralcel OD®, método n.º 33.....	109
FIGURA 7 - Cromatogramas da linearidade para o sulfato de atropina usando a coluna Chiralcel OD®.....	110
FIGURA 8 - Cromatograma obtido com Chiralcel OD® para l-hiosciamina 90%+d- hiosciamina 10%	110
FIGURA 9 - Cromatogramas da linearidade para l-hiosciamina 90%+d-hiosciamina 10% empregando a coluna Chiralcel OD®.	110
FIGURA 10 - Cromatograma obtido com Chiral AGP®, método n.º 4.	112
FIGURA 11 - Cromatograma obtido com Chiral AGP®, método n.º 7.	112
FIGURA 12 - Cromatograma obtido com Chiral AGP®, método n.º 15.	112
FIGURA 13 - Efeito e probabilidade cumulativa para a seletividade de l-hiosciamina e d-hiosciamina.....	114
FIGURA 14 - Efeito e probabilidade cumulativa para a retenção de l-hiosciamina.....	115
FIGURA 15 - Cromatograma obtido com Chiral AGP®, método n.º 23.	115
FIGURA 16 - Cromatograma obtido com Chiral AGP®, método n.º 29.	116
FIGURA 17 - Cromatograma obtido com Chiral AGP®, método n.º 42.	116
FIGURA 18 - Cromatograma obtido com Chiral AGP®, método n.º 50.	116
FIGURA 19 - Cromatogramas comparativos do teste de especificidade.	117

FIGURA 20 - Representação gráfica do intervalo do método.....	123
FIGURA 21 - Gráficos do efeito e significância dos fatores sobre a retenção de l- hiosciamina (a) e d-hiosciamina (b).	125
FIGURA 22 - Gráficos do efeito e significância dos fatores sobre a concentração de l- hiosciamina (a) e d-hiosciamina (b).	126
FIGURA 23 - Gráficos do efeito e significância dos fatores sobre a resolução (a) e seletividade (b) de l-hiosciamina e d-hiosciamina.	127
FIGURA 24 - Gráficos da linearidade para sulfato de hiosciamina.	170
FIGURA 25 - Gráficos da linearidade para l-hiosciamina do sulfato de atropina.	173
FIGURA 26 - Gráficos da linearidade para d-hiosciamina do sulfato de atropina.	175
FIGURA 27 - Gráficos da exatidão para a solução oftálmica 1%.	177
FIGURA 28 - Gráficos da exatidão para a solução oftálmica 0,5%.	178
FIGURA 29 - Gráficos da precisão intermediária para solução oftálmica 1%.	184
FIGURA 30 - Gráficos da precisão intermediária para solução oftálmica 0,5%.	185
FIGURA 31 - Gráfico da estabilidade da solução de sulfato de hiosciamina.	191
FIGURA 32 - Gráficos da estabilidade da solução de sulfato de atropina.	192
FIGURA 33 - Gráficos da estabilidade da solução oftálmica 1%.	193

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação dos tipos de fases estacionárias quirais e requisitos para análise enantiosseletiva.....	43
Tabela 2 - Colunas sugeridas para separação enantiomérica de aminas e alcalóides	44
Tabela 3 - Propriedades das proteínas AGP e OVM.....	48
Tabela 4 - Métodos avaliados com a coluna Chiralcel OD®	84
Tabela 5 - Métodos avaliados com a coluna Chiral AGP®.....	88
Tabela 6 - Dados do planejamento fatorial empregando a coluna Chiral AGP®.....	90
Tabela 7 - Dados do planejamento fatorial para o teste de robustez	104
Tabela 8 - Resumo da análise estatística da linearidade para a quantificação de l-hiosciamina e d-hiosciamina, empregando a coluna Chiralcel OD®.....	111
Tabela 9 - Resumo da análise estatística da repetibilidade do sistema para a quantificação de l-hiosciamina e d-hiosciamina, empregando a coluna Chiralcel OD®	111
Tabela 10 - Resultados do planejamento fatorial para separação de l-hiosciamina e d-hiosciamina	113
Tabela 11 - Retenção e seletividade de hiosciamina e substâncias relacionadas	118
Tabela 12 - Respostas relativas do estudo de estresse	118
Tabela 13 - Linearidade para a quantificação de l-hiosciamina e d-hiosciamina	120
Tabela 14 - Determinação de LD e LQ para l-hiosciamina e d-hiosciamina	120
Tabela 15 - Exatidão para a quantificação de l-hiosciamina e d-hiosciamina	121
Tabela 16 - Repetibilidade do sistema para a quantificação de l-hiosciamina e d-hiosciamina.....	121
Tabela 17 - Precisão intermediária para a quantificação de l-hiosciamina e d-hiosciamina na solução oftálmica 1%	122

Tabela 18 - Precisão intermediária para a quantificação de l-hiosciamina e d-hiosciamina na solução oftálmica 0,5%	122
Tabela 19 - Intervalo do método para a quantificação de l-hiosciamina e d-hiosciamina	123
Tabela 20 - Estabilidade das soluções de padrão e amostra para a quantificação de l- hiosciamina e d-hiosciamina	124
Tabela 21 - Respostas obtidas no planejamento fatorial para avaliar a robustez.....	124
Tabela 22 - Parâmetros de adequabilidade do sistema para a quantificação de l-hiosciamina e d-hiosciamina	128
Tabela 23 - Respostas do teste de linearidade para sulfato de hiosciamina	168
Tabela 24 - Respostas da linearidade para l-hiosciamina do sulfato de atropina.....	171
Tabela 25 - Respostas da linearidade para d-hiosciamina do sulfato de atropina.....	174
Tabela 26 - Respostas da exatidão para a quantificação de l-hiosciamina e d-hiosciamina	176
Tabela 27 - Respostas de precisão intermediária para a quantificação de l-hiosciamina e d- hiosciamina	183
Tabela 28 - Respostas da estabilidade das soluções de padrão e amostra para a quantificação de l-hiosciamina e d-hiosciamina	190

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Efeitos calculados para a seletividade de l-hiosciamina e d-hiosciamina.....	114
Quadro 2 - Efeitos calculados para a retenção de l-hiosciamina.....	115
Quadro 3 - Pureza dos picos de l-hiosciamina e d-hiosciamina	119
Quadro 4 - Análise estatística da linearidade para sulfato de hiosciamina	169
Quadro 5 - Análise estatística da linearidade para l-hiosciamina do sulfato de atropina.....	172
Quadro 6 - Análise estatística da linearidade para d-hiosciamina do sulfato de atropina	174
Quadro 7 - Análise estatística da exatidão: l-hiosciamina da solução oftálmica 1%	179
Quadro 8 - Análise estatística da exatidão: d-hiosciamina da solução oftálmica 1%	180
Quadro 9 - Análise estatística da exatidão: l-hiosciamina da solução oftálmica 0,5%	181
Quadro 10 - Análise estatística da exatidão: d-hiosciamina da solução oftálmica 0,5%	182
Quadro 11 - Análise estatística da precisão intermediária: l-hiosciamina na solução oftálmica 1%	186
Quadro 12 - Análise estatística da precisão intermediária: d-hiosciamina na solução oftálmica 1%	187
Quadro 13 - Análise estatística da precisão intermediária: l-hiosciamina na solução oftálmica 0,5%.....	188
Quadro 14 - Análise estatística da precisão intermediária: d-hiosciamina na solução oftálmica 0,5%.....	189
Quadro 15 - Análise estatística da estabilidade das soluções para a quantificação de l-hiosciamina e d-hiosciamina	194

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AGP	α -1-Ácido glicoproteína
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANOVA	“Analysis of Variance” (Análise de Variância)
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD	“Diodo Array Detector” (Detector de Arranjo de Diodos)
DEA	Dietilamina
DSHP	Fosfato de Sódio Dibásico
EtOH	Etanol
FDA	“Food and Drug Administration”
FEQ	Fase Estacionária Quiral
Hex	Hexano
HPLC	“High Performance Liquid Chromatography”
ICH	“International Conference on Harmonization”
IPA	Isopropanol
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MeOH	Metanol
MWD	Multiple Wavelength Detector
OSS	1-Octanosulfonato de sódio
OVM	Ovomucóide
PDA	“Photodiode Array Detector” (Detector de Arranjo de Fotodiodos)
pH	Logaritmo negativo da atividade do íon hidrogênio

Eur Ph	European Pharmacopoeia
pI	Ponto Isoelétrico
pK	Logaritmo negativo da constante de dissociação
REM	“Rapid Eyes Movement”
RSD	“Relative Standard Deviation” (Desvio Padrão Relativo)
SD	“Standard Deviation” (Desvio Padrão)
SDHP	Fosfato de Sódio Monobásico Monoidratado
SNC	Sistema Nervoso Central
SST	“System Suitability Test” (Teste de Adequabilidade do Sistema)
TEA	Trietilamina
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultravioleta
VIS	Visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 OBJETIVO	22
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.2 ATROPINA.....	23
2.1.1 Ação sobre os receptores colinérgicos muscarínicos.....	24
2.1.2 Farmacologia da atropina.....	26
2.1.3 Farmacocinética	30
2.1.4 Indicação e administração.....	30
2.1.5 Produtos farmacêuticos comerciais.....	33
2.1.6 Dados físicos e químicos da atropina e hiosciamina.....	34
2.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	38
2.3.1 CLAE com fase estacionária quiral	38
2.3.1.1 Fase estacionária quiral do tipo carboidrato.....	45
2.3.1.2 Fase estacionária quiral do tipo proteína.....	47
2.3.2 Métodos para análise de atropina	50
2.4 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA.....	56
2.5 QUIMIOMETRIA	71
3 JUSTIFICATIVA.....	79
4 MATERIAIS E MÉTODOS	80
4.1 MATERIAIS.....	80
4.2 MÉTODOS	84
4.2.1 Análise enantiosseletiva com a coluna Chiralcel OD®.....	84
4.2.1.1 Desenvolvimento.....	84

4.2.1.2 Validação: Testes preliminares	86
4.2.2 Análise enantiosseletiva com a coluna Chiral-AGP®	88
4.2.2.1 Desenvolvimento	88
4.2.2.2 Validação	91
5 RESULTADOS	108
5.1 ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA COM A COLUNA CHIRALCEL OD®	108
5.1.1 Desenvolvimento	108
5.1.2 Validação: Testes preliminares	110
5.2 ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA COM A COLUNA CHIRAL AGP®	112
5.2.1 Desenvolvimento	112
5.2.2 Validação	117
5.2.2.1 Especificidade	117
5.2.2.2 Linearidade	120
5.2.2.3 Limite de detecção e limite de quantificação	120
5.2.2.4 Exatidão	121
5.2.2.5 Precisão	121
5.2.2.6 Intervalo	123
5.2.2.7 Robustez	124
5.2.2.8 Teste de adequabilidade do sistema	128
6 DISCUSSÃO	129
6.1 ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA COM A COLUNA CHIRALCEL OD®	129
6.2 ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA COM A COLUNA CHIRAL AGP®	134
7 CONCLUSÕES	154
REFERÊNCIAS	161
APENDICE	168

APÊNDICE A – ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	168
A.1 Análise estatística da linearidade	168
A.2 Análise estatística da exatidão	176
A.3 Análise estatística da precisão intermediária.....	183
A.4 Análise estatística da robustez: estabilidade das soluções	190

1 INTRODUÇÃO

As ciências farmacêuticas têm avançado em ritmo cada vez mais acelerado, desenvolvendo e lançando no mercado novos produtos farmacêuticos e, outras vezes, como resultado de novas descobertas, retirando do mercado produtos que não têm a qualidade e a segurança comprovada.

É neste contexto que o controle de qualidade de medicamentos se desenvolve cada vez mais, inovando em tecnologia e aprimorando técnicas já existentes para a pesquisa e solução de problemas que acompanham as ciências farmacêuticas. Técnicas como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a cromatografia gasosa, a eletroforese capilar, a espectrometria de massas e outras são amplamente empregadas no controle de qualidade, na busca de metodologias analíticas que forneçam resultados reprodutíveis e confiáveis. Para atender estes requisitos, diversos parâmetros analíticos são avaliados durante o desenvolvimento e validação da metodologia, tais como especificidade, linearidade, exatidão, precisão, limites de detecção e de quantificação e robustez.

Algumas metodologias atendem em parte o parâmetro especificidade. Isto porque, com o emprego de metodologias convencionais, não é possível distinguir inequivocamente enantiômeros presentes no produto farmacêutico.

Em 1985 a maioria dos fármacos anualmente introduzidos no mercado era na forma de racemato. Em 2004, todos os novos fármacos sintéticos (13 no mundo) foram lançados no mercado como enantiômero puro (Murakami, 2006).

Os enantiômeros, freqüentemente, apresentam atividades farmacológicas e metabólicas diferentes entre si.

Em muitos casos, apenas um dos isômeros ópticos exibe o efeito farmacológico. O outro pode não apresentar o efeito, diminuir ou inibir a ação farmacológica ou apresentar efeitos tóxicos. Durante muitos anos o isomerismo óptico foi ignorado nos campos farmacêutico e bioquímico. Houve consequências trágicas, como o efeito tóxico, teratogênico, provocado pelo isômero (S)-talidomida. O efeito farmacológico desejado advém da (R)-talidomida. Contudo, devido à racemização *in vivo*, o uso da talidomida deve ser restrito. (PRADO, 2002). Para diminuir os riscos de ação nociva de enantiômeros, o *Food and Drug Administration* (FDA) e outras agências regulatórias, recomendam a produção de fármacos quirais como enantiômeros puros. Os estudos de racemização de enantiômero no sistema biológico também devem ser contemplados.

A fim de viabilizar a separação de enantiômeros, assegurando a qualidade e segurança de produtos farmacêuticos, cada vez mais são desenvolvidas metodologias analíticas enantiosseletivas. A técnica consiste no uso de substâncias quirais que interagem com os enantiômeros de modo seletivo. O reconhecimento quiral pode envolver ligação de hidrogênio, interações dipolo-dipolo e interações estéricas (SANTORO, 1996). Como resultado destas interações, as formas enantioméricas apresentam comportamentos diferentes, como velocidade de reação e solubilidade, o que possibilita a separação para a quantificação individual de cada enantiômero e isolamento para produção de fármacos opticamente puros.

Este estudo focaliza a aplicação de métodos de cromatografia líquida de alta eficiência para a separação e quantificação dos enantiômeros l-hiosciamina e d-hiosciamina, geralmente empregados em produtos farmacêuticos como mistura racêmica, sob a forma de sulfato de atropina.

1.1 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é a análise dos enantiômeros l-hiosciamina e d-hiosciamina, empregando a cromatografia líquida de alta eficiência com fase estacionária quiral. As etapas para atingir este objetivo são:

- Desenvolver e validar metodologias analíticas baseadas em cromatografia líquida de alta eficiência usando fase estacionária quiral para determinação dos enantiômeros l-hiosciamina e d-hiosciamina em produtos farmacêuticos;
- Realizar análise estatística dos resultados obtidos na validação do método;
- Aplicar metodologia analítica validada por CLAE para análise de soluções oftálmicas contendo sulfato de atropina, comercializadas no Brasil.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.2 ATROPINA

Estrutura química da atropina

A atropina é uma mistura racêmica de d-hiosciamina e l-hiosciamina.

A atropina é um antagonista competitivo dos receptores muscarínicos, também denominado fármaco parassimpatolítico, pois é capaz de bloquear seletivamente os efeitos da atividade nervosa parassimpática. Em sua estrutura química contém um grupo éster do ácido trópico (ou tropinol) e um básico, na mesma relação que a acetilcolina. Porém, possui um grupo aromático no lugar do grupo acetil (DELUCIA, 2004). A atropina é um alcalóide, amônio terciário, suficientemente lipossolúvel para ser rapidamente absorvido pelo intestino ou pelo saco conjuntival e, sobretudo, penetrar na barreira hematoencefálica.

Em sementes, folhas, flores e caule de plantas solanáceas são encontrados tanto o enantiômero ativo l-hiosciamina, como a atropina (NAMERA et al., 2002), principalmente na *Atropa belladonna*. O enantiômero l-hiosciamina tem ocorrência natural predominante (TAHARA et al., 1999). A atropina é frequentemente usada como pré-medicação em procedimentos anestésicos, antiespasmódico, reversor de bradicardia e antídoto contra pesticidas organofosforados (ZAREH; MALINOWSKA, 2007). O sulfato de atropina tem sido amplamente utilizado para induzir a dilatação da pupila e em alguns casos para reduzir a progressão da miopia (CHUA; CHAN; QUAH, 2006; DUNCAN; COLLISON, 2003; SCHMUCKER; SCHAEFFEL, 2006).

A forma l-hiosciamina é a forma farmacologicamente ativa enquanto que a forma d-hiosciamina praticamente não tem atividade antimuscarínica (DELUCIA, 2004). Alguns dos fármacos disponíveis comercialmente contêm atropina como racemato, enquanto outros contêm apenas o (S)-enantiômero, correspondente a l-hiosciamina, referida também como hiosciamina.

2.1.1 Ação sobre os receptores colinérgicos muscarínicos

A acetilcolina é sintetizada no citoplasma do neurônio, a partir da colina e da acetil-coenzima A, sob a ação catalítica da colina-acetil-transferase. Na ausência de estímulo nervoso, pequenas quantidades de acetilcolina (“quanta”) são continuamente liberadas. Cada *quantum* de acetilcolina liberado provoca uma despolarização da membrana pós-sináptica denominada potencial pós-sináptico em miniatura, que é demasiadamente pequeno para desencadear um potencial de ação pós-sináptico propagável na membrana de célula pós-juncional (DELUCIA, 2004).

Os fármacos colinérgicos exercem ações sobre o sistema nervoso autônomo (efeitos parassimpatomiméticos), sobre gânglios autonômicos, junção neuromuscular e células efetoras. Os efeitos dos fármacos colinérgicos apresentam amplo espectro de ação, dependendo do tipo de receptor, muscarínico ou nicotínico, que é ativado.

Os agentes colinérgicos muscarínicos manifestam pequena especificidade pelos diferentes subtipos de receptores muscarínicos. São classificados em dois grandes grupos: a) os de ação direta sobre o receptor, como a acetilcolina e a

pilocarpina e b) os de ação indireta que protegem o mediador acetilcolina da hidrólise pelas colinesterases, como a fisostigmina.

O uso de fármacos colinérgicos muscarínicos justifica-se por seus efeitos farmacológicos sobre o trato gastrointestinal, a bexiga e o globo ocular (DELUCIA, 2004).

Os fármacos denominados anticolinesterásicos inibem as colinesterases responsáveis pela hidrólise da acetilcolina, prolongando tanto suas ações muscarínicas quanto nicotínicas. Por esta razão são denominados de agentes colinérgicos de ação indireta.

Os anticolinesterásicos atuam sobre as sinapses colinérgicas autonômicas, a junção neuromuscular e o sistema nervoso central (SNC). Os efeitos autonômicos incluem bradicardia, hipotensão, secreções excessivas, broncoconstrição, hipermotilidade gastrointestinal e redução da pressão intra-ocular. A ação neuromuscular provoca fasciculação e contratura muscular, podendo induzir bloqueio por despolarização. A ação no SNC determina excitação inicial, que pode resultar em convulsões, seguidas de depressão, podendo causar perda da consciência e insuficiência respiratória.

As principais indicações terapêuticas dos agentes anticolinesterásicos são relativas ao aparelho visual, intestino e junção neuromuscular. Os inibidores da colinesterase produzem miose pelo aumento da transmissão colinérgica no músculo da íris, facilitando o escoamento do humor aquoso e reduzindo a pressão intra-ocular. Por esta razão podem ser indicados no tratamento de glaucoma, como por exemplo o demecário e o ecotiofato. Os anticolinesterásicos também são úteis para induzir aumento da motilidade dos tratos intestinal e urinário após manipulações cirúrgicas (DELUCIA, 2004).

Os anticolinesterásicos são empregados também no tratamento dos sintomas iniciais da doença de Alzheimer, um estado de demência progressiva caracterizado por uma diminuição da transmissão colinérgica no SNC.

Os antagonistas muscarínicos são classificados em: a) alcalóides naturais (atropina e escopolamina) e derivados semi-sintéticos; b) compostos sintéticos (aminas terciárias e aminas quaternárias). Esses agentes bloqueiam os vários subtipos de receptores muscarínicos através de antagonismo competitivo reversível. Seus efeitos podem ser revertidos aumentando-se a concentração de acetilcolina na biofase através do uso de anticolinesterásicos.

Os receptores muscarínicos ganglionares são bloqueados com dose mínima de atropina, insuficientes para causar inibição dos receptores colinérgicos dos efetadores do parassimpático.

A atropina é empregada como antiarrítmico, atuando como bloqueador de alta potência de receptores do tipo M2. Em condições fisiológicas, os bloqueadores dos receptores muscarínicos ganglionares, como a atropina e seus análogos, não alteram a transmissão ganglionar, nem apresentam efeito anti-hipertensivo.

2.1.2 Farmacologia da atropina

Hardman, Limbird e Gilman (2001) descreveram extensivamente a farmacologia da atropina. O histórico mostra que preparações de belladonna tem sido usadas há muitos séculos. O nome belladonna deriva do uso destas preparações por mulheres italianas para dilatar suas pupilas. Nos dias de hoje,

fotógrafos do mundo da moda ainda utilizam este recurso para realçar o visual de suas modelos. Os estudos das ações da belladonna datam do isolamento da atropina na forma pura por Mein em 1831. Em 1867, Bezold e Bloebaum mostraram que a atropina bloqueia os efeitos cardíacos pela estimulação vagal. Em 1869 foi demonstrado que uma substância exógena, a muscarina, era capaz de imitar os efeitos de estimulação do nervo vago, enquanto a atropina era capaz de inibir as ações tanto da muscarina quanto da estimulação nervosa (RANG; DALE; RITTER, 2001).

O principal efeito da atropina no homem é o aumento da frequência cardíaca, devido ao bloqueio das ações do parassimpático sobre o coração. Às vezes a taquicardia é precedida por um período de bradicardia, possivelmente pela estimulação transitória do núcleo do vago na medula oblonga. A atropina produz taquicardia de pequena intensidade, tanto em crianças como em idosos, pois nesses casos o tônus vagal é baixo. Em adultos jovens, cerca de 2 mg de atropina podem até fazer duplicar a frequência cardíaca. Tais alterações, entretanto, não são acompanhadas de mudanças significativas na pressão arterial. Isso se deve à influência dos reflexos cardiovasculares que mantêm o débito cardíaco praticamente inalterado.

Os vasos sangüíneos (com exceção dos que irrigam a musculatura esquelética) não possuem inervação colinérgica, portanto não são afetados pela atropina. Em doses elevadas, a atropina causa dilatação de vasos sangüíneos cutâneos, notadamente na face e no pescoço, resultando no aparecimento do “rubor atropínico”. Esse efeito não parece decorrer da ação antimuscarínica do fármaco, mas de uma ação direta da liberação de histamina. O rubor é sinal típico de intoxicação atropínica.

No trato gastrointestinal, a atropina provoca diminuição prolongada do tônus da motricidade, desde o estômago até o reto; nessa região, diminui os efeitos dos anticolinesterásicos e de outros agonistas colinérgicos.

A atropina impede a secreção de glândulas estimuladas por inervação colinérgica. Há diminuição do fluxo salivar e da secreção de muco pelas glândulas das vias respiratórias, provocando secura das mucosas (boca, narinas, faringe e brônquios). A secreção lacrimal também é inibida pela atropina.

Doses elevadas de atropina promovem o aumento da temperatura corporal. A sudorese, estimulada por fibras nervosas simpáticas colinérgicas, fica suprimida e a pele torna-se quente e seca. As contrações da bexiga urinária e vesícula biliar são inibidas pela atropina.

A aplicação tópica de atropina no globo ocular provoca bloqueio sustentado das contrações do músculo circular da íris e do músculo ciliar do cristalino; há portanto, midríase (dilatação pupilar) e cicloplegia (paralisia de acomodação). Esses efeitos diferem da estimulação por aminas simpatomiméticas, que produzem apenas midríase. Em idosos, a atropina pode precipitar crise de glaucoma pelo bloqueio da drenagem do humor aquoso, conseqüente à inibição da contração da musculatura circular da íris.

A ação da atropina em diversos músculos lisos depende do tônus parassimpático preexistente. A musculatura lisa de brônquios e bronquíolos relaxa e as vias aéreas se dilatam. O tônus e as contrações da uretra diminuem e o músculo detrusor da bexiga relaxa. A musculatura das vias biliares relaxa parcialmente, porém não o suficiente para justificar o uso de atropina no espasmo biliar.

A atropina estimula a medula espinhal e os centros superiores do cérebro. Em doses clínicas (0,5 a 1,0 mg), seu efeito restringe-se à ligeira excitação vagal.

Com doses elevadas, os efeitos passam a ser intensos, ocorrendo inquietação, irritabilidade, desorientação, alucinações e delírio. A estimulação é seguida por depressão e pode sobrevir morte por parada respiratória. Entre as ações centrais da atropina, estão descritas a supressão da rigidez típica do parkinsonismo e a diminuição do enjôo de movimento (cinetose), apesar de que estas ações não são terapeuticamente úteis.

Em altas doses, a atropina exhibe ações não relacionadas com seu efeito antimuscarínico, como por exemplo, ação anestésica, anti-histamínica e antinicotínica. Certos pacientes asmáticos podem experimentar alívio pela ação bronco-dilatadora deste fármaco, embora não seja indicado, devido aos efeitos secundários indesejáveis sobre as secreções brônquicas.

A intoxicação com atropina deve ser tratada com urgência; a primeira providência é lavagem gástrica, quando da ingestão. Outra manobra é a administração parenteral de fisiostigmina, anticolinesterásico de ação central e periférica que permite antagonizar os efeitos da atropina em nível de SNC, que representa o maior risco.

A atropina é também utilizada em associação com fármacos anticolinesterásicos, como a piridostigmina e a neostigmina, empregadas na terapia da miastenia grave, para se evitar os efeitos de estimulação parassimpática.

A síntese de fármacos análogos à atropina propiciou a obtenção de substâncias mais específicas, particularmente em nível intestinal e com menos efeitos adversos. Estão incluídas neste grupo as aminas terciárias (homatropina, ciclopentolato e tropicamida – midríaticos e cicloplégicos) e quaternárias (DELUCIA, 2004).

2.1.3 Farmacocinética

Conforme descrito no MARTINDALE (2002), a atropina é rápida e completamente absorvida no trato gastrointestinal e também nas membranas mucosas, olhos e pele. A atropina atravessa a barreira hematoencefálica e a placenta e podem ser detectados traços no leite materno. É incompletamente metabolizada no fígado e cerca de 50% é excretada na urina, na forma inalterada e em seus metabólitos. O tempo de meia-vida de cerca de 4 horas.

Apenas 18% (dose clinicamente insignificante) de sulfato de atropina ligam-se a proteínas plasmáticas. Cerca de 50% de sulfato de hiosciamina liga-se a proteínas plasmáticas. O sulfato de atropina é excretado primariamente através dos rins e uma pequena quantidade pode ser excretada pelas fezes e expirada no ar. O sulfato de hiosciamina é excretado na urina. A eliminação da meia-vida é bifásica, com uma fase inicial de 2 horas, seguida de uma fase terminal de cerca de 12 horas.

2.1.4 Indicação e administração

O uso da atropina se estende a vários propósitos, incluindo, segundo Korolkovas e França (2005) e MARTINDALE (2002):

- Anestesia: É ministrada como pré-medicação antes da anestesia geral, para diminuir o risco de inibição do nervo vagal do coração e reduzir a

salivação e a secreção brônquica. A dose usual para adultos e crianças com mais de 20 kg é de 0,4 mg, intramuscular ou subcutânea, administrado de 30 a 60 minutos antes da anestesia.

- Antiespasmódico: Empregada em distúrbios gastrointestinais e utilizada também para prevenir broncoespasmos
- Analgesia: Empregada como adjuvante a analgésicos opiáceos para alívio dos sintomas de cólica renal ou biliar.
- Cardiologia: Empregada para tratar bradicardia. A atropina deprime o nervo vago e por isso aumenta a taxa cardíaca. A dose usual para adultos é de 0,5 a 1 mg, por via intravenosa.
- Antídoto em caso de envenenamento: Empregada para tratamento de envenenamento com cogumelo que contém agentes muscarínicos e por pesticidas organofosforados. A dose típica para adulto é de 1 a 2 mg por via intramuscular ou intravenosa, repetidas vezes, de 5 a 60 minutos, até o desaparecimento dos sintomas muscarínicos.
- Para bloquear efeitos adversos de agentes anticolinérgicos quando estes agentes são usados para reverter bloqueio neuromuscular produzido por agentes curáricos. A dose usual para adultos é de 0,6 a 1,2 mg para cada 0,5 a 2,5 mg de neostigmina ou 10 a 20 mg de piridostigmina
- Oftalmologia: A atropina é usada topicamente como midriático e cicloplégico. A dose como cicloplégico para adultos é de 1 gota de solução 1%, uma hora antes da refração.

A hiosciamina, o isômero levogiro, tem aproximadamente duas vezes a potência da atropina, pois o isômero dextrogiro apresenta somente fraca atividade antimuscarínica. A hiosciamina é usada principalmente para aliviar as condições associadas com espasmos viscerais. Tem sido empregada também para o tratamento de Parkinsonismo. A hiosciamina é administrada usualmente com doses de 150 a 300 µg, até quatro vezes ao dia.

Os efeitos da atropina podem ser potencializados devido ao uso concomitante de outros fármacos com propriedades antimuscarínicas, como a amantadina, alguns anti-histamínicos, antipsicóticos fenotiazínicos e antidepressivos tricíclicos.

A atropina pode causar aumento do pH do trato gastrintestinal e em conseqüência, reduzir de maneira acentuada a absorção de cetoconazol. Pode aumentar as concentrações séricas da digoxina devido à diminuição da motilidade gastrintestinal. Pode aumentar a pressão intra-ocular. O sulfato de atropina é fisicamente incompatível com bitartarato de norepinefrina e bicarbonato de sódio.

Os efeitos colaterais periféricos da atropina e outros antimuscarínicos advêm da ação inibitória sobre os receptores muscarínicos no sistema nervoso autônomo.

A toxicidade sistêmica pode ser produzida pela instilação local de gotas oftálmicas, em especial em crianças e idosos. A administração prolongada de atropina nos olhos pode causar irritação local, hipertermia, edema e conjuntivites. Pode ocorrer aumento da pressão arterial, principalmente em pacientes prédispostos. A atropina pode causar hipertermia como resultado da inibição da sudorese.

2.1.5 Produtos farmacêuticos comerciais

A atropina e a hiosciamina são geralmente comercializadas na forma de sulfato (MARTINDALE, 2002).

No Brasil, medicamentos contendo atropina não associada estão disponíveis, mediante prescrição médica nas seguintes apresentações: solução injetável de sulfato de atropina 0,25 mg/mL e 0,5 mg/mL (uso hospitalar); solução oftálmica de sulfato de atropina 0,5% e 1%. Medicamentos contendo sulfato de atropina em associações também são comercializados nas seguintes formas farmacêuticas: solução oral (atropina + papaverina + tiamina + dipirona), comprimidos – fabricante “A” (ergotamina + cafeína + paracetamol + hiosciamina + atropina), comprimidos – fabricante “B” (difenoxilato + sulfato de atropina) e drágeas (fenobarbital + atropina + papaverina + leptolobium + passiflora) (*website CONSULTAREMÉDIO*, 2007).

A hiosciamina, no Brasil, está disponível apenas em associação, mediante prescrição médica, nas seguintes apresentações: comprimidos – fabricante “A” (ergotamina + cafeína + paracetamol + hiosciamina + atropina), comprimidos – fabricante “B” e solução oral (escopolamina + hiosciamina + dipirona + homatropina) (*website CONSULTAREMÉDIO*, 2007).

A atropina não deve ser administrada a crianças menores de 3 meses, devido à possibilidade de induzir cicloplegia e o desenvolvimento de ambliopia. Deve ser armazenada em temperatura ambiente (15 °C a 30 °C) e protegida de aquecimento, luz e ar.

2.1.6 Dados físicos e químicos da atropina e hiosciamina

Atropina

Fórmula molecular: $C_{17}H_{23}NO_3$

Peso molecular: 289,37

pKa: cerca de 9,5

Fórmula estrutural

A atropina também pode ser denominada como: dl-hiosciamina; dl-tropiltropato; tropato de tropina; ácido benzenoacético, α -(hidroximetil)- 8-metil-8-azabícilo[3.2.1]oct-3-il ester endo-($\pm$)-; 1- α -H,5- α -H-tropan-3- α -ol (.+/-)-tropato; ácido trópico, éster com tropina; ácido trópico, 3- α -tropanil éster; (+,-)-tropil tropato; 1 α H,5 α H-tropan-3 α -ol ($\pm$)-tropato; ($\pm$)-hiosciamina; ($\pm$)-atropina (MERCK INDEX, 1983).

A descrição farmacopeica da atropina está na USP 25 (MARTINDALE, 2002) como: cristais brancos, geralmente pontiagudos ou pó branco cristalino. Solubilidade: 1 parte solubiliza em 460 partes de água; 1 em 90 de água a 80°C, 1 em 2 de álcool; 1 em 1 de clorofórmio e 1 em 25 de éter; solúvel em glicerol. A solução saturada em água é alcalina, usando indicador de fenolftaleína. Deve ser acondicionada em recipiente hermeticamente fechado e protegido da luz.

Toxicidade por ingestão aguda: LD₅₀ dose oral em ratos: 75 mg.kg⁻¹.
Concentração letal para humanos: 0,302 μ mol.L⁻¹ (na forma de sulfato).

Sulfato de atropina

Fórmula estrutural

₂, H₂SO₄, H₂O

Fórmula molecular:

A descrição farmacopeica do sulfato de atropina está na USP 25 (MARTINDALE, 2002) como: cristais incolores e inodoros ou pó branco cristalino. Solubilidade: 1 parte solubiliza em 0,5 partes de água; 1 em 2,5 de água fervente, 1 em 5 de álcool; 1 em 2,5 de glicerol. Deve ser acondicionado em recipiente hermeticamente fechado.

O sulfato de atropina está descrito na Farmacopéia Européia (MARTINDALE, 2002) como: Pó cristalino branco ou cristais incolores. Solubilidade: muito solúvel em água; bastante solúvel em álcool, praticamente insolúvel em éter. Uma solução 2% em água apresenta pH de 4,5 a 6,2. Deve ser protegido da luz.

Foi observada incompatibilidade entre sulfato de atropina e preservantes tipo hidroxibenzoato, resultando em perda total da atropina em 2 a 3 semanas.

