

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Amanda da Silva Rio

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM FASE
ESTACIONÁRIA QUIRAL PARA AVALIAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS
DO MEDICAMENTO CLORIDRATO DE BUPIVACAÍNA INJETÁVEL**

Rio de Janeiro
2011

Amanda da Silva Rio

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR
CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM FASE ESTACIONÁRIA
QUIRAL PARA AVALIAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DO MEDICAMENTO
CLORIDRATO DE BUPIVACAÍNA INJETÁVEL**

Mestrado Profissional

Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

Orientadora: Prof. Dra. Silvana do Couto Jacob

Colaborador: Dr. André Luiz Mazzei Albert

Rio de Janeiro

2011

Rio, Amanda da Silva

Desenvolvimento e validação de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência com fase estacionária quiral para avaliação dos enantiômeros do medicamento cloridrato de bupivacaína injetável / Amanda da Silva Rio. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2011.

130 f., il., tab.

Dissertação (Mestrado Profissional) – Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2011.

Orientadora: Dra. Silvana do Couto Jacob

Colaborador: Dr. André Luis Mazzei Albert

1. Bupivacaína. 2. Levobupivacaína. 3. Dextrobupivacaína.
4. CLAE. 5. Desenvolvimento. 6. Validação

Development and validation of high performance liquid chromatography with chiral stationary phase analytical method for evaluation of enantiomers in hydrochloride bupivacaine injection.

Amanda da Silva Rio

Desenvolvimento e validação de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência com fase estacionária quiral para avaliação dos enantiômeros do medicamento cloridrato de bupivacaína injetável

Dissertação submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Vigilância Sanitária.

Aprovado em: ____/____/____

Dr^a Kátia Christina Leandro (FIOCRUZ)

Dr^a Gláucia Barbosa Candido Alves Slana (UFRJ)

Dr. Leonardo Lucchetti Caetano da Silva (FIOCRUZ)

Orientadora Dr^a Silvana do Souto Jacob

Colaborador Dr André Luis Mazzei Albert

Rio de Janeiro

2011

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar forças, perseverança e estímulo.

Ao meu esposo e amigo Alexandler pela paciência, apoio e compreensão, sem os quais, eu não conseguiria ter chegado até aqui.

A minha mãe Lúcia por estar sempre presente em minha vida e minha irmã e amiga Aline, por sua demonstração de admiração e carinho.

Aos meus orientadores Silvana e André Mazzei pela orientação e idéias.

Aos membros da comissão examinadora, por aceitarem participar da banca e pelas sugestões que contribuíram para a qualidade deste trabalho.

Aos meus amigos Letícia, Ozéias e José Luiz, pela amizade e importante ajuda na elaboração deste trabalho. Espero que um dia eu possa retribuir toda colaboração de vocês.

As amigas Anna Maria e Renata pelas palavras de conforto nos momentos de desespero.

A chefe de setor Mariete, agradeço pelo apoio.

Aos amigos do grupo de medicamentos, Maria Virgínia, Antenor, Euclides, Solange, Elizabeth, Lílian e André Colonese pelos momentos descontraídos.

Aos amigos do Departamento de Química do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, agradeço o incentivo.

A todos os colegas do Mestrado pelo companheirismo e amizade.

A direção do INCQS por dar a oportunidade de realização deste curso.

Aos funcionários da biblioteca e das secretarias do INCQS pela atenção.

RESUMO

A solução injetável de cloridrato de bupivacaína tem na sua potência e no tempo de duração de sua ação, os grandes diferenciais clínicos que a tornam uma das soluções anestésicas mais utilizadas. Esse fármaco possui em sua estrutura um carbono assimétrico, apresentando assim, dois isômeros, a levobupivacaína e a dextrobupivacaína, com comportamentos farmacológicos independentes em decorrência da estereosseletividade. Até o momento, os métodos analíticos presentes nos compêndios oficiais avaliam o somatório dos isômeros na solução injetável de cloridrato de bupivacaína, não havendo separação e quantificação das proporções de cada um desses isômeros. O desenvolvimento de métodos analíticos adequados para determinar precisamente as concentrações dos isômeros de um fármaco em preparações farmacêuticas é um pré-requisito essencial para controlar a qualidade. O objetivo deste estudo foi desenvolver e validar um método analítico para determinar as proporções dos isômeros presentes na solução injetável de cloridrato de bupivacaína por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O método desenvolvido utilizou coluna cromatográfica com fase estacionária quiral chirobiotic V – Vancomycin (250 x 4,6) mm, 5,0 μ m e fase móvel constituída de uma mistura de água: meOH: TEA (60: 40: 0,2) pH= 5,0 ajustado com ácido acético. O fluxo empregado foi de 0,8 mL/min e detecção no ultravioleta a 230 nm. Este estudo demonstrou que o método desenvolvido apresentou linearidade no intervalo de concentração de 0,20 a 1,40 mg/mL e mostrou-se satisfatório na avaliação dos parâmetros de seletividade, precisão, exatidão, efeito matriz e robustez. Esse método poderá ser empregado no laboratório de controle de qualidade do INCQS a fim de elucidar possível fonte de agravo à saúde, relacionada as diferentes proporções dos isômeros presentes na solução injetável de cloridrato de bupivacaína, gerando resultados capazes de auxiliar na atuação de vigilância sanitária.

Palavras-chave: Bupivacaína. Levobupivacaína. Dextrobupivacaína. CLAE. Desenvolvimento. Validação.

ABSTRACT

Potency and time of action are the major clinical advantages of bupivacaine hydrochloride injection which makes it one of most useful anesthetic solutions. This drug has in its structure one asymmetric carbon which leads to two forms of isomers, levobupivacaine and dextrobupivacaine, with independent pharmacological behavior because of its stereoselectivity. At the moment, available official analytical methods are able to evaluate the total isomers presented in injection solution of bupivacaine hydrochloride and do not separate and quantificate each one individually. Developing analytical methods to determine concentrations of each isomers individually of a drug in final products is a requisite to quality control. The aim of this study was to develop and validate a high performance liquid chromatography (HPLC) analytical method to quantificate bupivacaine hydrochloride isomers in injection. The method was developed using a chromatographic column with chiral chirobiotic V (vancomycin) stationary phase and 250mm length, 4,6mm diameter and 5 μ m particle size. Mobile phase was water:methanol:TEA (60:40:0,2) with pH = 5,0 adjusted with acetic acid; flow rate was 0,8 mL/min and detection was made by ultraviolet at 230 nm. This study have shown analytical method linearity from concentration 0,2 mg/mL to 1,4 mg/mL and evaluation of selectivity, precision, accuracy, matrix effects and ruggedness was demonstrated to be satisfactory. This analytical method could be employed by the quality control laboratory in INCQS to elucidate possible risk factors to public health related to different isomers proportion in bupivacaine hydrochloride injection, leading to results able to help health surveillance.