Hiosciamina

Fórmula molecular: $C_{17}H_{23}NO_3$

Peso molecular: 289,37

Fórmula estrutural

Outros nomes: l-hiosciamina; (-)-atropina; tropato l-tropina; tropina, (-)-tropato; ácido benzenoacético, α -(hidroximetil)-8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il éster, [3(S)-endo]-; 1 α H,5 α H-tropan-3 α -ol, (-)-tropato (éster); ácido trópico, (-)-, éster com tropina; (S)-(-)-hiosciamina; hiosciamina (MERCK INDEX, 1983).

É um alcalóide encontrado em diversas plantas da família das Solanaceas. É a forma natural, encontrada na *Atropa belladonna*. É o isômero leve da atropina, no qual pode ser convertido através de aquecimento ou por ação de álcali.

A descrição farmacopeica da hiosciamina está na USP 25 (MARTINDALE, 2002) como: Pó branco cristalino. Solubilidade: pouco solúvel em água; bastante solúvel em álcool, em clorofórmio e ácidos diluídos; pouco solúvel em éter. A solução de hiosciamina em água é alcalina. Deve ser acondicionado em recipiente hermeticamente fechado e protegido da luz.

Toxicidade por ingestão aguda: LD₅₀ dose intravenosa em ratos: 95 mgkg⁻¹.

Sulfato de hiosciamina

Fórmula estrutural

$\cdot 2, \text{H}_2\text{SO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$

Fórmula molecular:

A descrição farmacopeica do sulfato de hiosciamina está na USP 25 (MARTINDALE, 2002) como: Cristais incolores e inodoros ou pó cristalino. Ponto de fusão não menos que 200 °C. Solubilidade: 1 parte solubiliza em 0,5 parte de água; 1 em 5 de álcool; praticamente insolúvel em éter. Uma solução 1% em água apresenta pH de cerca de 5,3. Deve ser acondicionado em recipiente hermeticamente fechado.

O sulfato de hiosciamina está descrito na Farmacopéia Européia (MARTINDALE, 2002) como: Pó cristalino branco ou pó incolor. Solubilidade: muito solúvel em água; bastante solúvel em álcool, praticamente insolúvel em éter. Uma solução 2% em água apresenta pH de 4,5 a 6,2. Deve ser acondicionado em recipiente hermeticamente fechado e protegido da luz.

2.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A palavra cromatografia é de origem grega: *khroma*, *khromatos*, cor + *graphein*, descrever. Consiste de método de separação dos constituintes de uma mistura, visando identificação, dosagem ou produção industrial, mediante a migração de compostos através de sistemas formados por diferentes fases que manifestam afinidades preferenciais a cada componente (GRANDE ENCICLOPÉDIA LAROUSSE CULTURAL, 1998).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é de grande valia na análise de fármacos em medicamentos. A técnica permite identificar, quantificar e separar mistura de fármacos dos excipientes e/ou dos produtos de decomposição. Devido a estas características a CLAE tem sido empregada no controle de qualidade de medicamentos e é muito recomendada em compêndios oficiais como a Farmacopéia Americana e a Farmacopéia Européia.

A cromatografia líquida de alta eficiência com fase estacionária quiral é um sistema cromatográfico especial capaz de separar compostos que, em sistemas convencionais, não manifestam afinidades preferenciais.

2.3.1 CLAE com fase estacionária quiral

A palavra quiral é de origem grega e significa “mão”. A mão esquerda não é superponível à mão direita e esta, quanto posicionada frente ao espelho reflete a

imagem da outra. Uma molécula quiral é aquela que não é idêntica à sua imagem num espelho (especular), são chamadas enantiômeros e estabelecem entre si uma relação enantiomérica (SOLOMONS, 1996).

Enantiômeros são compostos diferentes, com a mesma fórmula molecular (diz-se isômeros), a mesma conectividade e diferente arranjo dos átomos no espaço (diz-se estereoisômeros), que formam imagens especulares. Enantiômeros possuem propriedades químicas e físicas idênticas, exceto para a direção de rotação da luz plano polarizada. Uma molécula quiral possui um ou mais centros estereogênicos, que são tipicamente carbonos ligados a quatro ligantes diferentes. A mistura de enantiômeros em igual proporção (1:1) é chamada de racemato. De acordo com a nomenclatura adotada para distinguir estereoisômeros, as moléculas quirais recebem duas denominações diferentes:

- i) Sistema Cahn-Ingold-Prelog: **R** e **S**.
- ii) Rotação do plano de polarização da luz: (+) ou dextrogiro, d e (-) ou levogiro, l.

Quando os estereoisômeros não formam entre si imagens especulares são chamados diastereômeros, que apresentam diferentes propriedades químicas e físicas e podem ser separados por cromatografia.

De maneira a diferenciar os enantiômeros um do outro, tanto química quanto físico-quimicamente, é necessário fornecer uma fonte quiral para a formação dos complexos diastereoisômeros.

A separação de enantiômeros por cromatografia pode ser feita através de métodos indiretos ou diretos (SANTORO, 1992).

O método indireto consiste na reação inicial de moléculas quirais com um agente quiral derivatizador, enantiomericamente puro (pureza > 99%). Esta reação

resulta em dois diastereômeros que podem ser separados por cromatografia gasosa ou cromatografia líquida de alta eficiência com coluna não quiral. Ao utilizar-se cromatografia líquida, a fase normal é preferível para separar derivados diastereoméricos, pois possui melhor seletividade para isômeros. A derivatização quiral está em desuso, pois requer grande tempo e esforço para análise, há possibilidade de racemização e a reação pode apresentar diferentes rendimentos das duas formas.

O uso de aditivo quiral na fase móvel para a formação de complexo diastereomérico transitório com o analito é classificado como método direto de separação enantiomérica. Este procedimento está em desuso, devido a problemas com o fornecimento contínuo de aditivos, separação com baixa eficiência e dificuldades na detecção.

O método direto de separação de enantiômeros mais empregado faz uso de colunas contendo fase estacionária quiral (FEQ), em que moléculas quirais estão quimicamente ligadas a um suporte, sendo mais comuns os de sílica ou aminopropilsílica. A ligação química pode ser do tipo covalente, iônica ou por revestimento físico.

A utilização de fase estacionária quiral na cromatografia líquida de alta eficiência conduz à formação de complexos diastereoisoméricos transitórios entre os enantiômeros presentes em uma amostra e o material constituinte da coluna quiral.

Quando os enantiômeros passam através da FEQ, cada um forma com esta fase um adsorbato transitório. Estes adsorbatos são diastereoisômeros e sua formação é condição necessária, mas insuficiente para ultimar a separação dos enantiômeros. Os adsorbatos devem diferir adequadamente na energia livre para que a separação enantiomérica possa ser observada (SANTORO, 1992).

O analito e a fase estacionária quiral podem formar complexos através de pontes de hidrogênio, interação do tipo π - π , ligação dipolo, complexo de inclusão e impedimento estérico. É preciso que existam forças de ligação intermoleculares para manter as moléculas do complexo espacialmente orientadas e estáveis. Estudos indicam que são necessárias pelo menos três forças de ligação, onde uma deve ser estereoespecífica, podendo ser repulsiva ou atrativa (SANTORO, 1992).

O reconhecimento quiral, em termos cromatográficos, significa interação preferencial de um enantiômero de uma substância com o enantiômero de uma segunda. Para que os enantiômeros possam ser cromatograficamente separados em FEQs, duas condições fundamentais devem ser atendidas: 1) os complexos ou adsorbatos diastereoisoméricos devem ser formados entre a FEQ e pelo menos um dos enantiômeros da mistura de isômeros a ser separada; 2) uma vez formados devem diferir nas suas energias livres de formação (SANTORO, 1992). O grau de enantiosseletividade será determinado principalmente pelo adsorbato diastereoisomérico que contenha as espécies complexadas na conformação de mais baixa energia e com o menor grau de interação estérica. Este complexo ficará mais retido na FEQ e, por conseguinte, apresentará um maior tempo de retenção resultando na separação enantiomérica. (SANTORO, 1992).

A eficiência da separação é medida pela enantiosseletividade, através do fator de separação (α) entre os dois enantiômeros. Um par de enantiômeros é considerado satisfatoriamente separado se $\alpha > 1,1$ (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

O fator mais importante na cromatografia líquida quiral é a fase estacionária quiral. A separação dos enantiômeros é muito sensível às mudanças de temperatura, pH, força iônica, polaridade e composição de fase móvel (SINGH,

2002). Pequenas mudanças nestes parâmetros causam drásticas modificações nos tempos de retenção e na resolução. Este fato é explicado devido à alta especificidade e às interações simultâneas que são necessárias para haver o reconhecimento quiral.

Baixa eficiência e vazão, usualmente 0,8 mL/min ou menos, associados com colunas quirais são indicações de baixa transferência de massa entre as fases, o que resulta em tempos de retenção mais longos quando comparados com os da CLAE convencional. Esta desvantagem é compensada pela alta seletividade de algumas FEQs. Os detectores mais usados na CLAE-FEQ são o ultravioleta e o de fluorescência. Para a confirmação dos picos são utilizados detectores de arranjo de fotodiodos (diode array detector) e espectrômetro de massas.

Para o desenvolvimento de métodos utilizando CLAE-FEQ, são válidas as diretrizes gerais adotadas ao empregar-se coluna aquiral, somando-se cuidados especiais. A estrutura química do analito deve ser minuciosamente identificada e examinada. É importante que sejam avaliados: a solubilidade do analito em diferentes solventes; a capacidade de formação de ponte de hidrogênio e interação do tipo π - π ; o valor de pKa; a presença e tipo de grupos funcionais e grupamentos estéricos; o perfil espectrométrico na região UV-VIS e a capacidade de complexação de inclusão. Quanto mais próximo um grupo funcional estiver do centro quiral, maior a probabilidade de reconhecimento quiral e enantiosseletividade.

Segundo Snyder, Kirkland e Glajch (1997), as quatro principais classes de fase estacionária, na ordem por universalidade de separação de enantiômeros, são: proteína; carboidrato, Pirkle e ciclodextrina. Outras duas classes empregadas em menor escala são: troca de ligante e antibiótico macrocíclico. Há mais de 100 fases estacionárias quirais disponíveis comercialmente. A separação de enantiômeros

empregando fase estacionária com AGP imobilizada tem sido vastamente estudada, desde a década de 80 (HERMANSSON, 1983).

A Tabela 1 mostra um resumo comparativo dos tipos de fases estacionárias quirais, incluindo a base do mecanismo de reconhecimento quiral e os requisitos do analito e da fase móvel para promover a separação enantiomérica.

Tabela 1 - Comparação dos tipos de fases estacionárias quirais e requisitos para análise enantiosseletiva

Mecanismos e requisitos do analito e fase móvel		Tipo de fase estacionária quiral					
		Proteína	Carboi- drato	Pirkle	Ciclo- dextrina	Troca de ligante	Antibió- ticos
Mecanismo	Interação hidrofóbica	X					
	Interação eletrostática	X					
	Interações atrativas		X				
	Interações π - π			X			X
	Ligação dipolo			X			X
	Ponte de hidrogênio			X	X		X
	Complexação de inclusão		X		X		
	Complexos de coordenação com metais					X	
	Impedimento estérico						X
	Aprisionamento hidrofóbico						X
Analito	Grupo ionizável (ex.: amina ou ácido)	X					
	Grupo aromático	X			X		
	Grupo aromático forte	X		X			
	Grupo polar				X		
	Habilidade para ponte de hidrogênio		X	X			X
	Habilidade para interação π			X			X
	Habilidade para ligação dipolo						X
	Grupo estérico próximo ao centro quiral		X				X
	Presença de α -amino e α -hidroxiamino ácido					X	
Fase Móvel	Fase reversa	X	X	X	X	X	X
	Fase normal		X	X	X		X
	Fase reversa não aquosa		X		X		X

Fonte: Adaptado de Snyder, Kirkland e Glajch (1997).

A análise enantiosseletiva da atropina tem sido mais comumente descrita em literatura com o uso de fases estacionárias quirais do tipo carboidrato e proteína.

Para estas fases será feita uma abordagem mais detalhada. Informações sobre os demais tipos de fases estacionárias quirais podem ser facilmente encontradas em vasta literatura. A sugestão de uso de colunas para a separação de enantiômeros da classe de composto de amina e alcalóide está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 - Colunas sugeridas para separação enantiomérica de aminas e alcalóides

Nome comercial	Tipo de fase estacionária	Uso na separação de:	
		Aminas	Alcalóides
Chiral AGP®	Proteína: α -1-ácido glicoproteína (AGP)	X	
Enantiopak	Proteína: α -1-ácido glicoproteína (AGP)	X	
Ultron ES-OVM	Proteína: ovomucóide (OVM)	X	
Resolvosil	Proteína: albumina sérica bovina (BSA)	X	
Coluna BSA	Proteína: albumina sérica bovina (BSA)	X	
BA	Proteína: albumina sérica bovina (BSA)	X	
Chiralcel OB	Carboidrato: éster de celulose	X	
Chiralcel OJ	Carboidrato: éster de celulose	X	
Chiralcel OD	Carboidrato: carbamato de celulose	X	X
Chiralcel OC	Carboidrato: carbamato de celulose		X
Chiralcel OF	Carboidrato: carbamato de celulose		X
Chiralcel OG	Carboidrato: carbamato de celulose		X
CTA	Carboidrato: celulose triacetato	X	
DNBPG	Pirkle: d ou l-fenilglicina	X	
Naftilalanina	Pirkle: d ou l-N-2-Naftilalanina	X	
Whelk-O-1	Pirkle: Whelk-O-1	X	
Cyclobond II 2000	Ciclodextrina: γ -ciclodextrina	X	

Fonte: Adaptado de Snyder, Kirkland e Glajch (1997).

2.3.1.1 Fase estacionária quiral do tipo carboidrato

Os carboidratos são polissacarídeos de ocorrência natural. Derivados deste polímero, como a celulose e a amilose exibem a propriedade de reconhecimento quiral. Há comercialmente disponível uma extensa quantidade de fases estacionárias quirais contendo derivados de polissacarídeo. Estas colunas são empregadas para a separação de muitas classes de enantiômeros em que a diferença na seletividade resulta de diferentes estruturas dos polissacarídeos (SINGH, 2002).

Os polissacarídeos mais empregados na análise enantiosseletiva são os derivados de celulose e amilose. A celulose apresenta uma estrutura linear rígida e a amilose estrutura helicoidal e isto é a base dos diferentes graus de separação de enantiômeros.

As fases estacionárias do tipo carboidrato apresentam vantagens como elevada capacidade de carregamento de amostra, geralmente são usadas com solventes orgânicos, facilmente removidos para isolamento de espécies e são aplicáveis na separação de grande número de compostos. Como desvantagem, as colunas de carboidratos convencionais (usadas no modo de fase normal) são sensíveis à presença de água, requerendo amostras e solventes livres de água e apresentam eficiência moderada em relação às fases estacionárias protéicas. O emprego de fase móvel aquosa é viável, quanto em conjunto com colunas de carboidrato modificadas para fase reversa (Ex.: Chiralcel OD-R®).

O mecanismo de reconhecimento quiral de colunas com base em polissacarídeos é complexo e não bem elucidado. Alguns fatores importantes no

mecanismo de retenção são: o modo de fixação do polímero na coluna; o peso molecular do polímero e sua distribuição na coluna e a natureza do suporte. A resolução com derivados de éster benzoato pode envolver interações dipolo com o grupo carbonil e pontes de hidrogênio com compostos que têm grupo hidroxil ou amino. A formação de complexos de inclusão parece de muita importância para o reconhecimento quiral. A enantiosseletividade de polissacarídeos com substituinte fenilcarbamato também pode ser afetada por substituintes no grupo fenil. A presença de diferentes substituintes em anel aromático também pode afetar a capacidade de reconhecimento quiral através de diferentes interações de dipolo.

Registros em literatura (SINGH, 2002) mostram que a fase estacionária quiral Chiralcel OD®, contendo o derivado de celulose tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose é a que tem sido mais empregada na separação de centenas de racematos.

Além das fases estacionárias do tipo carboidrato, exclusivamente empregadas em fase normal, foram desenvolvidas colunas quirais de polissacarídeos compatíveis com análises em fase reversa e com o uso de solvente polar não aquoso. A coluna Chiralcel OD-R® é exemplo para aplicação em fase reversa.

A coluna Chiralcel OD® foi empregada com sucesso na análise enantiosseletiva da atropina, apresentando valor de α maior que 1,5 (SZÁSZ; BUDVÁRI-BÁRÁNY; GYIMESI-FORRÁS, 1999).

2.3.1.2 Fase estacionária quiral do tipo proteína

As fases estacionárias quirais do tipo proteína apresentam elevada versatilidade para separação de enantiômeros. Os diferentes tipos de proteínas são imobilizados em coluna, através de ligação covalente a partículas de sílica e suportes poliméricos. Proteínas imobilizadas têm a vantagem de serem compatíveis com fase móvel tamponada, com ou sem modificador orgânico. Este tipo de fase estacionária quiral tem a desvantagem de não ser muito aplicável em cromatografia preparativa, devido principalmente à baixa capacidade de carregamento e alto custo (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

Os materiais protéicos comercializados em fase estacionária quiral são: albumina sérica bovina (BSA); albumina sérica humana (HSA); α -1-ácido glicoproteína (AGP, também chamado orosomucóide); ovomucóide (OVM, proteína da clara do ovo de galinha); celulase e pepsina.

O uso de fase estacionária protéica resulta em elevada seletividade para diferentes enantiômeros ou racematos. Na análise cromatográfica o espaçamento entre os picos pode ser manipulado através da variação, isolada ou em conjunto, de fatores como valor de pH, aditivo na fase móvel (ex.: aminas), modificador orgânico (tipo e proporção) e temperatura.

O mecanismo de interação quiral em fases protéicas não está completamente elucidado. A principal interação entre proteínas e enantiômeros parece ser de natureza hidrofóbica e eletrostática. A formação de pontes de hidrogênio e transferência de carga pode contribuir. Diferentes sítios da proteína estão envolvidos nas interações com moléculas quirais. As interações hidrofóbicas são afetadas pela

porcentagem de modificador orgânico (%B) na fase móvel. Quanto maior a %B, menor a retenção dos enantiômeros sobre a base protéica. As interações eletrostáticas envolvem processo de troca iônica. No ponto isoelétrico (pI), a carga aparente de uma proteína é igual a zero. A fase estacionária protéica imobilizada pode assumir carga acima ou abaixo de seu ponto isoelétrico. Desse modo, o pH da fase móvel pode ser usado para controlar a seletividade e retenção das formas enantioméricas. Em valores de pH intermediários, diferentes partes da proteína podem apresentar carga positiva ou negativa, não sendo muito susceptível à variação de pH. No geral, para valores de pH entre 3 e 7, o aumento do pH leva à maior retenção para compostos ácidos e resulta em menor retenção de compostos básicos.

As proteínas são complexas, compostas de biopolímeros de elevado peso molecular de amino ácidos l-enantiômeros. As proteínas AGP e OVM contêm elevada concentração de grupos carboidratos, que exibem importante papel na elevada enantiosseletividade. As pontes dissulfeto (pontes S-S) aumentam a estabilidade das fases estacionárias protéicas. A Tabela 3 resume algumas propriedades das proteínas AGP e OVM.

Tabela 3 - Propriedades das proteínas AGP e OVM

Proteína	PM	pI	Ponte S-S	% CHO	Resíduo
AGP (α -1-ácido glicoproteína)	41.000	2,7	2	45	14
OVM (ovomucóide)	28.800	3,7 – 4,5	8	30	0,3

Fonte: Extraído de Snyder, Kirkland e Glajch (1997). PM: peso molecular. pI: ponto isoelétrico. Ponte S-S: Ponte molecular dissulfeto. %CHO: porcentagem de carboidrato. Resíduo: Resíduo molecular de ácido siálico.

Por ser objeto deste trabalho, será focalizada a proteína α -1-ácido glicoproteína. A AGP é um polipeptídeo contendo 181 aminoácidos e 14 resíduos de

ácido siálico incorporados na porção carboidrato. Esta proteína tem a habilidade de ligar-se a muitos fármacos básicos devido à sua pronunciada carga elétrica negativa, com um ponto isoelétrico de 2,7 (FITOS et al., 2004; KURODA; SHIBUKAWA; NAKAGAWA, 1999; MILLOT, 2003; SINGH; MEHTA, 2006; ZSILA; IWAO, 2007).

A AGP é um agente de fase aguda cuja concentração normal no plasma varia entre 70 e 110 mg/mL e tem importante papel no transporte de fármacos básicos como disopiramida, lidocaína, propranolol e alprenol, quinidina, imipramina, etc. Vários fatores aumentam a concentração da AGP, tais como inflamação de média e longa duração, neoplasias, estresse e diversas condições hematológicas. Diminuem a concentração dessa proteína: distúrbios hepáticos, síndrome nefrótica e má nutrição (DELUCIA, 2004).

A proteína plasmática humana AGP apresenta polimorfismo e em muitos indivíduos é uma mistura de dois ou três variantes genéticos (FITOS et al., 2006).

A primeira coluna comercial da fase estacionária contendo a proteína α -1-ácido glicoproteína foi a EnantioPac® (ARVIDSON; JANSSEN; SCHILL, 1990). A coluna Chiral AGP® representa a nova geração desta fase estacionária.

Estudos indicam que em pH = 6,0 a fase AGP é menos fortemente carregada, o que conduz a menor dominância de ligação iônica sobre a distribuição de par iônico (ARVIDSON; JANSSEN; SCHILL, 1990).

Fases estacionárias contendo α -1-ácido glicoproteína possuem ampla aplicação, incluindo enantiômeros carregados e não carregados com diferentes estruturas. A enantiosseletividade pode ser variada e adaptada para diferentes solutos e aditivos na fase móvel. A AGP possui diversos centros quirais, mas o mecanismo de ligação quiral não é conhecido. A retenção de compostos neutros está associada à presença dos resíduos de ácido siálico.

Empregando-se a fase AGP, a separação é feita com fase móvel aquosa e a retenção e seletividade pode ser alterada variando-se o pH, descarregando a molécula, usando aditivo catiônico e aniônico e variando-se a temperatura (ARVIDSON; JANSSON; SCHILL, 1992).

Atropina e homatropina são muito similares, mas mostram grandes diferenças no perfil cromatográfico com a fase estacionária Chiral-AGP®, em especial na presença de ânions de ácido octanóico e ácido 2-fenilbutírico (ARVIDSON; JANSSON; SCHILL, 1990).

Arvidson, Jansson e Schill (1990) mostraram que em análises para separação dos enantiômeros da atropina, empregando a coluna Chiral-AGP®, tampão fosfato e gradiente de fase móvel contendo 2-propanol, que o pareador iônico octanato de sódio tem efeito significativo sobre a estereosseletividade, sem o qual uma resolução pobre é obtida. Ânions hidrofóbicos como octanato são essenciais para a enantiosseletividade da atropina sobre uma fase ligada do tipo AGP. Além disso, este aditivo também pode aumentar a seletividade por efeitos indiretos de detecção. O octanato possui bastante absorvidade molar em comprimento de onda baixo (210 – 220 nm). Os enantiômeros da atropina possuem similar absorvidade molar aparente.

2.3.2 Métodos para análise de atropina

Santoni et al. (1993) propuseram um método por CLAE convencional para a determinação de sulfato de atropina e cloreto de benzancônio em solução oftálmica.

Foi empregada uma coluna Technosphere RP C-8® e fase móvel composta por acetonitrila-ácido acético (0,25 M, pH 2,5, contendo 6 mM de brometo de tetrametilamônio, TMA), (80:20, v/v). A função do ácido acético é controlar a ionização da atropina e reduzir as interações deste soluto com grupos silanóis fracos, acessíveis sobre a fase estacionária. Com o uso de TMA os silanóis livres foram adequadamente bloqueados e houve melhora na simetria dos picos. O método proposto mostrou-se adequado para a análise pretendida e também para a determinação de ácido trópico, o principal produto hidrolítico da atropina. A metodologia proposta não é enantiosseletiva e não foram apresentados testes de validação.

Ceyhan et al. (2001) propuseram um método por CLAE convencional para identificação de sulfato de atropina e brometo de escopolamina em matéria-prima e dosagem de sulfato de atropina em solução injetável. Foi empregada uma coluna μ -Bondapack C18® e fase móvel composta por metanol-água-ácido fórmico (165:35:1, v/v/v), ajustada para pH 8,3 com trietilamina. A validação do método proposto foi realizada, porém, foram obtidos resultados questionáveis, em especial para a exatidão (recuperação de 94,6%) e a precisão ($RSD_{\text{intra-dia}} = 2,3$, em contraste com método por UV que apresentou $RSD_{\text{intra-dia}} = 0,74\%$). Os resultados insatisfatórios podem ser devido ao valor de pH adotado e/ou à falta de tamponamento da fase, comprometendo a dinâmica de ionização da atropina ($pK_{a_{\text{atropina}}} \sim 9,5$). A metodologia proposta não é enantiosseletiva e a validação do método não foi satisfatoriamente demonstrada.

Gören et al. (2004) apresentaram um método por CLAE convencional para determinação de atropina e obidoxima em dispositivo parenteral injetável. A atropina é usada associada a algumas oximas em soluções parenterais, para melhorar a

função neuromuscular e diminuir a insuficiência respiratória em casos de envenenamento por organofosforados. Foi empregada coluna Nucleosil 100-5® e fase móvel composta por acetonitrila-tampão fosfato (pH 3,5) (40:60, v/v). Alguns testes de validação foram realizados e foram obtidos resultados satisfatórios. Entretanto, são observados pontos de melhorias na metodologia proposta, tais como maior exatidão ($R\%_{\text{obtida}} = 95\%$) e simetria do pico de obidoxima. A metodologia proposta não é enantiosseletiva e não foi apresentada validação completa.

Amanlou et al. (2005) apresentaram um método por CLAE para determinação de tropicamida (derivado do ácido trópico) em formulações farmacêuticas, usando sulfato de atropina como padrão interno. A coluna empregada foi uma μ -Bondapack ODS C18® e a fase móvel foi composta de metanol-tampão fosfato com pH 4,0 (30:70, v/v). As vantagens apresentadas para o método proposto foram a simplicidade, rapidez e precisão. Contudo, não foi evidenciada a necessidade de usar a atropina como padrão interno. Isto resulta em maior número de etapas no procedimento analítico, maior custo e maior tempo de análise. Para sistemas de CLAE modernos, geralmente o padrão interno é dispensável. A metodologia apresentada pode ser potencialmente empregada para análise de atropina, porém, não é enantiosseletiva.

Mapihan, Vial e Jardy (2004) empregaram o planejamento fatorial (DOE) para estudar o comportamento da atropina e outros fármacos devido a variações de pH, temperatura, concentração de tampão e porcentagem de solvente orgânico na fase móvel, em metodologia utilizando CLAE convencional. Foi empregada a coluna SymmetryShield RP 18® e fase móvel contendo proporções variadas de metanol ou acetonitrila e tampão acetato (em diferentes concentrações e pH). O trabalho focaliza o estudo da robustez de diferentes solutos e não um método específico para

a atropina. Entretanto, mostra que a retenção da atropina é influenciada pelas condições de pH e força da fase móvel (proporção e tipo de modificador orgânico). Os métodos apresentados não são enantiosseletivos.

Kirchhoff et al. (2004) apresentaram um método por CLAE convencional para análise da atropina e de seus produtos de decomposição e um método similar para análise de substâncias relatadas de origem natural. Foi empregada a coluna Thermo Hypersil Aquasil® C18 e gradiente de fase móvel contendo acetonitrila e tampão fosfato pH 2,5. Foi demonstrado que a separação da atropina e do ácido trópico é crítica, porém, aceitável ($R_s > 1,2$). Os métodos em conjunto podem ser empregados como indicativo de estabilidade, de acordo com os testes de validação apresentados. Contudo, não são enantiosseletivos.

A análise de atropina também está descrita na literatura para métodos não cromatográficos. Zareh e Malinowska (2007) apresentaram método potenciométrico, usando eletrodo sensível à atropina. O método mostrou-se adequado para a análise não enantiosseletiva, porém, não foi apresentado estudo completo de validação. Pierre e Sentell (1994) apresentaram método enantiosseletivo para atropina empregando eletroforese capilar, contendo ciclodextrinas como ativo quiral. No estudo, foi possível obter a separação dos enantiômeros, porém, não foi apresentada validação da metodologia.

A análise enantiosseletiva da atropina está amplamente reportada na literatura e a cromatografia líquida tem sido a técnica preferida (ARVIDSON; JANSSEN; SCHILL, 1990 e 1992; BRETON et al., 2005; HELDIN; HUYNH; PETTERSSON, 1992; SCHILL; WAINER; BARKAN, 1986a e 1986b; SZÁSZ; BUDVÁRI-BÁRÁNY; GYIMESI-FORRÁS, 1999).

Nos métodos enantiosseletivo reportados na literatura indicada são empregadas as colunas Chiralcel OD® (SZÁSZ; BUDVÁRI-BÁRÁNY; GYIMESI-FORRÁS, 1999) e Chiral AGP® (ou a precursora EnantioPac®) nos demais. O método empregando a coluna Chiralcel OD® foi proposto para controlar a pureza enantiomérica da l-hiosciamina, como complemento de análise para doseamento da atropina por CLAE convencional.

De modo geral, os métodos empregando a coluna Chiral AGP® focalizam o mecanismo de interação dos enantiômeros da atropina com a fase estacionária protéica e, em alguns casos, é empregado o planejamento fatorial (ARVIDSON; JANSSEN; SCHILL, 1992; BRETON et al., 2005). Citações específicas a estes métodos são feitas ao longo deste trabalho. A seguir são apresentadas as conclusões dos estudos realizados, que são concordantes entre si e mostram que:

- i) O pH da fase móvel afeta a retenção dos enantiômeros, de modo significativo e positivo. O pH mais indicado para a separação enantiomérica está entre pH 6,0 e 7,0, controlado com tampão fosfato.
- ii) O uso de pareador iônico a base de ácido octanóico é imprescindível para a separação dos enantiômeros da atropina, ainda que em concentrações baixas (ex.: 1 mM).
- iii) São empregados como modificadores orgânicos o isopropanol e a acetonitrila, em baixas proporções (até 3%). Esta última resulta em melhor fator de separação e o aumento de acetonitrila na fase móvel implica em menor seletividade.
- iv) Nas condições estudadas, a temperatura da coluna não apresentou efeito significativo sobre a retenção e/ou separação.

- v) A separação completa dos enantiômeros da atropina foi somente possível em experimentos que resultaram em elevado tempo de retenção (cerca de 30 minutos), ou condições cromatográficas incluindo aditivo quiral na fase móvel ou uso de colunas em série no sistema cromatográfico.
- vi) Os experimentos mostram que os comportamentos da atropina e da molécula análoga homatropina, diferem bastante em termos de retenção e seletividade. Isto é indicativo de que o reconhecimento quiral da atropina pela proteína AGP envolve sítios de interação quiral e não quiral, incluindo pontes de hidrogênio (na atropina o grupo OH está mais afastado do centro quiral, por um grupamento CH₂).

Nenhum dos métodos relacionados apresentou estudo de validação da metodologia analítica para quantificação dos enantiômeros da atropina.

2.4 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA

Validação refere-se ao ato de validar, tornar legítimo. Este termo é empregado e inclusive requerido em legislações e normas nacionais e internacionais para assegurar a validade de processos de distinta natureza.

Validar é assegurar através de evidência consistentemente documentada que um sistema ou processo funciona como deve funcionar, de acordo com as especificações técnicas e atributos de qualidade previamente estabelecidos (HUBER, 2002).

Os conceitos e definições sobre validação de metodologia analítica são encontrados em vasta literatura, incluindo compêndios como as Farmacopéias, guias técnicos de agências regulatórias como o FDA (Food and Drug Administration), conferências como o ICH (International Conference on Harmonization), legislações como a RE 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), normas e orientações do INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial), artigos de revisão (RIBANI et al., 2004) e outros. Entretanto, estes guias são geralmente não específicos e carecem detalhes de “como fazer” os testes de validação na prática.

Conforme legislação vigente da ANVISA (RE nº 899, de 29 de maio de 2003), a validação de metodologia analítica é o ato de demonstrar que um método é confiável e reprodutível para as finalidades propostas. Para isto o método é desafiado mediante a avaliação dos seguintes parâmetros:

- Especificidade (ou seletividade)
- Linearidade

- Limite de detecção
- Limite de quantificação
- Exatidão
- Precisão (repetibilidade e reprodutibilidade)
- Intervalo
- Robustez (estabilidade de solução e planejamento fatorial)

A adequabilidade do sistema deriva da avaliação conjunta dos testes de validação.

A seguir, será feita uma abordagem sobre validação de metodologia analítica, baseada nos guias e legislação disponíveis sobre o tema, porém com foco primordialmente prático, advindo de experiência na indústria farmacêutica, para análise por cromatografia líquida de alta eficiência.

Especificidade

Os termos especificidade e seletividade algumas vezes são empregados como sinônimos. Por definição, diz-se que um método é específico quando responde para uma única substância de interesse. Um método é seletivo quando exprime resposta para vários compostos químicos, com características comuns (RIBANI et al., 2004). Em validação de metodologia analítica na área farmacêutica, o termo especificidade é comumente o mais adotado.

Especificidade é a capacidade de o método distinguir inequivocamente o analito na presença de outros componentes, por exemplo, matriz da amostra, produtos de decomposição, impureza, subprodutos de síntese, contaminantes, etc. A matriz da amostra também é comumente chamada de placebo e refere-se à

mistura de todos os componentes da amostra, exceto o analito de interesse, nas mesmas concentrações previstas para a solução teste.

Para comprovar a especificidade do método cromatográfico, este deve ser desafiado através da injeção de soluções contendo o analito e isenta de analito. Tipicamente são avaliadas soluções de: branco da análise (solvente da amostra e/ou padrão); fase móvel; placebo; padrão do analito puro; placebo mais analito; produtos de decomposição identificados e não identificados; subprodutos de síntese; produtos de decomposição mais analito; placebo proveniente de estudo de decomposição por estresse; amostra; amostra proveniente de estudo de decomposição por estresse.

No estudo de decomposição por estresse, placebo e amostra devem ser submetidos a condições que possam favorecer a formação de produtos de decomposição. As condições de estresse geralmente empregadas são: exposição à luz (ex.: artificial, 70 kluz/2horas ou solar, 14 dias); exposição ao calor elevado e umidade relativa ambiente (ex.: 65°C + URambiente/7 dias); exposição ao calor e umidade relativa elevados (ex.: 65°C + UR 100%/7 dias); hidrólise ácida (ex.: HCl 1M/2horas); hidrólise básica (ex.: NaOH 1M/2horas) e oxidação (ex.: H₂O₂ 3% / 2horas).