Keywords: Bupivacaine. Levobupivacaine. Dextrobupivacaine. HPLC. Development. Validation.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACN – Acetonitrila

AGP – α 1-acid glycoprotein (glicoproteína ácida)

ANOVA – Análise de Variância

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BVC – Bupivacaína

CEME - Central de Medicamentos

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLAE- FEQ – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Fase Estacionária Quiral

DAD – Detector com arranjo de diodos

DGSP – Diretoria Geral de Saúde Pública

DNSP – Departamento Nacional de Saúde Pública

DOU – Diário Oficial da União

DPR – Desvio Padrão Relativo

DPR_r – Desvio Padrão Relativo de repetitividade

DPR_{Spi} – Desvio Padrão Relativo de Precisão Intermediária

DSC – Differential Scanning Calorimetry (Calorimetria Exploratória Diferencial)

DRX – Difração de Raios-X

FB – Farmacopéia Brasileira

FC – Fator de cauda

FEQ – Fase Estacionária Quiral

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FM – Fase móvel

ICH – International Conference on Harmonization (Conferência Internacional de Harmonização)

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

MIP – Polímeros impressos molecularmente

K – Fator de retenção ou Fator de capacidade

LCCDM - Laboratório Central de Controle de Drogas e Medicamentos

LCCDMA - Laboratório Central de Controle de Drogas, Medicamentos e Alimentos

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

LO – Laboratório Oficial
MeOH – Metanol
MMQO – Método dos Mínimos Quadrados Ordinários
MP – Matéria-prima
N – Número de pratos teóricos da coluna
RDC – Resolução da Diretoria Colegiada
R – Resolução
R (+) BVC – Dextrobupivacaína
S (-) BVC – Levobupivacaína
SE – Solução estoque
SNVS - Sistema Nacional de Vigilância Sanitária
SQR – Substância Química de Referência
SQR - FB – Substância Química de Referência - Farmacopéia Brasileira
ST – Solução de trabalho
TEA – Trietilamina
TGA – Thermal Gravimetric Analysis (Análise Termo-Gravimétrica)
THF – Tetrahidrofurano
Tp KH_2PO_4 – Tampão fosfato de potássio monobásico
US-FDA – United States - Food and Drug Administration
USP – United States Pharmacopeia (Farmacopéia Americana)
UV/VIS – Ultravioleta/visível
Vi – Volume interno da coluna vazia
Vo – Volume morto
Vr – Volume de retenção
WHO – World Health Organization
 α – Fator de separação ou Fator de seletividade

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Exemplo de estrutura de um sólido cristalino e um amorfo.....	27
Figura 2: Fórmula estrutural do cloridrato de bupivacaína	33
Figura 3: Fórmula estrutural da levobupivacaína e dexbupivacaína	33
Figura 4: Representação do modelo de interação de três pontos	37
Figura 5: Cromatógrafo líquido, fabricante Shimadzu com detector ultravioleta-visível e conjunto de fotodiodos usado em todas as etapas da validação	56
Figura 6: Sobreposição dos cromatogramas obtidos nas diferentes composições de fase móvel na coluna Chiral AGP.....	69
Figura 7: Sobreposição dos cromatogramas obtidos nas diferentes condições analíticas na coluna Chiral AGP	70
Figura 8: Sobreposição dos cromatogramas obtidos nas diferentes composições de fase móvel na coluna Chirobiotic V	71
Figura 9: Sobreposição dos cromatogramas obtidos para modificações adicionais das composições de fase móvel na coluna Chirobiotic V.....	72
Figura 10: Cromatograma da SQR cloridrato de bupivacaína nas condições analíticas escolhidas	73
Figura 11: Cromatograma de levobupivacaína nas condições analíticas escolhidas	74
Figura 12: Cromatograma de dexbupivacaína nas condições analíticas escolhidas	74
Figura 13: Gráfico das áreas obtidas da solução SQR – FB de cloridrato de bupivacaína: (a) áreas referentes ao sinal de levobupivacaína; (b) áreas referentes ao sinal de dexbupivacaína.....	76
Figura 14: Gráfico das áreas obtidas da solução padrão de cloridrato de levobupivacaína	76
Figura 15: Gráfico das áreas obtidas da solução padrão de cloridrato de dexbupivacaína: (a) áreas referentes ao sinal de dexbupivacaína; (b) áreas referentes ao sinal da impureza de síntese de levobupivacaína	77
Figura 16: Gráfico das áreas obtidas da solução do produto 1: (a) áreas referentes ao sinal de levobupivacaína; (b) áreas referentes ao sinal de dexbupivacaína	77
Figura 17: Gráfico das áreas obtidas da solução do produto 2: (a) áreas referentes ao sinal de levobupivacaína; (b) áreas referentes ao sinal de dexbupivacaína	78

Figura 18: Gráfico das áreas obtidas da solução do produto 3: (a) áreas referentes ao sinal de levobupivacaína; (b) áreas referentes ao sinal de dextrobupivacaína	78
Figura 19: Gráfico das áreas obtidas da solução do produto 4: (a) áreas referentes ao sinal de levobupivacaína; (b) áreas referentes ao sinal de dextrobupivacaína	78
Figura 20: Gráfico das áreas obtidas da solução do produto 5: (a) áreas referentes ao sinal de levobupivacaína; (b) áreas referentes ao sinal de dextrobupivacaína	79
Figura 21: Gráfico de comparação das inclinações das curvas de adição do padrão de levobupivacaína nas matrizes com a curva analítica em solvente nos sete diferentes níveis	80
Figura 22: Gráfico de comparação das inclinações das curvas de adição do padrão de dextrobupivacaína nas matrizes com a curva analítica em solvente nos sete diferentes níveis	80
Figura 23: Gráfico da curva analítica levobupivacaína na faixa de concentração 0,20 a 1,40 mg/mL	83
Figura 24: Gráfico da curva analítica dextrobupivacaína na faixa de concentração de 0,20 a 1,40 mg/mL	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Seletores quirais e principais interações com analitos quirais.....	40
Tabela 2: Relação entre fator de cauda e o fator de assimetria.....	45
Tabela 3: Limites dos parâmetros para a adequação do sistema	47
Tabela 4: Matriz dos fatores para determinação da robustez do método.....	67
Tabela 5: Resultados dos parâmetros de adequação do sistema para os cromatogramas da figura 6.....	69
Tabela 6: Resultados dos parâmetros de adequação do sistema para os cromatogramas da figura 7.....	70
Tabela 7: Resultados dos parâmetros de adequação do sistema para os cromatogramas da figura 8.....	71
Tabela 8: Resultados dos parâmetros de adequação do sistema para os cromatogramas da figura 9.....	72
Tabela 9: Valores da adequação do sistema no início e durante a validação de método analítico	75
Tabela 10: Média dos resultados obtidos para avaliação da pureza espectral de levobupivacaína e dextrobupivacaína nas soluções dos padrões e produtos.....	81
Tabela 11: Recuperações para cada nível de concentração das curvas de adição de levobupivacaína e dextrobupivacaína	85
Tabela 12: Repetitividade do método para o sinal referente a levobupivacaína	85
Tabela 13: Repetitividade do método para o sinal referente a dextrobupivacaína	86
Tabela 14: Avaliação da precisão intermediária do método a partir dos resultados de teor de levobupivacaína obtidos por dois diferentes analistas para os cinco produtos estudados.....	87
Tabela 15: Avaliação da precisão intermediária do método a partir dos resultados de teor de dextrobupivacaína obtidos por dois diferentes analistas para os cinco produtos estudados.....	87
Tabela 16: Variações nos fatores (parâmetros operacionais) para a determinação da robustez	89
Tabela 17: Resultados obtidos para as variações superiores às nominais	89
Tabela 18: Resultados obtidos para as variações inferiores às nominais	89
Tabela 19: Resultados dos efeitos para as variações superiores às nominais	90
Tabela 20: Resultados dos efeitos para as variações inferiores às nominais	90

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio.....	48
Quadro 2: Produtos que participaram do estudo de validação.....	55
Quadro 3: Concentrações das soluções de trabalho da curva analítica levobupivacaína (mg/mL)	81
Quadro 4: Concentrações das soluções de trabalho da curva analítica dextrobupivacaína (mg/mL).....	82
Quadro 5: Determinação da faixa linear de trabalho	84

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	16
1.1 – Vigilância Sanitária de medicamentos no Brasil – Histórico	17
1.2 – O papel da Farmacopéia	21
1.3 – Os Laboratórios Oficiais	21
1.4 – As modalidades de análises	22
1.5 – A avaliação analítica e a monografia oficial	23
1.6 – Ineficácia terapêutica e o processo de síntese dos fármacos	25
1.7 – A estrutura cristalina dos fármacos	26
1.8 – O comportamento estereoquímico das moléculas e a Interação fármaco-receptor	28
1.9 – A descoberta da anestesia	31
1.10 – Cloridrato de Bupivacaína	32
1.11 – Desenvolvimento de método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Fase Estacionária Quiral (CLAE-FEQ)	36
1.11.1 – Fases estacionárias quirais (FEQs)	36
1.11.1.1 – Proteínas	40
1.11.1.2 – Glicopeptídeos Macro-cíclicos	41
1.11.2 – Adequação do Sistema Cromatográfico	42
1.11.2.1 – Volume interno (Vi) e o volume “morto” referente à coluna (Vo)	42
1.11.2.2 – Fator de retenção ou fator de capacidade (K)	43
1.11.2.3 – Eficiência ou número de pratos teóricos (N).....	43
1.11.2.4 – Fator de separação ou fator de seletividade (α)	44
1.11.2.5 – Fator de resolução ou resolução (R)	44
1.11.2.6 – Fator de cauda (FC) ou fator de assimetria do pico (As).....	45
1.11.2.7 – Desvio padrão relativo (DPR).....	45
1.11.2.8 – Fatores que afetam no resultado de adequação do sistema.....	46
1.11.2.9 – Limites dos parâmetros de adequação do sistema	46
1.12 – Validação de método analítico	47
1.12.1 – Seletividade	48
1.12.2 – Faixa de trabalho	49
1.12.3 – Linearidade	49
1.12.4 – Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)	49

1.12.5 – Precisão	50
1.12.5.1 – Repetitividade.....	50
1.12.5.2 – Precisão intermediária.....	51
1.12.6 – Tendência/Recuperação	51
1.12.7 – Efeito Matriz	52
1.12.8 – Robustez	52
1.13 – Relevância do estudo para a vigilância sanitária	53
2 – OBJETIVO	54
2.1 – Objetivo geral	54
2.2 – Objetivos específicos	54
3 – METODOLOGIA	55
3.1 – Aquisição e preparo dos produtos	55
3.2 – Equipamentos, Materiais e Reagentes	55
3.2.1 – Equipamentos	55
3.2.2 – Materiais e Reagentes	57
3.2.3 – Cuidados para demonstrar qualidade nas análises	58
3.3 – Desenvolvimento do método analítico	58
3.3.1 – Verificação da adequação do sistema	59
3.3.2 – Verificação da estabilidade das soluções dos padrões e amostras	59
3.4 – Validação do método analítico	60
3.4.1 – Seletividade	60
3.4.2 – Determinação da Linearidade	61
3.4.2.1 – Confecção da curva analítica	61
3.4.2.1.1 – Preparo da solução estoque (SE) de Levobupivacaína.....	61
3.4.2.1.2 – Preparo da solução estoque (SE) de Dextrobupivacaína.....	61
3.4.2.1.3 – Preparo das soluções de trabalho (ST) de Levobupivacaína	61
3.4.2.1.4 – Preparo das soluções de trabalho (ST) de Dextrobupivacaína	62
3.4.2.2 – Avaliação da curva analítica.....	62
3.4.3 – Determinação da faixa de trabalho	63
3.4.4 – Determinação da Tendência / Recuperação	63
3.4.4.1 – Preparo da solução estoque (SE) dos padrões de levobupivacaína e dextrobupivacaína.....	63
3.4.4.2 – Preparo das soluções de trabalho.....	64

3.4.5 – Determinação da Precisão: Repetitividade e Precisão Intermediária.....	64
3.4.5.1 – Determinação da Repetitividade	64
3.4.5.1.1 – Preparo das soluções padrão de Levobupivacaína e Dextrobupivacaína...	65
3.4.5.1.2 – Preparo das soluções dos produtos	65
3.4.5.2 – Determinação da Precisão Intermediária	65
3.4.6 – Avaliação do Efeito Matriz.....	66
3.4.7 – Determinação da Robustez	66
3.5 – Avaliação das estruturas cristalinas dos padrões utilizados.....	67
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
4.1 – Desenvolvimento do método analítico	68
4.1.1 – Testes utilizando coluna Chiral AGP 150 x 4,0mm x 5 µm.....	68
4.1.2 – Testes utilizando coluna Chirobiotic V 250 x 4,6mm x 5 µm	70
4.1.3 – Escolha do método analítico.....	73
4.1.4 – Verificação da Adequação do sistema	74
4.1.5 – Verificação da estabilidade das soluções dos padrões.....	75
4.1.5.1 – Avaliação da estabilidade das soluções dos padrões	76
4.1.5.2 – Avaliação da estabilidade das soluções dos produtos	77
4.2 – Validação do método analítico.....	79
4.2.1 – Seletividade	79
4.2.2 – Determinação da linearidade.....	81
4.2.2.1 – Avaliação da curva analítica para Levobupivacaína.....	82
4.2.2.2 – Avaliação da curva analítica para Dextrobupivacaína.....	83
4.2.3 – Determinação da faixa de trabalho	84
4.2.4 – Determinação da Tendência / Recuperação	84
4.2.5 – Determinação da Precisão: Repetitividade e Precisão Intermediária.....	85
4.2.5.1 – Repetitividade.....	85
4.2.5.2 – Precisão Intermediária.....	86
4.2.6 – Verificação do Efeito Matriz.....	88
4.2.7 – Avaliação da Robustez	88
4.3 – Avaliação das estruturas cristalinas dos padrões utilizados.....	91
5 – CONCLUSÃO	92
6 – PERSPECTIVAS.....	94

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
APÊNDICE A – ESPECTROS DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA	105
APÊNDICE B – CURVA ANALÍTICA LEVOBUPIVACAÍNA	107
APÊNDICE C – CURVA ANALÍTICA DEXTROBUPIVACAÍNA.....	108
APÊNDICE D – CURVA MATRIZ PRODUTO 1 – LEVOBUPIVACAÍNA	109
APÊNDICE E – CURVA MATRIZ PRODUTO 2 – LEVOBUPIVACAÍNA	110
APÊNDICE F – CURVA MATRIZ PRODUTO 3 – LEVOBUPIVACAÍNA.....	111
APÊNDICE G – CURVA MATRIZ PRODUTO 4 – LEVOBUPIVACAÍNA	112
APÊNDICE H – CURVA MATRIZ PRODUTO 5 – LEVOBUPIVACAÍNA	113
APÊNDICE I – CURVA MATRIZ PRODUTO 1 – DEXTROBUPIVACAÍNA.....	114
APÊNDICE J – CURVA MATRIZ PRODUTO 2 – DEXTROBUPIVACAÍNA.....	115
APÊNDICE K – CURVA MATRIZ PRODUTO 3 – DEXTROBUPIVACAÍNA	116
APÊNDICE L – CURVA MATRIZ PRODUTO 4 – DEXTROBUPIVACAÍNA.....	117
APÊNDICE M – CURVA MATRIZ PRODUTO 5 – DEXTROBUPIVACAÍNA.....	118
APÊNDICE N – EFEITO MATRIZ PRODUTO 1 – LEVOBUPIVACAÍNA.....	119
APÊNDICE O – EFEITO MATRIZ PRODUTO 2 – LEVOBUPIVACAÍNA.....	120
APÊNDICE P – EFEITO MATRIZ PRODUTO 3 – LEVOBUPIVACAÍNA	121
APÊNDICE Q – EFEITO MATRIZ PRODUTO 4 – LEVOBUPIVACAÍNA	122
APÊNDICE R – EFEITO MATRIZ PRODUTO 5 – LEVOBUPIVACAÍNA.....	123
APÊNDICE S – EFEITO MATRIZ PRODUTO 1 – DEXTROBUPIVACAÍNA.....	124
APÊNDICE T – EFEITO MATRIZ PRODUTO 2 – DEXTROBUPIVACAÍNA	125
APÊNDICE U – EFEITO MATRIZ PRODUTO 3 – DEXTROBUPIVACAÍNA	126
APÊNDICE V – EFEITO MATRIZ PRODUTO 4 – DEXTROBUPIVACAÍNA.....	127
APÊNDICE W – EFEITO MATRIZ PRODUTO 5 – DEXTROBUPIVACAÍNA.....	128
APÊNDICE X – DIFRATOGRAMAS DA SUBSTÂNCIA CLORIDRATO DE BUPIVACAÍNA (MISTURA RACÊMICA).....	129
APÊNDICE Y – DIFRATOGRAMAS DAS SUBSTÂNCIAS CLORIDRATO DE LEVOBUPIVACAÍNA E CLORIDRATO DE DEXTROBUPIVACAÍNA.....	130

1 – INTRODUÇÃO

A maioria dos fármacos quirais obtidos por vias sintéticas são comercializados como racematos, ou seja, misturas contendo quantidades iguais dos dois enantiômeros, embora para alguns deles, já tenha sido demonstrado que os efeitos farmacológicos e/ou tóxicos estejam relacionados apenas a um dos enantiômeros. Além disso, é conhecido o fato de que os enantiômeros podem apresentar perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos diferentes (SINGH, 2006).