O método será considerado específico se atender a dois requerimentos gerais: 1) os cromatogramas das soluções isentas do analito não devem apresentar resposta na região de eluição dos picos de interesse; 2) a resposta dos picos de interesse não deve ser afetada por outros solutos.

Os parâmetros mais importantes na avaliação da especificidade são: resolução, retenção relativa (fator de separação), fator de capacidade (fator de retenção), fator de simetria e número de pratos teóricos (INMETRO DOQ-CGCRE-008, 2003).

Para assegurar o cumprimento desses requisitos deve ser demonstrada separação satisfatória do pico do analito e outros picos do cromatograma. Geralmente fator de resolução (R_s) maior que 1,5 são aceitáveis, sendo recomendáveis $R_s > 2,0$ (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

Os picos de interesse devem apresentar fator de pureza satisfatório, ou seja, não deve haver coeluição. Para determinar o fator de pureza de pico, o modo mais seguro é submeter o efluente da análise cromatográfica a um espectrômetro de massa (Sistema LC/MS). Estes sistemas são pouco viáveis para uso em laboratórios de rotina devido ao elevado custo agregado da análise. A determinação do fator de pureza, através da comparação de espectros sobre a área do pico, empregando detector de arranjo de diodos (detector DAD), em conjunto com os demais resultados do teste de especificidade, é indicativo satisfatório da especificidade do método.

Caso seja observada resposta em cromatogramas de soluções isentas do analito, devem ser realizados testes adicionais para demonstrar a significância da interferência. Isto pode ser feito, por exemplo, através da análise de replicatas de soluções contendo placebo mais padrão e replicatas de soluções contendo apenas padrão. As respostas médias obtidas para as soluções podem ser comparadas através de teste estatístico de análise de variância para verificar se apresentam diferença significativa. A comparação da inclinação de curvas analíticas de soluções padrão contendo a matriz e soluções padrão puras também pode ser empregada para avaliar a significância da interferência da matriz.

A experiência mostra que, dentre os testes de validação, a especificidade é o mais complexo, difícil, trabalhoso, demorado e propício a erros. Enfim é o pior e também é o melhor. Pior devido às dificuldades práticas do planejamento e

execução. Melhor, pela posterior avaliação analítica quantitativa, qualitativa e estatística minuciosa que permite obter a radiografia do método e conhecer seu potencial e suas limitações, importantes no controle de qualidade de medicamentos.

Linearidade

Linearidade é a capacidade que o método tem de fornecer respostas proporcionais à concentração, numa faixa determinada (ANVISA, RE 899 de 29 de maio de 2003).

Nas análises cromatográficas é fortemente recomendado que a resposta varie em proporção linear com as variações de concentração, segundo um modelo de primeira ordem do tipo $y = a + bx$. As interações entre fase móvel, fase estacionária e soluto são de natureza complexa e pode haver dependência com a massa injetada. A maioria das análises cromatográficas emprega detector do tipo UV-VIS, que decodifica a resposta de absorbância de um analito. Segundo a Lei de Beer, a absorbância é proporcional à concentração e esta relação segue um modelo linear para faixa de concentração limitada.

Para demonstrar a linearidade deve-se preparar soluções padrão de concentração seriada, de acordo com a faixa pretendida para uso do método. Em geral são avaliados, no mínimo, cinco níveis de concentração e recomenda-se que estejam igualmente espaçados na faixa de concentração.

Usualmente, no teste de linearidade são avaliados os seguintes níveis de concentração, em relação à concentração alvo 100% da solução teste de análise da rotina: 25%, 50%, 75%, 100%, 125% e 150%. Na prática, é preparada uma solução estoque de concentração de no mínimo 250% em relação à solução teste.

Diretamente a partir desta solução estoque a série de diluição é preparada em duplicata, no mínimo. As soluções da replicata 1 são submetidas à análise cromatográfica, na ordem crescente e sucessivamente decrescente de concentração, obtendo-se assim duas injeções de cada solução. A seguir, o procedimento é repetido para a replicata 2 da série de diluição. Este plano de análise propicia a identificação de erros sistemáticos ou variações de equipamentos que possam interferir na análise confiável dos resultados do teste de linearidade.

A análise do resultado de cada solução injetada deve ser feita com base na resposta de altura e/ou área dos picos de interesse. A integração dos picos deve ser feita do mesmo modo para todos os cromatogramas. Deve-se calcular a resposta média e o correspondente RSD obtido para as replicatas de um mesmo nível de concentração. A resposta relativa média obtida para cada nível de concentração injetado deve ser calculada e comparada com a resposta relativa obtida para o nível 100% de concentração. Isto permite avaliar o quanto a resposta de cada nível desvia do ponto central de concentração estabelecido para o método e é possível identificar alguma tendência que põe em risco a proporcionalidade entre resposta e concentração.

Os resultados médios de resposta obtidos em duplicata para cada nível de concentração são tratados estatisticamente, segundo o método dos mínimos quadrados, com base no modelo de regressão linear. Os parâmetros do modelo linear são obtidos e correspondem ao coeficiente de correlação linear, intercepto ("a") e coeficiente de correlação angular, "slope" ("b"). Desta forma, está definida a equação de primeira ordem do modelo linear: $y = a + bx$. A significância estatística do intercepto é determinada através da soma dos desvios e seu erro padrão.

Com os dados da regressão linear, é feita a análise de variância (ANOVA) para testar a significância do modelo e dos resíduos associados. A relação entre as variáveis x e y é determinada através do cálculo do coeficiente de determinação (R^2), que mostra o grau de variabilidade explicada pelo método e do coeficiente de correlação ($r = \sqrt{R^2}$). Para análise de medicamentos por cromatografia líquida, recomenda-se $r > 0,999$ (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

Para verificar se há falta ajuste dos dados ao modelo escolhido é realizado o “Lack of Fit Test”, através da ANOVA. Os resíduos são decompostos em erro puro (aleatório) e erro devido à falta de ajuste dos dados (pode ser originado de erros sistemáticos, grosseiros). A significância da falta de ajuste é avaliada através da comparação das variâncias obtidas para a soma quadrática dos desvios de erro puro e dos desvios de falta de ajuste. Se não houver diferença entre estas variâncias, está comprovado que não há falta de ajuste dos dados ao modelo linear escolhido. A avaliação visual do gráfico de resíduos padronizados é importante para identificar tendência ou indicação de autocorrelação serial entre os desvios dos diferentes níveis de concentração avaliado. O gráfico deve exibir perfil aleatório, randômico, mostrando que a variabilidade é a mesma ao longo da faixa de concentração avaliada no teste de linearidade (BRUNS; SCARMINIO; BARROS NETO, 2003).

A linearidade do método é plenamente comprovada para a faixa avaliada quando são atendidos de modo satisfatório os critérios de aceitação quanto ao coeficiente de correlação linear, desvio da resposta relativa, significância do intercepto e da falta de ajuste e distribuição dos resíduos.

A avaliação da linearidade do método deve ser concordante com o modo de padronização: uso de padrão externo ou interno. Quando a metodologia é aplicada à matriz complexa ou biológica e modos de adição de padrão ou superposição de

matriz forem empregados nas análises, isto deve ser considerado na execução do teste de linearidade.

A faixa de concentração e as quantidades de níveis avaliados podem ser estendidos para adequar-se à finalidade do método, por exemplo, para quantificação de fármacos em medicamentos com dosagens diferentes de apresentação.

Em alguns casos somente é possível demonstrar a linearidade após uma transformação matemática prévia. Por exemplo, em metodologias analíticas em cujo procedimento estão envolvidos microorganismos, a resposta (por exemplo turbidez) apresenta uma relação logarítmica com a concentração. Após transformação matemática, a relação pode ser comprovada se é linear ou não.

Caso a linearidade não seja comprovada na faixa de 25% a 150%, o intervalo pode ser estreitado, de acordo com a finalidade do método, em concordância com os requisitos da legislação vigente. Se mesmo em faixa menor não for comprovada linearidade, o método deve ser revisto, alterado e os testes de validação devem ser repetidos.

Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) de um método é a menor concentração detectada, mas não necessariamente quantificada. O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração que foi detectada e pode ser quantificada com precisão e exatidão adequadas (ANVISA, RE 899 de 29 de maio de 2003).

Em análises cromatográficas, os valores de LD e LQ são primeiro determinados teoricamente, geralmente, através da relação sinal/ruído da linha de base na região de eluição dos analitos. É calculada a distância pico a pico na faixa

de eluição. Metade desta distância (porção superior à linha de base média) corresponde ao ruído que pode afetar o sinal do pico do analito.

Teoricamente, múltiplo de 1,5 vezes, o ruído gera um sinal (medido em altura do pico) suficientemente distinguível do ruído, a ponto de ser sempre detectado (LD). Do mesmo modo, múltiplo de 5 vezes o ruído, gera um sinal quantificável com precisão e exatidão adequada. O emprego de múltiplos de 1,5 e 5 vezes o ruído é comumente adotado como requisito interno em Laboratórios de Controle de Qualidade na Indústria Farmacêutica, pois isto promove uma avaliação mais rigorosa dos limites do método para o uso rotineiro. Usualmente adota-se, teoricamente, múltiplo de 5 vezes para o LD e 10 vezes para o LQ. De todo modo, este é um cálculo teórico e ponto de partida para desafiar os limites mínimos de concentração que o método é capaz de detectar e quantificar.

Na prática, com base no valor teórico calculado, devem ser preparadas soluções padrão diluídas, com concentração equivalente à altura esperada para o valor de LD e LQ calculados. Estas soluções devem ser cromatografadas, injetadas sequencialmente, por no mínimo seis vezes.

Os cromatogramas obtidos devem ser avaliados e os picos, se presentes, devem ser integrados. As respostas das seis injeções devem ser avaliadas. Se nos cromatogramas da solução de LD foi detectado pico em todas as injeções, então de fato, a solução testada corresponde ao limite de detecção. A resposta das injeções da solução de LQ deve ser avaliada quanto ao valor de concentração resultante e ao RSD. Se o resultado obtido apresentar precisão e exatidão adequada, então realmente a solução testada corresponde ao limite de quantificação do método.

A concordância entre o cálculo teórico e prático dos limites LD e LQ depende também do sistema cromatográfico empregado, da condição das lâmpadas do

detector, das fontes de ruído eletrônico e da concentração de análise da solução teste. Quanto menor for a concentração de análise da solução teste, menor o grau de concordância entre o cálculo teórico e a comprovação real, prática dos limites.

Caso os valores teóricos de LD e LQ não sejam comprovados na prática, deve-se preparar solução gradativamente mais concentrada para que o método seja novamente desafiado.

Exatidão

A exatidão do método exprime o grau de concordância entre um valor observado experimentalmente e um valor aceito como verdadeiro (RIBANI et al., 2004). A exatidão deve ser demonstrada através da avaliação de pelo menos nove replicatas, sendo três replicatas de três diferentes níveis de concentração – baixo, central e alto –, concordante com o intervalo recomendado para a finalidade do método (ANVISA, RE 899 de 29 de maio de 2003).

Para fazer o teste de exatidão, deve-se analisar concentração conhecida do analito, na presença dos componentes da matriz e mediante a submissão de todas as etapas envolvidas no procedimento de preparação da solução teste.

Em análises de medicamentos por cromatografia, em geral a concentração do analito na solução teste é da ordem de microgramas ou nanogramas. Desse modo, não é viável preparar uma solução teste contendo a matriz e concentração conhecida do analito, devido à limitação de pesagem.

Para preparar as soluções para a avaliação da exatidão, primeiramente prepara-se a matriz correspondente a uma tomada de ensaio e sobre esta adiciona volume preciso de uma solução padrão estoque contendo concentração conhecida

do analito. Diretamente a partir de diferentes volumes da mesma solução padrão estoque são preparadas as nove replicatas de solução teste de exatidão para avaliar o grau de recuperação do analito em diferentes níveis de concentração. Os níveis de concentração baixo, central e alto podem ser: 50%, 100% e 150% ou 70%, 100% e 130% ou 80%, 100% e 120%, de acordo com a finalidade do método.

Os resultados de resposta obtidos com as soluções de recuperação são comparados com as respostas de uma solução padrão controle, no nível de concentração 100%, preparada a partir da mesma solução padrão estoque usada para fazer as soluções de recuperação.

Recuperação de 98% a 102% é usualmente recomendada em análise de medicamentos. Além de avaliar a exatidão de recuperação de cada nível de concentração, é feita análise estatística através de análise de variância para verificar se há diferença na recuperação obtida entre os diferentes níveis de concentração.

Precisão

A precisão de um método é dada pelo grau de concordância (grau de dispersão) entre uma série de medidas obtidas a partir de múltiplas amostragens de uma mesma amostra homogênea sob as condições prescritas no método. A precisão de um método deve ser avaliada em quatro níveis: repetibilidade do sistema, repetibilidade do método, precisão intermediária e reprodutibilidade (ANVISA, RE 899 de 29 de maio de 2003).

A repetibilidade do sistema expressa a precisão sob as mesmas condições de operação, em um curto intervalo de tempo. Pode ser demonstrada injetando seqüencialmente seis vezes as soluções referentes aos níveis de concentração

baixo, central e alto de uma das replicatas utilizadas no teste de linearidade. Para cada nível de concentração é calculada a resposta média das injeções e o correspondente RSD. Também é aplicável a análise estatística da variância para verificar se as respostas relativas média dos níveis de concentração apresentam diferença significativa entre si.

A repetibilidade do método é definida como o nível de concordância entre os resultados obtidos a partir da aplicação do procedimento experimental diversas vezes ($n \geq 6$ para o nível de concentração 100% ou um mínimo de 9 determinações, como por exemplo, 3 replicatas de três níveis de concentração), sob as condições prescritas pelo método, num curto intervalo de tempo. Deve-se determinar o RSD correspondente às repostas obtidas em cada nível de concentração de recuperação avaliado no teste de exatidão. A análise estatística é aplicada para comparar as variâncias entre os níveis de concentração e verificar se o método apresenta o mesmo grau de precisão ao longo da faixa de concentração avaliada.

A repetibilidade do método também pode ser determinada através do cálculo do RSD correspondente à média dos resultados obtidos na análise de seis amostras, preparadas em um único dia, por um mesmo analista.

A precisão intermediária indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias, diferentes analistas, diferentes equipamentos ou uma combinação desses fatores. É reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório (RIBANI et al., 2004).

A determinação da precisão intermediária pode ser feita através da análise de seis replicatas de amostras de um lote homogêneo, durante dois dias, analisados por dois analistas, utilizando dois sistemas cromatográficos e duas colunas, preferencialmente, de lotes diferentes. Cada análise deverá ser realizada como um

teste independente, utilizando soluções de padrão e amostra recém preparadas. Usar preferencialmente amostras de lotes recém produzidos. Para cada dia, calcular a média dos resultados e o correspondente RSD. Calcular a média geral dos resultados obtidos nos dois dias de análise ($n = 12$) e o respectivo RSD geral. A precisão intermediária é expressa pelo RSD geral. Neste teste é aplicável a avaliação estatística dos dados através da análise de variância e para determinar se há diferença estatisticamente significativa entre os resultados dos diferentes dias de análise.

A reprodutibilidade é a avaliação dos resultados obtidos em diferentes laboratórios, mediante o uso da mesma metodologia analítica. Deve ser considerada em situações de padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos, por exemplo, em farmacopéias (RIBANI et al., 2004).

Intervalo

O intervalo de um método analítico é a faixa entre a maior e a menor concentração (quantidade) de analito em uma amostra para a qual se demonstra que o procedimento analítico tem um nível adequado de linearidade, exatidão e precisão (ANVISA, RE 899 de 29 de maio de 2003). O intervalo de um método analítico deriva, portanto, das faixas testadas para a determinação da linearidade, exatidão e precisão.

Robustez

A robustez de um método analítico é a medida da capacidade do método manter-se inalterado mesmo após pequenas, mas deliberadas variações de alguns de seus parâmetros (ANVISA, RE 899 de 29 de maio de 2003). É um indicativo da sua confiabilidade para seu uso rotineiro.

A demonstração da robustez pode ser etapa integrante do desenvolvimento do método. Para demonstrar a robustez deve-se comprovar que pequenas variações de alguns fatores como pH, temperatura, marca de coluna, porcentagem de componentes da fase móvel, vazão não tenham efeito significativo sobre a resposta para a quantificação do analito na amostra. Isto pode ser feito através de planejamento fatorial (DEJAEGER; VANDER HEYDEN, 2007; GOUPY, 2005; VANDER HEYDEN et al., 1999).

A estabilidade das soluções refere-se à capacidade das soluções de amostra e padrão manterem inalteradas suas características e propriedades físico-químicas, quando submetidas a condições de armazenamento específicas.

Adequabilidade do sistema

O teste de adequabilidade do sistema (SST, "System Suitability Test") é parte integrante de um procedimento analítico cromatográfico (ICH Q2-R1, 2005). O SST deve ser realizado antes de iniciar a análise e durante a análise, para assegurar que o sistema está funcionando conforme necessário para o teste específico. Os critérios de adequabilidade do sistema identificam critérios cromatográficos importantes que, quando alcançados, demonstram que o sistema funciona de acordo com as

características estabelecidas durante a validação do método (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

Os parâmetros que demonstram a adequabilidade de um sistema cromatográfico incluem: fator de cauda (“tailing factor”); RSD entre as injeções das soluções padrão; tempo de retenção; fator de capacidade (k'); número de pratos teóricos (N); fator de resolução (R_s) e cálculo do fator de resposta médio para duas soluções de padrão (cálculo do valor-Q).

A metodologia analítica será considerada validada se forem atendidos os critérios de aceitação para os resultados obtidos nos teste de especificidade, linearidade, limite de detecção e quantificação, exatidão, precisão (repetibilidade do sistema, repetibilidade do método, precisão intermediária, reprodutibilidade), intervalo, robustez (estabilidade das soluções de padrão e amostra) e adequabilidade do sistema.

A documentação referente aos testes realizados, incluindo, protocolo, “log book” de análise, resultados analíticos e relatório final, deve estar disponível para que a validação do método seja considerada concluída satisfatoriamente.

2.5 QUIMIOMETRIA

A quimiometria é o emprego de técnicas estatísticas, matemáticas e gráficas para resolver problemas químicos. A estatística não faz milagres e não pode substituir o conhecimento técnico especializado. O que leva um pesquisador a fazer experimentos é o desejo de encontrar a solução de determinados problemas. Quando um profissional junta conhecimentos de planejamento de experimentos e de análise de dados a uma sólida formação técnica em sua área de atuação, obtém como produto um trabalho de qualidade inquestionável (BRUNS; SCARMINIO; BARROS NETO, 2003).

O ponto de partida para entender e obter resultados satisfatórios com a quimiometria é definir e esclarecer a nomenclatura empregada. Uma propriedade de interesse, por exemplo, rendimento, porcentagem de recuperação, teor, é chamada de resposta. Variáveis como temperatura, concentração, fluxo e tempo são denominadas fatores. A função que descreve a influência de um (ou vários) fator sobre uma resposta é chamada de superfície de resposta.

Ao falar de erros deve-se ter o cuidado de classificá-los adequadamente em sistemáticos ou aleatórios para avaliar e identificar a influência que estes acarretam ao objeto de estudo.

Erros sistemáticos são aqueles que afetam o resultado sempre na mesma direção, para mais ou para menos. São exemplos de erros sistemáticos: padrão primário adulterado, balança não calibrada, pipeta aferida erroneamente, acerto de menisco de modo inadequado.

Erros aleatórios são frutos de variações que não podem ser controladas. Parecem ser ao acaso, tais como a gotícula residual de uma pipeta, a tonalidade diferente do ponto de viragem de titulações volumétricas, entre outros. A hipótese mais comum de erros aleatórios está relacionada à distribuição Gaussiana ou Normal.

Na abordagem estatística, o termo população refere-se ao conjunto de todos os valores possíveis numa dada situação; é qualquer coleção de indivíduos ou valores, finita ou infinita. Ao coletar e analisar os dados o objetivo é chegar a conclusões sobre a população.

Uma parte da população normalmente selecionada com o objetivo de se fazer inferências sobre a população é denominada amostra. Uma amostra representativa apresenta as características relevantes da população na mesma proporção em que elas ocorrem na própria população. Uma amostra aleatória é aquela em que os N valores ou indivíduos são obtidos de tal forma que todos os possíveis conjuntos de N valores na população têm a mesma chance de serem escolhidos. O número de graus de liberdade (G) é definido como N menos o número de restrições ($G = N - p$).

Os valores de média, variância e desvio padrão amostral são representados por letras latinas como $\bar{x}$, s^2 e s , respectivamente. Para representar os valores populacionais são empregadas letras gregas como as correspondentes μ , σ^2 e σ .

Ao se analisar uma população, o objetivo é atribuir um modelo que represente a população de modo satisfatório. Para isto, primeiro deve-se postular um modelo e a seguir verificar se a representação é satisfatória. Em caso positivo, segue-se com as conclusões apropriadas. Caso contrário, deve-se trocar o modelo até encontrar-se um que represente a população de modo apropriado para viabilizar conclusões e futuras tomadas de decisão.

Uma distribuição estatística é uma função que descreve o comportamento de uma variável aleatória. A Distribuição Gaussiana é um dos modelos mais importantes da estatística. Foi proposta por Karl F. Gauss, no início do século XIX, para calcular a ocorrência de erros em medições. Com o passar dos tempos, esta distribuição passou a ser considerada Normal.

Na curva Gaussiana, a maior parte da área da curva está contida no intervalo definido por um desvio padrão em torno da média e, praticamente, toda ela está situada entre $\mu - 3\sigma$ e $\mu + 3\sigma$.

Segundo Bruns, Scarminio e Barros Neto (2003), um dos conceitos mais importantes em estatística é o Teorema do Limite Central: “Se a flutuação total numa certa variável aleatória for o resultado da soma das flutuações de muitas variáveis independentes e de importância mais ou menos igual, a sua distribuição tenderá para a normalidade, não importa qual seja a natureza das distribuições das variáveis individuais.” O erro final se distinguirá de forma aproximadamente normal, e tanto mais normal quanto mais numerosas forem as fontes de erros individuais.

Caso a distribuição populacional de uma variável aleatória seja Normal, o intervalo $[\mu - 1,96\sigma; \mu + 1,96\sigma]$ deve conter 95% de todas as possíveis observações. Nenhum dos valores do intervalo é mais provável que os demais.

Para uma dada população cujo objeto de estudo sejam as variáveis x e y , o termo covariância é a tendência destas variáveis se desviarem de forma parecida em relação às respectivas médias (co-variante = variar junto). A covariância $\text{cov}(x, x)$ é a própria variância de x . O coeficiente de correlação (r) é a covariância normalizada e está no intervalo $[-1, +1]$. É uma medida da associação linear entre duas variáveis. Variáveis estatisticamente independentes têm coeficiente de correlação igual a zero.

Considerando amostras de N elementos extraídos aleatoriamente de uma população normal de média μ e variância σ^2 , pode-se demonstrar que os valores amostrais $\bar{x}$, e s^2 obedecem o seguinte:

- A média amostral $\bar{x}$, também segue distribuição Normal, mas com variância igual a σ^2/N .
- A variável aleatória t , definida conforme equação 1, segue a distribuição t , com $N-1$ graus de liberdade.

$$t = \frac{\bar{x} - \mu}{s/\sqrt{N}} \quad (\text{Equação 1})$$

- A partir dessas conclusões, é possível obter os intervalos de confiança.

“Em 1908 W. S. Gosset, um químico que usava o pseudônimo Student publicou a dedução da curva representando a distribuição de frequência de uma grandeza z , obtida dividindo-se a distância entre a média amostral e a média populacional pelo desvio padrão amostral” (BRUNS; SCARMINIO; BARROS NETO, 2003).

A variável aleatória $\frac{\bar{x} - \mu}{s/\sqrt{N}}$ é representada por t_{N-1} e é chamada de distribuição t ou distribuição de Student. $N-1$ é o grau de liberdade e refere-se à obtenção do desvio padrão. A distribuição t é simétrica, porém, mais espalhada em relação à distribuição normal.

Com a distribuição t , pode-se calcular um intervalo de confiança usando apenas os valores amostrais. Para a média populacional o intervalo de confiança a partir da distribuição Student é:

$$\bar{x} - t_{N-1} \frac{s}{\sqrt{N}} < \mu < \bar{x} + t_{N-1} \frac{s}{\sqrt{N}} \quad (\text{Equação 2})$$

Na prática a distribuição t somente é usada quando o número de graus de liberdade na estimativa do desvio padrão é inferior a 30. Para amostras maiores, o cálculo do intervalo de confiança para a média populacional, a partir da distribuição normal é considerado satisfatório.

Comparar as variâncias de duas populações é importante para se avaliar a qualidade do ajuste de diversos modelos estatísticos. A distribuição estatística apropriada é descendente da distribuição Normal e é chamada distribuição F , representada pela equação 3.

$$\frac{s_1^2}{s_2^2} \approx \frac{\sigma_1^2}{\sigma_2^2} F_{v_1 v_2} \quad (\text{Equação 3})$$

A distribuição F é empregada para testar hipóteses sobre a relação entre variâncias populacionais, em particular, para testar a possibilidade de que elas sejam idênticas, isto é, $(\sigma_1^2/\sigma_2^2) = 1$.

Em análises químicas é freqüente a comparação de resultados, por exemplo, médias obtidas através de metodologias diferentes ou comparação com valor padronizado. Para isto são empregados testes de hipóteses, recorrendo à distribuição t . Os métodos gerais para múltiplas comparações estão contidos na categoria geral da análise de variância, conhecida pelo acrônimo ANOVA (“Analysis of Variance”).

A ANOVA é empregada para testar se existe diferença nas médias de mais de duas populações (SKOOG et al., 2006). Após a aplicação da ANOVA, pode-se usar procedimentos de comparação múltipla para identificar quais médias específicas diferem entre si. Na ANOVA, a variância entre grupos é comparada com a variância intragrupo, através do teste F . Na prática, quando a variância entre grupos não for maior que quatro vezes a variância intragrupos, indica que não há diferença estatisticamente significativa entre as médias, com 95% de confiança.

Box, Hunter e Hunter (1978) descrevem de modo bastante detalhado como construir as tabelas de ANOVA. Quando são muitas as respostas e os seus fatores geradores, os métodos de planejamento experimental são adotados em substituição à ANOVA, pois permitem estudar o maior número de variáveis com o menor número de experimentos.

O “Planejamento de Experimentos”, também chamado de DOE, “Design of Experiments”, é uma importante ferramenta estatística a ser aplicada previamente aos experimentos para que o posterior tratamento de dados assegure a confiabilidade dos resultados e qualidade da pesquisa (BRUNS; SCARMINIO; BARROS NETO, 2003).

O emprego de DOE, através de planejamento fatorial é bastante empregado durante o desenvolvimento de metodologias analíticas por CLAE para melhor conhecer o mecanismo de separação dos analitos (ARVIDSON; JANSSON; SCHILL, 1990; BRETON et al., 2005; FERREIRA et al., 2007; VANDER HEYDEN; KHOTS; MASSART, 1993). Durante a validação do método, o DOE é adotado para demonstrar a robustez do método e fornecer os parâmetros necessários para o teste de adequabilidade do sistema (GOUPY, 2005; MAPIHAN; VIAL; JARDY, 2004; MARINI et al., 2005; SRINUBABU et al., 2007; VANDER HEYDEN et al., 1999).

Neste trabalho foi empregado DOE durante os testes de desenvolvimento do método utilizando a coluna Chiral AGP®, através de planejamento fatorial completo para o estudo do efeito de quatro fatores, em dois níveis (Tabela 6), sobre a retenção e a seletividade dos enantiômeros a atropina (Quadros 1 e 2). Na validação do método foi adotado planejamento fatorial fracionário saturado, para estudar o efeito de sete fatores, em dois níveis (Tabela 7), sobre a retenção, a concentração, a resolução e a seletividade e dos enantiômeros da atropina (Tabela 21).

Para construir as tabelas de planejamento fatorial (ex.: Tabelas 6) são atribuídos níveis “-” e “+”, na chamada ordem padrão, quando todas as colunas começam com o nível “-” e depois os sinais vão se alternando, de acordo com a disposição da coluna: 1ª (um-a-um); 2ª (dois-a-dois); 3ª (três-a-três), etc. Um planejamento completo com k fatores em dois níveis, resulta em 2^k ensaios e a última coluna teria 2^{k-1} sinais negativos e depois 2^{k-1} sinais positivos (BRUNS; SCARMINIO; BARROS NETO, 2003).

O efeito de cada fator X é calculado usando a equação:

$$E_x = \frac{\sum Y(+1)}{n_i} - \frac{\sum Y(-1)}{n_i} \quad (\text{Equação 4})$$

Onde $\sum Y(+1)$ e $\sum Y(-1)$ são as somas das respostas quanto o fator X está no nível +1 e -1, respectivamente, e n_i o número de ensaios realizados no correspondente nível do fator (MARINI et al., 2005). A significância dos efeitos pode ser determinada estatística e/ou graficamente.

No desenvolvimento do método com a coluna Chiral AGP® foram realizados 16 ensaios ($2^4 = 16$). A significância do efeito dos fatores foi determinada através do modo estatístico (erro padrão de um efeito) e do modo gráfico (gráfico normal).

Para estudos otimização e robustez, comumente, mais de meia dúzia de fatores precisam ser avaliados. Por exemplo, se houver sete fatores, devem ser realizados 128 ensaios (2^7). Esta quantidade de ensaios é, geralmente, impraticável por questões técnicas (ex.: saturação de coluna analítica) e econômicas (ex.: elevado gasto de reagentes, tempo). A fim de viabilizar os estudos, emprega-se o planejamento fatorial fracionário, principalmente o saturado e o de Plackett-Burman (DEJAEGER et al., 2007; GOUPY, 2005).

O planejamento fatorial saturado mostrado na Tabela 7 foi construído a partir de um planejamento fatorial completo para as três primeiras variáveis, atribuídas aos principais fatores, com base em testes prévios. Para definir os níveis das quatro variáveis restantes, foram adotadas relações geradoras (Equivalências: $D=AB$; $E=AC$; $F=BC$; $G=ABC$), que consideram os níveis previamente estabelecidos para os fatores principais. Por exemplo, como $D = A.B$, para o 1º ensaio, isto significa que, $D = -1.-1 = +1$, então, D será avaliado no nível positivo (BRUNS; SCARMINIO; BARROS NETO, 2003).

Para o teste de robustez, a significância do efeito de cada fator foi avaliada estatisticamente, através da comparação com um valor de efeito crítico ($E_{critico}$), derivado do teste t .

$$E_{critico} = t_{critico} \times (S.E.)_{est} \quad (Equação 4)$$

Onde, $t_{critico}$ é o valor tabelado na *Distribuição de Student*, para apropriado grau de liberdade e nível de confiança. $(S.E.)_{est}$ é o erro padrão estimado de um efeito, que é a raiz quadrada da variância de um efeito. Esta é derivada da variância média calculada para as respostas obtidas em replicada, para cada um dos ensaios. Um efeito é considerado significativo se o seu valor absoluto é maior que o efeito crítico ($E_{critico}$).

Após planejar bem os experimentos, obter dados confiáveis e estatisticamente tratáveis é possível mapear o fenômeno em estudo através do conhecimento da superfície de resposta. Esta é a base para a otimização e para assegurar a robustez de métodos, necessárias tanto na pesquisa quanto na indústria, tendo como resultados, maior rapidez no resultado, maior confiabilidade e menor custo.

3 JUSTIFICATIVA

Devido ao aumento do número de substâncias quirais em uso na terapêutica e à constatação de comportamentos biológicos diferentes dos enantiômeros, métodos analíticos mais específicos e sensíveis são necessários para determinar, separar e quantificar os isômeros ópticos.

O aumento do rigor de agências regulatórias é uma tendência no mundo. Há guias de agências, incluindo FDA (1992), Japan Health Ministry and Brazilian Health Minister, contendo tópicos relacionados à quiralidade. O FDA, por exemplo, recomenda a produção de fármacos quirais como enantiômeros puros. Não sendo isto possível, é requerido que os enantiômeros presentes em formulação farmacêutica sejam conhecidos, separados e quantificados individualmente, a fim de garantir a segurança do produto.

A atropina é um racemato empregado na terapêutica na forma farmacêutica de comprimidos, solução injetável e solução oftálmica. O enantiômero l-hiosciamina está presente como substância ativa e a forma d-hiosciamina como contaminante, sendo impureza de processo de extração e/ou síntese.

Em compêndios de referência como a Farmacopéia Americana (2007) e a Farmacopéia Européia (2004) não são reportadas metodologias analíticas que sejam específicas para a separação dos enantiômeros da atropina.

A falta de métodos analíticos validados para a separação e quantificação dos enantiômeros da atropina, l-hiosciamina e d-hiosciamina, em produtos farmacêuticos é a principal justificativa para a realização deste trabalho.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Reagentes e solventes

Grau analítico: acetato de amônio, J. T. Baker[®]; ácido bórico, J. T. Baker[®]; ácido ortofosfórico 85%, Merck[®]; citrato de sódio diidratado, J. T. Baker[®]; cloreto de benzalcônio, Fluka[®]; dietilamina (DEA), Aldrich[®] e Synth[®]; edetato dissódico, Synth[®]; fosfato de sódio dibásico anidro, Na₂HPO₄ (DSHP), J. T. Baker[®]; fosfato de sódio monobásico monoidratado, NaH₂PO₄.H₂O (SDHP), J. T. Baker[®]; hidróxido de amônio, Merck[®]; 1-octanosulfonato de sódio (OSS), J. T. Baker[®]; trietilamina (TEA), Aldrich[®] e Merck[®]; tween 80, Vetec[®].

Grau cromatográfico: acetonitrila (ACN), J. T. Baker[®]; ácido acético glacial, J. T. Baker[®] e Merck[®]; água ultra pura, Millipore[®]; etanol absoluto (EtOH), J. T. Baker[®] e Merck[®]; hexano 95% (Hex), J. T. Baker[®] e Merck[®]; isopropanol (IPA), J. T. Baker[®]; metanol (MeOH), J. T. Baker[®] e Merck[®].

Substâncias químicas de referência

Os fármacos empregados como substâncias químicas de referência foram gentilmente cedidos por laboratório farmacêutico, com a devida identificação de pureza e foram utilizados sem ulterior purificação.