Existem na literatura científica várias citações que descrevem o uso da cromatografia líquida de alta eficiência com fase estacionária quiral (CLAE – FEQ) em estudos farmacológicos da solução anestésica de cloridrato de bupivacaína, mas não na análise quantitativa dos enantiômeros em suas preparações farmacêuticas. O desenvolvimento de métodos analíticos adequados para determinar precisamente as concentrações dos enantiômeros de um fármaco em preparações farmacêuticas é um pré-requisito essencial para controlar a qualidade desses medicamentos. É conhecido o fato de que o método CLAE-FEQ oferece vantagens sobre as técnicas clássicas de separação e análise de estereoisômeros, especialmente para os enantiômeros (SINGH, 2006).

Do ponto de vista sanitário, a manutenção da qualidade do medicamento significa a garantia de que o mesmo apresentar-se-á sempre seguro e eficaz em consonância com as evidências constantes na literatura e nos dados apresentados às autoridades quando de seu registro. Um desvio de qualidade pode significar uma perda de eficácia ou de segurança, expondo o paciente a riscos desnecessários. A possibilidade de ocorrer modificações no medicamento acabado e, conseqüentemente, prejudicar a qualidade do medicamento a ser dispensado, mesmo dentro de seu prazo de validade, deve ser levada em consideração e estudada pelo fabricante do medicamento (COSTA, 2005).

Atualmente, o controle da qualidade sob regime da Vigilância Sanitária é feito pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pelos Órgãos de Vigilância Municipais e Estaduais em conjunto com os laboratórios oficiais: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) e os Laboratórios Centrais de Saúde Pública dos Estados, que atuam como fonte geradora de informações capaz de desencadear ações de vigilância sanitária. A análise realizada por estes laboratórios pode gerar dados que eliminem, diminuam ou previnam riscos à saúde (SILVA,

2000). O direito a saúde está garantido na Constituição Federal de 1988, que o define como “direito de todos e dever do Estado” (BRASIL, 1988).

A ação da Vigilância Sanitária deve ocorrer quando verificada a existência de riscos ou situações prováveis de ocorrências de riscos de modo que, encontradas as causas, atue-se para evitar a reincidência desses fatores. Assim, o princípio da precaução é, por natureza, o mais típico dos atuais princípios relacionados à Vigilância Sanitária, porque é em função dele que os profissionais atuam. É para a existência ou probabilidade de existência de risco que se dirigem as ações da ANVISA (SILVA & COROA, 2005).

O INCQS atua como laboratório de referência nacional para o controle da qualidade de produtos e serviços vinculados à Vigilância Sanitária e constitui-se num dos alicerces do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, desempenhando importante papel na proteção da população contra as situações de risco e os fatores nocivos associados à produção e à comercialização de produtos e serviços vinculados à saúde. Entre as suas principais competências estão as análises laboratoriais previstas na legislação sanitária e o desenvolvimento, adequação e implantação de metodologias analíticas aplicadas à verificação da qualidade de produtos de saúde (INCQS, 2009).

1.1 –Vigilância Sanitária de medicamentos no Brasil - Histórico

Quando se faz um retrospecto sobre a história e o aparecimento dos primeiros produtos para fins terapêuticos, observa-se que o homem primitivo era tanto o produtor quanto o consumidor. Mais tarde, com o posterior desenvolvimento, o homem que produzia passou a vender seus produtos a outros, separando-se assim o produtor do consumidor. Com a revolução industrial surgiu a necessidade do intermediário ou comerciante. O tamanho cada vez maior das empresas exigiu um tipo diferente de organização. Um só indivíduo já não era capaz de controlar a qualidade. Foi assim desenvolvendo-se a inspeção com o auxílio da estatística (SANTORO, 1988).

No Brasil, as atividades de vigilância sanitária tiveram início no século XVI e acompanharam o modelo existente em Portugal. Com a chegada da família real, em 1808, intensificou-se o fluxo de embarcações, passageiros e mercadorias e com isso fez-se necessário aumentar o controle sanitário para evitar epidemias de doenças e

também criar condições de aceitação dos produtos brasileiros no mercado internacional. Mas foi só com a instauração da República, em 1889, é que se observou a organização das administrações sanitárias estaduais e em 1897 foi criada a Diretoria Geral de Saúde Pública (DGSP), que foi substituída em 1920 pelo Departamento Nacional de Saúde Pública (DNSP) (COSTA & ROZENFELD, 2000).

No período correspondente a 1930, Costa & Rozenfeld (2000) relatam que foi evidenciado um aumento no desenvolvimento da indústria químico-farmacêutica e de agrotóxicos, principalmente devido à II Guerra Mundial e, em consequência, houve intensa produção normativa e legal. As estruturas de saúde pública passaram por várias reformas, com a criação e especialização de órgãos e ampliação das suas funções. O Instituto Oswaldo Cruz, além de pesquisar e fabricar produtos farmacêuticos passou a realizar exames laboratoriais, inclusive os relacionados ao controle sanitário de produtos químico-farmacêuticos.

O período seguinte à queda de Getúlio Vargas (1945) se destacou pelo intenso movimento de entrada de capital estrangeiro, inclusive o da indústria químico-farmacêutica que passou a ser regulada pelo Decreto nº 20.397/1946. Apesar da preocupação com a nocividade dos produtos, o conteúdo normativo deste Decreto estava intensamente voltado para legalização das atividades e para regulamentar a concorrência entre os fabricantes (COSTA & ROZENFELD, 2000).

Em 1953 foi criado o Ministério da Saúde e no ano seguinte, a fim de se realizar análises e estabelecer padrões, criou-se o Laboratório Central de Controle de Drogas e Medicamentos (LCCDM) que, em 1961 incorporou a área de alimentos, passando a ser denominado Laboratório Central de Controle de Drogas, Medicamentos e Alimentos (LCCDMA) (COSTA & ROZENFELD, 2000).

De acordo com Costa & Rozenfeld (2000), a legislação editada após 1960 foi influenciada pela ocorrência de graves denúncias na área de alimentos e medicamentos: as mortes por consumo de peixes contaminados com mercúrio no Japão, as mortes de animais que se alimentavam de ração com aflatoxinas, a revelação da contaminação da carne brasileira com anabolizantes, o nascimento de bebês mal formados em virtude do uso da talidomida. Em 1961 foi regulamentado o Código Nacional de Saúde que estabelecia normas gerais sobre defesa e proteção à saúde.

A criação da Central de Medicamentos (CEME), em 1971, teve o propósito de regular a produção e distribuição de medicamentos, além de efetivar no país um

sistema de farmacovigilância. Mundialmente, havia uma preocupação com os efeitos do lançamento no mercado de inúmeros fármacos com pouco conhecimento toxicológico. Nesse período também ocorreu importante revisão da legislação sanitária, com a edição de leis e decretos que vigoram até os dias de hoje. Entre essas leis, destacam-se a Lei nº 5.991/1973 que dispõe sobre o controle sanitário do comércio de drogas, medicamentos, insumos farmacêuticos e correlatos, e define medicamento como “produto farmacêutico, tecnicamente obtido ou elaborado, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico” e a Lei nº 6.360/1976 que fundamentada no controle de qualidade, consagrou a Vigilância Sanitária como atividade permanente. Esta lei define controle de qualidade como “conjunto de medidas destinadas a garantir, a qualquer momento, a produção de lotes de medicamentos e demais produtos abrangidos por esta Lei, que satisfaçam às normas de atividade, pureza, eficácia e inocuidade” e representou um marco importante no processo de conformação da vigilância sanitária de produtos farmacêuticos. A partir de uma concepção mais abrangente para além do conceito de fiscalização, a vigilância sanitária foi estabelecida nesta lei como ação permanente e rotineira dos órgãos de saúde. Um destaque que a diferenciou dos regulamentos anteriores deve-se ao fato de ter incorporado a preocupação com o medicamento e demais produtos, atentando para a qualidade, eficácia e segurança. Várias reformulações na chamada lei de Vigilância Sanitária vêm sendo incorporadas, em resposta às necessidades que vêm surgindo ao longo do tempo, devido às inovações tecnológicas industriais do ramo farmacêutico (COSTA & ROZENFELD, 2000; BRASIL, 1973; BRASIL, 1976).

A década de 1980 se caracterizou pelo movimento em direção ao exercício da cidadania e, em 1988, a Constituição Federal afirmou ser a saúde um direito de todos e destacou as atribuições da Vigilância Sanitária como obrigação do Estado (COSTA & ROZENFELD, 2000; BRASIL, 1988).

Na segunda metade dos anos de 1990 surgem no mercado uma grande quantidade de produtos falsificados e comércio ilegal de medicamentos. Esta situação impulsionou a edição de muitas normas para melhorar a qualidade dos produtos e uma reformulação no modelo institucional, culminando com a criação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (COSTA & ROZENFELD, 2000).

A qualidade do medicamento é algo que se obtém como resultado da consideração de todos os fatores que, de uma maneira ou outra, entra na concepção,

desenvolvimento, produção, distribuição e uso do fármaco. Atualmente é cada vez maior a preocupação de assegurar-se a administração de medicamentos eficazes e inócuos (SANTORO, 1988).

O controle de qualidade no medicamento propriamente dito é um processo bastante complexo pela própria natureza das amostras. Para que se possa ter confiabilidade nos resultados de uma análise, várias considerações devem ser feitas em relação à amostra, ao método empregado e ao analista. Em relação à amostra, devem ser considerados alguns parâmetros como: conteúdo do princípio ativo dentro dos limites experimentais; uniformidade de conteúdo em cada dose; ausência de contaminantes, incluindo a contaminação cruzada com outros fármacos; manutenção da potência, eficácia terapêutica e aspecto até o momento do uso; liberação do ingrediente ativo de tal maneira que seja exercida a máxima disponibilidade biológica (SANTORO, 1988).

Em outras palavras, qualidade significa cumprimento de especificações. As especificações da qualidade dos produtos farmacêuticos, desde a matéria-prima até a embalagem e, conseqüentemente, de todos os insumos utilizados na fabricação de formas farmacêuticas, é competência exclusiva das farmacopéias. Essas especificações regulam as relações com o comércio exterior (importação e exportação), como requisitos de qualidade da matéria-prima e especificações farmacêuticas produzidas no país, servindo, ainda, de parâmetro para ações legais da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (BITTENCOURT, 1997).

Especificar as matérias-primas e as técnicas utilizadas na preparação de medicamentos é prática tão antiga como a própria história do uso de produtos para fins terapêuticos. Com o advento da escrita, as farmacopéias – livros que descreviam as matérias-primas, as fórmulas as indicações e as posologias das drogas – passaram a ser o cofre desse saber e ganharam autoridade, embora de uso não obrigatório (SILVA, 2000).

No Brasil, até a Independência, em 1822, usava-se a farmacopéia portuguesa de 1794. Mas com a influência do positivismo passou-se a adotar a farmacopéia francesa a partir de 1837. A obrigatoriedade legal do uso da farmacopéia, porém, só se estabeleceu através do Decreto nº 828/1851. O artigo 45 desse decreto estabelecia que “... *para a preparação dos remédios officinaes seguir-se-á a pharmacopeia franceza, até que esteja composta uma pharmacopeia brasiliense...*” (SILVA, 2000).

A primeira Farmacopéia Brasileira foi aprovada pelo Decreto nº 17.509/1926. Esse Decreto estabelecia a obrigatoriedade do uso da mesma na elaboração e no controle de medicamentos, o que só aconteceu em 1929 (SILVA, 2000).

1.2 - O papel da Farmacopéia

Os métodos e limites farmacopéicos não são estabelecidos com o intuito de garantir a qualidade total de um determinado insumo ou produto. Sua finalidade é, simplesmente, a de criar exigências que estes insumos ou produtos devem cumprir para adequar-se à qualidade farmacopéica. Esta última, por outro lado, também não constitui necessariamente um requisito nacional de qualidade. A qualidade farmacopéica implica que um determinado produto e matérias-primas encontram-se integralmente dentro dos limites de todos os ensaios recomendados, tanto para procedimentos laboratoriais gerais, quanto para técnicas específicas de controle do produto. Do ponto de vista da segurança do consumidor, entretanto, o cumprimento integral dos requisitos nem sempre é suficiente, visto que as especificações farmacopéicas não dizem respeito às boas práticas de fabricação, aos ensaios pré-clínicos e clínicos e aos ensaios de estabilidade. A utilização de requisitos farmacopéicos pelo produtor não é obrigatória e sim indicação de requisitos de qualidade cujo cumprimento poderá ser avaliado oficialmente no ato do registro ou quando for submetido a controles laboratoriais pelos órgãos governamentais em qualquer momento do prazo de validade do produto (ROSENBERG & SILVA, 1997).

1.3 - Os Laboratórios Oficiais

Os Laboratórios Oficiais (L.O.) têm, como principal função, a avaliação analítica para fornecer subsídios e elucidar dúvidas quanto à qualidade mínima dos produtos sujeitos à vigilância sanitária. Como órgãos de controle oficial da qualidade de insumos e de proteção à saúde, devem manter posição neutra e objetiva que concilie os interesses e a defesa do consumidor com o desenvolvimento de uma indústria moderna e eficiente e, ao mesmo tempo, forneça dados imprescindíveis à execução dos programas de Vigilância Sanitária, tanto no nível federal quanto nos níveis estaduais e municipais de saúde (SILVA, 2000).

O Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), em parceria com a Gerência Geral de Laboratórios de Saúde Pública, coordena a Rede Nacional de Laboratórios Oficiais de Controle de Qualidade em Saúde. Nos estados e municípios, atua em parceria com os serviços locais de vigilância sanitária na criação e execução de programas de análise e monitoramento (FIOCRUZ, 2009a).

O INCQS foi incorporado à Fundação Oswaldo Cruz em 1978 em substituição ao Laboratório Central de Controle de Drogas, Medicamentos e Alimentos (LCCDMA) e teve sua nova instalação oficialmente inaugurada em 1981, como parte do processo de desenvolvimento do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) (FIOCRUZ, 2009a).

O INCQS como membro integrante do Sistema de Vigilância Sanitária Brasileira, tem como responsabilidade as ações tecnológicas e normativas correspondentes ao controle e fiscalização de produtos e substâncias de interesse para a saúde verificando o cumprimento da legislação. Estão no escopo de sua competência: executar análises laboratoriais previstas na legislação sanitária ou por demanda de órgãos oficiais; desenvolver, adequar ou implantar metodologias analíticas aplicadas à verificação da qualidade de produtos de saúde; avaliar tecnicamente e emitir pareceres sobre requerimento de registro de produtos para o Ministério da Saúde (INCQS, 2009).

1.4 – As modalidades de análises

São três as modalidades de análise previstas em lei: análise prévia, análise de controle e análise fiscal. Cada uma dessas análises está sempre relacionada a um momento do ciclo da fiscalização. A primeira avalia a eficácia e a segurança do produto, e se dá no momento da avaliação da concessão do registro; a segunda se refere à avaliação da capacidade de produzir, de acordo com os termos concedidos no registro; a terceira avaliará a capacidade de se seguir produzindo, conforme o estabelecido nos termos do registro, durante toda a vida útil do produto. Esta última corresponde à rotina da fiscalização, para apuração das fontes de agravo, fortuitas ou eventuais, sendo a modalidade mais praticada pelos fiscais através de apreensões (SILVA, 2000).