Bromidrato de homatropina, USP[®] (Teor: 100%); noratropina, Ph Eur[®] (Teor: 100%); sulfato de atropina, Degussa-Huss Ltda.[®] (Teor: 97,1% e 96,3%); sulfato de atropina, Sigma[®] (Teor: 97%); sulfato de hiosciamina, Degussa-Huss Ltda.[®] (Teor: 97,5% e 97,3%); sulfato de hiosciamina, USP[®] (Teor: 100%).

Amostras

Produto farmacêutico comercial à base de atropina, na apresentação de solução oftálmica estéril de 0,5% e 1%.

Amostras manipuladas das soluções oftálmicas de 0,5% e 1% de sulfato de atropina.

Vidraria

Materiais de laboratório necessários para as análises, para finalidade volumétrica e graduada: Balões volumétricos de 5 mL, 10 mL, 15 mL, 20 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL, 150 mL, 200 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL e 2000 mL; pipetas volumétricas de 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL, 7 mL, 8 mL, 9 mL, 10 mL, 13 mL, 15 mL, 20 mL, 25 mL, 30 mL, 50 mL e 100 mL; pipetas graduadas de 1 mL, 2 mL, 3 mL, 5 mL e 10 mL; Provetas de 10 mL, 50 mL, 100 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL e 2000 mL; béqueres de 50 mL, 100 mL, 250 mL, 600 mL, 1000 mL, 2000 mL e 4000 mL e tubos de ensaio de 30 mL.

Equipamentos

- Aparelho de ultra-som, Thorton T-14 e Branson 2210.
- Balança analítica com precisão de quatro casas, Mettler Toledo AB204.
- Balança analítica com precisão de cinco casas, Sartorius Genius.
- pHmetro Methohm.
- Sistema cromatográfico 1: HPLC 10 vp Shimadzu: degaseificador DGU-14A; bomba binária LC-10ADvp; injetor automático com *loop* de 50µL SIL-10ADvp; compartimento de coluna CTO-10ACvp; detector de arranjo de diodos UV-Vis SPD-M10Avp; controlador do sistema SCL-10Avp; *software* LC Workstation Class-VP 5.1.2; computador com Windows Millennium.
- Sistema cromatográfico 2: HPLC 1100 Agilent: degaseificador G1322A; bomba quaternária G1311A; injetor automático com *loop* de 900µL G1313A; compartimento de coluna G1316A; detector de arranjo de diodos G1315A; *software* ChemStation V.A.09.01; computador HP Compaq: X86 Family 15 Model 4 Stepping 1; Windows XP.
- Sistema cromatográfico 3: HPLC 1100 Agilent: degaseificador G1322A; bomba quaternária G1311A; injetor automático com *loop* de 900µL G1313A; compartimento de coluna G1316A; detector de comprimentos de onda múltiplos G1365B; *software* ChemStation V.A.09.03; computador HP Compaq: X86 Family 15 Model 4 Stepping 1; Windows XP.
- Sistema cromatográfico 4: HPLC 1100 Agilent: degaseificador G1322A; bomba quaternária G1311A; injetor automático com *loop* de 900µL G1313A; termostatizador de injetor automático G1330B; compartimento de coluna G1316A; detector de arranjo de diodos G1315A; *software*

ChemStation V.A.10.02; computador HP Compaq: X86 Family 15 Model 4 Stepping 1; Windows XP.

- Sistema cromatográfico 5: HPLC 1200 Agilent: Degaseificador G1322A; Bomba quaternária G1311A; Injetor automático com *loop* de 900µL G1329A; Termostatizador de injetor automático G1330B; Compartimento de coluna G1316A; Detector de arranjo de diodos G1315B. *Software* ChemStation V. B.02.01; computador HP Compaq: X86 Family 15 Model 4 Stepping 1; Windows XP.
- Filtros: membrana filtrante HA em ésteres de celulose 0,45 µm, 47mm, Millipore; unidade filtrante descartável Millex HV 0,45 µm PVDF 25mm; Millipore.
- Colunas cromatográficas:

Fase estacionária quiral 1: Chiral-AGP® 100 x 4,0 mm (α -1-ácido glicoproteína), 5µm, ChromTech.

Fase estacionária quiral 2: Chiralcel-OD® 250 x 4,6 mm (carbamato de celulose tris-3,5-dimetilfenil), 10µm, Daicel.

Fase estacionária quiral 3: ULTRON ES-OVM 150 x 4 mm, (Proteína ovomucóide), 5µm, Agilent.
- “SOFTWARES”

Sistemas de aquisição e processamento de dados cromatográficos: Class-VP (Shimadzu), versão 5.1.2. ChemStation, versões A.09.01, A.09.03, A.10.01 e versão B.02.01.

Sistema para tratamento de dados, utilizando o programa Excel e o “software” Statgraphics®.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Análise enantiosseletiva com a coluna Chiralcel OD®

4.2.1.1 Desenvolvimento

Durante o desenvolvimento analítico para separação da atropina foram avaliados 35 métodos, distintos quanto aos tipos de solventes e proporções na fase móvel e quanto às condições cromatográficas, conforme relacionado na Tabela 4. As soluções teste foram diluídas na fase móvel correspondente ao método. As fases móveis foram preparadas através de mistura manual com posterior filtração por membrana de 0,45µm.

Tabela 4 - Métodos avaliados com a coluna Chiralcel OD®

Método	Proporção dos componentes da fase móvel (%)							φ	T	Vol.	Conc.
Nº	Hex	MeOH	IPA	EtOH	DEA	TEA	AA	(mL/min)	(°C)	(µL)	(µg/mL)
1	98			2				1,0	24,0	20	100
2	90			10				1,0	24,0	20	100
3	80			20				1,0	24,0	20	100
4	80	10	10					1,0	24,0	20	100
5	90	5	5					1,0	24,0	20	100
6	95	2,5	2,5					1,0	24,0	20	100
7	85	10	5					1,0	24,0	20	100
8	85	5	10					1,0	24,0	20	100
9	90	3,3	6,7					1,0	24,0	20	100

continua

continuação

Método		Proporção dos componentes da fase móvel (%)						ϕ	T	Vol.	Conc.
Nº	Hex	MeOH	IPA	EtOH	DEA	TEA	AA	(mL/min)	(°C)	(μ L)	(μ g/mL)
10	80	10	10			0,0250		1,0	24,0	20	120
11	80	10	10			0,0250		1,0	24,0	10	1200
12	80	10	10			0,0250		1,1	24,0	5	5000
13	85	10	5			0,0125		1,0	24,0	10	5000
14	80	10	10			0,25		1,0	24,0	10	5000
15	80	10	10		0,5			1,0	24,0	10	5000
16	85	5	10		0,5			1,0	24,0	10	5000
17	80	10	10		0,25			1,0	24,0	10	5000
18	80	10	10		0,125			1,0	24,0	10	5000
19	80	0	10	10	0,125			1,0	24,0	10	5000
20	80	0	5	15	0,125			1,0	24,0	10	5000
21	80	0	0	20	0,125			1,0	24,0	10	5000
22	80	15	5		0,0625			1,0	24,0	10	5000
23	80	5	15		0,1825			1,0	24,0	10	5000
24	80	15	5		0,1825			1,0	24,0	10	5000
25	80	5	15		0,0625			1,0	24,0	10	5000
26	80	15	5		0,0625			1,0	24,0	20	50
27	80	15	5		0,0625		0,0625	1,0	24,0	20	50
28	80	15	5		0,0625		0,0125	1,0	24,0	20	50
29	80	15	5		0,0625		0,0125	1,1	24,0	20	50
30	80	15	5		0,1		0,02	1,1	24,0	20	50
31	80	15	5		0,1		0,02	1,1	18,0	20	50
32	75	15	10		0,1		0,02	1,1	18,0	20	50
33	75	15	10		0,1		0,02	1,1	24,0	20	50
34	75	15	10		0,1		0,02	1,1	28,0	20	50
35	70	15	15		0,1		0,02	1,0	24,0	20	50

Notas: Hex: hexano; MeOH: metanol; IPA: isopropanol; EtOH: etanol; DEA: dietilamina; TEA: trietilamina; AA: ácido acético; ϕ : vazão da fase móvel; T: temperatura da coluna; Vol.: volume de injeção; Conc.: concentração injetada.

Dentre os métodos avaliados, mostrou-se promissor o método nº 33, para o qual foram feitos testes preliminares de validação. A linearidade e a repetibilidade do sistema foram os parâmetros avaliados para a determinação quantitativa dos enantiômeros em mistura racêmica e em solução contendo 90% de l-hiosciamina e 10% de d-hiosciamina.

4.2.1.2 Validação: Testes preliminares

Os testes da validação do método foram realizados no sistema cromatográfico 4 (HPLC 1100 Agilent). As condições cromatográficas foram: coluna analítica: Chiralcel OD® 250 X 4,6 mm, 10 µm, Daicel; temperatura: 24 °C; vazão: 1,1 mL/min; volume de injeção: 20 µL; pressão de cerca de 34 bar; detector DAD UV-VIS, 214 nm, “bandwidth” 4nm, referência 320 nm “bandwidth” 50 nm; Fase móvel preparada por mistura manual, composta por: hexano + metanol + isopropanol + dietilamina + ácido acético, na proporção de 75+15+10+0,1+0,02 v+v%, respectivamente. A concentração nominal para o total de enantiômeros foi de 50,0 µg/mL. As soluções injetadas foram diluídas com a fase móvel.

Para avaliar a linearidade, foi preparada uma solução estoque de concentração de 250% em relação à concentração nominal para o total de enantiômeros. Para avaliar a mistura racêmica, a solução estoque 250% foi preparada a partir de sulfato de atropina. Para avaliar a mistura de 90% de l-hiosciamina e 10% de d-hiosciamina, a solução estoque 250% foi preparada a partir de quantidades proporcionais de sulfato de hiosciamina e sulfato de atropina.

Diretamente a partir da solução estoque, foram preparadas duas replicatas de diluição, de modo a obter soluções de 25%, 50%, 75%, 100%, 125% e 150% em relação à concentração nominal total de enantiômeros de 50,0 µg/mL.

Para cada série de diluição, foram injetadas as soluções dos níveis de 25% a 150%, em duplicata, na seqüência crescente e decrescente de concentração. Para a avaliação dos resultados, foi calculada a resposta média das injeções para cada nível de concentração, com base na altura e na área do pico dos enantiômeros l-hiosciamina e d-hiosciamina, obtida no comprimento de onda de 214 nm.

Foi feita a avaliação estatística dos dados mostrando: a equação da reta, a ordem da função, a inclinação da linha de regressão, o intercepto com o eixo y, a significância estatística do intercepto, o teste de *lack of fit*, a resposta relativa ao nível nominal 100%, a avaliação dos resíduos e o coeficiente de correlação da regressão linear.

A repetibilidade do sistema foi determinada injetando seqüencialmente seis vezes as soluções referentes aos níveis de concentração 50%, 100% e 150% da replicata um do teste de linearidade.

Para cada nível de concentração, foi calculada a resposta média das injeções com base na altura e na área do pico dos enantiômeros l-hiosciamina e d-hiosciamina, obtida no comprimento de onda de 214 nm e foi calculado o correspondente RSD.

Para comparar a repetibilidade do sistema entre os níveis avaliados, foi calculada a resposta relativa (resposta de altura ou área dividida pelo nível de concentração), determinada a resposta relativa média entre os níveis ($n = 18$) e o correspondente RSD geral.

Para determinar se há diferença estatisticamente significativa entre os resultados de repetibilidade do sistema obtidos para os diferentes níveis de concentração avaliados, foi feita avaliação estatística dos dados através da análise de variância (ANOVA).

4.2.2 Análise enantiosseletiva com a coluna Chiral-AGP®

4.2.2.1 Desenvolvimento

Durante o desenvolvimento analítico para separação da atropina foram avaliados 50 métodos, distintos quanto aos tipos de solventes e proporções na fase móvel e quanto às condições cromatográficas, conforme relacionado na Tabela 5. As soluções teste foram diluídas na fase móvel correspondente ao método. As fases móveis foram preparadas através de mistura manual com posterior filtração por membrana hidrofílica de 0,45 µm.

Tabela 5 - Métodos avaliados com a coluna Chiral AGP®

Nº	Tampão	Fase aquosa				F. O (%)		φ (mL/min)	T (°C)
		µTp (mM)	OSS (mM)	TEA (mM)	pH	%	ACN		
1	Fosfato de Sódio	20			6,00	95		5	24,0
2	Fosfato de Sódio	20			6,00	98		2	24,0
3	Fosfato de Sódio	50			6,00	100			24,0
4	Fosfato de Sódio	20	1		6,82	98	2		22,0
5	Fosfato de Sódio	20	1		6,83	95		5	22,0
6	Fosfato de Sódio	20	1		6,82	95	5		22,0
7	Fosfato de Sódio	20	4		6,79	98	2		22,0

continua

continuação

Nº	Fase aquosa						F. O (%)		ϕ (mL/min)	T (°C)
	Tampão	μ Tp (mM)	OSS (mM)	TEA (mM)	pH	%	ACN	IPA		
8	Fosfato de Sódio	20	4		5,74	98	2		0,4	22,0
9	Fosfato de Sódio	20	4		6,82	95		5	0,4	22,0
10	Fosfato de Sódio	20	1		5,78	95	5		0,4	22,0
11	Fosfato de Sódio	20	1		6,84	98		2	0,4	22,0
12	Fosfato de Sódio	20	4		5,84	95	5		0,4	22,0
13	Fosfato de Sódio	20	4		5,82	98		2	0,4	22,0
14	Fosfato de Sódio	20	4		6,81	95	5		0,4	22,0
15	Fosfato de Sódio	20	4		5,77	95		5	0,4	22,0
16	Fosfato de Sódio	20	4		6,83	98		2	0,4	24,0
17	Fosfato de Sódio	20	1		5,83	98		2	0,4	22,0
18	Fosfato de Sódio	20	1		5,83	95		5	0,4	22,0
19	Fosfato de Sódio	20	1		5,83	98	2		0,4	22,0
20	Fosfato de Sódio	20	1		6,53	99	1		0,4	22,0
21	Fosfato de Sódio	20	1		6,89	100			0,4	22,0
22	Fosfato de Sódio	20	1		6,89	99	1		0,4	22,0
23	Acetato de amônio	10	1		6,15	97	3		0,4	20,0
24	Acetato de amônio	10	1		6,15	100			0,4	20,0
25	Acetato de amônio	10	1		6,39	100			0,4	20,0
26	Acetato de amônio	10	1		6,39	100			0,6	20,0
27	Acetato de amônio	10	1		6,96	100			0,4	20,0
28	Fosfato de Sódio	20	1	1	6,90	100			0,4	20,0
29	Fosfato de Sódio	20	1	2	6,82	100			0,4	20,0
30	Fosfato de Sódio	20	1	4	7,02	100			0,4	20,0
31	Fosfato de Sódio	20	1	8	7,00	100			0,4	20,0
32	Fosfato de Sódio	20	1	15	7,02	100			0,4	20,0
33	Fosfato de Sódio	20	1	4	7,02	99	1		0,4	20,0
34	Fosfato de Sódio	20	1	8	7,01	99	1		0,4	20,0
35	Fosfato de Sódio	20	1	20	7,01	100			0,4	20,0
36	Fosfato de Sódio	20	1	20	7,01	100			0,350	20,0
37	Fosfato de Sódio	20	1	29	7,01	100			0,4	20,0
38	Fosfato de Sódio	20	1	29	7,00	100			0,350	20,0
39	Fosfato de Sódio	20	1	7,5	7,00	100			0,530	20,0
40	Fosfato de Sódio	20	1	7,5	7,00	98	2		0,280	20,0
41	Fosfato de Sódio	20	1	7,5	7,00	98	2		0,330	20,0
42	Fosfato de Sódio	40	1	7,5	7,00	100			0,400	20,0
43	Fosfato de Sódio	40	1	7,5	7,00	100			0,5	20,0
44	Fosfato de Sódio	40	1	7,5	7,00	100			0,5	20,0
45	Fosfato de Sódio	40	1	7,5	7,00	99	1		0,6	20,0
46	Fosfato de Sódio	40	1	7,5	7,00	97	3		0,5	20,0
47	Fosfato de Sódio	40	1	7,5	7,00	97	3		0,6	20,0
48	Fosfato de Sódio	40	10	7,5	7,00	99	1		0,6	20,0
49	Fosfato de Sódio	40	10	7,5	7,00	99	1		0,6	15,0
50	Fosfato de Sódio	20	10	7,5	7,00	99	1		0,6	20,0

Nota: μ Tp: força do tampão; OSS: 1-octanosulfonato de sódio; TEA: trietilamina; F.O.: fase orgânica; ACN: acetonitrila; IPA: isopropanol; ϕ : vazão da fase móvel; T: temperatura da coluna; Volume de injeção de 10 μ L para métodos nº 1, 2 e 3 e de 20 μ L para demais métodos. Concentração da amostra de 25 μ g/mL para métodos nº 1, 2 e 3 e de 50 μ g/mL para os demais.

Os métodos do nº 4 até o nº 36 são resultantes de planejamento fatorial completo, com quatro fatores em dois níveis. A identificação dos fatores e o plano experimental para o planejamento fatorial estão apresentados na Tabela 6. Os ensaios foram realizados em ordem aleatória, definida através de sorteio.

Tabela 6 - Dados do planejamento fatorial empregando a coluna Chiral AGP®

Ensaio	Fator			
	MO A	[MO] B	pH C	[OSS] D
1	-	-	-	-
2	+	-	-	-
3	-	+	-	-
4	+	+	-	-
5	-	-	+	-
6	+	-	+	-
7	-	+	+	-
8	+	+	+	-
9	-	-	-	+
10	+	-	-	+
11	-	+	-	+
12	+	+	-	+
13	-	-	+	+
14	+	-	+	+
15	-	+	+	+
16	+	+	+	+

Nota:

Fator		Nível	
		(-)	(+)
A	Modificador orgânico (MO)	Acetonitrila	Isopropanol
B	Proporção do MO (%) na fase móvel [MO]	2	5
C	pH do tampão fosfato de sódio 20 mM (pH)	5,8	6,8
D	mM de 1-octanosulfonato de sódio [OSS]	1	4

Para cada método do planejamento fatorial foram feitas injeções do solvente da amostra (água), da fase móvel em estudo e das soluções de sulfato de atropina e sulfato de hiosciamina, na concentração de 50,0 µg/mL.

As respostas obtidas no planejamento foram tabeladas e foi feita avaliação estatística para determinar a significância dos fatores estudados sobre a separação e retenção dos enantiômeros da atropina.

Com os resultados obtidos no planejamento fatorial, foram fixados os fatores de concentração do pareador iônico ácido octanosulfônico em 1 mM e o uso de acetonitrila como modificador orgânico.

Foram realizados testes adicionais com variação do pH, alteração do uso de tampão fosfato para tampão acetato e adição de trietilamina na fase móvel. Nos experimentos finais foi avaliada a retenção e separação usando concentração maior do pareador iônico 1-octanosulfonato de sódio (10 mM).

Por apresentar resultados satisfatórios, foi escolhido o método nº 50 para prosseguir com os ensaios de validação para avaliar a reprodutibilidade e confiabilidade da metodologia analítica na separação e determinação quantitativa dos enantiômeros da atropina.

4.2.2.2 Validação

Os testes da validação do método foram realizados nos sistemas cromatográficos 2, 3 e 5 (HPLC 1100 e HPLC 1200 Agilent).

Condições cromatográficas: Coluna analítica: Chiral-AGP® 100 X 4,0 mm, 5 µm, Chromtech; coluna de guarda: Chiral-AGP® 10 x 4,0 mm, 5 µm, Chromtech; temperatura: 20°C; vazão: 0,6 mL/min; volume de injeção: 20 µL; pressão de cerca de 60 bar; detector UV-VIS do tipo DAD ou MWD, 205 nm “bandwidth” 4 nm, referência de 360 nm “bandwidth” 16 nm.

Solvente de padrão e amostra: Solução tampão fosfato de sódio 20 mM, contendo 10 mM de 1-octanosulfonato de sódio e 7,5 mM de trietilamina, ajustada

para pH 7,0 com ácido fosfórico (solução tampão). Para preparar 1000 mL de solução tampão, 1,4 g de fosfato de sódio monobásico monoidratado, 1,4 g de fosfato de sódio dibásico anidro e 2,2 g de 1-octanosulfonato de sódio foram pesados e transferidos para béquer de 2 L. Foi adicionado 1000,0 mL de água purificada, medido em balão volumétrico, e a solução foi submetida ao banho ultrassom por cerca de 10 minutos para a dissolução dos sais. Sob agitação, foi adicionado 1,0 mL de trietilamina e o pH foi ajustado para 7,0 usando ácido ortofosfórico. A solução tampão final foi filtrada através de membrana de 0.45 µm HV hidrofílica Millipore®.

Fase móvel: Mistura de solução tampão e acetonitrila (99:1 v/v). Para preparar 1000,0 mL de fase móvel, a solução tampão foi transferida para balão volumétrico correspondente e foram retirados 10,0 mL. Foram adicionados 10,0 mL de acetonitrila e a mistura foi homogeneizada.

Em todos os testes de validação foram utilizadas a solução tampão e a fase móvel, preparadas conforme descrito acima. Nos ensaios do planejamento fatorial, as quantidades (pesos e volumes) dos componentes da solução tampão e da fase móvel foram ajustados para obter os níveis estabelecidos para os fatores avaliados, conforme Tabela 7.

Com base nos testes realizados durante a etapa de desenvolvimento do método, a concentração nominal para o total de enantiômeros na solução teste foi ajustada para 20,0 µg/mL. Esta concentração corresponde ao nível 100% da validação do método. Todas as soluções injetadas foram preparadas usando pipetas e balões volumétricos.

Os parâmetros avaliados durante a validação da metodologia analítica foram: especificidade; linearidade; exatidão; precisão, nos níveis de repetibilidade do

sistema; repetibilidade do método e precisão intermediária; intervalo; robustez, incluindo estabilidade das soluções e planejamento fatorial e teste de adequabilidade do sistema (System Suitability Test – SST). Os procedimentos para a realização dos testes de validação estão descritos a seguir.

Especificidade

I) *Aplicação do método na separação dos enantiômeros da atropina.* Foram preparadas soluções estoque 2500% (12,5 mg : 25 mL), contendo sulfato de hiosciamina ou sulfato de atropina. Foi transferido 1,0 mL da solução estoque para balão volumétrico de 25 mL e foram obtidas duplicatas das soluções avaliadas: a) solução de sulfato de hiosciamina 100%; b) solução de sulfato de atropina 100%.

II) *Estudo da interferência de substância relacionada e impureza.* Foram preparadas soluções estoque 2500% de bromidrato de homatropina (5 mg : 10 mL) e da impureza noratropina (2,5 mg : 5 mL). Foi transferido 1,0 mL da solução estoque para balão de 25 mL e foram obtidas as soluções avaliadas: a) solução de bromidrato de homatropina 100%; b) solução da impureza noratropina 100%;

III) *Estudo de soluções contendo mistura de l-hiosciamina e dos potenciais interferentes.* Para um mesmo balão de 25 mL foram transferidos 1,0 mL da solução de sulfato de hiosciamina 2500% e 100 µL (usando micropipeta) da solução estoque 2500% do potencial interferente e foram obtidas as soluções: a) solução de sulfato de hiosciamina 100% + sulfato de atropina 10%; b) solução de sulfato de hiosciamina 100% + bromidrato de homatropina 10%; c) solução de sulfato de hiosciamina 100% + impureza noratropina 10%; d) solução de sulfato de hiosciamina 100% + sulfato de atropina 10% + impureza noratropina 10%; e) solução de sulfato

de hiosciamina 100% + sulfato de atropina 10% + bromidrato de homatropina 10%+ impureza noratropina 10%.

IV) *Estudo do efeito da matriz.* Empregando procedimentos farmacotécnicos foi preparado 25 mL de placebo da amostra comercial de solução oftálmica, contendo: 2% de ácido bórico, 3% de citrato de sódio diidratado, 0,01% de edetato de sódio, 0,33% de polissorbato 80 e 0,01% de cloreto de benzalcônio, diluídos em água ultrapurificada. Foi medido o pH da solução placebo e após a homogeneização, a solução foi filtrada através de membrana de 0,45 µm. Em duplicata, foi transferido 1,0 mL da solução placebo para um balão de 50 mL e diluído para o volume com a solução tampão. Foram transferidos 4,0 mL desta solução para balão de 20 mL para obter a solução teste de placebo.

V) *Aplicação do método na análise de amostra comercial.* A partir de seis frascos de mesmo lote de amostra comercial de sulfato de atropina 1% foi preparada uma mistura de 10 mL de amostra. Em duplicata, foi transferido 1,0 mL desta mistura para balão de 50 mL e diluído para o volume com a solução tampão. Foram transferidos 2,0 mL desta solução para balão de 20 mL para obter a solução teste de amostra.

VI) *Estudo de decomposição por estresse.* Em duplicata, foi submetido ao estresse 1,0 mL do placebo, da amostra, da solução sulfato de hiosciamina 2500% e da solução sulfato de atropina 2500%. As condições avaliadas foram: a) hidrólise básica, 1 mL NaOH 1 mol/L por 3 horas; b) hidrólise ácida, 1 mL HCl 1 mol/L por 3 horas; c) oxidação, H₂O₂ 3% por 3 horas; d) calor, 121 °C por 30 minutos. Durante o período de hidrólise e oxidação, a cada 30 minutos, as soluções foram agitadas durante 1 minuto em aparelho de vórtex. Após o período de hidrólise, as soluções

foram neutralizadas. Após o período de estresse, foi feita a diluição das soluções conforme procedimento citado nos itens I, IV e V.

Para cada solução obtida foram feitas injeções em duplicata e foram avaliados: a) cromatogramas individuais; b) cromatogramas comparativos; c) espectros de absorbância dos picos de interesse; d) pureza de pico dos enantiômeros da atropina; e) tempo de retenção; f) seletividade; g) respostas absolutas e respostas relativas dos compostos de interesse.

Linearidade

Foram preparadas soluções estoque 1250% (12,5 mg : 50 mL), contendo sulfato de hiosciamina ou sulfato de atropina.

Diretamente a partir da solução estoque, foram preparadas duas replicatas de diluição, de modo a obter soluções de 25%, 50%, 75%, 100%, 125% e 150% em relação à concentração nominal total de enantiômeros de 20,0 µg/mL. As pipetas e balões volumétricos utilizados foram, respectivamente: 1:50; 1:25; 3:50; 2:25; 2:20 e 6:50.

Para cada série de diluição, foram injetadas as soluções dos níveis de 25% a 150%, em duplicata, na seqüência crescente e decrescente de concentração. Para a avaliação dos resultados, foi calculada a resposta média das injeções para cada nível de concentração, com base na área do pico dos enantiômeros l-hiosciamina e d-hiosciamina, obtida no comprimento de onda de 205 nm.

Foi feita a avaliação estatística dos dados mostrando: a equação da reta, a ordem da função, a inclinação da linha de regressão, o intercepto com o eixo y, a significância estatística do intercepto, o teste de *lack of fit*, a resposta relativa ao

nível nominal 100%, a avaliação dos resíduos e o coeficiente de correlação da regressão linear.

Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram determinados através do método do sinal/ruído. No cromatograma do branco da análise (solução tampão), foi calculada a distância pico-a-pico do ruído da linha de base, na região do tempo de retenção dos enantiômeros. O ruído do sinal corresponde à metade da distância pico-a-pico. Para determinar o LD e LQ do método foram consideradas as relações sinal/ruído de 5:1 e 10:1, respectivamente. A partir de uma solução de sulfato de atropina 2,5 µg/mL foram preparadas soluções diluídas com concentração correspondente aos valores teóricos de LD (0,06 µg/mL) e LQ (0,12 µg/mL) para cada um dos enantiômeros. Também foram preparadas soluções diluídas correspondente a 0,6 µg/mL e 1,0 µg/mL para estudar a precisão da resposta nestes níveis de concentração dos enantiômeros.

As soluções contendo cada um dos enantiômeros nas concentrações 0,06 µg/mL, 0,12 µg/mL, 0,6 µg/mL e 1,0 µg/mL foram injetadas seqüencialmente seis vezes. Os cromatogramas foram avaliados quanto à presença de pico dos enantiômeros. Foi calculada a resposta média das injeções com base na área do pico dos enantiômeros da atropina, obtida no comprimento de onda de 205 nm e foi calculado o correspondente RSD.

Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através da contaminação do placebo da amostra de solução oftálmica, com quantidades conhecidas de sulfato de atropina. O placebo foi preparado conforme descrição do teste de especificidade (item IV: *Estudo do efeito da matriz*).

Foi preparada uma solução estoque 50.000% (200 mg : 20 mL), contendo sulfato de atropina. Foram transferidos 2,0 mL desta solução para balão volumétrico de 20 mL para se obter uma solução estoque intermediária 5000%. A partir desta solução foram preparadas três replicatas da solução padrão de referência no nível 100%, através da diluição de 1,0 mL em balão volumétrico de 50 mL, usando a solução tampão.

A exatidão foi avaliada para as apresentações da solução oftálmica a 0,5% e 1%, nos níveis 70%, 100% e 130%, em triplicata. Para isto, 1,0 mL do placebo foi transferido para 18 diferentes balões volumétricos de 50 mL.

Para obter os níveis de concentração desejados para avaliar a recuperação para a apresentação da solução oftálmica 0,5%, foram transferidos, em triplicata, 350 µL, 500 µL e 650 µL da solução estoque 50.000% para os balões de 50 mL contendo a solução placebo. O volume foi completado com a solução tampão. Foram transferidos 4,0 mL da solução obtida para balão volumétrico de 20 mL e o volume foi completado com a solução tampão.

Para obter os níveis de concentração desejados para avaliar a recuperação para a apresentação da solução oftálmica 1%, foram transferidos, em triplicata, 700 µL, 1000 µL e 1300 µL da solução estoque 50.000% para os balões de 50 mL contendo a solução placebo. O volume foi completado com a solução tampão.

Foram transferidos 2,0 mL da solução obtida para balão volumétrico de 20 mL e o volume foi completado com a solução tampão.

As soluções padrão e as soluções de recuperação foram injetadas em duplicata.

Para os padrões de referência 100%, para cada enantiômero, foram calculados a resposta média (área) das injeções de cada replicata, a média geral das replicatas e o correspondente RSD geral.

Para as soluções teste de recuperação, para cada enantiômero e para cada nível de recuperação avaliado, foram calculados a resposta média (área) das injeções de cada replicata e a porcentagem de recuperação em relação à média geral da resposta do padrão de referência 100%. A seguir, para cada replicata do nível de recuperação avaliado, foi comparada a porcentagem de recuperação obtida em relação ao padrão de referência 100% com a porcentagem nominal do nível avaliado e o resultado foi expresso como porcentagem de recuperação. A partir dos resultados obtidos, foram calculados a média geral da porcentagem de recuperação para cada nível de concentração avaliado e o correspondente RSD geral.

A média geral da porcentagem de recuperação ($n = 9$), obtida para os níveis de concentração de 70%, 100% e 130% foi calculada.

Foi feita avaliação estatística dos dados através da análise de variância para determinar se há diferença estatisticamente significativa entre os resultados de recuperação dos diferentes níveis de concentração dos enantiômeros.

Precisão

A precisão do método foi avaliada nos níveis de repetibilidade do sistema, repetibilidade do método e precisão intermediária.

Repetibilidade do sistema

Foram preparadas soluções estoque 1250% (12,5 mg : 50 mL), contendo sulfato de hiosciamina ou sulfato de atropina.

Diretamente a partir da solução estoque, foram preparadas soluções de 25%, 50% e 150% em relação à concentração nominal total de enantiômeros de 20,0 µg/mL. As pipetas e balões volumétricos utilizados foram, respectivamente: 1:50; 1:25 e 6:50. A partir da solução 150% foram preparadas soluções de concentração de 70%, 100% e 130%, transferindo respectivamente 7,0 mL, 10,0 mL e 13,0 mL para balão volumétrico de 15 mL.

A repetibilidade do sistema foi determinada injetando seqüencialmente seis vezes as soluções referentes aos níveis de concentração de 25%, 50%, 70%, 100% e 130%. Para cada nível de concentração, foi calculada a resposta média das injeções com base na área do pico dos enantiômeros l-hiosciamina e d-hiosciamina, obtida no comprimento de onda de 205 nm e foi calculado o correspondente RSD.

A repetibilidade do sistema foi expressa pelo RSD obtido para cada nível de concentração avaliado.

Para comparar a repetibilidade do sistema entre os níveis avaliados, foi calculada a resposta relativa (resposta de área dividida pelo nível nominal de

concentração), determinada a resposta relativa média entre os níveis e o correspondente RSD geral.

Repetibilidade do método

A repetibilidade método foi determinada através dos resultados obtidos no teste de exatidão e de precisão intermediária, para as duas apresentações de solução oftálmica.

Foi calculado o RSD correspondente à média geral da porcentagem de recuperação ($n = 9$), obtida para os níveis de concentração de 70%, 100% e 130%. A repetibilidade do método é expressa pelo RSD geral.

Foi calculado o RSD correspondente à média dos resultados obtidos para as seis amostras, analisadas em um dia de teste de precisão intermediária. A repetibilidade do método é expressa pelo RSD de valor mais restritivo dos dias de análise da precisão intermediária.

Precisão intermediária

A precisão intermediária foi determinada através da análise de seis replicatas um mesmo lote de amostra comercial de solução oftálmica de sulfato de atropina 0,5% e a 1%. Os testes foram realizados em três dias, utilizando três sistemas cromatográficos diferentes. As análises de cada dia foram feitas de modo independente, utilizando soluções de padrão, amostra e fase móvel recém-preparadas.

Para cada dia de análise, foram utilizados seis frascos de mesmo lote da amostra comercial para preparar uma mistura de 10 mL de amostra.

Para a análise da solução oftálmica de sulfato de atropina 0,5% foi transferido 1,0 mL da mistura de amostra para balão volumétrico de 50 mL e diluído para o volume com a solução tampão. Foram transferidos 4,0 mL desta solução para balão de 20 mL para obter a solução teste de amostra.

Para a análise da solução oftálmica de sulfato de atropina 1% foi transferido 1,0 mL da mistura de amostra para balão volumétrico de 50 mL e diluído para o volume com a solução tampão. Foram transferidos 2,0 mL desta solução para balão de 20 mL para obter a solução teste de amostra.

O doseamento foi feito com base na padronização externa, usando solução de referência de sulfato de hiosciamina. A solução padrão foi preparada em duplicata, para obter os níveis de concentração de 90% e 110% e determinar o fator de resposta. Foram pesados exatamente cerca de 11,0 mg e 9,0 mg de sulfato de hiosciamina e transferido para balão volumétrico de 50 mL. Foi utilizada a solução tampão para dissolver e diluir para o volume. Foram transferidos 2,0 mL desta solução para balão de 20 mL para obter as soluções de referência. De modo similar, foi preparada uma solução de sulfato de atropina para avaliar a adequabilidade do sistema para a quantificação dos enantiômeros.

Com base na resposta da solução padrão de sulfato de hiosciamina foi calculada a concentração do enantiômero l-hiosciamina na solução oftálmica de sulfato de atropina 0,5% e 1%. A concentração do enantiômero d-hiosciamina foi estimada com base na resposta da solução padrão de sulfato de hiosciamina e a concentração total dos enantiômeros na amostra comercial foi calculada. A quantificação foi feita com base na resposta de área dos picos.

Para cada replicata, foi calculada a concentração do enantiômero no produto e a porcentagem em relação à porcentagem declarada. Foi calculada a média das seis replicatas e o correspondente RSD.

Para determinar a precisão intermediária foi calculada a média geral da concentração dos enantiômeros no produto, obtidas nos três dias de análise ($n = 18$) e o respectivo RSD geral.

Foi feita avaliação estatística dos dados através da análise de variância para determinar se há diferença estatisticamente significativa entre os resultados dos três dias de análise.

Intervalo

O intervalo do método foi determinado através da avaliação dos resultados obtidos nos testes de linearidade, exatidão e precisão.

Robustez

A robustez do método foi avaliada através do estudo da estabilidade das soluções e de planejamento fatorial fracionário, do tipo saturado com resolução três, para variação em dois níveis de sete fatores.

Estabilidade das soluções

Foi avaliada a estabilidade das soluções de sulfato de hiosciamina 100%, sulfato de atropina 100% e da solução teste da amostra de solução oftálmica sulfato

de atropina 1%. Foram feitas injeções no dia da preparação (tempo zero) a após acondicionamento em temperatura ambiente (25°C) e no refrigerador (2°C a 8°C), durante dois e três dias.

O teste foi feito simultaneamente com o dia dois da precisão intermediária. Foram utilizadas as duas soluções de sulfato de hiosciamina e sulfato de atropina e foi preparada uma replicata adicional, para se avaliar a estabilidade de três replicatas de soluções. Foram utilizadas três das seis replicatas de amostra da solução oftálmica 1%.

Para avaliar a estabilidade das soluções em temperatura ambiente, na condição de análise, as soluções de padrão e amostra foram transferidas para *vials*, que foram mantidos no suporte do compartimento do injetor do cromatógrafo.

Para avaliar a estabilidade das soluções sob refrigeração, os balões contendo amostra e padrões foram mantidos vedados em temperatura de 2°C a 8°C. A cada dia de análise os balões eram retirados do refrigerador e as soluções eram transferidas para *vials*.

Para demonstrar a estabilidade das soluções, as respostas de área obtidas para os diferentes dias e condições de acondicionamento foram comparadas com as respostas obtidas no tempo zero. Com base na resposta relativa do tempo zero, foram calculados a resposta relativa média dos dias dois e três e o correspondente RSD.

Foi feita avaliação estatística dos dados através da análise de variância para determinar se há diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos durante o estudo de estabilidade das soluções.

Planejamento fatorial: sete fatores em dois níveis

Para demonstrar a robustez do método quanto a pequenas variações foi estudado o efeito de sete potenciais fatores, em dois níveis. Foi empregado um planejamento fatorial fracionário saturado, de resolução três (2^{7-4}_{III}). A ordem de atribuição dos fatores, de um a sete, é concordante com o grau de importância esperado para os efeitos. Este tipo de planejamento prevê oito ensaios, que foram realizados de modo randomizado, conforme apresentado na Tabela 7.

Tabela 7 - Dados do planejamento fatorial para o teste de robustez

Ensaio	Ordem	Fator						
		pH	%ACN	%TEA	[OSS]	T°C	[SDHP]	[DSHP]
		(-) 6,9 (+) 7,1	(-) 0,9 (+) 1,1	(-) 0,09 (+) 0,11	(-) 9 (+) 11	(-) 18 (+) 22	(-) 18 (+) 22	(-) 18 (+) 22
Equivalências: D=AB; E=AC; F=BC; G=ABC								
		A	B	C	D	E	F	G
1	3	-	-	-	+	+	+	-
2	5	+	-	-	-	-	+	+
3	7	-	+	-	-	+	-	+
4	2	+	+	-	+	-	-	-
5	1	-	-	+	+	-	-	+
6	6	+	-	+	-	+	-	-
7	4	-	+	+	-	-	+	-
8	8	+	+	+	+	+	+	+

Nota:

Fator	Interações de ordem dois	Nível			Variação
		(-)	(o)	(+)	
A pH do tampão fosfato	BD+CE+FG	6,9	7,0	7,1	± 0,1 unidade
B % acetonitrila	AD+CF+EG	0,9	1,0	1,1	± 10% v/v
C % TEA	AE+BF+DG	0,09	0,1	0,11	± 10% v/v
D mM de 1-octanosulfonato de sódio	AB+EF+CG	9,0	10,0	11,0	± 10% mM
E temperatura da coluna	AC+DF+BG	18,0	20,0	22,0	± 2 °C
F mM de fosfato de sódio monobásico monohidratado	BC+DE+AG	18,0	20,0	22,0	± 10% mM
G mM de fosfato de sódio dibásico anidro	CD+BE+AF	18,0	20,0	22,0	± 10% mM

Com exceção da temperatura da coluna, os demais fatores são fontes da variação da fase móvel. Os fatores foram determinados com base em possíveis variações decorrentes do uso rotineiro do método.

De acordo com testes prévios, a variação do pH, da porcentagem de acetonitrila e de trietilamina na fase móvel pode interferir de modo significativo na retenção e na seletividade. Por este motivo, estes foram considerados os fatores principais, derivando deles as relações de equivalência para os quatro fatores restantes.

A temperatura da coluna é um fator controlado de modo exato e preciso nos sistemas cromatográficos. Contudo, por se tratar de fase estacionária quiral de base protéica, foi avaliado o efeito de variações de temperatura em caso de maior oscilação do sistema ($\pm 2^\circ\text{C}$). Outras condições cromatográficas como fluxo, volume de injeção e comprimento de onda de detecção não foram avaliadas por serem estritamente controladas e monitoradas durante toda a análise cromatográfica. Variações nestas condições podem ser atribuídas mais a erros grosseiros do que a falta de robustez do método. Em caso de desvio, a falha pode ser identificada previamente à análise, durante o teste de adequabilidade do sistema.

Além dos fatores estudados, o emprego de fase estacionária de diferentes lotes também é bastante importante. Isto não foi avaliado por não haver disponibilidade, podendo ser realizado em estudo futuro.

As soluções tampão e a correspondente fase móvel foram preparadas de modo independente. Para preparar as soluções estoque, foram pesados 10,0 mg de sulfato de hiosciamina ou sulfato de atropina e transferidos para balão volumétrico de 50 mL e foi adicionada água para dissolver e completar para o volume. A partir da mesma solução estoque, para cada ensaio, foram preparadas soluções diluídas no

tampão (branco, Br) correspondente, sendo, duas replicatas de solução padrão de sulfato de hiosciamina (SH) e duas replicatas de solução de sulfato de atropina (SA). Para cada ensaio foram feitas 14 injeções, com cerca de 14 minutos cada. Antes de cada seqüência de injeção foi padronizado um tempo de estabilização do sistema de 120 minutos e, foram feitas duas injeções de sulfato de atropina para testar a adequabilidade do sistema (SST). As injeções foram feitas na seguinte ordem: SA-SST, SA-SST, Br, SH-1, SH-2, SA-1, SA-2, SH-1, SH-2, SA-2, SA-1, SH-1, SH-2 e Br. Cada ensaio durou cerca de seis horas. Os oito ensaios foram realizados em dois dias consecutivos, por um mesmo analista, utilizando o mesmo sistema cromatográfico, balança analítica, frasco de solventes e reagentes e conjunto de vidrarias.

Foi feito um ensaio adicional no nível nominal zero, a fim de avaliar o sistema antes de executar o planejamento experimental para o teste de robustez.

As respostas avaliadas foram: retenção, concentração, seletividade e resolução dos enantiômeros l-hiosciamina e d-hiosciamina na solução de sulfato de atropina.

Teste de adequabilidade do sistema

Os parâmetros para testar a adequabilidade do sistema foram estabelecidos com base nos resultados obtidos no teste de robustez e nos demais experimentos realizados para a validação da metodologia analítica.

Os parâmetros avaliados ao longo da validação do método foram: tempo de retenção, fator de capacidade (k'), largura do pico à meia altura ($w_{0,5}$), fator de cauda (*USP Tailing*, T), número de pratos teóricos (*halfwidth method*, N), fator de resolução

(*halfwidth method*, R_s), seletividade ($\alpha = k'_2/k'_1$), desvio padrão relativo das injeções de solução padrão de sulfato de hiosciamina (*relative standard deviation*, RSD) e fator de resposta relativa ($Q = [Mpd1/Rpd1] \cdot [Rpd2/Mpd2]$, onde m = massa, pd = solução padrão).

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA COM A COLUNA CHIRALCEL OD®

5.1.1 Desenvolvimento

FIGURA 1 - Cromatograma obtido com Chiralcel OD®, método n.º 18.
Condições: fase móvel composta por hexano-metanol-isopropanol-dietilamina (80+10+10+0,125, v/v/v/v), 1,0 mL/min, 24 °C, injetados 10 µL de sulfato de atropina 5 mg/mL.

FIGURA 2 - Cromatograma obtido com Chiralcel OD®, método n.º 22.
Condições: fase móvel composta por hexano-metanol-isopropanol-dietilamina (80+15+5+0,0625, v/v/v/v), 1,0 mL/min, 24 °C, injetados 10 µL de sulfato de atropina 5 mg/mL.

FIGURA 3 - Cromatograma obtido com Chiralcel OD®, método n.º 24.
Condições: fase móvel composta por hexano-metanol-isopropanol-dietilamina (80+15+5+0,1825, v/v/v/v), 1,0 mL/min, 24 °C, injetados 10 µL de sulfato de atropina 5 mg/mL.

FIGURA 4 - Cromatograma obtido com Chiralcel OD®, método n.º 23. Condições: fase móvel composta por hexano-metanol-isopropanol-dietilamina (80+5+15+0,1825, v/v/v/v), 1,0 mL/min, 24 °C, injetados 10 µL de sulfato de atropina 5 mg/mL.

FIGURA 5 - Cromatograma obtido com Chiralcel OD®, método n.º 25. Condições: fase móvel composta por hexano-metanol-isopropanol-dietilamina (80+5+15+0,0625, v/v/v/v), 1,0 mL/min, 24 °C, injetados 10 µL de sulfato de atropina 5 mg/mL.

FIGURA 6 - Cromatograma obtido com Chiralcel OD®, método n.º 33. Condições: fase móvel composta por hexano-metanol-isopropanol-dietilamina-ácido acético (75+15+10+0,1+0,02, v/v/v/v/v), 1,1 mL/min, 24 °C, injetados 20 µL de sulfato de atropina 50 µg/mL. Estas condições foram adotadas durante os testes preliminares de validação do método.

5.1.2 Validação: Testes preliminares

FIGURA 7 - Cromatogramas da linearidade para o sulfato de atropina usando a coluna Chiralcel OD®.

Identificação dos sinais na ordem ascendente no eixo y: fase móvel, 5%, 12,5%, 25%, 50%, 75%, 100%, 125% e 150%, em relação à concentração nominal de 50 µg/mL de sulfato de atropina (condições conforme Figura 6).

FIGURA 8 - Cromatograma obtido com Chiralcel OD® para l-hiosciamina 90%+d-hiosciamina 10%. (condições conforme Figura 6)

FIGURA 9 - Cromatogramas da linearidade para l-hiosciamina 90%+d-hiosciamina 10% empregando a coluna Chiralcel OD®.

Identificação dos sinais na ordem ascendente no eixo y: fase móvel, 5%, 12,5%, 25%, 50%, 75%, 100%, 125% e 150%, em relação à concentração nominal de 50 µg/mL para o total de enantiômeros (condições conforme Figura 6).

Tabela 8 - Resumo da análise estatística da linearidade para a quantificação de l-hiosciamina e d-hiosciamina, empregando a coluna Chiralcel OD®

Solução		Resposta	Equação ajustada	R ²	r	p-y	p-LOF
Sulfato de atropina	l-H	Altura	$y = 0,0149667 + 0,149659X$	99,9623	0,999812	0,8705	0,2009
		Área	$y = -0,5839 + 3,7352X$	98,9366	0,994669	0,9619	0,4299
	d-H	Altura	$y = -0,0973333 + 0,180217X$	99,9710	0,999855	0,3274	0,0189
		Área	$y = 1,32417 + 3,59959X$	99,9176	0,999588	0,6861	0,0278
l-hiosciamina 90% + d-hiosciamina 10%	l-H	Altura	$y = 0,0897 + 0,244672X$	99,9776	0,999888	0,4451	0,8832
		Área	$y = 3,79967 + 6,01661X$	99,9336	0,999668	0,4446	0,354
	d-H	Altura	$y = 0,00603333 + 0,0408434X$	99,8437	0,999218	0,9059	0,6087
		Área	$y = 3,8286 + 0,800647X$	99,4442	0,997217	0,0645	0,6462

Nota: l-H: l-hiosciamina; d-H: d-hiosciamina; R²: coeficiente de determinação; r: coeficiente de correlação; p-y: valor “p” para o intercepto; p-LOF: valor “p” para a falta de ajuste.

Tabela 9 - Resumo da análise estatística da repetibilidade do sistema para a quantificação de l-hiosciamina e d-hiosciamina, empregando a coluna Chiralcel OD®

Solução		Resposta	Nível 50%		Nível 100%		Nível 150%	
			Resposta	RSD (%)	Resposta	RSD (%)	Resposta	RSD (%)
Sulfato de atropina	l-H	Altura**	7,56*	2,26	15,04*	0,83	22,12*	0,75
		Área**	187,12	4,57	365,60	2,03	542,42	1,74
	d-H	Altura	9,02*	0,66	18,02*	0,71	26,50*	0,59
		Área	185,6*	1,21	360,2*	1,48	533,9*	0,68
l-H 90% + d-H10%	l-H	Altura	12,36	0,60	24,62	0,36	36,83	0,73
		Área	306,2*	1,02	602,6*	0,83	909,64	0,81***
	d-H	Altura	1,99*	1,76	4,00*	2,40	6,16*	2,12
		Área	41,68	6,76***	78,60*	5,39	128,6*	6,94

Nota: l-H: l-hiosciamina; d-H: d-hiosciamina. Denota diferença estatisticamente significativa (*) entre a resposta relativa média dos níveis de concentração, (**) entre a variância dos níveis de concentração. ***há falta de homogeneidade entre os dados intra-nível.

5.2 ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA COM A COLUNA CHIRAL AGP®

5.2.1 Desenvolvimento

FIGURA 10 - Cromatograma obtido com Chiral AGP®, método n.º 4.

Condições: fase móvel composta por solução tampão fosfato de sódio 20 mM (contendo 1 mM de OSS, pH 6,8) e acetonitrila (98:2 v/v), 0,4 mL/min, 22°C, injetados 20 µL de sulfato de atropina 50 µg/mL.

FIGURA 11 - Cromatograma obtido com Chiral AGP®, método n.º 7.

Condições: fase móvel composta por solução tampão fosfato de sódio 20 mM (contendo 4 mM de OSS, pH 6,8) e acetonitrila (98:2 v/v), 0,4 mL/min, 22°C, injetados 20 µL de sulfato de atropina 50 µg/mL.

FIGURA 12 - Cromatograma obtido com Chiral AGP®, método n.º 15.

Condições: fase móvel composta por solução tampão fosfato de sódio 20 mM (contendo 4 mM de OSS, pH 5,8) e isopropanol (95:5 v/v), 0,4 mL/min, 22°C, injetados 20 µL de sulfato de atropina 50 µg/mL.

Tabela 10 - Resultados do planejamento fatorial para separação de l-hiosciamina e d-hiosciamina

Ensaio	Fator				Resposta de seletividade e retenção do enantiômero l-hiosciamina	
	MO	[MO]	pH	[OSS]	α (k'_2/k'_1)	Retenção: l-hiosciamina
	A	B	C	D		
1	-	-	-	-	1,065	8,602
2	+	-	-	-	1,000	7,471
3	-	+	-	-	1,000	6,848
4	+	+	-	-	1,000	6,244
5	-	-	+	-	1,082	19,278
6	+	-	+	-	1,055	12,326
7	-	+	+	-	1,059	12,292
8	+	+	+	-	1,000	9,112
9	-	-	-	+	1,052	7,612
10	+	-	-	+	1,000	7,117
11	-	+	-	+	1,000	6,739
12	+	+	-	+	1,000	5,870
13	-	-	+	+	1,088	15,976
14	+	-	+	+	1,058	11,655
15	-	+	+	+	1,051	11,362
16	+	+	+	+	1,000	8,883

Nota:

Fator		Nível	
		(-)	(+)
A	Modificador orgânico (MO)	Acetonitrila	Isopropanol
B	Proporção do MO (%) na fase móvel [MO]	2	5
C	pH do tampão fosfato de sódio 20 mM (pH)	5,8	6,8
D	mM de 1-octanosulfonato de sódio [OSS]	1	4

Quadro 1 - Efeitos calculados para a seletividade de l-hiosciamina e d-hiosciamina

Média			1,0318	
Efeitos principais	A	MO	-0,0353	
	B	[MO]	-0,0363	
	C	pH	0,0345	
	D	[OSS]	-0,0014	
Interações de dois efeitos	AB		0,0079	
	AC		-0,0062	
	AD		0,0022	
	BC		-0,0071	
	BD		-0,0004	
	CD		0,0019	
Interações de três efeitos	ABC		-0,0212	VAR _(efeito)
	ABD		-0,0003	0,000450125
	ACD		-0,0011	0,000000090
	BCD		-0,0038	0,000001274
Interações de quatro efeitos	ABCD		0,0030	0,000014163
				0,000009112
VAR _(efeito) = $\frac{(r\ 123)^2 + (r\ 124)^2 + \dots + (r\ 1234)^2}{5}$ = $\frac{0,000474764}{5}$ = 0,0000949527				
erro padrão de um efeito = 0,010

FIGURA 13 - Efeito e probabilidade cumulativa para a seletividade de l-hiosciamina e d-hiosciamina.

Quadro 2 - Efeitos calculados para a retenção de l-hiosciamina

Média			9,83667	
Efeitos principais	A	MO	-2,50372	
	B	[MO]	-2,83582	
	C	pH	5,54782	
	D	[OSS]	-0,8700	
Interações de dois efeitos	AB		0,7209	
	AC		-1,7293	
	AD		0,4629	
	BC		-1,5606	
	BD		0,4594	
	CD		-0,4132	
Interações de três efeitos	ABC		0,6825	VAR _(efeito)
	ABD		-0,3538	0,465804544
	ACD		0,3705	0,125178863
	BCD		0,2442	0,137276734
Interações de quatro efeitos	ABCD		-0,1287	0,059640356
				0,016560473
VAR _(efeito) = (r 123) ² + (r 124) ² +...+ (r 1234) ² = 0,804460968 = 0,1608921937				
			5	5
erro padrão de um efeito =			0,401

FIGURA 14 - Efeito e probabilidade cumulativa para a retenção de l-hiosciamina.

FIGURA 15 - Cromatograma obtido com Chiral AGP®, método n.º 23. Condições: fase móvel composta por solução tampão acetato de amônio 10 mM (contendo 1 mM de OSS, pH 6,2) e acetonitrila (97:3 v/v), 0,4 mL/min, 20°C, injetados 20 µL de sulfato de atropina 50 µg/mL.

FIGURA 16 - Cromatograma obtido com Chiral AGP®, método n.º 29.

Condições: fase móvel composta por solução tampão fosfato de sódio 20 mM (contendo 1 mM de OSS e 2 mM de TEA, pH 6,8) (100%/v), 0,4 mL/min, 20 °C, injetados 20 µL de sulfato de atropina 50 µg/mL.

FIGURA 17 - Cromatograma obtido com Chiral AGP®, método n.º 42.

Condições: fase móvel composta por solução tampão fosfato de sódio 40 mM (contendo 1 mM de OSS e 7,5 mM de TEA, pH 7,0) (100%/v), 0,4 mL/min, 20 °C, injetados 20 µL de sulfato de atropina 50 µg/mL.

FIGURA 18 - Cromatograma obtido com Chiral AGP®, método n.º 50.

Condições: fase móvel composta por solução tampão fosfato de sódio 20 mM (contendo 10 mM de OSS e 7,5 mM de TEA, pH 7,0) e acetonitrila (99:1 v/v), 0,6 mL/min, 20 °C, injetados 20 µL de sulfato de atropina 20 µg/mL. Estas condições foram adotadas durante os testes de validação do método.

5.2.2 Validação

5.2.2.1 Especificidade

(a)

(b)

FIGURA 19 - Cromatogramas comparativos do teste de especificidade.

a) cromatogramas do branco (tampão), dos padrões, placebo e amostra. b) cromatogramas do estudo de estresse do sulfato de hiosciamina (condições conforme Figura 18).

Tabela 11 - Retenção e seletividade de hiosciamina e substâncias relacionadas

Composto	Pico	t _R (min)	t _{RR} I-H	k'	Seletividade
Sulfato de hiosciamina	l-hiosciamina	9,268	1,000	4,600	1,206
	d-hiosciamina ¹	10,837	1,169	5,548	
Sulfato de atropina	l-hiosciamina	9,366	1,011	4,659	1,160
	d-hiosciamina	10,597	1,143	5,403	
Sulfato de hiosciamina + sulfato de atropina	l-hiosciamina	9,252	0,998	4,597	1,204
	d-hiosciamina	10,803	1,166	5,535	
Bromidrato de homatropina	enantiômero 1	7,634	0,824	3,644	1,270
	enantiômero 2	9,249	0,998	4,626	
Impureza Noratropina	enantiômero 1	8,500	0,917	4,120	1,057
	enantiômero 2	8,893	0,960	4,357	

Nota: ¹ Foi detectada resposta para o enantiômero d-hiosciamina, porém, em nível não quantificável. t_R: tempo de retenção. t_{RR}: relativo ao pico de l-hiosciamina do sulfato de hiosciamina.

Tabela 12 - Respostas relativas do estudo de estresse

% de resposta em relação à condição não estressada						
Condição	Sulfato de hiosciamina		Sulfato de atropina		Solução oftálmica 1%	
	l-hiosciamina	d-hiosciamina ¹	l-hiosciamina	d-hiosciamina	l-hiosciamina	d-hiosciamina
Hidrólise básica	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Hidrólise ácida	96,9%	2,9%	98,4%	99,6%	98,4%	99,3%
Oxidação	84,8%	1,5%	93,6%	97,0%	98,6%	99,1%
Calor	49,4%	17,5%	68,0%	69,6%	98,1%	98,5%

Nota: ¹ neste caso, corresponde à porcentagem da área de d-hiosciamina formada no estudo de estresse, em relação à resposta de l-hiosciamina da solução não estressada de sulfato de hiosciamina.

Quadro 3 - Pureza dos picos de l-hiosciamina e d-hiosciamina

Enantiômero	Sulfato de hiosciamina		Sulfato de atropina		Solução oftálmica 1%	
l-hiosciamina	998,391	997,804	998,464	998,238	998,541	998,698
d-hiosciamina	-	-	998,220	998,337	998,777	998,261

Exemplo de cálculo:

Purity results peak 3 at 9.366 min.

Data : V304B005.D
Signal : DAD1 A
Peak : 3 at 9.366 min
Date : 30-Apr-07, 12:58:51

-> The purity factor is within the threshold limit. <-

Purity factor : 998.464 (179 of 179 spectra are within the threshold limit.)
Threshold : 950.000 (Set by user)
Reference : Manual selected (8.299 / 12.292)
Spectra : 5 (Selection automatic, 5)
Spectra : Smooth 7, Splined 5

Peak spectra

1 DAD1, 9.099 (4.2 mAU, -) Ref= 8.299 & 12.292
2 DAD1, 9.239 (14.1 mAU, -) Ref= 8.299 & 12.292
3 DAD1, 9.366 (19.7 mAU, Apx) Ref= 8.299 & 12.292
4 DAD1, 9.552 (12.9 mAU, Bln) Ref= 8.299 & 12.292
5 DAD1, 9.759 (4.6 mAU, -) Ref= 8.299 & 12.292

Peak signals

1 Similarity curve, mean level 998.464 (974.259-999.992) of DAD1, 9.099 (4.2 mAU, -)
Ref= 8.299 & 12.292 of V304B005.D
2 Similarity curve, mean level 998.464 (974.259-999.992) of DAD1, 9.099 (4.2 mAU, -)
Ref= 8.299 & 12.292 of V304B005.D

*** End of Report ***

Purity results peak 4 at 10.597 min.

Data : V304B005.D
Signal : DAD1 A
Peak : 4 at 10.597 min
Date : 30-Apr-07, 12:58:51

-> The purity factor is within the threshold limit. <-

Purity factor : 998.220 (212 of 212 spectra are within the threshold limit.)
Threshold : 950.000 (Set by user)
Reference : Manual selected (8.299 / 12.292)
Spectra : 5 (Selection automatic, 5)
Spectra : Smooth 7, Splined 5

Peak spectra

1 DAD1, 10.279 (3.8 mAU, -) Ref= 8.299 & 12.292
2 DAD1, 10.445 (11.6 mAU, -) Ref= 8.299 & 12.292
3 DAD1, 10.599 (16.1 mAU, Apx) Ref= 8.299 & 12.292
4 DAD1, 10.826 (10.6 mAU, -) Ref= 8.299 & 12.292
5 DAD1, 11.079 (3.9 mAU, -) Ref= 8.299 & 12.292

Peak signals

1 Similarity curve, mean level 998.220 (968.412-999.990) of DAD1, 10.279 (3.8 mAU, -)
Ref= 8.299 & 12.292 of V304B005.D
2 Similarity curve, mean level 998.220 (968.412-999.990) of DAD1, 10.279 (3.8 mAU, -)
Ref= 8.299 & 12.292 of V304B005.D

*** End of Report ***

5.2.2.2 Linearidade

Tabela 13 - Linearidade para a quantificação de l-hiosciamina e d-hiosciamina

Solução		Resposta	Equação ajustada	R²	r	p-y	p-LOF
Sulfato de hiosciamina	I-H	Área	y = 1,11915 + 9,10092X	99,9889	0,999944	0,7016	0,3418
	Sulfato de atropina	Área	y = 0,8879 + 4,72225X	99,9936	0,999968	0,4471	0,002
	d-H	Área	y = -1,01885 + 4,84066X	99,9928	0,999964	0,4206	0,04

Nota: I-H: l-hiosciamina; d-H: d-hiosciamina; R²: coeficiente de determinação; r: coeficiente de correlação; p-y: valor “p” para o intercepto; p-LOF: valor “p” para a falta de ajuste

A avaliação estatística da linearidade está apresentada no Apêndice A.1.

5.2.2.3 Limite de detecção e limite de quantificação

Tabela 14 - Determinação de LD e LQ para l-hiosciamina e d-hiosciamina

Injeção	I-Hiosciamina (Área, mAU*s)				d-Hiosciamina (Área, mAU*s)			
	0,06µg/mL	0,12µg/mL	0,6µg/mL	1,0µg/mL	0,06µg/mL	0,12µg/mL	0,6µg/mL	1,0µg/mL
1	4,46710	7,26412	30,44630	48,33711	4,46224	7,71184	34,08695	46,90789
2	5,29440	8,32438	29,68367	47,92652	4,00387	6,65372	29,70502	47,65577
3	6,38862	9,88795	30,24889	48,87375	5,79482	9,27501	29,68522	47,85327
4	5,10633	8,59341	30,64746	51,80297	4,78142	6,71560	31,93604	51,22141
5	7,38187	8,46818	29,42199	51,83604	5,48953	8,50920	31,18220	50,75257
6	6,51751	6,59525	31,56997	50,78213	4,58454	6,50260	33,40319	49,25096
Média	5,859	8,189	30,336	49,926	4,853	7,561	31,666	48,940
SD	1,082	1,144	0,762	1,763	0,670	1,142	1,841	1,763
RSD (%)	18,47%	13,97%	2,51%	3,53%	13,80%	15,10%	5,82%	3,60%

5.2.2.4 Exatidão

Tabela 15 - Exatidão para a quantificação de l-hiosciamina e d-hiosciamina

	Recuperação %			
	Solução oftálmica 1%		Solução oftálmica 0,5%	
	l-hiosciamina	d-hiosciamina	l-hiosciamina	d-hiosciamina
70% (n=3)	99,987	100,453	100,624	100,428
100% (n=3)	100,267	100,197	100,664	100,658
130% (n=3)	100,141	100,427	100,141	99,937
MÉDIA GERAL (n=9)	100,131	100,359	100,476	100,341
SD GERAL (n=9)	1,05	1,14	0,71	0,80
RSD GERAL (n=9)	1,05%	1,14%	0,71%	0,80%
ANOVA valor-p	0,9605	0,9662	0,6685	0,5924
Teste de Variância valor-p	0,4052	0,7271	0,5640	0,3733

A avaliação estatística da exatidão está apresentada no Apêndice A.2.

5.2.2.5 Precisão

Tabela 16 - Repetibilidade do sistema para a quantificação de l-hiosciamina e d-hiosciamina

	Sulfato de hiosciamina			Sulfato de atropina					
	l-hiosciamina			l-hiosciamina			d-hiosciamina		
	Área	RR	RSD%	Área	RR	RSD%	Área	RR	RSD%
25% (n=5)	235,710	9,42841	0,39	119,801	4,79204	0,94	120,669	4,82675	0,92
50% (n=6)	454,190	9,08381	0,23	235,218	4,70436	0,50	240,233	4,80467	0,90
70% (n=6)	641,189	9,15984	0,28	331,250	4,73215	0,22	337,667	4,82382	0,56
100% (n=6)	913,885	9,13885	0,12	470,577	4,70577	0,12	481,457	4,81457	0,21
130% (n=6)	1191,925	9,16866	0,19	613,492	4,71917	0,25	627,813	4,82933	0,35
GERAL (n=30)	-	9,18790	1,3	-	4,73070	0,8	-	4,81983	0,6

Nota: Área, em mAU*s; RR: resposta relativa, mAU*s/%

Os resultados obtidos para a repetibilidade do método através do teste de exatidão estão apresentados na Tabela 15.

Os resultados obtidos para a repetibilidade do método através do teste de precisão intermediária estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 - Precisão intermediária para a quantificação de l-hiosciamina e d-hiosciamina na solução oftálmica 1%

Concentração no produto: Solução oftálmica 1%									
	l-hiosciamina			d-hiosciamina			l-hiosciamina + d-hiosciamina		
	mg/mL	%Decl	RSD%	mg/mL	%Decl	RSD%	mg/mL	%Decl	RSD%
Dia I (n=6)	5,009	50,09	0,33	5,079	50,79	0,49	10,088	100,88	0,40
Dia II (n=6)	4,931	49,31	0,43	5,017	50,17	0,78	9,948	99,48	0,39
Dia III (n=6)	5,015	50,15	0,54	5,030	50,30	0,67	10,045	100,45	0,60
GERAL (n=18)	4,985	49,85	0,89	5,042	50,42	0,82	10,027	100,27	0,75
ANOVA valor-p		0,0000			0,0140			-	
Teste de Variância valor-p		0,47			0,66			-	

Tabela 18 - Precisão intermediária para a quantificação de l-hiosciamina e d-hiosciamina na solução oftálmica 0,5%

Concentração no produto: Solução oftálmica 0,5%									
	l-hiosciamina			d-hiosciamina			l-hiosciamina + d-hiosciamina		
	mg/mL	%Decl	RSD%	mg/mL	%Decl	RSD%	mg/mL	%Decl	RSD%
Dia I (n=6)	2,541	50,82	0,24	2,574	51,49	0,40	5,115	102,31	0,29
Dia II (n=6)	2,520	50,39	0,38	2,566	51,32	0,91	5,085	101,71	0,60
Dia III (n=6)	2,567	51,35	0,45	2,586	51,72	0,39	5,153	103,07	0,41
GERAL (n=18)	2,543	50,85	0,86%	2,575	51,51	0,67	5,118	102,36	0,70
ANOVA valor-p		0,0000			0,1174			-	
Teste de Variância valor-p		0,43			0,04			-	

A avaliação estatística da precisão intermediária está apresentada no Apêndice A.3.

5.2.2.6 Intervalo

Tabela 19 - Intervalo do método para a quantificação de l-hiosciamina e d-hiosciamina

Parâmetro		Faixa avaliada			
		µg/mL na solução		% em relação à concentração nominal de 20,0 µg/mL	
				Mínimo	Máximo
		Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Linearidade		5,0	25,0	25%	125%
Exatidão		14,0	26,0	70%	130%
Precisão	Repetibilidade do sistema	5,0	26,0	25%	130%
	Repetibilidade do método (Referente à exatidão)	14,0	26,0	70%	130%
	Precisão intermediária	20,0	20,0	100%	100%
Intervalo		14,0	26,0	70%	130%
Faixa de especificação		18,6	21,4	93%	107%

FIGURA 20 - Representação gráfica do intervalo do método.

5.2.2.7 Robustez

Tabela 20 - Estabilidade das soluções de padrão e amostra para a quantificação de l-hiosciamina e d-hiosciamina

Solução avaliada	Tempo	% de resposta dos dias 2 e 3 em relação ao dia 1			
		l-hiosciamina		d-hiosciamina	
		Temperatura ambiente	Temperatura de 2°C a 8°C	Temperatura ambiente	Temperatura de 2°C a 8°C
Sulfato de hiosciamina	dia 2 (n=3)	99,521	100,164	-	-
	dia 3 (n=3)	99,170	99,929	-	-
	RSD (n=12)	0,5%		-	-
	ANOVA valor-p	0,0287		-	-
	Teste de Variância valor-p	0,9526		-	-
Sulfato de atropina	dia 2 (n=3)	99,862	100,166	100,091	100,003
	dia 3 (n=3)	99,343	100,822	99,189	100,801
	RSD (n=12)	0,7%		0,8%	
	ANOVA valor-p	0,0563		0,0609	
	Teste de Variância valor-p	0,1919		0,1686	
Solução oftálmica 1%	dia 2 (n=3)	99,837	99,876	100,442	100,219
	dia 3 (n=3)	99,212	100,331	99,484	100,791
	RSD (n=12)	0,7%		0,6%	
	ANOVA valor-p	0,2886		0,0215	
	Teste de Variância valor-p	0,9854		0,398	

A avaliação estatística da estabilidade das soluções apresentada no Apêndice A.4.