Os medicamentos chegam para a análise no INCQS através de apreensões fiscais por programas de análise com a ANVISA, Vigilâncias Estaduais ou Municipais,

enviadas pelos Laboratórios Centrais, para análise em processos judiciais ou através de apreensões de denúncias de possíveis irregularidades, feitas por usuários ou por profissionais de saúde.

A denúncia é uma fonte importante de informação para todos os órgãos envolvidos na fiscalização, pois assumem uma relevância importante no contexto da Saúde Pública, já que a suspeita de irregularidade do produto está latente e a veracidade da denúncia necessita ser elucidada (BEZERRA, 2000). O fato gerador da denúncia deve ser devidamente apurado pelo fiscal, para se verificar a procedência, ou não, da denúncia. Uma denúncia bem apurada, com relato circunstanciado, poderá permitir uma abordagem laboratorial incisiva sobre as possíveis fontes de agravo, e dará agilidade ao processo de elucidação dos fatos. Em alguns casos de denúncia, a elucidação do problema vai além da avaliação analítica executada pelo laboratório oficial, pois as possíveis causas são inúmeras: falta de estabilidade do produto, defeitos ou impropriedades na embalagem, condições impróprias de transporte e/ou armazenamento, etc; nesse caso pode ser necessária uma investigação conjunta dos agentes fiscais e o produtor (SILVA, 2000).

1.5 - A avaliação analítica e a monografia oficial

Os resultados das análises laboratoriais irão nortear as ações fiscalizadoras dando subsídios para dirimir dúvidas quanto à qualidade mínima de produtos sujeitos à vigilância sanitária. Essas análises são realizadas de acordo com normas contidas em compêndios oficiais e contribuirão para elucidar possíveis irregularidades. As normas oficiais devem incorporar o padrão mínimo de qualidade suficiente, no entender do Estado, para a aceitação do produto tendo em vista as tecnologias de produção em uso no país (SILVA, 2000).

O conjunto de normas aplicadas à avaliação analítica chama-se Monografia Oficial cujo objetivo é estabelecer padrões para a tomada de decisão quanto a aceitação ou a recusa de produtos (SILVA, 2000). O Decreto nº 79.094/1977, que regulamenta a Lei nº 6360/1976, instrumento legal maior sobre vigilância sanitária de produtos, diz, no Artigo 158: “Para efeito de fiscalização sanitária os ensaios e análises destinados a verificação de eficiência da fórmula, serão realizados consoantes as normas fixadas pelo laboratório de controle do Ministério da Saúde”

(BRASIL, 1976; BRASIL, 1977). Estas normas incluem, além da Farmacopéia Brasileira, Normas Técnicas publicadas no Diário Oficial da União (DOU) e, dependendo do produto, normas formalmente adotadas pelos laboratórios oficiais. A RDC nº 37/2009 estabelece que, na ausência de monografias oficiais inscritas na Farmacopéia Brasileira, poderá ser adotada monografia oficial, última edição, de um dos seguintes compêndios internacionais: Farmacopéia Alemã, Americana, Argentina, Britânica, Européia, Francesa, Internacional, Japonesa, Mexicana e Portuguesa (BRASIL, 2009). É importante lembrar, entretanto, que as monografias oficiais são consideradas como padrão mínimo de qualidade para a aceitação do produto, objetivando assegurar a eficácia e a segurança do mesmo. Significa dizer que, no mínimo, os ensaios nelas inscritos, deverão ser realizados, sem detrimento de outros testes que o laboratório julgue necessário para elucidar denúncias de sinistros ou qualquer outra irregularidade. Excetua-se do cumprimento integral das monografias oficiais os programas específicos de monitoramento ou fiscalização, assim como denúncias apuradas que permitem direcionar os ensaios para aqueles mais diretamente vinculados às causas da denúncia. Este também será o caso daqueles para os quais não exista nenhuma monografia oficial disponível (FIOCRUZ, 2009b).

O alvo principal da avaliação laboratorial da Vigilância Sanitária é a realização de testes que se relacionam com a segurança dos produtos. Ou seja, é a verificação da presença de determinados contaminantes, ou sua quantificação, nos casos de limites pré-estabelecidos na Monografia Oficial. Os testes relacionados com a eficácia do produto, de um modo geral, se restringem a identificação e a quantificação da(s) substância(s) que, segundo se declara no registro, tem esta função (SILVA, 2000).

A Lei nº 6.360/1976 define controle de qualidade como o “conjunto de medidas destinadas a garantir, a qualquer momento, a produção de lotes de medicamentos e demais produtos abrangidos por esta Lei que satisfaçam as normas de atividades, pureza, eficácia e inocuidade” (BRASIL, 1976). Não é função do Laboratório Oficial (L.O.) garantir a qualidade de qualquer linha de produção ou realizar controle de qualidade; estas são funções do fabricante. Por isso, o termo mais apropriado para definir a função do L.O. não seria controle de qualidade, e sim avaliação da qualidade analítica ou avaliação laboratorial, entendida como a que se

deve efetuar para se assegurar a qualidade mínima de um produto ao chegar ao consumidor (SILVA, 2000).

Quando uma apreensão entra no L.O., são várias as incógnitas de difícil elucidação. Desconhece-se o processo de síntese da matéria-prima utilizada e se supõe que a mesma tenha a qualidade estabelecida na Monografia Oficial, fundamental para a qualidade do produto final. Em geral não se repetem, no produto acabado, como exemplo, os testes de contaminantes previstos para a matéria-prima (SILVA, 2000).

As normas vêm sofrendo sucessivas revisões com o intuito de acompanhar o conhecimento científico do risco e o desenvolvimento tecnológico da produção. Entretanto, é importante lembrar que existe uma defasagem muito grande entre as descobertas científicas e a elaboração de normas, que por dependerem de negociações políticas, só absorvem o conhecimento científico muito tempo depois. Falta, na Legislação Sanitária, explicar que, na ausência de um teste específico para elucidação de agravos à saúde, prevalecerão os últimos conhecimentos científicos sobre o assunto (SILVA, 2000).

1.6 – Ineficácia terapêutica e o processo de síntese dos fármacos

Apesar da política nacional de medicamentos assegurar qualidade, eficácia e segurança, medicamentos contendo o mesmo fármaco, na mesma concentração e forma farmacêutica não necessariamente apresentam o efeito terapêutico na mesma intensidade. Por exemplo, alterações na rota de síntese podem provocar alterações nas características físico-químicas do fármaco e das substâncias empregadas na formulação, comprometendo a eficácia do medicamento (BRASIL, 1998; ZHANG *et al.*, 2004).

Muitas vezes, os fatores que poderiam provocar alguma alteração na molécula do fármaco não são avaliados adequadamente na etapa de síntese. Porém é nesta etapa que podem ocorrer modificações na molécula, provocando alterações na eficácia do medicamento. Por isso, é essencial que as reações de uma rota sintética possam ser controladas e planejadas adequadamente para a obtenção da molécula desejada (STRENG, 1997).

O processo de descoberta de novos fármacos caracteriza-se por sua complexidade, fruto da multiplicidade de fatores que envolvem o planejamento

molecular de novas estruturas capazes de apresentarem os efeitos farmacológicos desejados (BARREIRO, 1997).

Uma das maiores complicações numa rota de síntese é que ocorra uma alteração no seu desenvolvimento e, com isso, uma provável alteração no perfil de impurezas. Portanto, é necessário desenvolver métodos analíticos para a determinação de produtos de degradação na substância ativa (BAUER *et al.*, 1998).

Baseado na complexidade e na extensão de síntese de uma molécula até a obtenção de um novo fármaco, torna-se necessária uma análise de todos os fatores que possam afetar cada uma das possíveis rotas (BAUER *et al.*, 1998).