Tabela 21 - Respostas obtidas no planejamento fatorial para avaliar a robustez

Ensaio	Tempo de retenção (min)				% da concentração teórica				Resolução		Seletividade	
	l-hiosciamina		d-hiosciamina		l-hiosciamina		d-hiosciamina					
1	9,0330	9,0375	10,1995	10,2055	101,8101	99,3659	102,3242	100,1997				
2	10,4780	10,4815	12,0180	12,0230	102,2751	100,3485	102,3801	100,7183				
3	9,1355	9,1405	10,2865	10,2915	102,7261	101,8506	102,8104	101,6584				
4	10,3890	10,3935	11,8645	11,8720	101,2142	99,2937	101,1334	99,3592				
5	8,7195	8,7200	9,9260	9,9255	101,3835	99,1882	102,4844	99,7295				
6	10,2295	10,2485	11,6560	11,6830	102,4185	98,8410	101,8330	98,1954				
7	9,1520	9,1580	10,3815	10,3875	102,5600	100,5824	102,9706	100,4456				
8	9,0915	9,0965	10,2750	10,2825	102,5761	100,2671	102,9009	100,2724				

Nota: respostas obtidas em oito ensaios, para duas replicatas de solução de sulfato de atropina.

(a)

(b)

FIGURA 21 - Gráficos do efeito e significância dos fatores sobre a retenção de l-hiosciamina (a) e d-hiosciamina (b).

Fatores: pH do tampão fosfato (pH), % de acetonitrila (ACN), % de trietilamina (TEA); mM de 1-octanosulfonato de sódio (OSS), temperatura da coluna (T), mM de fosfato de sódio monobásico monohidratado (SDHP), mM de fosfato de sódio dibásico anidro (DSHP). Efeito > $E_{crítico}$ = significativo. Planejamento fatorial conforme Tabela 7.

(a)

(b)

FIGURA 22 - Gráficos do efeito e significância dos fatores sobre a concentração de l-hiosciamina (a) e d-hiosciamina (b).
Fatores conforme Figura 21. Planejamento fatorial conforme Tabela 7.

(a)

(b)

FIGURA 23 - Gráficos do efeito e significância dos fatores sobre a resolução (a) e seletividade (b) de l-hiosciamina e d-hiosciamina. Fatores conforme Figura 21. Planejamento fatorial conforme Tabela 7.

5.2.2.8 Teste de adequabilidade do sistema

Tabela 22 - Parâmetros de adequabilidade do sistema para a quantificação de l-hiosciamina e d-hiosciamina

Parâmetro	Modo de cálculo	Valor
Tempo de retenção (t_R , min.) para l-hiosciamina	t_R no ápice	$8,6 \leq t_R \leq 10,5$
Fator de retenção (k) para l-hiosciamina	$[(T_i - T_0)/T_0]$	$4,1 \leq k \leq 5,3$
Fator de cauda (T) para l-hiosciamina	<i>USP Tailing</i>	$\leq 1,8$
Número de pratos teóricos (N) para l-hiosciamina	<i>Halwidth</i>	≥ 2000
RSD referente à área média do sulfato de hiosciamina ($n \geq 3$)	SD/Média	$\leq 1,5$
Fator de resposta (Q) referente à área média do sulfato de hiosciamina	$[Mpd1/Rpd1] \cdot [Rpd2/Mpd2]$	$0,98 \leq Q \leq 1,02$
Fator de resolução (R_s) referente ao sulfato de atropina	<i>Halwidth</i>	$\geq 1,3$
Seletividade (α) referente ao sulfato de atropina	(K'_2/K'_1)	$\geq 1,15$

6 DISCUSSÃO

6.1 ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA COM A COLUNA CHIRALCEL OD®

Desenvolvimento

Os testes iniciais realizados com a coluna Chiralcel OD®, correspondente aos métodos de nº 1 a 9 (M1 a M9) da Tabela 4, mostram que a separação dos enantiômeros da atropina não é satisfatória sem a adição de modificador amínico (TEA ou DEA).

Segundo registros da literatura (SZÁSZ; BUDVÁRI-BÁRÁNY; GYIMESI-FORRÁS, 1999), a adição de trietilamina na fase móvel proporciona separação adequada dos enantiômeros da atropina. Esta condição foi testada, conforme métodos M10 a M14, porém, não foi reproduzido o grau de separação dos enantiômeros da atropina e a linha de base apresentou ruído significativo.

De acordo com Snyder, Kirkland e Glajch (1997), o uso de dietilamina (DEA) é mais indicado para a coluna Chiralcel OD® e foi avaliado conforme métodos M15 a M26 da Tabela 4. A análise da atropina usando etanol em substituição ao metanol resultou em picos mais alargados e com menor separação.

Os ensaios realizados com DEA na proporção máxima recomendada para coluna Chiralcel OD® (0,5%) resultaram em separação adequada, com resposta avaliada em 258 nm. Com a diminuição gradativa da porcentagem de DEA na fase móvel até atingir 0,125% foram obtidas intensidade de resposta e a separação adequadas (Figura 1, M18). O espectro de absorção característico da atropina

apresenta bandas de absorção máxima próximo a 215 nm e na região entre 246 e 265 nm. O espectro obtido na análise cromatográfica usando DEA 0,125% é similar ao perfil esperado.

De acordo com a variação da concentração de DEA na fase móvel, houve alteração no perfil do espectro de absorção dos enantiômeros l-hiosciamina e d-hiosciamina. A resposta de altura de pico do enantiômero d-hiosciamina é cerca de 3 vezes menor, quando a concentração de DEA é aumentada três vezes, mantendo-se a mesma proporção dos solventes na fase móvel e concentração da amostra. Isto é observado nas Figuras 2 (M22, DEA: 0,0625%) e 3 (M24, DEA: 0,1825%).

A análise dos cromatogramas das Figuras 4 (M23, DEA: 0,1825%) e 5 (M25, DEA: 0,0625%), em conjunto com as Figuras 2 e 3 mostra um efeito de interação dos fatores de concentração de DEA e proporção de metanol sobre a intensidade do sinal e ruído da fase móvel.

Os resultados obtidos até o método M26 indicam que o aumento da proporção de metanol e a diminuição da concentração de dietilamina podem resultar em intensidade de sinal e separação enantiomérica adequados.

De acordo com a literatura (SINGH, 2001), a adição de ácido acético contribui para a diminuição da cauda de compostos básicos em análises usando a coluna Chiralcel OD®. Este fator foi avaliado nos métodos M27 a M35 da Tabela 4.

O uso de ácido acético na mesma proporção que a dietilamina aumentou a retenção dos enantiômeros, resultando em picos mais alargados. A diminuição da concentração de ácido acético para cerca de 20% em relação à proporção de dietilamina contribuiu para diminuir a cauda do pico dos enantiômeros, sem prejudicar a separação e a retenção. Isto é devido ao melhor controle de ionização

da atropina e redução das interações dos enantiômeros com os grupos silanóis livres (SANTONI et al., 1993).

O aumento da força da fase móvel, usando maior proporção de isopropanol (10%) contribui para melhorar a forma dos picos e aumenta a miscibilidade do metanol com o hexano na fase móvel. A manutenção da temperatura da coluna em 24°C parece ser importante para obter melhor perfil cromatográfico, quando comparado com o uso de temperatura a 18°C e 28°C.

Dentre os métodos estudados, foi escolhido o de nº 33 (Figura 6) para realizar os testes preliminares de validação. As condições cromatográficas foram: coluna Chiralcel OD® (250 X 4,6 mm, 10 µm), a 24°C, fase móvel composta por hexano-metanol-isopropanol-dietilamina-ácido acético (75+15+10+0,1+0,02 v+v%), vazão de 1,1 mL/min e detecção UV em 214 nm.

Validação: testes preliminares

A avaliação estatística da linearidade, resumida na Tabela 8, mostra que há uma forte correlação linear entre a concentração dos enantiômeros da atropina e a resposta de altura e área, com linha de regressão de primeira ordem. O modelo linear explica mais que 99,84% (valor mínimo do coeficiente de determinação, R^2) da variabilidade de resposta de altura para quantificação dos enantiômeros presentes em solução de sulfato de atropina ou solução de l-hiosciamina 90% e d-hiosciamina 10%. A correlação entre as variáveis absorbância e concentração é adequada com $r \geq 0,9992$ para resposta de altura.

Para todas as regressões avaliadas, o valor de probabilidade (valor “p”) obtido para o intercepto (valor de y para x = 0) é maior do que 0,05. Isto indica que o

coeficiente linear obtido não tem significância estatística e pode ser considerado igual a zero, com 95% de confiança.

O ajuste dos dados de resposta ao modelo linear foi avaliado empregando análise de variância (ANOVA), através da decomposição dos resíduos em erro puro (aleatório) e erro devido à falta de ajuste (sistemático). Para todas as respostas avaliadas o ajuste ao modelo linear é adequado, exceto para a resposta de altura e área do enantiômero d-hiosciamina da solução de sulfato de atropina. Os gráficos de resíduo correspondentes a estas respostas foram avaliados, e foi observada uma possível autocorrelação serial entre os resíduos, no nível de confiança de 95%.

A avaliação dos cromatogramas mostra que para alguns picos, o “software” (ChemStation, Agilent) atribuiu integração perpendicular, principalmente entre os da cauda do enantiômero d-hiosciamina e a frente do enantiômero l-hiosciamina. Para a grande maioria dos picos dos enantiômeros foi atribuída integração tangencial à linha de base, considerada mais apropriada à análise cromatográfica.

Na avaliação conjunta dos resultados do teste de linearidade não há evidências de falha na preparação das soluções. A diferença no modo de integração tem consequência sobre as respostas de altura e, mais intensificadamente de área, podem ser resultantes de variabilidade intrínseca do método empregado.

O método avaliado para análise enantiosseletiva da atropina apresenta linearidade adequada para a quantificação, com base na resposta de altura, do enantiômero l-hiosciamina para o intervalo de concentração de 12,5 µg/mL a 75 µg/mL de solução de sulfato de atropina e ou na solução de l-hiosciamina 90% e d-hiosciamina 10%.

A avaliação da linearidade mostra que o método requer ajustes, a fim de diminuir a variabilidade de injeção e replicata a níveis aceitáveis. Possíveis

melhorias no método incluem: diminuição da cauda dos picos, aumento da resolução, aumento da concentração dos enantiômeros e uso da fase estacionária quiral Chiralcel OD® com partículas de menor tamanho (ex.: partículas de 5µm).

Os resultados obtidos no teste de repetibilidade estão sumarizados na Tabela 9 e são concordantes com a avaliação da linearidade do método. O método apresenta repetibilidade de sistema adequada para a quantificação, com base na resposta de altura do enantiômero l-hiosciamina na solução de sulfato de atropina e na solução de l-hiosciamina 90% e d-hiosciamina 10%. A análise de variância (ANOVA) mostra que há diferença estatisticamente significativa entre as respostas relativas médias de altura e de área dos enantiômeros, para pelo menos dois níveis de concentração. Para a resposta de área dos enantiômeros l-hiosciamina e d-hiosciamina, para os níveis de 150% e 50%, respectivamente foi constatado grupo não homogêneo, indicando uma possível diferença entre as respostas intra-nível.

O teste de variância mostra que, no nível de confiança de 95%, há diferença estatisticamente significativa entre os desvios padrão da resposta de altura e de área para as concentrações de 50%, 100% e 150% do enantiômero l-hiosciamina da solução de sulfato de atropina. A razão desta diferença está relacionada principalmente ao elevado desvio padrão relativo (RSD) obtido para o nível de 50% de concentração.

Não foi evidenciada falha na preparação das soluções utilizadas no teste de repetibilidade do sistema. Os resultados apresentados descrevem o comportamento do método escolhido para os testes preliminares de validação e indicam que há necessidade de implementar melhorias a fim de obter uma metodologia analítica mais robusta para a separação e análise quantitativa dos enantiômeros da atropina.

6.2 ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA COM A COLUNA CHIRAL AGP®

Desenvolvimento

O uso da fase estacionária quiral Chiral AGP® para análise enantiosseletiva da atropina é classicamente indicado na literatura. Schill, Wainer e Barkan (1986a) mostraram que o uso de fase móvel com tampão fosfato 20 mM, com adição de ácido octanóico 10mM, em pH 7,0 resulta em separação adequada dos enantiômeros d-hiosciamina e l-hiosciamina. A separação da atropina também foi demonstrada por Breton et al. (2005) usando a fase estacionária quiral Chiral AGP® e fase móvel composta por tampão acetato 10 mM, pH 6,2, ácido octanóico 1 mM e 3% de acetonitrila.

Os métodos avaliados ao longo deste estudo, usando a coluna Chiral AGP® estão apresentados na Tabela 5. Os testes iniciais foram estabelecidos através de um planejamento fatorial completo 2^4 , realizado no sistema cromatográfico 1 (Shimadzu), conforme Tabela 6. Nos níveis fixados para os quatro fatores avaliados (tipo e proporção do modificador orgânico, pH e concentração do pareador iônico ácido octanossulfônico) não foi obtida separação adequada dos enantiômeros da atropina. As Figuras 10 (método M4) e 11 (método M7) correspondem aos cromatogramas com melhor separação dos enantiômeros da atropina, obtida no planejamento fatorial. A Figura 12 (método M15) é exemplo de método não enantiosseletivo.

Na avaliação estatística dos resultados do planejamento fatorial foi calculado o efeito dos quatro fatores na seletividade (Quadro 1 e Figura 13) e na retenção do enantiômero l-hiosciamina (Quadro 2 e Figura 14). Nos quadros de cálculo de

efeitos, o valor positivo (+) indica que o efeito aumenta ao mudar do nível (-) para o nível (+) do fator. Desse modo, a substituição da acetonitrila (nível "-") pelo isopropanol (nível "+") leva à diminuição da separação dos enantiômeros (efeito negativo: -0,0353).

Dos fatores estudados, o pH é o de efeito mais significativo no aumento da separação e retenção dos enantiômeros. A concentração do pareador iônico não afeta de modo significativo a retenção e separação na análise da atropina.

A análise estatística mostra que não há interação de terceira ou quarta ordem entre os efeitos estudados. De modo geral, o valor do erro padrão de um efeito é da mesma grandeza do valor do efeito de interação de três fatores ou mais. Os gráficos de probabilidade cumulativa mostram que os fatores ou interações mais significativos são os que estão mais distante da reta média que intercepta o eixo x no ponto zero.

O método proposto por Breton et al. (2005), usando tampão acetato, em pH 6,2 e 3% de acetonitrila, foi testado (método M23), porém, os resultados não foram reproduzidos. A separação dos enantiômeros da atropina não foi adequada e foi observado elevado ruído na linha de base (Figura 15).

A adição de TEA à fase móvel resultou em maior grau de separação dos enantiômeros l-hiosciamina e d-hiosciamina (Figura 16, método M29). Com cerca de 15 mM de TEA na fase móvel (método M32), foi obtido fator de separação (α) igual a 1,17, adequado para análise enantiosseletiva. A adição de maior quantidade de TEA na fase móvel, levou a coluna Chiral AGP® à saturação. Isto gerou picos com "barriga" e a separação dos compostos ficou prejudicada.

Algumas fases estacionárias apresentam efeito de memória de aditivos amínicos, como se as moléculas dos aditivos ficassem aprisionadas na fase

estacionária e manifestassem ação mesmo na ausência destes na fase móvel. A coluna Chiral AGP® apresentou esta reação com a TEA. Para “apagar” a memória da coluna devido ao uso de elevada concentração de TEA, foram feitas lavagens sucessivas com água purificada e lavagem da coluna com solução de ácido fórmico, pH 4 e temperatura ambiente.

Após a restauração da coluna Chiral AGP®, os testes foram continuados, fixando a concentração de TEA em 7,5 mM, em tampão fosfato pH 7,0 e 1 mM 1-octanosulfonato de sódio. O cromatograma obtido apresentou perfil de acordo com o esperado e concordante com o perfil obtido antes da contaminação da coluna Chiral AGP®. Nestas condições os enantiômeros foram separados com α igual a 1,18, porém elevado tempo de retenção de cerca de 20 minutos (Figura 17, método M42). Para ajustar a retenção dos enantiômeros da atropina a níveis adequados para análise de rotina, foram manipulados os parâmetros de fluxo, porcentagem do modificador orgânico acetonitrila e temperatura da coluna.

O cromatograma da Figura 17 mostra integração tangencial dos picos l-hiosciamina e d-hiosciamina, indicando separação completa. Contudo, ao observar atentamente, nota-se que a integração está forçada. Em nenhuma das condições avaliadas foi obtida separação completa dos enantiômeros da atropina, porém, foi possível obter uma separação adequada para análise quantitativa dos enantiômeros da atropina.

O método escolhido para os testes de validação (Método M50 da Tabela 6) apresenta resultados aceitáveis de separação, retenção e parâmetros de adequabilidade do sistema, compatíveis com análise enantiosseletiva (Figura 18). As condições cromatográficas foram: coluna Chiral-AGP® (100 x 4,0 mm, 5 μ m), a 20°C, fase móvel composta por solução tampão fosfato (contendo 10 mM de 1-

octanosulfonato de sódio e 7,5 mM de trietilamina, pH 7,0) e acetonitrila (99:1 v/v), vazão de 0,6 mL/min e detecção UV 205 nm.

Os testes de validação foram avaliados com base na resposta de área, pois, durante os testes de desenvolvimento, foi constatado que este modo de integração é mais adequado para a quantificação dos enantiômeros.

Validação

Métodos enantiosseletivos para determinar a composição enantiomérica de formulações farmacêuticas são muito importantes sob o aspecto farmacológico, farmacocinético, toxicológico e regulatório (SINGH; KEDOR-HACKMANN; SANTORO, 2001)

Para demonstrar a especificidade do método, foram avaliadas soluções de sulfato de hiosciamina, sulfato de atropina, solução oftálmica 1%, placebo, solução de substâncias com estruturas relacionadas e foi feito o estudo de estresse.

As substâncias relacionadas estudadas foram o bromidrato de homatropina e a noratropina. A homatropina é um análogo sintético da atropina, diferindo desta pela ausência do grupo CH₂ ligado ao carbono α , e é empregada como padrão interno na monografia da Farmacopéia Americana (USP 30) para análise de solução oftálmica de sulfato de atropina. A noratropina é uma substância avaliada como impureza para identificação de atropina, segundo a Farmacopéia Européia (5. ed). Na avaliação dos cromatogramas foi observada coeluição entre os picos destas substâncias com o pico de l-hiosciamina, conforme mostrado pelos tempos de retenção absoluto e relativo ao pico de l-hiosciamina (Tabela 11). Dentre as substâncias avaliadas, o método mostrou-se mais seletivo para os enantiômeros da

homatropina ($\alpha = 1,27$), para os quais foi obtida separação completa. Os enantiômeros de noratropina não apresentam separação adequada ($\alpha = 1,06$). Os resultados obtidos para estas substâncias não comprometem o emprego do método para análise dos enantiômeros da atropina. Isto porque o método não requer padronização interna e a identificação de impurezas na matéria-prima é feita de acordo com métodos farmacopeicos.

Na injeção da solução padrão de sulfato de hiosciamina foi detectado pico de d-hiosciamina, porém em nível não quantificável. Os enantiômeros l-hiosciamina e d-hiosciamina apresentam diferença na retenção, se provenientes da solução de sulfato de hiosciamina ou sulfato de atropina (Tabela 11). Este fenômeno foi observado previamente durante o desenvolvimento do método. A retenção de l-hiosciamina e d-hiosciamina apresenta dependência com a massa total e proporcional injetada dos enantiômeros. De modo geral, a injeção de mistura racêmica resulta em maior retenção de l-hiosciamina e menor retenção de d-hiosciamina. Consequentemente, a seletividade diminui. Quanto maior a massa injetada da mistura racêmica, menor a retenção, em grau similar, dos enantiômeros, consequentemente, a seletividade se mantém. Para a injeção de solução com maior proporção de l-hiosciamina (90% ou maior), a retenção de l-hiosciamina diminui com o aumento da massa e a retenção de d-hiosciamina mantém-se praticamente inalterada. Consequentemente, a seletividade aumenta com o aumento da massa injetada. Os resultados obtidos na validação do método asseguram que esta dependência da retenção com a massa injetada não compromete a quantificação dos enantiômeros l-hiosciamina e d-hiosciamina, desde que os resultados sejam avaliados com base na área dos picos.

Na comparação dos cromatogramas obtidos para as soluções de sulfato de hiosciamina puro e contaminado com sulfato de atropina (Figura 19a), pode-se observar a correta identificação do pico de d-hiosciamina. No cromatograma do sulfato de hiosciamina contaminado, há formação de pico na mesma região do tempo de retenção de d-hiosciamina. As respostas dos enantiômeros l-hiosciamina e d-hiosciamina não sofrem interferência do placebo de solução oftálmica 1%. O perfil cromatográfico obtido para o sulfato de atropina e a solução oftálmica 1% apresenta similaridade. Com base neste fator, foi possível viabilizar o estudo da robustez, através do planejamento fatorial, empregando sulfato de atropina, em substituição à amostras de solução oftálmica 1%.

A pureza dos picos de l-hiosciamina e d-hiosciamina, calculada para os enantiômeros das soluções de sulfato de hiosciamina, sulfato de atropina e solução oftálmica 1% (Quadro 3) mostra similaridade adequada dos espectros ao longo do pico (maior que 99,7% ou fator de pureza maior que 997). O cálculo de pureza de pico é uma ferramenta que, isoladamente, não assegura a especificidade de um método. Isto ocorre porque, se houver coeluição de compostos que possuam o mesmo espectro de absorção, o fator de similaridade não será afetado. A determinação da pureza de pico é uma análise complementar para demonstrar a especificidade do método, pois, os enantiômeros apresentam as mesmas propriedades físico-químicas, incluindo espectro de absorção (exemplo de cálculo no Quadro 3).

No estudo de estresse (Tabela 12) foi observada decomposição completa dos enantiômeros l-hiosciamina e d-hiosciamina submetidos à hidrólise básica. Isto ocorre devido à saponificação da ligação do grupo éster (SIMMS et al., 1998). Os enantiômeros apresentam susceptibilidade decrescente ao calor, à oxidação e à

hidrólise ácida. No geral, o enantiômero l-hiosciamina é mais susceptível que o enantiômero d-hiosciamina. Na solução oftálmica estudada, com exceção da hidrólise básica, para as demais condições de estresse, não houve decomposição apreciada dos enantiômeros da atropina. Isto pode indicar um efeito de proteção dos componentes da matriz, resultando em maior estabilidade da formulação farmacêutica. Os resultados do estudo de estresse mostram, por exemplo, que para a solução oftálmica de atropina pode ser empregada esterilização por calor úmido (autoclavação a 121 °C). A solução de sulfato de hiosciamina foi a que sofreu maior grau de decomposição dos enantiômeros (Figura 19b). O cromatograma da solução submetida à oxidação mostra picos desconhecidos na região de tempo de retenção entre 6 e 8 minutos. O cromatograma de estresse por calor mostra que primeiro ocorre a formação de d-hiosciamina e depois ambos enantiômeros são degradados. Em todos os cromatogramas do estudo de estresse foi observado o alargamento dos picos dos enantiômeros. Isto mostra que, embora a resposta de área seja mantida, com o método empregado é possível identificar uma amostra ou padrão submetido ao estresse, através da avaliação do perfil cromatográfico diferenciado.

Os testes realizados demonstram que o método apresenta especificidade adequada para a quantificação dos enantiômeros l-hiosciamina e d-hiosciamina. Para o propósito de quantificação dos produtos de decomposição (ex.: ácido trópico, ácido atrópico e apoatropina) e substâncias relacionadas (ex.: noratropina, escopolamina e litorina), outros métodos da literatura são recomendados (KIRCHHOFF et al., 2004).

Para demonstrar a linearidade do método para quantificação dos enantiômeros l-hiosciamina e d-hiosciamina em solução pura ou em mistura racêmica, o teste foi realizado a partir de solução de sulfato de hiosciamina e sulfato

de atropina. Foram analisadas soluções dos níveis de concentração de 25% a 150%. Porém, devido ao desvio significativo apresentado para o nível 150% para a solução de sulfato de hiosciamina (Tabela 23 do Apêndice A1), a análise estatística da linearidade foi restringida para a faixa de 25% a 125%.

A avaliação estatística da linearidade para análise enantiosseletiva da atropina com a coluna Chiral AGP®, sumarizada na Tabela 13, mostra que há uma forte correlação linear entre a concentração dos enantiômeros l-hiosciamina e d-hiosciamina e a resposta de área, com linha de regressão de primeira ordem. O modelo linear explica mais que 99,99% da variabilidade de resposta. A correlação entre as variáveis absorvância e concentração é adequada com $r \geq 0,9999$ (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH; 1997).

Para as regressões avaliadas, o valor de probabilidade (valor-p) obtido para o intercepto (valor de y para x = 0) é maior que 0,05. Isto indica que o coeficiente linear obtido não tem significância estatística e pode ser considerado igual a zero, com 95% de confiança.

O ajuste dos dados de resposta ao modelo linear foi avaliado empregando análise de variância (ANOVA), através da decomposição dos resíduos em erro puro (aleatório) e erro devido à falta de ajuste (sistemático). Para avaliação da linearidade a partir da solução de sulfato de atropina, foi obtido valor “p” menor que 0,05, indicando falta de ajuste da resposta de área.

Os resíduos foram avaliados visualmente através do gráfico de resíduo e através do teste estatístico de Durbin-Watson para determinar se há alguma correlação, baseada na ordem que os desvios ocorrem, com os dados de concentração (Apêndice A.1). Uma distribuição não randômica dos dados no gráfico de resíduo pode indicar que o modelo selecionado não descreve adequadamente os

dados observados e qualquer valor de resíduo padronizado excluído da faixa de -3 a +3 é um “outlier” (valor discrepante, não pertencente à população avaliada). Se o modelo é correto e se todas as suposições são satisfeitas, os resíduos devem apresentar perfil aleatório, sem padrão aparente.

O gráfico de resíduo para o enantiômero l-hiosciamina da solução de sulfato de atropina apresenta um perfil cíclico. O gráfico de resíduo para o enantiômero d-hiosciamina da solução de sulfato de atropina apresenta um perfil de declínio tendencioso a partir do nível de concentração 100%. Todos os gráficos de resíduo dos enantiômeros l-hiosciamina e d-hiosciamina apresentam resíduo padronizado com desvio menor que 3, não indicando presença de “outlier”.

O teste de Durbin-Watson somente retornou valor “p” menor que 0,05 para a regressão feita para o enantiômero l-hiosciamina da solução de sulfato de atropina. Isto indica uma possível autocorrelação serial entre os resíduos, no nível de confiança de 95%.

O teste de “lack of fit” não é aplicável para as regressões obtidas para os enantiômeros da solução de sulfato de atropina, pois foi observada possível autocorrelação serial e/ou resíduos não randomizados (BRUNS; SCARMINIO; BARROS NETO, 2003).

Em todo o teste de linearidade não foi observada variabilidade significativa entre replicata de injeção (mesmo frasco) ou replicata de nível de concentração (mesma concentração obtida a partir de diferente diluição da mesma solução estoque). A integração dos picos nos cromatogramas foi avaliada e não foi constatada diferença no modo de integração. Todos os cromatogramas do teste de linearidade foram integrados automaticamente via “software”, com os mesmos

eventos de integração. Foi feita integração tangencial à linha de base e perpendicular no vale entre os enantiômeros da atropina.

A análise dos tempos de retenção obtidos no teste de linearidade a partir da solução de sulfato de atropina mostra que a retenção dos enantiômeros depende de modo inversamente proporcional à concentração. Quanto maior a concentração, menor a capacidade de retenção da coluna para os dois enantiômeros.

Na avaliação conjunta dos resultados do teste de linearidade não há evidência de falha analítica. O perfil de retenção dos enantiômeros é indicativo de variabilidade intrínseca do método empregado. Isto está relacionado à capacidade de carregamento de massa da fase estacionária Chiral AGP® para separação dos enantiômeros l-hiosciamina e d-hiosciamina. Esta limitação da coluna Chiral AGP® pode ser a causa do desvio observado para o nível de concentração de 150% na avaliação da linearidade para a solução de sulfato de hiosciamina. A dependência da retenção com a massa injetada de atropina foi descrita em literatura (SZÁSZ; BUDVÁRI-BÁRÁNY; GYIMESI-FORRÁS, 1999), para análise com a coluna Chiralcel OD®.

O método avaliado para análise dos enantiômeros da atropina usando a coluna Chiral AGP® apresenta linearidade adequada para a quantificação, com base na resposta de área, na faixa de concentração de 5,0 µg/mL a 25,0 µg/mL. Esta faixa corresponde à concentração total dos enantiômeros, em mistura racêmica ou em solução do enantiômero l-hiosciamina. A faixa avaliada é adequada, pois para doseamento de substância ativa em produto farmacêutico é recomendado um intervalo de linearidade de no mínimo 80% a 120% da concentração nominal da solução teste.

A avaliação do limite de detecção mostra que o método tem sensibilidade adequada para análise dos enantiômeros da atropina. Para as injeções repetidas da solução equivalente à relação sinal/ruído de 5:1 foi detectada resposta com $RSD < 20\%$ para os enantiômeros l-hiosciamina e d-hiosciamina, cada um na concentração de cerca de $0,06 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 14). Esta variação é aceitável para estabelecer a concentração mínima de detecção do método.

Na avaliação do limite de quantificação, foi observada variação adequada ($RSD < 5,0\%$) para soluções com concentração de cerca de $1,0 \mu\text{g/mL}$ de cada um dos enantiômeros da atropina. Esta concentração corresponde a cerca de 5% da concentração nominal de $20,0 \mu\text{g/mL}$, adotada durante a validação do método.

Os resultados obtidos para o LD e LQ mostram que o método pode potencialmente ser adotado para determinação de traços do enantiômero inativo d-hiosciamina. Porém, para isto é necessário complementar os testes de validação, para adequar à finalidade de determinação de produto de decomposição e/ou subproduto de síntese.

A exatidão do método é adequada para análise de produto farmacêutico na apresentação de solução oftálmica contendo sulfato de atropina a 1% e 0,5%. Os resultados apresentados na Tabela 15 mostram que a recuperação dos enantiômeros l-hiosciamina e d-hiosciamina é adequada na faixa de 70% a 130% da concentração nominal de $20,0 \mu\text{g/mL}$.

A análise estatística da exatidão (Apêndice A.2) mostra que não há diferença nos resultados médios de recuperação para os níveis de 70%, 100% e 130% (valor “p” $> 0,05$ da ANOVA). O teste variância mostra que não há diferença estatisticamente significativa entre os valores de RSD obtidos para os diferentes

níveis de recuperação. Isto demonstra que o método apresenta repetibilidade adequada para a faixa de concentração avaliada na exatidão.

A recuperação média dos níveis avaliados e a recuperação geral atendem à faixa de 98,0% a 102,0%, tipicamente recomendada para o teste de exatidão. O intervalo de confiança 95% da recuperação média dos níveis ($n = 3$), em alguns não está contido nesta faixa, porém, está contido na faixa de 95% a 105%. Isto é considerado aceitável quando comparado com a especificação de 93% a 107%, requerida na Farmacopéia Americana (USP 30) para análise de solução oftálmica de sulfato de atropina.

O método avaliado para análise dos enantiômeros da atropina com a coluna Chiral AGP® apresenta exatidão adequada para a quantificação, com base na resposta de área, na faixa de concentração de 14,0 µg/mL a 26,0 µg/mL. Esta faixa corresponde à concentração total dos enantiômeros, em mistura racêmica. A faixa avaliada é adequada, pois para doseamento de substância ativa em produto farmacêutico é recomendado um intervalo de exatidão de no mínimo 80% a 120% da concentração nominal da solução teste.

Para demonstrar a repetibilidade do sistema para quantificação dos enantiômeros l-hiosciamina e d-hiosciamina em solução pura ou em mistura racêmica, o teste foi realizado a partir de solução de sulfato de hiosciamina e sulfato de atropina.

O método avaliado para análise enantiosseletiva da atropina apresenta repetibilidade de sistema adequada para a quantificação, com base na resposta de área dos enantiômeros l-hiosciamina e d-hiosciamina (Tabela 16). Para o nível de concentração de 25% da solução de sulfato de hiosciamina, foi desconsiderada uma

injeção, pois o valor de área correspondente foi identificado como “outlier” através do teste de Anderson-Darling.

O RSD obtido para cada nível avaliado é adequado, com base na recomendação de $RSD < 1,5\%$, tipicamente recomendada para doseamento de princípio ativo por cromatografia líquida. Valores maiores de RSD são observados para os níveis de concentração de 25% e 50%. Isto é esperado, em razão da menor área absoluta para os níveis de menor concentração.

O RSD geral obtido para a resposta relativa média também é adequado (menor que 1,5%). A diferença observada entre a resposta relativa dos níveis não é analiticamente significativa.

O método avaliado apresenta repetibilidade do sistema adequada para a quantificação, com base na resposta de área, na faixa de concentração de 5,0 $\mu\text{g/mL}$ a 26,0 $\mu\text{g/mL}$. Esta faixa corresponde à concentração total dos enantiômeros, em mistura racêmica ou em solução do enantiômero l-hiosciamina.

A precisão intermediária do método é adequada para análise de produto farmacêutico na apresentação de solução oftálmica contendo sulfato de atropina a 1% e 0,5%, conforme resultados apresentados nas Tabelas 17 e 18. O produto farmacêutico analisado é fabricado a partir da mistura racêmica dos enantiômeros l-hiosciamina e d-hiosciamina e as amostras foram preparadas para obter soluções teste de concentração total de enantiômeros de 20,0 $\mu\text{g/mL}$. Desse modo, espera-se que metade da dosagem total declarada pelo fabricante seja do enantiômero ativo l-hiosciamina.

Vale ressaltar que o doseamento do produto foi feito com base na padronização externa, empregando padrão primário de sulfato de hiosciamina, que é o enantiômero ativo da atropina. O enantiômero d-hiosciamina não foi encontrado no

comércio em sua forma pura para ser usado na quantificação direta deste enantiômero em produtos farmacêuticos. Assim, durante os testes de validação, o padrão de sulfato de hiosciamina foi utilizado para a quantificação do enantiômero l-hiosciamina e para estimar a quantidade de d-hiosciamina, através da comparação da resposta de área. A discussão que se segue está focalizada nos resultados obtidos para o enantiômero l-hiosciamina. A concentração média deste fármaco no produto foi comprovada para as duas apresentações de solução oftálmica estudadas, nos três dias de análise.

A análise estatística da precisão intermediária (Apêndice A, item 8.1.3) mostra que há diferença estatisticamente significativa nos resultados médios de teor do fármaco nas soluções oftálmicas de 1% e 0,5% (valor “p” < 0,05 da ANOVA). A diferença entre os níveis demonstrada na análise de variância (ANOVA) está relacionada à reduzida variabilidade de cada dia de análise. Como o desvio padrão relativo de cada dia é muito baixo (por exemplo, $RSD \leq 0,5\%$), ao comparar as concentrações médias, com diferença analiticamente não significativa, o teste de ANOVA resulta em diferença estatisticamente significativa.

Para comprovar a repetibilidade do método é recomendado que a variação dos resultados intra-dia apresente $RSD \leq 2,0$. Para comprovar a precisão intermediária do método é recomendado que a variação dos resultados entre dias apresente $RSD \leq 2,5$. Os valores de RSD obtidos para cada dia e o RSD geral estão de acordo com as recomendações. O teste variância mostra que não há diferença estatisticamente significativa entre os valores de RSD obtidos para os diferentes dias de análise. Isto demonstra que o método apresenta repetibilidade e precisão intermediária adequada para a análise de solução oftálmica de sulfato de atropina 1% e 0,5%.

O intervalo de confiança 95% do teor médio do ativo em cada dia de análise está contido na faixa de especificação de 93% a 107%, requerida na Farmacopéia Americana (USP 30) para análise de solução oftálmica de sulfato de atropina.

A avaliação conjunta da validação do método mostra que os resultados obtidos para a quantificação do enantiômero d-hiosciamina a partir do padrão de sulfato de hiosciamina representam uma estimativa adequada. Isto porque os cálculos são feitos com base na área dos picos. O planejamento fatorial realizado para avaliar a robustez do método mostra que a resposta de área não sofre variação significativa na faixa de tempo de retenção dos enantiômeros. Isto significa que os enantiômeros têm um fator de resposta semelhante para a faixa de tempo de retenção preconizada pelo método e a resposta do padrão de sulfato de hiosciamina pode ser empregada para estimar a concentração do enantiômero d-hiosciamina.

O método avaliado apresenta precisão intermediária adequada para a quantificação, com base na resposta de área, do enantiômero l-hiosciamina presente em solução oftálmica de sulfato de atropina.

O intervalo de método recomendado para doseamento de substância ativa em produto farmacêutico é de 80% a 120%. As faixas comprovadas através dos testes de linearidade, precisão e exatidão do método estão de acordo com o intervalo preconizado.

Na representação gráfica do intervalo do método (Figura 20), o limite superior da faixa de linearidade está uma unidade menor que o limite superior dos testes de exatidão e precisão, porém isto não compromete a definição do intervalo do método. De acordo com a análise estatística da linearidade (Apêndice A.1), os valores previstos através da equação do modelo ajustado são concordantes com os valores observados. A resposta prevista para o nível de concentração de 130% apresenta

desvio aceitável (menor que 1%), em relação à resposta observada para o nível nominal 100%. Desse modo, pode-se assumir que o método apresenta linearidade satisfatória em faixa concordante com os testes de exatidão e precisão.

A faixa de especificação de 93% a 107% corresponde à recomendação da Farmacopéia Americana (USP 30) para análise de solução oftálmica de sulfato de atropina e foi empregada para avaliação dos resultados durante a validação do método.

O método avaliado apresenta robustez adequada quanto à estabilidade das soluções de sulfato de hiosciamina, sulfato de atropina e solução oftálmica de sulfato de atropina (Tabela 20). Estas soluções são estáveis por até três dias, sob acondicionamento em temperatura ambiente ou em refrigerador (2°C a 8°C). Este período é compatível com o tempo de análise.

Através da análise estatística da estabilidade das soluções (Apêndice A.4), foi observada diferença para a resposta média obtida entre os dias e/ou condições de armazenamento para a solução de sulfato de hiosciamina e para o enantiômero d-hiosciamina da solução oftálmica. A variabilidade da resposta apresenta RSD geral menor do que 1% e não é analiticamente significativa. O teste de variância mostra que não há diferença na variabilidade da resposta, para nenhuma das soluções analisadas.

A robustez do método é também adequada para a quantificação dos enantiômeros l-hiosciamina e d-hiosciamina (Tabela 21), sob pequenas variações na composição da fase móvel e na temperatura da coluna (Tabela 7).

Os gráficos apresentados nas Figuras de n^{os} 21 a 23 mostram que os fatores avaliados têm efeito significativo sob a retenção, a resolução e a seletividade. Contudo, nos níveis de variação estudados, não há efeito significativo sobre a

quantificação dos enantiômeros l-hiosciamina e d-hiosciamina em solução contendo mistura racêmica. Isto assegura a robustez do método para análise do produto farmacêutico solução oftálmica 1% e 0,5%, sob as condições estudadas durante a validação.

É notável a influência que o fator pH causa sobre a retenção dos enantiômeros. A análise estatística mostra um efeito positivo, ou seja, a retenção é aumentada com o aumento do pH. Este efeito é esperado em análises cromatográficas para separação de compostos amínicos e já foi demonstrado na literatura para separação de atropina (BRETON et al, 2005). Para uso do método em análises de rotina é desejado que os enantiômeros eluam com menor retenção para não prolongar o tempo de análise.

O fator pH tem efeito positivo também sobre a separação, em especial sobre a seletividade. Isto indica que o reconhecimento quiral inclui centros quirais e não quirais sobre a proteína AGP da fase estacionária, como já descrito previamente (CECCATO; HEBERT; CROMMEN, 1997; NYSTRÖM; KARLSSON, 1997). A análise conjunta do efeito do pH sobre a retenção e a seletividade indica que, com a maior retenção, pode ocorrer maior discriminação dos enantiômeros pela fase estacionária quiral α -1-glicoproteína ácida.

Dentre todos os fatores avaliados, a temperatura da coluna é o que causa maior efeito negativo sobre a separação dos enantiômeros da atropina. Isto indica que a cinética da separação dos enantiômeros através da base protéica da fase estacionária é bastante perturbada com a alteração da temperatura em apenas 2 °C. Como consequência, faz-se necessário o controle rígido da temperatura do sistema. No geral, os cromatógrafos a líquido apresentam controle de temperatura do compartimento de coluna com exatidão e precisão adequadas, na ordem de 1 °C. Os

resultados obtidos mostram que não é adequado usar sistemas cromatográficos sem controle de temperatura, para a separação dos enantiômeros da atropina, utilizando o método validado.

A comparação dos resultados obtidos para os parâmetros de separação mostra que a resolução é mais afetada pela variação dos fatores do que a seletividade. A razão disto pode ser porque no cálculo da resolução está embutido o valor de altura dos picos, que é afetado pela retenção. Somando-se a isto, os resultados de resolução podem ter sofrido influência da co-variação da eficiência da coluna, ao longo do período de teste da robustez.

No teste de robustez, a seletividade variou de 1,15 a 1,17. Esta variação não é analiticamente significativa, porém, por apresentar variância intra-ensaio praticamente nula, da ordem de 10^{-7} (altamente reprodutível!), faz com que seja estatisticamente significativa.

O uso do planejamento fatorial empregado para avaliar a robustez do método requer cautela na avaliação dos resultados, pois o efeito calculado para cada fator está confundido com outras 15 interações de diferentes ordens. Se consideradas somente as interações de ordem dois, o efeito calculado para cada fator está confundido com três pares de interação. Os resultados obtidos na análise estatística podem ser justificados com base na avaliação de parâmetros técnicos da metodologia analítica. Isto mostra que o planejamento experimental delineado é adequado para demonstrar a robustez do método.

Conforme mostrado no teste de robustez, o controle do pH é imprescindível para se obter a eluição dos enantiômeros em faixa adequada. Recomenda-se fortemente que o pH da fase móvel seja de $7,0 \pm 0,05$. Esta faixa é mais estreita do

que a avaliada na robustez, para melhor assegurar a obtenção do tempo de retenção desejado.

Os valores dos parâmetros estabelecidos para testar a adequabilidade do sistema (Tabela 22) são resultantes do estudo de robustez, conforme recomendado na literatura (VANDER HEYDEN et al., 1999), e dos demais testes de validação do método. Os valores recomendados para o tempo de retenção, fator de capacidade, fator de cauda, número de pratos teóricos, RSD, fator de resposta, fator de resolução e seletividade são considerados adequados para análise cromatográfica dos enantiômeros da atropina.

O método validado para quantificação dos enantiômeros l-hiosciamina e d-hiosciamina em solução oftálmica de sulfato de atropina pode potencialmente ser empregado para outras formas farmacêuticas, tais como solução injetável de sulfato de atropina ou medicamentos contendo apenas hiosciamina. Para avaliar a aplicabilidade do método, recomenda-se primeiramente realizar testes para avaliar o efeito da matriz sobre o cromatograma e depois avaliar a recuperação do analito da matriz da forma farmacêutica. Se forem obtidos resultados satisfatórios para estes testes, muito provavelmente o método poderá ser empregado com sucesso. Durante a validação foram analisadas amostras de sulfato de atropina injetável e foram obtidos resultados satisfatórios para o doseamento dos enantiômeros. Esta forma farmacêutica tem comercialização restrita, por ser de uso hospitalar e não foi possível adquirir amostras a tempo de se realizar os testes de validação.

Também foram realizados testes para produtos farmacêuticos na apresentação de solução oral e comprimidos contendo atropina, hiosciamina ou extrato de belladona. Nestas formas farmacêuticas os enantiômeros estão associados a outras substâncias ativas, em concentração relativamente mais

elevada (exemplo: presença de dipirona sódica em concentração até 2.500 vezes maior), fazendo com que haja interferência na resposta dos enantiômeros l-hiosciamina e d-hiosciamina. Para empregar o método para estas formulações é necessário desenvolver procedimentos especiais de preparação da amostra, tais como, técnicas de extração em fase sólida, para pré-separação dos interferentes e concentração dos analitos.

7 CONCLUSÕES

A capacidade de separação dos enantiômeros da atropina empregando cromatografia líquida de alta eficiência com fase estacionária quiral é facilmente encontrada na literatura (ARVIDSSON; JANSSON; SCHILL, 1990; BRETON ET AL., 2005; HELDIN; HUYNH; PETTERSSON, 1992; SCHILL; WAINER; BARKAN, 1986; SZÁSZ; BUDVÁRI-BÁRÁNY; GYIMESI-FORRÁS, 1999). O estudo da atropina é bastante atrativo, pois este fármaco faz parte de importante classe de composto – os alcalóides. Contudo, na literatura pesquisada, os estudos não focalizam o uso de metodologias para análise dos enantiômeros l-hiosciamina e d-hiosciamina, como procedimento de rotina em laboratórios de controle de qualidade de medicamentos.

A atropina é geralmente comercializada como sulfato de atropina. No Brasil, está presente em produtos farmacêuticos não associados, na apresentação de solução injetável e solução oftálmica. Já a hiosciamina, o enantiômero ativo da atropina, está disponível apenas em associações, nas formas farmacêuticas de comprimidos e solução oral.

Neste trabalho foi apresentado método satisfatoriamente validado para análise dos enantiômeros da atropina em solução oftálmica, empregando a cromatografia líquida de alta eficiência com a fase estacionária quiral Chiral AGP®. Também foi desenvolvido método usando a coluna Chiralcel OD®, para a separação dos enantiômeros da atropina.

Os estudos realizados mostram que o doseamento dos enantiômeros l-hiosciamina e d-hiosciamina, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com

as fases estacionárias quirais Chiralcel OD® e Chiral AGP®, é possível e viável para ser empregado na rotina de controle de qualidade de medicamentos.

Quando empregada a coluna Chiralcel OD®, o modificador orgânico metanol é imprescindível para obter uma separação adequada entre os enantiômeros d-hiosciamina e l-hiosciamina (nesta ordem). O uso do metanol é limitado, pois, em proporções elevadas (maior que 15%), não é miscível com o hexano. A adição de isopropanol aumenta a solubilidade do metanol em hexano e por outro lado, diminui o fator de separação entre a d-hiosciamina e a l-hiosciamina.

A adição de dietilamina (DEA) à fase móvel, em concentração maior do que 0,125% altera significativamente o perfil do espectro da hiosciamina.

Nos testes preliminares de validação foram obtidos resultados satisfatórios, empregando a coluna Chiralcel OD® (250 X 4,6 mm, 10 µm), a 24°C, com vazão de 1,1 mL/min, fase móvel composta por hexano-metanol-isopropanol-dietilamina-ácido acético (75+15+10+0,1+0,02 v+v%) e detecção UV em 214 nm.). Os picos possuem retenção e separação adequadas, porém apresentam cauda (aceitável, mas não desejável), que interfere na quantificação com base na resposta de área. Desse modo, os resultados foram avaliados com base na resposta de altura.

A presença de cauda em picos cromatográficos está intimamente relacionada à fase estacionária. Em análise enantiosseletiva, a fase estacionária é o fator mais importante do método, podendo ser maior a sua contribuição para a boa forma do pico. Para melhorar este aspecto da metodologia empregada, uma mudança na fase estacionária pode ser promissora. O uso de uma coluna Chiralcel OD®, com partículas de 10 µm, igual à empregada nos testes, porém nova ou de outro lote, já pode ser suficiente para que sejam obtidos picos mais simétricos, com fator de cauda mais adequado.

Os testes preliminares de validação mostram que o uso da coluna Chiralcel OD® com partículas de 5 µm, seja a condição imprescindível para obter melhor separação dos enantiômeros d-hiosciamina e l-hiosciamina, presentes ou não em mistura racêmica.

Por razões de disponibilidade de material (fase estacionária apropriada) e maior viabilidade para uso rotineiro em laboratórios de controle de qualidade (menor custo: 99% de água na fase móvel), a validação do método foi focalizada usando a fase estacionária Chiral AGP®.

A separação de l-hiosciamina e d-hiosciamina (nesta ordem) com a coluna Chiral-AGP®, com partículas de 5 µm e dimensão de 100 x 4,0 mm, não é completa. Mas a revisão da literatura (BRETON et al., 2005), indica que esta é uma limitação inerente deste tipo de fase estacionária (mesmo usando coluna com maior eficiência, 150 x 2 mm), para a separação dos enantiômeros da atropina.

A avaliação pormenorizada da linearidade do método mostra que apenas o coeficiente de correlação (usualmente empregado para comprovar linearidade) não é, necessariamente, suficiente para assegurar que uma dada metodologia analítica dá origem a respostas proporcionais para uma faixa de concentração pré-estabelecida. É necessário avaliar outros parâmetros analíticos (por exemplo: modo de integração) e estatísticos (por exemplo: significância do intercepto, falta de ajuste dos dados ao modelo linear, resposta relativa, desvios e resíduos) para que, em conjunto com o coeficiente de correlação, a linearidade do método seja garantida.

Para emprego de método utilizando a coluna Chiral AGP®, a quantificação deve ser feita com base na resposta de área dos picos dos enantiômeros. Os resultados obtidos na validação mostram que a área desconsiderada dos picos de l-

hiosciamina e d-hiosciamina, devido à região de coeluição, não compromete a quantificação.

Em testes preliminares da validação do método foi constatado que a integração com base na altura não é adequada para a coluna Chiral AGP®. Na faixa de concentração avaliada, usual em cromatografia líquida (de 12,5 µg/mL a 75,0 µg/mL), foi observada dependência da retenção e da seletividade com a massa injetada de analito na coluna. Devido à variação da retenção, há variação da altura, sendo maiores os picos menos retidos. Nas condições avaliadas, foi observado que, quanto menor a concentração, maior foi a retenção e a altura obtida foi menor do que a esperada. Esta variação na resposta de altura leva a erros significativos para a análise quantitativa dos enantiômeros l-hiosciamina e d-hiosciamina. Com base nestes resultados, durante os testes de validação do método com a coluna Chiral AGP®, a faixa de linearidade avaliada foi restringida para concentrações entre 5,0 µg/mL a 30,0 µg/mL.

Nos estudos com as fases estacionárias quirais Chiralcel OD® e Chiral AGP® também foi avaliada a separação dos enantiômeros da homatropina, que é um análogo sintético da atropina. Para ambos os métodos selecionados, foram obtidos valores adequados de retenção e seletividade dos enantiômeros da homatropina. Contudo, os métodos não são seletivos para distinguir as quatro formas enantioméricas da atropina e da homatropina, em um mesmo cromatograma. Os cromatogramas apresentam pelo menos uma região de coeluição entre os enantiômeros da atropina e de seu análogo. Este fato não interfere na quantificação dos enantiômeros l-hiosciamina e d-hiosciamina, pois o método validado, não requer padrão interno.

Foram obtidos resultados satisfatórios para a validação do método empregando a coluna Chiral AGP® (100 x 4,0 mm, 5 µm), a 20°C, fase móvel composta por solução tampão fosfato (contendo 10 mM de 1-octanosulfonato de sódio e 7,5 mM de trietilamina, pH 7,0) e acetonitrila (99:1 v/v), vazão de 0,6 mL/min e detecção UV 205 nm. Os testes realizados durante a validação foram: especificidade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, exatidão, precisão (repetibilidade do sistema, repetibilidade do método e precisão intermediária), intervalo e robustez (estabilidade das soluções e planejamento fatorial para variações na fase móvel e no sistema). Os resultados demonstram que o método é confiável e reproduzível para a quantificação dos enantiômeros l-hiosciamina e d-hiosciamina em produto farmacêutico, sob a forma de solução oftálmica contendo sulfato de atropina 1% e 0,5%.

Durante o período da pesquisa foram feitas cerca de 2.000 injeções com a coluna Chiral AGP®, indicando boa estabilidade desta fase estacionária quiral. Considerando o tempo de corrida de 15 minutos por injeção, os solventes, reagentes e condições analíticas utilizados, o custo de uma análise empregando o método validado pode ser estimado.

O método apresenta potencial de aplicação para outras formas farmacêuticas, como solução injetável de sulfato de atropina e medicamentos contendo hiosciamina não associada. O método foi aplicado para análise de produtos contendo atropina e/ou hiosciamina em associações. Porém, devido à presença outros fármacos em concentrações muito mais elevadas (até 2800 vezes mais!) houve interferência da matriz. O emprego do método em medicamentos contendo associações, pode ser possível, se desenvolvidos procedimentos especiais de preparação de amostra, tais como extração em fase sólida (LANÇAS,

2004). Para o propósito de quantificação dos produtos de decomposição da atropina (ex.: ácido trópico, ácido atrópico e apoatropina) e substâncias relacionadas (ex.: noratropina, escopolamina e litorina), outros métodos são recomendados na literatura (KIRCHHOFF et al., 2004).

Os estudos realizados com a coluna Chiralcel OD® podem resolver a falta do enantiômero d-hiosciamina na forma pura. Fases estacionárias do tipo carboidrato são bastante empregadas em cromatografia preparativa. Com a coluna Chiralcel OD® foi obtida separação completa ($\alpha \approx 1,5$) e o enantiômero d-hiosciamina é o primeiro a ser eluído. Fazendo-se um “up scale” adequado das condições analíticas, o enantiômero d-hiosciamina pode ser isolado a partir da matéria-prima sulfato de atropina.

Um terceiro tipo de fase estacionária quiral foi avaliado, a coluna tipo protéica Ultron ES-OVM®. Nos cromatogramas obtidos com esta coluna não houve separação adequada ou promissora dos enantiômeros l-hiosciamina e d-hiosciamina. Os testes com a coluna Ultron ES-OVM® foram descontinuados.

As ferramentas estatísticas foram extensamente empregadas durante toda a pesquisa: ANOVA, teste variância, construção de modelos empíricos, planejamento fatorial, etc. O uso da estatística deve ser condição primeira em toda a pesquisa para desenvolvimento e validação de metodologias analíticas. Para que os resultados possam ser adequadamente avaliados, os experimentos para obtê-los devem ser bem planejados. O tratamento de um dado duvidoso em sua obtenção leva à conclusão errônea e não confiável.

Em alguns tratamentos estatísticos, foi observado que o que é estatisticamente significativo pode não ser analiticamente significativo. Isto mostra a importância de o profissional farmacêutico ter o conhecimento da quimiometria e o

domínio da instrumentação e dos fundamentos da química analítica, sem deixar de focalizar a finalidade de aplicação para análise de medicamentos.

Ao longo deste trabalho houve dificuldade de se reproduzir resultados de literatura, usando as mesmas condições cromatográficas, tanto para a coluna Chiralcel OD®, quanto para a Chiral AGP®. Fases estacionárias normalmente apresentam diferenças entre lotes de mesmo fabricante e até entre séries diferentes de um mesmo lote. A construção de uma coluna é um processo individual que pode resultar nas variabilidades relatadas neste trabalho. “Na prática, a teoria é diferente”. E, quando o que se pratica é a quiralidade, a teoria é bastante diferente.

A disponibilidade de metodologias analíticas enantiosseletivas é muito importante no controle de qualidade de produtos farmacêuticos e pode ser considerada etapa inicial da produção de medicamentos contendo somente o princípio ativo usado na terapêutica.

REFERÊNCIAS *

AMANLOU, M.; ASMARDI, G.; ANDALIBI, P.; JAVADI, N.; KHODADADY, F.; OMARNY, Z.B. Determination of tropicamide in pharmaceutical formulations using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography, A*, v.1088, p.136-139, 2005.

ARVIDSON, E.; JANSSON, S.O.; SCHILL, G. Chiral separations of atropine and homatropine on an α -1-acid-glycoprotein-bonded stationary phase. *Journal of Chromatography, A*, v.506, p.579-591, 1990.

ARVIDSSON, E.; JANSSON, S.O.; SCHILL, G. Retention processes on α -1-acid glycoprotein-bonded stationary phase. *Journal of Chromatography, A*, v.591, p.55-63, 1992.

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.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. *Resolução n.899, de 29 de maio de 2003*. O Adjunto da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos", fica revogada a Resolução RE n.475, de 19 de março de 2002. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word=>. Acesso em: 03 mar. 2007.

BRETON, D.; BURET, D.; CLAIR, P.; LAFOSSE, M. Chiral separation of atropine by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography, A*, v.1088, p.104-109, 2005.

CECCATO, A.; HEBERT, Ph.; CROMMEN, J. Direct liquid chromatographic enantioseparation of sotalol and other β -blockers using an α 1-acid glycoprotein-based chiral stationary phase. *Journal of Chromatography, A*, v.760, p.193-203, 1997.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CEYHAN, T.; KARTAL, M.; ALTUN, M.L.; TÜLEMIS, F.; CEVHEROGLU, S. LC determination of atropine sulfate and scopolamine hydrobromide in pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.25, p.399-406, 2001.

CHUA, W.H.; CHAN, Y.H.; QUAH, B.L. Atropine for the treatment of childhood myopia. *Ophthalmology*, v.13, p.2285-2291, 2006.

CONSULTA REMÉDIOS. *Atropina*. Disponível em: <http://www.consultaremedios.com.br/cr.php?uf=SP&nome=&substancia=atropina>>. Acesso em: 3 mar. 2007.

CONSULTA REMÉDIOS. *Hiosciamina*. Disponível em: <http://www.consultaremedios.com.br/cr.php?uf=SP&nome=&substancia=hiosciamina>>. Acesso em: 3 mar. 2007.

DEJAEGER, B.; DUMAREY, M.; CAPRON, X.; BLOOMFIELD, M.S.; VANDER HEYDEN, Y. Comparison of Plackett–Burman and supersaturated designs in robustness testing. *Analytica Chimica Acta*, v.595, p.59-71, 2007.

DEJAEGER, B.; VANDER HEYDEN, Y. Ruggedness and robustness testing. *Journal of Chromatography, A*, v.1158, p138-157, 2007.

DELUCIA, R.; OLIVEIRA FILHO, R.M., coord. *Farmacologia integrada*. 2.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2004. 678p.

DUNCAN, G.; COLLISON, D.J. Role of the non-neuronal cholinergic system in the eye: a review. *Life Sciences*, v.72, p.2013-2019, 2003.

EUROPEAN Pharmacopoeia. 5.ed. Strasbourg: Council of Europe, 2004. p.1033-1036, 1778-1780.

FERREIRA, S.L.C.; BRUNS, R.E.; SILVA, E.G.P.; SANTOS, W.N.L.; QUINTELLA, C.M.; DAVID, J.M.; ANDRADE, J.B.; BREITKREITZ, M.C.; JARDIM, I.C.S.F.; BARROS NETO, B. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. *Journal of Chromatography, A*, v.1158, p.2-14, 2007.

FITOS, I.; VISY, J.; ZSILA, F.; MÁDY, G.; SIMONYI, M. Selective binding of imatinib to the genetic variants of human α 1-acid glycoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1760, p.1704-1712, 2006.

FITOS, I.; VISY, J.; ZSILA, F.; BIKÁDI, Z.; MÁDY, G.; SIMONYI, M. Specific ligand binding on genetic variants of human α 1-acid glycoprotein studied by circular dichroism spectroscopy. *Biochemical Pharmacology*, v.67, p.679-688, 2004.

GÖREN, A.C.; BILSEL, G.; BILSEL, M.; YENISOY-KARAKAS, S.; KARAKAS, D. Simple high-performance liquid chromatographic method for determination of atropine and obidoxime in a parenteral injection device. *Journal of Chromatography, A*, v.1057, p.237-239, 2004.

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

GRANDE Enciclopédia Larousse Cultural. São Paulo: Plural, [1998?]. p.1705-1706.

HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; GILMAN, A.G., eds. *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 10.ed. New York: McGraw-Hill, 2001. p.155-173.

HEBER, L. *A primer good laboratory practice and current good manufacturing practice*. Waldbronn: Agilent Technologies, 2002. 116p.

HELDIN, E.; HUYNH, N.H.; PETTERSSON, C. (2S,3S)-Dicyclohexyl tartrate as mobile phase additive for the determination of the enantioeric purity of (S)-atropine in tablets. *Journal of Chromatography*, v.592, p.339-343, 1992.

HERMANSSON, J. Direct liquid chromatographic resolution of racemic drugs using α 1-acid glycoprotein as the chiral stationary phase. *Journal of Chromatography*, v.269, p.71-80, 1983.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. *Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos*. Rio de Janeiro, 2003. 36p. (DOQ-CGCRE-008). Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/kits/doqcgcre008r01.pdf>. Acesso em: 3 mar. 2007.

International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registrations of Pharmaceuticals for Human Use. Publications: Guidelines. "Quality" Topics. *Q2(r1) Validation of analytical procedures: text and methodology*. Geneva, 2005. 13p. Disponível em: <http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>. Acesso em: 3 mar. 2007.

KIRCHHOFF, C.; BITAR, Y.; EBEL, S.; HOLZGRABE, U. Analysis of atropine, its degradation products and related substances of natural origin by means of reversed-

phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography, A*, v.1046, p.115-120, 2004.

KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F.F.A.C. *Dicionário terapêutico Guanabara*: 2005-2006. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

KURODA, Y.; SHIBUKAWA, A.; NAKAGAWA, T. The role of branching glycan of human α 1-acid glycoprotein in enantioselective binding to basic drugs as studied by capillary electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, v.268, p.9-14, 1999.

LANÇAS, F.M. *Extração em fase sólida (SPE)*. São Carlos: Rima, 2004. 96p. (Métodos cromatográficos de análise, 4).

MAPIHAN, K.; VIAL, J.; JARDY, A. Reversed-phase liquid chromatography column testing: robustness study of the test. *Journal of Chromatography, A*, v.1061, p.149-158, 2004.

MARINI, R.D.; BOULANGER, B.; VANDER HEYDEN, Y.; CHIAP, P.; CROMMEN, J.; HUBERT, Ph. Uncertainty assessment from robustness testing applied on a LC assay for R-timolol and other related substances in S-timolol maleate. *Analytica Chimica Acta*, v.531, p.131-140, 2005.

MARTINDALE: the complete drug reference. 33.ed. London, Chicago: Pharmaceutical Press, 2002. p.459-463, 469-470.

MERCK index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 10.ed. Rahway: Merck, 1983. p.125,126, 709, 710.

MILLOT, M.C. Separation of drug enantiomers by liquid chromatography and capillary electrophoresis, using immobilized proteins as chiral selectors. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v.797, n.1/2, p.131-159, 2003.

MURAKAMI, H. From racemates to single enantiomers - Chiral synthetic drugs over the last 20 years. *Novel Optical Resolution Technologies Topics in Current Chemistry*, v.269, p.273-299, 2007.

NAMERA, A.; YASHIKI, M.; HIROSE, Y.; YAMAJI, S.; TANI, T.; KOJIMA, T. Quantitative analysis of tropane alkaloids in biological materials by gas chromatography - mass spectrometry. *Forensic Science International*, v.130, n.1, p.34-43, 2002.

NYSTRÖM, A.; KARLSSON, A. Enantiomeric resolution on Chiral-AGP with the aid of experimental design Unusual effects of mobile phase pH and column temperature. *Journal of Chromatography, A*, v.763, p.105-113, 1997.

PRADO, M.S.A. *Determinação de fármacos em formulações farmacêuticas empregando a eletroforese capilar como alternativa à cromatografia líquida de alta eficiência*. São Paulo, 2002. 329p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. *Farmacologia*. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 703p.

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

SAINT PIERRE, L.A.; SENTELL, K.B. Cyclodextrins as enantioselective mobile phase modifiers for chiral capillary electrophoresis: effects of pH and cyclodextrin concentration. *Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications*, v.657, n.2, p.291-300, 1994.

SANTONI, G.; TONSINI, A.; GRATTERI, P.; MURA, P.; FURLANETTO, S.; PINZAUTI, S. Determination of atropine sulphate and benzalkonium chloride in eye drops by HPLC. *International Journal of Pharmaceutics*, v.93, p.239-243, 1993.

SANTORO, M.I.R.M.; CHO, H.S. Aplicação da cromatografia líquida de alta eficiência em fase quiral na análise de medicamentos. *Racine*, v.6, n.30, p.10-12, 1996.

SANTORO, M.I.R.M. Cromatografia líquida em fase quiral: novos rumos no controle de qualidade de medicamentos. *Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo*, v.28, p.1-29, 1992.

SCHILL, G.; WAINER, I.W.; BARKAN, S.A. Chiral separation of cationic and anionic drugs on an α 1-acid glycoprotein-bonded stationary phase (EnantioPac®). II. Influence of mobile phase additives and pH on chiral resolution and retention. *Journal of Chromatography*, v.365, p.73-88, 1986b.

SCHILL, G.; WAINER, I.W.; BARKAN, S.A. Chiral separation of cationic drugs on an α -1-acid glycoprotein bonded stationary phase. *Journal of Liquid Chromatography*, v.9, p.641-666, 1986a.

SCHMUCKER, C.; SCHAEFFEL, F. Contrast sensitivity of wildtype mice wearing diffusers or spectacle lenses, and the effect of atropine. *Vision Research*, v.46, p.678-687, 2006.

SIMMS, P.J.; TOWNE, R.W.; GROSS, C.S.; MILLER, R.E. The separation of ipratropium bromide and its related compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.17, p.841-849, 1998.

SINGH, A.K. *Separação enantiomérica de fármacos em medicamentos por cromatografia líquida com fase estacionária quiral*. São Paulo, 2002. 263p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

SINGH, A.K.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M.; SANTORO, M.I.R.M. Development and validation of a chiral liquid chromatographic method for the determination of atenolol and metoprolol enantiomers in tablet preparations. *Journal of AOAC International*, v.84, p.1724-1729, 2001.

SINGH, S.S.; MEHTA, J. Measurement of drug–protein binding by immobilized human serum albumin-HPLC and comparison with ultrafiltration. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v.834, n.1/2, p.108-116, 2006.

SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J.; CROUCH, S.R. *Fundamentos de química analítica*. 8.ed. São Paulo: Pioneira, Thomson Learning, 2006. 999p.

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

SOLOMONS, T.W.G. *Química orgânica*. 6.ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1996. p.184-230.

SZÁSZ, G.; BUDVÁRI-BÁRÁNY, Z.; GYIMESI-FORRÁS, K. Optimized and validated HPLC methods for compendial quality assessment. IV. Non-chiral and chiral purity tests for solanaceous (Tropane) alkaloids. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v.22, n.5, p.747-759, 1999.

TAHARA, S.; OKAYAMA, A.; KITADA, Y.; WATANABE, T.; NAKAZAWA, H.; KAKEHI, K.; HISAMATU, Y. Enantiomeric separation of atropine in *Scopolia* extract and *Scopolia Rhizome* by capillary electrophoresis using cyclodextrins as chiral selectors. *Journal of Chromatography, A*, v.848, p.465-471, 1999.

UNITED States Pharmacopeia: USP 30. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2007. p.1225, 1464-1467, 2319-2323.

VANDER HEYDEN, Y.; JIMIDAR, M.; HUND, E.; NIEMEIJER, N.; PEETERS, R.; SMEYERS-VERBEKE, J.; MASSART, D.L.; HOOGMARTENS, J. Determination of system suitability limits with a robustness test. *Journal of Chromatography, A*, v.845, p.145-154, 1999.

VANDER HEYDEN, Y.; KHOTS, M.S.; MASSART, D.L. Three-level screening designs for the optimisation or the ruggedness testing of analytical procedures. *Analytica Chimica Acta*, v.276, p189-195, 1993.

ZAREH, M.M.; MALINOWSKA, E. Phosphorated calix[6]arene derivatives as an ionophore for atropine-selective membrane electrodes. *Journal of AOAC International*, v.90, p.147-152, 2007.

ZSILA, F.; IWAO, Y. The drug binding site of human α 1-acid glycoprotein: Insight from induced circular dichroism and electronic absorption spectra. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1770, p.797-809, 2007.

APENDICE

APÊNDICE A – ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados obtidos na validação do método para determinação quantitativa do enantiômero l-hiosciamina, usando a coluna Chiral AGP® está apresentada a seguir.