Entre os fatores mais importantes relacionados à síntese de fármacos que pode ser modificado durante sua obtenção, acarretando uma provável alteração na eficácia do produto final, destacam-se a estrutura cristalina dos fármacos e o comportamento estereoquímico das moléculas (GASPAROTTO, 2005).

1.7 – A estrutura cristalina dos fármacos

A estrutura cristalina dos fármacos pode ser alterada durante sua síntese através de etapas específicas como precipitação e cristalização ou durante as operações para a obtenção da forma farmacêutica (MARTIN & VILADROSA, 2000).

As formas cristalinas comuns encontradas são os polimorfos e os solvatos. Os polimorfos têm a mesma composição química, mas são diferentes na estrutura interna e, conseqüentemente, possuem propriedades físico-químicas diferentes. Os solvatos, conhecidos também como pseudopolimorfos, são sólidos cristalinos que contêm moléculas de solventes dentro da estrutura cristalina. Se o solvente incorporado for a água, o solvato é chamado de hidrato (VIPPAGUNTA *et al.*, 2001).

Os fármacos ocorrem não só na forma cristalina identificável, mas também como partículas amorfas sem estrutura definida, podendo influenciar na estabilidade química e na atividade biológica (ANSEL *et al.*, 2000).

Quando se comparam as formas cristalinas e amorfas, espera-se que a amorfa seja menos estável quimicamente e mais solúvel que a forma cristalina. Isso se dá devido aos cristais apresentarem menor energia livre, enquanto que na forma amorfa, a ausência de uma rede cristalina tridimensional proporciona maior mobilidade molecular. A energia cinética decorrente das diferentes formas de cristalização (amorfos, polimorfos ou solvatos) é responsável pelas diferenças na

solubilidade e velocidade de dissolução. Assim, diferentes formas polimórficas apresentam significantes diferenças em suas propriedades físicas, se comportando como entidades químicas diferentes. Assim, ponto de fusão, densidade, compressibilidade, solubilidade e velocidade de dissolução são freqüentemente muito diferentes para cada polimorfo (ANSEL *et al.*, 2000).

A avaliação da estrutura cristalina de fármacos é caracterizada por um conjunto de metodologias, pois não há um sistema universal para investigar o polimorfismo de fármacos aplicável a todas as substâncias existentes (KALINKOVA, 1999).

Um método muito adequado para detectar a presença de polimorfos é a difração de raios X (DRX) em pós. Uma vez detectada a presença de polimorfos, outras técnicas, tais como absorção por espectroscopia de estado sólido (infravermelho, Raman e ressonância magnética nuclear), cristalografia, microscopia e métodos de análise térmica, tais como calorimetria exploratória diferencial (DSC) e análise termo-gravimétrica (TGA), podem ser empregados para futura caracterização do polimorfo (AGUIAR, 1999; KALINKOVA, 1999; VIPPAGUNTA *et al.*, 2001; BUCKTON, 2005).

O princípio da difração de raios X consiste em um fenômeno de interação entre o feixe de raios X incidente e os átomos (elétrons) do material, relacionada ao espalhamento coerente em átomos arranjados periodicamente no espaço (CULLITY & STOCK, 2001).

Um sólido cristalino consiste em um arranjo de átomos ordenados com periodicidade regular numa rede tridimensional (figura 1), bem definida e contínua, denominada rede cristalina que pode ser visualizada como resultado da repetição contínua, em três dimensões, de uma unidade de construção estrutural, a célula unitária (SKOOG, 2002).

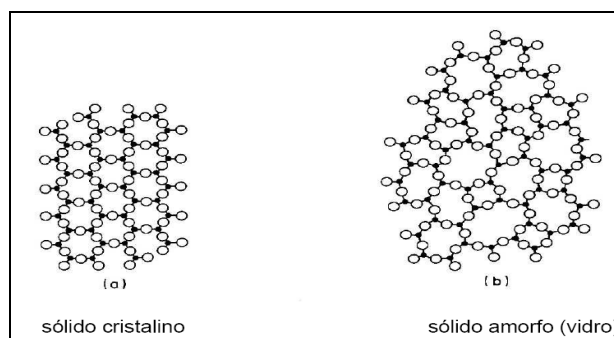


Figura 1 – Exemplo de estrutura de um sólido cristalino e um amorfo

Se os átomos que geram espalhamento estiverem arranjados de maneira sistemática, como em uma estrutura cristalina, apresentando entre eles distâncias próximas ao do comprimento de onda da radiação incidente, pode-se verificar que as relações de fase entre os espalhamentos tornam-se periódicas e que efeitos de difração dos raios X podem ser observados em vários ângulos (CULLITY & STOCK, 2001).

Os planos de difração e suas respectivas distâncias interplanares, bem como as densidades de átomos (elétrons) ao longo de cada plano cristalino, são características específicas e únicas de cada substância cristalina, da mesma forma que o padrão difratométrico por ela gerado (equivalente a uma impressão digital) (CULLITY & STOCK, 2001).

1.8 – O comportamento estereoquímico das moléculas e a interação fármaco-receptor.

Grande parte das moléculas biológicas é quiral, significa dizer que apresentam na sua estrutura química carbono assimétrico sem plano de simetria e composição química idêntica. A maior parte das rotas de síntese leva à produção de racematos, ou seja, de uma mistura equimolar de estereoisômeros que são opticamente inativas. A falta de atividade óptica, neste caso, é decorrente do fato de que enquanto um dos enantiômeros desvia o plano da luz para um determinado valor α , o seu par o desvia, na mesma proporção, na direção exatamente oposta, anulando o resultado final (LIMA, 1997; RENTSCH, 2002).

Estereoisômeros são aqueles isômeros cujos átomos ou grupos de átomos possuem uma distribuição espacial diferente na molécula. Eles podem ser divididos em geométricos ou ópticos. Os isômeros geométricos são estereoisômeros que não apresentam atividade óptica (capacidade que certas substâncias possuem de desviar o plano da luz polarizada) e sua terminologia é designada (Z) (do mesmo lado) e (E) (lados opostos) para descrever sua posição espacial. Isômeros ópticos são aqueles que apresentam atividade óptica, possuindo centros quirais ou centros assimétricos (LIMA, 1997; SOLOMONS, 2000).

As moléculas com um elemento de quiralidade apresentam enantiomeria. Os enantiômeros são estereoisômeros relacionados entre si por uma simetria em relação a um plano e possuem as mesmas características físicas, como solubilidade

ou ponto de fusão. As moléculas que apresentam dois ou mais elementos de quiralidade apresentam a diastereoisomeria. Diastereoisômeros não são enantiômeros e podem apresentar diferentes propriedades físicas e também químicas. Os enantiômeros apresentam desvios polarimétricos opostos de mesma magnitude, se o desvio for para a direita ela será dextrorrotatória adotando o sinal (+) ou *d*, se for para a esquerda, levorrotatória e adota o sinal (-) ou *l* (LIMA, 1997).

Aparentemente, é irrelevante essa diferença espacial entre os enantiômeros (moléculas que são imagem uma da outra e não são sobreponíveis), mas estes compostos podem apresentar atividades biológicas distintas (LIMA, 1997).

Portanto, são inúmeros os efeitos oriundos da quiralidade de uma molécula, o que pode ocasionar sérias conseqüências se esta molécula for de interesse farmacológico, pois se existem enantiômeros que possuam a mesma atividade biológica, há também aqueles que diferem em relação à intensidade da ação ou mesmo aqueles que possuem atividades completamente diferentes. O que se sabe, é que os estereoisômeros demonstram interesses terapêuticos diferentes, por apresentarem, na grande maioria das vezes, perfis terapêuticos diferentes (LIMA, 1997; RENTSCH, 2002).

O exemplo mais trágico de conseqüências terapêuticas resultantes da administração de mistura racêmica é o da talidomida. Quando o fármaco foi usado, ambos enantiômeros produziram a atividade terapêutica desejada (sedação branda para náusea), mas somente um dos enantiômeros foi responsável pelo efeito teratogênico (CALDWELL, 1995).