A.1 Análise estatística da linearidade

Tabela 23 - Respostas do teste de linearidade para sulfato de hiosciamina

Nível	R _{I1}	R _{I2}	Média _{RI}	RSD _{RI}	RR	Média _{RN}	RSD _{RN}	Média _{RRN}	RR _{N100%}	DRR _{N100%}
(%)	(mAU*s)	(mAU*s)	(mAU*s)	(%)	(mAU*s/%)	(mAU*s)	(%)	(mAU*s/%)		(%)
25	228,47025	226,39075	227,431	0,65%	9,0972	226,7951	0,40%	9,0718	0,9948	-0,52%
25	226,43521	225,88408	226,160	0,17%	9,0464					
50	455,68024	454,78729	455,234	0,14%	9,1047	455,6903	0,14%	9,1138	0,9994	-0,06%
50	454,80313	457,49072	456,147	0,42%	9,1229					
75	685,98425	685,47308	685,729	0,05%	9,1430	687,7552	0,42%	9,1701	1,0056	0,56%
75	689,25653	690,30688	689,782	0,11%	9,1971					
100	906,68658	907,50934	907,098	0,06%	9,0710	911,8880	0,74%	9,1189	1,0000	0,00%
100	914,14117	919,21472	916,678	0,39%	9,1668					
125	1139,82141	1136,57312	1138,197	0,20%	9,1056	1136,3122	0,23%	9,0905	0,9969	-0,31%
125	1134,50220	1134,35193	1134,427	0,01%	9,0754					
150	1384,19141	1385,73425	1384,963	0,08%	9,2331	1390,3832	0,55%	9,2692	1,0165	1,65%
150	1397,13843	1394,46875	1395,804	0,14%	9,3054					

Nota: R: resposta, com base na área; I: injeção; RR: Resposta relativa à concentração do nível; N: Nível; D: Desvio.

Quadro 4 - Análise estatística da linearidade para sulfato de hiosciamina

Simple Regression - Área 1 Hiosciamina 25 a 125 vs. Conc 1 Hiosciamina 25 a 125

Regression Analysis - Linear model: $Y = a + b \cdot X$

Dependent variable: Área 1 Hiosciamina 25 a 125

Independent variable: Conc 1 Hiosciamina 25 a 125

Parameter	Estimate	Standard Error	T Statistic	P-Value
Intercept	1,11915	2,81718	0,397259	0,7016
Slope	9,10092	0,0339765	267,86	0,0000

Analysis of Variance with Lack-of-Fit

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	1,03533E6	1	1,03533E6	71748,82	0,0000
Residual	115,44	8	14,43		
Lack-of-Fit	53,0074	3	17,6691	1,42	0,3418
Pure Error	62,4326	5	12,4865		
Total (Corr.)	1,03545E6	9			

Correlation Coefficient = 0,999944

R-squared = 99,9889 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 99,9875 percent

Standard Error of Est. = 3,79868

Durbin-Watson statistic = 2,35397 (P=0,1507)

The equation of the fitted model is

Área 1 Hiosciamina 25 a 125 = 1,11915 + 9,10092*Conc 1 Hiosciamina 25 a 125

(a)

(b)

FIGURA 24 - Gráficos da linearidade para sulfato de hiosciamina.
a) representação da regressão linear; b) resíduos.

Tabela 24 - Respostas da linearidade para l-hiosciamina do sulfato de atropina

Nível	R _{I1}	R _{I2}	Média _{RI}	RSD _{RI}	RR	Média _{RN}	RSD _{RN}	Média _{RRN}	RR _{N100%}	DRR _{N100%}
(%)	(mAU*s)	(mAU*s)	(mAU*s)	(%)	(mAU*s/%)	(mAU*s)	(%)	(mAU*s/%)		(%)
25	118,61034	117,94777	118,279	0,40%	4,7312	118,9101	0,75%	4,7564	1,0021	0,21%
25	119,06750	120,01494	119,541	0,56%	4,7816					
50	234,41180	236,84256	235,627	0,73%	4,7125	235,6067	0,01%	4,7121	0,9928	-0,72%
50	234,85338	236,31908	235,586	0,44%	4,7117					
75	356,25681	356,05841	356,158	0,04%	4,7488	356,4597	0,12%	4,7528	1,0014	0,14%
75	357,85617	355,66748	356,762	0,43%	4,7568					
100	475,11911	474,38141	474,750	0,11%	4,7475	474,6237	0,04%	4,7462	1,0000	0,00%
100	474,39233	474,60184	474,497	0,03%	4,7450					
125	589,64575	590,20007	589,923	0,07%	4,7194	589,6823	0,06%	4,7175	0,9939	-0,61%
125	588,41064	590,47272	589,442	0,25%	4,7155					
150	712,47754	712,66351	712,571	0,02%	4,7505	713,3735	0,16%	4,7558	1,0020	0,20%
150	716,56744	711,78558	714,177	0,47%	4,7612					

Nota: R: resposta, com base na área; I: injeção; RR: Resposta relativa à concentração do nível; N: Nível; D: Desvio.

Quadro 5 - Análise estatística da linearidade para l-hiosciamina do sulfato de atropina

Simple Regression - Área Atropina l H vs. Conc Atropina

Regression Analysis - Linear model: $Y = a + b \cdot X$

Dependent variable: Área Atropina l H

Independent variable: Conc Atropina

Parameter	Estimate	Standard Error	T Statistic	P-Value
Intercept	0,8879	1,11052	0,799533	0,4471
Slope	4,72225	0,0133934	352,58	0,0000

Analysis of Variance with Lack-of-Fit

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	278745,0	1	278745,0	124312,47	0,0000
Residual	17,9384	8	2,2423		
Lack-of-Fit	16,8111	3	5,6037	24,86	0,0020
Pure Error	1,12726	5	0,225451		
Total (Corr.)	278763,0	9			

Correlation Coefficient = 0,999968

R-squared = 99,9936 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 99,9928 percent

Standard Error of Est. = 1,49743

Durbin-Watson statistic = 1,08081 (P=0,0173)

The equation of the fitted model is

Área Atropina l H = 0,8879 + 4,72225*Conc Atropina

(a)

(b)

FIGURA 25 - Gráficos da linearidade para l-hiosciamina do sulfato de atropina. a) representação da regressão linear; b) resíduos.

Tabela 25 - Respostas da linearidade para d-hiosciamina do sulfato de atropina

Nível (%)	R _{I1} (mAU*s)	R _{I2} (mAU*s)	Média _{RI} (mAU*s)	RSD _{RI} (%)	RR (mAU*s/%)	Média _{RN} (mAU*s)	RSD _{RN} (%)	Média _{RRN} (mAU*s/%)	RR _{N100%}	DRR _{N100%} (%)
25	119,20382	118,66168	118,933	0,32%	4,7573	120,3777	1,70%	4,8151	0,9955	-0,45%
25	120,54472	123,10076	121,823	1,48%	4,8729					
50	237,83302	239,89513	238,864	0,61%	4,7773	239,1089	0,14%	4,7822	0,9886	-1,14%
50	239,16899	239,53841	239,354	0,11%	4,7871					
75	364,63736	362,82935	363,733	0,35%	4,8498	363,7973	0,02%	4,8506	1,0028	0,28%
75	364,38251	363,34003	363,861	0,20%	4,8515					
100	484,47421	482,30524	483,390	0,32%	4,8339	483,7092	0,09%	4,8371	1,0000	0,00%
100	484,14417	483,91324	484,029	0,03%	4,8403					
125	603,79895	601,98206	602,891	0,21%	4,8231	603,1604	0,06%	4,8253	0,9976	-0,24%
125	603,63086	603,22955	603,430	0,05%	4,8274					
150	726,07336	728,29626	727,185	0,22%	4,8479	729,3570	0,42%	4,8624	1,0052	0,52%
150	733,94885	729,10968	731,529	0,47%	4,8769					

Nota: R: resposta, com base na área; I: injeção; RR: Resposta relativa à concentração do nível; N: Nível; D: Desvio.

Quadro 6 - Análise estatística da linearidade para d-hiosciamina do sulfato de atropina

Simple Regression - Área Atropina d H vs. Conc Atropina					
Regression Analysis - Linear model: $Y = a + b \cdot X$					
Dependent variable: Área Atropina d H					
Independent variable: Conc Atropina					
Parameter	Estimate	Standard Error	T Statistic	P-Value	
Intercept	-1,01885	1,20016	-0,848929	0,4206	
Slope	4,84066	0,0144745	334,428	0,0000	
Analysis of Variance with Lack-of-Fit					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	292900,0	1	292900,0	111841,97	0,0000
Residual	20,951	8	2,61887		
Lack-of-Fit	16,2973	3	5,43243	5,84	0,0434
Pure Error	4,65371	5	0,930743		
Total (Corr.)	292921,0	9			
Correlation Coefficient = 0,999964					
R-squared = 99,9928 percent					
R-squared (adjusted for d.f.) = 99,992 percent					
Standard Error of Est. = 1,61829					
Durbin-Watson statistic = 2,06546 (P=0,2992)					
The equation of the fitted model is					
Área Atropina d H = -1,01885 + 4,84066*Conc Atropina

(a)

(b)

FIGURA 26 - Gráficos da linearidade para d-hiosciamina do sulfato de atropina. a) representação da regressão linear; b) resíduos.

A.2 Análise estatística da exatidão

Tabela 26 - Respostas da exatidão para a quantificação de l-hiosciamina e d-hiosciamina

Nível %	Recuperação %			
	Solução oftálmica 1%		Solução oftálmica 0,5%	
	l-hiosciamina	d-hiosciamina	l-hiosciamina	d-hiosciamina
70	98,441	98,582	99,914	99,818
70	101,746	101,447	101,062	100,717
70	99,773	101,328	100,897	100,751
100	99,400	99,083	99,988	99,940
100	100,498	100,229	100,803	100,723
100	100,903	101,277	101,200	101,313
130	99,872	100,137	99,872	99,930
130	101,249	101,703	101,249	101,117
130	99,302	99,440	99,302	98,764

(a)

(b)

FIGURA 27 - Gráficos da exatidão para a solução oftálmica 1%.
a) recuperação de l-hiosciamina; b) recuperação de d-hiosciamina.

(a)

(b)

FIGURA 28 - Gráficos da exatidão para a solução oftálmica 0,5%.
a) recuperação de l-hiosciamina; b) recuperação de d-hiosciamina.

Quadro 7 - Análise estatística da exatidão: l-hiosciamina da solução oftálmica 1%

One-Way ANOVA - %Rec C 1% l H Atropina by Nível conc %

Analysis Summary

Dependent variable: %Rec C 1% l H Atropina

Factor: Nível conc %

Number of observations: 9

Number of levels: 3

Summary Statistics for %Rec C 1% l H Atropina

Nível conc %	Count	Average	Variance	Standard deviation	Coeff. of variation
70	3	99,9867	2,765	1,6683	1,66305%
100	3	100,267	0,604773	0,777672	0,775601%
130	3	100,141	1,00197	1,00099	0,999577%
Total	9	100,132	1,10772	1,05248	1,0511%

ANOVA Table for %Rec C 1% l H Atropina by Nível conc %

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,118282	2	0,0591408	0,04	0,9605
Within groups	8,74348	6	1,45725		
Total (Corr.)	8,86177	8			

Table of Means for %Rec C 1% l H Atropina by Nível conc %
with 95,0 percent confidence intervals

Nível conc %	Count	Mean	Std. error (individual)	Lower limit	Upper limit
70	3	99,9867	0,960034	95,856	104,117
100	3	100,267	0,448989	98,3352	102,199
130	3	100,141	0,57792	97,6544	102,628
Total	9	100,132			

Multiple Range Tests for %Rec C 1% l H Atropina by Nível conc %

Method: 95,0 percent LSD

Nível conc % Count Mean Homogeneous Groups

70	3	99,9867	X
130	3	100,141	X
100	3	100,267	X

Contrast	Difference	+/- Limits
70 - 100	-0,280333	2,4118
70 - 130	-0,154333	2,4118
100 - 130	0,126	2,4118

* denotes a statistically significant difference.

Variance Check

Cochran's C test: 0,63247 P-Value = 0,405234

Bartlett's test: 1,22693 P-Value = 0,605327

Hartley's test: 4,57196

Levene's test: 0,489677 P-Value = 0,635342

Quadro 8 - Análise estatística da exatidão: d-hiosciamina da solução oftálmica 1%

One-Way ANOVA - %Rec C 1% d H Atropina by Nível conc %

Analysis Summary

Dependent variable: %Rec C 1% d H Atropina

Factor: Nível conc %

Number of observations: 9

Number of levels: 3

Summary Statistics for %Rec C 1% d H Atropina

Nível conc %	Count	Average	Variance	Standard deviation	Coeff. of variation
70	3	100,452	2,62715	1,62085	1,61355%
100	3	100,196	1,20421	1,09736	1,09521%
130	3	100,427	1,34322	1,15897	1,15405%
Total	9	100,358	1,30855	1,14392	1,13983%

ANOVA Table for %Rec C 1% d H Atropina by Nível conc %

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,119248	2	0,0596241	0,03	0,9662
Within groups	10,3492	6	1,72486		
Total (Corr.)	10,4684	8			

Table of Means for %Rec C 1% d H Atropina by Nível conc %
with 95,0 percent confidence intervals

Nível conc %	Count	Mean	Std. error (individual)	Lower limit	Upper limit
70	3	100,452	0,935797	96,4259	104,479
100	3	100,196	0,633564	97,4703	102,922
130	3	100,427	0,669134	97,5476	103,306
Total	9	100,358			

Multiple Range Tests for %Rec C 1% d H Atropina by Nível conc %

Method: 95,0 percent LSD

Nível conc %	Count	Mean	Homogeneous Groups	
100	3	100,196	X	
130	3	100,427	X	
70	3	100,452	X	
Contrast			Difference	+/- Limits
70 - 100			0,256	2,62392
70 - 130			0,0256667	2,62392
100 - 130			-0,230333	2,62392

* denotes a statistically significant difference.

Variance Check

Cochran's C test: 0,507703 P-Value = 0,727068

Bartlett's test: 1,0649 P-Value = 0,856976

Hartley's test: 2,18164

Levene's test: 0,0397371 P-Value = 0,961293

Quadro 9 - Análise estatística da exatidão: l-hiosciamina da solução oftálmica 0,5%

One-Way ANOVA - %Rec C 05% l H Atropina by Nível conc %

Analysis Summary

Dependent variable: %Rec C 05% l H Atropina

Factor: Nível conc %

Number of observations: 9

Number of levels: 3

Summary Statistics for %Rec C 05% l H Atropina

Nível conc %	Count	Average	Variance	Standard deviation	Coeff. of variation
70	3	100,624	0,385236	0,620674	0,616823%
100	3	100,664	0,381796	0,617897	0,613823%
130	3	100,141	1,00197	1,00099	0,999577%
Total	9	100,476	0,505794	0,711192	0,70782%

ANOVA Table for %Rec C 05% l H Atropina by Nível conc %

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,508339	2	0,254169	0,43	0,6685
Within groups	3,53801	6	0,589669		
Total (Corr.)	4,04635	8			

Table of Means for %Rec C 05% l H Atropina by Nível conc %
with 95,0 percent confidence intervals

Nível conc %	Count	Mean	Std. error (individual)	Lower limit	Upper limit
70	3	100,624	0,358346	99,0825	102,166
100	3	100,664	0,356743	99,1287	102,199
130	3	100,141	0,57792	97,6544	102,628
Total	9	100,476			

Multiple Range Tests for %Rec C 05% l H Atropina by Nível conc %

Method: 95,0 percent LSD

Nível conc %	Count	Mean	Homogeneous Groups
130	3	100,141	X
70	3	100,624	X
100	3	100,664	X

Contrast	Difference	+/- Limits
70 - 100	-0,0393333	1,53419
70 - 130	0,483333	1,53419
100 - 130	0,522667	1,53419

* denotes a statistically significant difference.

Variance Check

Cochran's C test: 0,566405 P-Value = 0,564014

Bartlett's test: 1,11636 P-Value = 0,763248

Hartley's test: 2,62437

Levene's test: 0,213817 P-Value = 0,813393

Quadro 10 - Análise estatística da exatidão: d-hiosciamina da solução oftálmica 0,5%

One-Way ANOVA - %Rec C 05% d H Atropina by Nível conc %

Analysis Summary

Dependent variable: %Rec C 05% d H Atropina
Factor: Nível conc %

Number of observations: 9
Number of levels: 3

Summary Statistics for %Rec C 05% d H Atropina

Nível conc %	Count	Average	Variance	Standard deviation	Coeff. of variation
70	3	100,429	0,279974	0,529126	0,526868%
100	3	100,659	0,474386	0,688757	0,68425%
130	3	99,937	1,38419	1,17652	1,17726%
Total	9	100,341	0,636567	0,797852	0,795137%

ANOVA Table for %Rec C 05% d H Atropina by Nível conc %

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,815439	2	0,407719	0,57	0,5924
Within groups	4,2771	6	0,71285		
Total (Corr.)	5,09254	8			

Table of Means for %Rec C 05% d H Atropina by Nível conc %
with 95,0 percent confidence intervals

Nível conc %	Count	Mean	Std. error (individual)	Lower limit	Upper limit
70	3	100,429	0,305491	99,1142	101,743
100	3	100,659	0,397654	98,9477	102,37
130	3	99,937	0,679262	97,0144	102,86
Total	9	100,341			

Multiple Range Tests for %Rec C 05% d H Atropina by Nível conc %

Method: 95,0 percent LSD

Nível conc %	Count	Mean	Homogeneous Groups
130	3	99,937	X
70	3	100,429	X
100	3	100,659	X

Contrast	Difference	+/- Limits
70 - 100	-0,23	1,68684
70 - 130	0,491667	1,68684
100 - 130	0,721667	1,68684

* denotes a statistically significant difference.

Variance Check

Cochran's C test: 0,647256 P-Value = 0,373285
Bartlett's test: 1,25367 P-Value = 0,574124
Hartley's test: 4,94399
Levene's test: 0,595382 P-Value = 0,580936

A.3 Análise estatística da precisão intermediária

Tabela 27 - Respostas de precisão intermediária para a quantificação de l-hiosciamina e d-hiosciamina

Dia de análise	Concentração no produto (mg/mL)			
	Solução oftálmica 1%		Solução oftálmica 0,5%	
	l-hiosciamina	d-hiosciamina	l-hiosciamina	d-hiosciamina
I	5,022	5,090	2,543	2,573
I	4,993	5,043	2,548	2,577
I	5,000	5,087	2,536	2,564
I	5,036	5,117	2,539	2,564
I	4,997	5,071	2,533	2,576
I	5,005	5,065	2,548	2,592
II	4,905	5,089	2,502	2,551
II	4,935	5,011	2,517	2,550
II	4,965	5,028	2,528	2,571
II	4,920	5,007	2,522	2,557
II	4,941	4,989	2,528	2,611
II	4,918	4,981	2,520	2,555
III	4,999	5,001	2,558	2,581
III	4,984	4,998	2,556	2,570
III	5,057	5,077	2,569	2,589
III	5,037	5,067	2,584	2,596
III	5,011	5,021	2,577	2,597
III	5,000	5,018	2,561	2,584

FIGURA 29 - Gráficos da precisão intermediária para solução oftálmica 1%.
a) quantificação de l-hiosciamina; b) quantificação de d-hiosciamina.

FIGURA 30 - Gráficos da precisão intermediária para solução oftálmica 0,5%.
a) quantificação de l-hiosciamina; b) quantificação de d-hiosciamina.

Quadro 11 - Análise estatística da precisão intermediária: l-hiosciamina na solução oftálmica 1%

One-Way ANOVA - Conc C 1% l H by Dia Análise

Analysis Summary

Dependent variable: Conc C 1% l H
Factor: Dia Análise

Number of observations: 18
Number of levels: 3

Summary Statistics for Conc C 1% l H

Dia Análise	Count	Average	Variance	Standard deviation	Coeff. of variation
I	6	5,00883	0,000278967	0,0167023	0,333457%
II	6	4,93067	0,000447467	0,0211534	0,429017%
III	6	5,01467	0,000741067	0,0272225	0,542858%
Total	18	4,98472	0,00198457	0,0445485	0,8937%

ANOVA Table for Conc C 1% l H by Dia Análise

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,0264001	2	0,0132001	26,98	0,0000
Within groups	0,0073375	15	0,000489167		
Total (Corr.)	0,0337376	17			

Table of Means for Conc C 1% l H by Dia Análise
with 95,0 percent confidence intervals

Dia Análise	Count	Mean	Std. error (individual)	Lower limit	Upper limit
I	6	5,00883	0,00681868	4,99131	5,02636
II	6	4,93067	0,00863584	4,90847	4,95287
III	6	5,01467	0,0111136	4,9861	5,04324
Total	18	4,98472			

Multiple Range Tests for Conc C 1% l H by Dia Análise

Method: 95,0 percent LSD

Dia Análise	Count	Mean	Homogeneous Groups
II	6	4,93067	X
I	6	5,00883	X
III	6	5,01467	X

Contrast	Difference	+/- Limits
I - II	*0,0781667	0,0272172
I - III	-0,00583333	0,0272172
II - III	*-0,084	0,0272172

* denotes a statistically significant difference.

Variance Check

Cochran's C test: 0,504986 P-Value = 0,473446
Bartlett's test: 1,0816 P-Value = 0,582581
Hartley's test: 2,65647
Levene's test: 0,473001 P-Value = 0,632114

Quadro 12 - Análise estatística da precisão intermediária: d-hiosciamina na solução oftálmica 1%

One-Way ANOVA - Conc C 1% d H by Dia Análise

Analysis Summary

Dependent variable: Conc C 1% d H
Factor: Dia Análise

Number of observations: 18
Number of levels: 3

Summary Statistics for Conc C 1% d H

Dia Análise	Count	Average	Variance	Standard deviation	Coeff. of variation
I	6	5,07883	0,000636967	0,0252382	0,496929
II	6	5,0175	0,0015039	0,0387801	0,772898
III	6	5,03033	0,00113347	0,033667	0,66928
Total	18	5,04222	0,00170171	0,0412518	0,818128

ANOVA Table for Conc C 1% d H by Dia Análise

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,0125574	2	0,00627872	5,75	0,0140
Within groups	0,0163717	15	0,00109144		
Total (Corr.)	0,0289291	17			

Table of Means for Conc C 1% d H by Dia Análise
with 95,0 percent confidence intervals

Dia Análise	Count	Mean	Std. error (individual)	Lower limit	Upper limit
I	6	5,07883	0,0103035	5,05235	5,10532
II	6	5,0175	0,0158319	4,9768	5,0582
III	6	5,03033	0,0137445	4,995	5,06566
Total	18	5,04222			

Multiple Range Tests for Conc C 1% d H by Dia Análise

Method: 95,0 percent LSD

Dia Análise	Count	Mean	Homogeneous Groups
II	6	5,0175	X
III	6	5,03033	X
I	6	5,07883	X

Contrast	Difference	+/- Limits
I - II	*0,0613333	0,0406552
I - III	*0,0485	0,0406552
II - III	-0,0128333	0,0406552

* denotes a statistically significant difference.

Variance Check

Cochran's C test: 0,4593 P-Value = 0,666998
Bartlett's test: 1,06191 P-Value = 0,661181
Hartley's test: 2,36103
Levene's test: 0,126997 P-Value = 0,881673

Quadro 13 - Análise estatística da precisão intermediária: l-hiosciamina na solução oftálmica 0,5%

One-Way ANOVA - Conc C 05% l H by Dia Análise

Analysis Summary

Dependent variable: Conc C 05% l H

Factor: Dia Análise

Number of observations: 18

Number of levels: 3

Summary Statistics for Conc C 05% l H

Dia Análise	Count	Average	Variance	Standard deviation	Coeff. of variation
I	6	2,54117	0,0000389667	0,00624233	0,245648%
II	6	2,5195	0,0000927	0,00962808	0,382143%
III	6	2,5675	0,0001259	0,0112205	0,437021%
Total	18	2,54272	0,000483624	0,0219915	0,864878%

ANOVA Table for Conc C 05% l H by Dia Análise

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,00693378	2	0,00346689	40,38	0,0000
Within groups	0,00128783	15	0,0000858556		
Total (Corr.)	0,00822161	17			

Table of Means for Conc C 05% l H by Dia Análise
with 95,0 percent confidence intervals

Dia Análise	Count	Mean	Std. error (individual)	Lower limit	Upper limit
I	6	2,54117	0,00254842	2,53462	2,54772
II	6	2,5195	0,00393065	2,5094	2,5296
III	6	2,5675	0,00458076	2,55572	2,57928
Total	18	2,54272			

Multiple Range Tests for Conc C 05% l H by Dia Análise

Method: 95,0 percent LSD

Dia Análise	Count	Mean	Homogeneous Groups
II	6	2,5195	X
I	6	2,54117	X
III	6	2,5675	X

Contrast	Difference	+/- Limits
I - II	*0,0216667	0,0114025
I - III	*-0,0263333	0,0114025
II - III	*-0,048	0,0114025

* denotes a statistically significant difference.

Variance Check

Cochran's C test: 0,488805 P-Value = 0,537337

Bartlett's test: 1,11644 P-Value = 0,468296

Hartley's test: 3,23097

Levene's test: 0,886427 P-Value = 0,432646

Quadro 14 - Análise estatística da precisão intermediária: d-hiosciamina na solução oftálmica 0,5%

One-Way ANOVA - Conc C 05% d H by Dia Análise

Analysis Summary

Dependent variable: Conc C 05% d H

Factor: Dia Análise

Number of observations: 18

Number of levels: 3

Summary Statistics for Conc C 05% d H

Dia Análise	Count	Average	Variance	Standard deviation	Coeff. of variation
I	6	2,57433	0,000107467	0,0103666	0,402691%
II	6	2,56583	0,000546567	0,0233788	0,9111157%
III	6	2,58617	0,000102967	0,0101472	0,392366%
Total	18	2,57544	0,000296261	0,0172122	0,668321%

ANOVA Table for Conc C 05% d H by Dia Análise

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,00125144	2	0,000625722	2,48	0,1174
Within groups	0,003785	15	0,000252333		
Total (Corr.)	0,00503644	17			

Table of Means for Conc C 05% d H by Dia Análise
with 95,0 percent confidence intervals

Dia Análise	Count	Mean	Std. error (individual)	Lower limit	Upper limit
I	6	2,57433	0,00423215	2,56345	2,58521
II	6	2,56583	0,00954434	2,5413	2,59037
III	6	2,58617	0,0041426	2,57552	2,59682
Total	18	2,57544			

Multiple Range Tests for Conc C 05% d H by Dia Análise

Method: 95,0 percent LSD

Dia Análise	Count	Mean	Homogeneous Groups
II	6	2,56583	X
I	6	2,57433	XX
III	6	2,58617	X

Contrast	Difference	+/- Limits
I - II	0,0085	0,019548
I - III	-0,0118333	0,019548
II - III	*-0,0203333	0,019548

* denotes a statistically significant difference.

Variance Check

Cochran's C test: 0,722017 P-Value = 0,0393813

Bartlett's test: 1,38496 P-Value = 0,106125

Hartley's test: 5,30819

Levene's test: 0,465968 P-Value = 0,636313

A.4 Análise estatística da robustez: estabilidade das soluções

Tabela 28 - Respostas da estabilidade das soluções de padrão e amostra para a quantificação de l-hiosciamina e d-hiosciamina

Solução analisada	Tempo de análise	l-Hiosciamina		d-Hiosciamina	
		Área (mAU*s)	Resposta relativa ao dia 1	Área (mAU*s)	Resposta relativa ao dia 1
Sulfato de hiosciamina	D1	1074,257	100,000		
	D1	841,098	100,000		
	D1	928,706	100,000		
	D2-Amb	1073,044	99,887		
	D2-Amb	836,874	99,498		
	D2-Amb	921,083	99,179		
	D2-Ref	1078,874	100,430		
	D2-Ref	843,309	100,263		
	D2-Ref	926,832	99,798		
	D3-Amb	1067,029	99,327		
	D3-Amb	835,234	99,303		
	D3-Amb	918,292	98,879		
	D3-Ref	1076,115	100,173		
	D3-Ref	842,291	100,142		
	D3-Ref	923,811	99,473		
Sulfato de atropina	D1	518,777	100,000	523,506	100,000
	D1	420,084	100,000	423,322	100,000
	D1	450,813	100,000	453,510	100,000
	D2-Amb	519,568	100,152	525,460	100,373
	D2-Amb	419,580	99,880	422,519	99,810
	D2-Amb	448,803	99,554	453,911	100,088
	D2-Ref	524,521	101,107	528,976	101,045
	D2-Ref	420,071	99,997	422,473	99,799
	D2-Ref	448,079	99,393	449,722	99,165
	D3-Amb	517,737	99,799	521,729	99,661
	D3-Amb	416,540	99,156	417,507	98,626
	D3-Amb	446,629	99,072	450,242	99,279
	D3-Ref	525,473	101,291	529,560	101,156
	D3-Ref	423,114	100,721	425,110	100,422
	D3-Ref	452,853	100,452	457,245	100,824

continua

continuação

Solução analisada	Tempo de análise	l-Hiosciamina		d-Hiosciamina	
		Área (mAU*s)	Resposta relativa ao dia 1	Área (mAU*s)	Resposta relativa ao dia 1
Solução Oftálmica 1%	D1	447,343	100,000	450,857	100,000
	D1	451,851	100,000	449,622	100,000
	D1	448,423	100,000	451,425	100,000
	D2-Amb	446,536	99,819	449,804	99,766
	D2-Amb	448,162	99,184	453,068	100,767
	D2-Amb	450,697	100,507	455,001	100,792
	D2-Ref	447,340	99,999	450,041	99,819
	D2-Ref	448,598	99,280	451,768	100,477
	D2-Ref	449,986	100,349	453,054	100,361
	D3-Amb	444,766	99,424	446,990	99,142
	D3-Amb	444,965	98,476	447,538	99,536
	D3-Amb	447,241	99,736	450,396	99,772
	D3-Ref	449,304	100,438	453,129	100,504
	D3-Ref	449,833	99,553	453,382	100,836
	D3-Ref	452,917	101,002	456,081	101,031

concluída

FIGURA 31 - Gráfico da estabilidade da solução de sulfato de hiosciamina.

Means and 95,0 Percent Confidence Intervals (internal s)

(a)

Means and 95,0 Percent Confidence Intervals (internal s)

(b)

FIGURA 32 - Gráficos da estabilidade da solução de sulfato de atropina.
a) l-hiosciamina; b) d-hiosciamina.

Means and 95,0 Percent Confidence Intervals (internal s)

(a)

Means and 95,0 Percent Confidence Intervals (internal s)

(b)

FIGURA 33 - Gráficos da estabilidade da solução oftálmica 1%.
a) l-hiosciamina; b) d-hiosciamina.

Quadro 15 - Análise estatística da estabilidade das soluções para a quantificação de l-hiosciamina e d-hiosciamina

Contrastes para sulfato de hiosciamina%: l-hiosciamina			
Multiple Range Tests for % RR D1 l H SHiosc by Tempo Estab Sol			

Method: 95,0 percent LSD			
Tempo Estab Sol	Count	Mean	Homogeneous Groups

D3-Amb	3	99,1697	X
D2-Amb	3	99,5213	XX
D3-Ref	3	99,9293	XX
D2-Ref	3	100,164	X

Contrast		Difference	+/- Limits

D2-Amb - D2-Ref		*-0,642333	0,633566
D2-Amb - D3-Amb		0,351667	0,633566
D2-Amb - D3-Ref		-0,408	0,633566
D2-Ref - D3-Amb		*0,994	0,633566
D2-Ref - D3-Ref		0,234333	0,633566
D3-Amb - D3-Ref		*-0,759667	0,633566

* denotes a statistically significant difference.			

Contrastes para sulfato de atropina%: l-hiosciamina			
Multiple Range Tests for % RR D1 l H SATrop by Tempo Estab Sol			

Method: 95,0 percent LSD			
Tempo Estab Sol	Count	Mean	Homogeneous Groups

D3-Amb	3	99,3423	X
D2-Amb	3	99,862	XX
D2-Ref	3	100,166	XX
D3-Ref	3	100,821	X

Contrast		Difference	+/- Limits

D2-Amb - D2-Ref		-0,303667	1,02573
D2-Amb - D3-Amb		0,519667	1,02573
D2-Amb - D3-Ref		-0,959333	1,02573
D2-Ref - D3-Amb		0,823333	1,02573
D2-Ref - D3-Ref		-0,655667	1,02573
D3-Amb - D3-Ref		*-1,479	1,02573

* denotes a statistically significant difference.			

Contrastes para sulfato de atropina%: d-hiosciamina			
Multiple Range Tests for % RR D1 d H SATrop by Tempo Estab Sol			

Method: 95,0 percent LSD			
Tempo Estab Sol	Count	Mean	Homogeneous Groups

D3-Amb	3	99,1887	X
D2-Ref	3	100,003	XX
D2-Amb	3	100,09	XX
D3-Ref	3	100,801	X

Contrast		Difference	+/- Limits

D2-Amb - D2-Ref		0,0873333	1,11513
D2-Amb - D3-Amb		0,901667	1,11513
D2-Amb - D3-Ref		-0,710333	1,11513
D2-Ref - D3-Amb		0,814333	1,11513
D2-Ref - D3-Ref		-0,797667	1,11513
D3-Amb - D3-Ref		*-1,612	1,11513

* denotes a statistically significant difference.			

continua

continuação**Contrastes para solução oftálmica 1%: l-hiosciamina**

Multiple Range Tests for % RR D1 l H C 1% by Tempo Estab Sol

Method: 95,0 percent LSD

Tempo Estab SolCount Mean Homogeneous Groups

D3-Amb	3	99,212	X
D2-Amb	3	99,8367	X
D2-Ref	3	99,876	X
D3-Ref	3	100,331	X

Contrast	Difference	+/- Limits
D2-Amb - D2-Ref	-0,0393333	1,22709
D2-Amb - D3-Amb	0,624667	1,22709
D2-Amb - D3-Ref	-0,494333	1,22709
D2-Ref - D3-Amb	0,664	1,22709
D2-Ref - D3-Ref	-0,455	1,22709
D3-Amb - D3-Ref	-1,119	1,22709

* denotes a statistically significant difference.

Contrastes para solução oftálmica 1%: d-hiosciamina

Multiple Range Tests for % RR D1 d H C 1% by Tempo Estab Sol

Method: 95,0 percent LSD

Tempo Estab SolCount Mean Homogeneous Groups

D3-Amb	3	99,4833	X
D2-Ref	3	100,219	XX
D2-Amb	3	100,442	X
D3-Ref	3	100,79	X

Contrast	Difference	+/- Limits
D2-Amb - D2-Ref	0,222667	0,752089
D2-Amb - D3-Amb	*0,958333	0,752089
D2-Amb - D3-Ref	-0,348667	0,752089
D2-Ref - D3-Amb	0,735667	0,752089
D2-Ref - D3-Ref	-0,571333	0,752089
D3-Amb - D3-Ref	*-1,307	0,752089

* denotes a statistically significant difference.