Nesse caso, em que um isômero possuiu o efeito terapêutico enquanto o outro foi responsável pelo efeito não desejável, a decisão de uma mistura racêmica ir para o mercado ao invés do fármaco enantiomericamente puro deveria ser precedida de estudos clínicos do fármaco para isômeros separados a fim de justificar a decisão tomada (KRSTULOVIC, 1989).

A possibilidade de um enantiômero racemizar em solução permite que ocorra o fenômeno da inversão quiral. Esta característica conduz a uma aceitação da comercialização de fármacos estereoisoméricos na forma de recemato (LIMA, 1997).

Considerando que o organismo contém receptores farmacológicos constituídos por macromoléculas (proteínas e ácidos nucleicos), que por sua vez, são compostas por aminoácidos e açúcares, estruturas passíveis de estereoisomeria

por possuírem centros quirais, pode-se dizer que, o organismo é um meio quiral (CALVEY, 1995).

Os receptores farmacológicos são passíveis de apresentar estereoisomeria. Sendo assim, diferentes enantiômeros de um fármaco quiral podem apresentar diferenças de interação com estes receptores, desencadeando diferentes reações (CALVEY, 1995). Como resultado, diferenças podem ocorrer na farmacocinética, farmacodinâmica e toxicidade desses enantiômeros, sendo possíveis diferentes interações, como: dois enantiômeros podem ter eficácia e toxicidade idênticas qualitativa e quantitativamente; enantiômeros podem ter os mesmos efeitos terapêuticos e tóxicos, mas diferem em magnitude desses efeitos; um dos enantiômeros pode possuir toda atividade farmacológica, e o outro pode ser inativo biologicamente ou apresentar atividade indesejável; ambos enantiômeros podem ser farmacologicamente ativos, mas qualitativamente diferentes em efeitos terapêuticos e tóxicos (CALDWELL, 1995; LIMA, 1997; RENTSCH, 2002).

Como os enantiômeros não apresentam diferenças físicas nem químicas, não podem ser analisados pelos métodos comuns, necessitando de técnicas analíticas especiais, tanto do ponto de vista qualitativo quanto quantitativo. Alguns métodos empregados são: polarimetria, ressonância magnética nuclear, cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gás-líquido com fase estacionária quiral e dicroísmo circular (LIMA, 1997).

Atualmente no Brasil, para o registro de medicamentos genéricos e medicamentos similares, é preconizado que o solicitante do registro apresente documentação do fabricante do fármaco contendo informações, no caso de fármacos que apresentam quiralidade, sobre os teores dos estereoisômeros, cuja proporção de estereoisômeros possa comprometer a eficácia e a segurança do medicamento (BRASIL, 2007; BRASIL, 2007a).

De acordo com Rentsch (2002), os fármacos enantiômeros tornaram-se mais importantes nos últimos 20 - 30 anos, já que 56% dos fármacos são compostos quirais e 88% destes fármacos sintéticos são usados terapêuticamente como racematos.

Grande parte dos anestésicos utilizados apresenta quiralidade, em função da presença de carbono assimétrico (quiral) em suas moléculas. Tem sido possível, com o avanço do desenvolvimento no campo da estereoquímica, a separação de enantiômeros, bem como o estudo das características de cada um deles

separadamente, com o objetivo de aumentar a eficácia e a segurança destes agentes anestésicos (ABERG, 1972).

1.9 – A descoberta da anestesia

Antes da era moderna, apenas algumas poucas civilizações do mundo deixaram escrituras que relatam a tentativa de aliviar a dor durante os procedimentos cirúrgicos. Os chineses se beneficiavam com a milenar acupuntura. Os Incas da América do Sul usufruíam a anestesia pela mastigação das folhas de coca. Nas sociedades cristãs européias da Idade Média o controle da dor através de ervas ou outros compostos químicos podia ser interpretado como magia ou bruxaria, e a doença, a dor e o sofrimento eram vistos como castigos divinos para purificação da alma. Mulheres eram severamente punidas se usassem de qualquer ritual não religioso para alívio da sua dor durante o parto (MAIA & FERNANDES, 2002).

Os estudantes de Medicina imitavam seus mestres e muitas vezes omitiam o registro de qualquer sofrimento do paciente, ao tomarem notas das operações que testemunhavam. Como havia pouco que pudesse ser feito para aliviá-la, e parecendo ser um componente aparentemente inseparável das lesões, a dor era enobrecida e a capacidade de suportá-la era uma nobre virtude (MAIA & FERNANDES, 2002).

A falta de anestesia satisfatória constituía grande obstáculo para o desenvolvimento e aperfeiçoamento de novas técnicas cirúrgicas. Utilizavam-se drogas como álcool e derivados do ópio, administrados por via oral para se proporcionar algum conforto. Entretanto, o método mais efetivo era a contenção do paciente pela força. Os gritos de dor ecoavam a grandes distâncias, motivo pelo qual os primeiros hospitais tinham seus anfiteatros de cirurgia localizados na sua parte mais alta e isolada, as famosas cúpulas. O bom cirurgião era aquele que operasse rápido. Para a maioria dos cirurgiões da época, era utopia separar a dor do bisturi (MAIA & FERNANDES, 2002).

Foi a partir de 16 de outubro de 1846, que o mundo tomou conhecimento da possibilidade de se operar sem dor. Um jovem estudante da Faculdade de Medicina de Harvard e odontologista, William Thomas Green Morton, demonstrou e divulgou publicamente, em importante ambiente médico, o uso, ainda que extremamente

precário, da anestesia geral para cirurgia, utilizando vapores de éter sulfúrico (REIS, 2006).

No Brasil, a primeira anestesia foi realizada pelo Dr. Roberto Jorge Haddock Lobo, nascido em Portugal, em um estudante da Escola de Medicina do Rio de Janeiro, Francisco d'Assis Paes Leme, com intenção apenas experimental, em 20 de maio de 1847 (REIS, 2006).

Em agosto de 1884, Karl Köller descobriu referências sobre analgesia tópica causada pela injeção de cocaína sob a pele, ocasionando a perda do tato e da dor. Estudou com atenção a famosa publicação de Freud, "*Über Coca*", e reviu o compêndio de farmacologia pelo qual estudara na Universidade. Após essas leituras, Köller tirou imediatas conclusões, pois, praticando clínica e cirurgia oftalmológica, foi levado a examinar com sucesso o efeito da droga em olhos de animais e em seus próprios olhos (REIS, 2009).

As observações preliminares de Köller foram apresentadas no Congresso Oftalmológico da Sociedade Germânica, realizado em Heidelberg, em 15 de setembro 1884 e, em poucos meses, numerosos casos bem-sucedidos de aplicação da nova descoberta foram relatados em vários países (REIS, 2009).

Complicações clínicas com o uso da cocaína, algumas trágicas, levaram a pesquisas de outros anestésicos locais menos tóxicos. Após investigações com mais de uma centena de amino-ésteres derivados do ácido paraminobenzóico, Einhorn, em 1904, sintetizou a procaína (éster dietil-amino-etílico), obtendo grande avanço científico e prático no campo da anestesia regional. Outros anestésicos locais foram sintetizados até 1932, como benzocaína, piperocaína e tetracaína. A partir de 1943, iniciou-se a fase dos anestésicos locais modernos, amino-amidas, como lidocaína, prilocaína, etidocaína, bupivacaína, levobupivacaína e ropivacaína (REIS, 2008).

1.10 – Cloridrato de Bupivacaína

O cloridrato de bupivacaína (figura 2), quimicamente descrita como 1-butil-2',6'-pipecolidilxilidida, sendo relacionada química e farmacologicamente com os anestésicos locais do tipo amino-amida, se apresenta na forma de um pó cristalino com fórmula molecular $C_{18}H_{28}N_2O \cdot HCl$, peso molecular de 324,9 e com a seguinte fórmula estrutural:

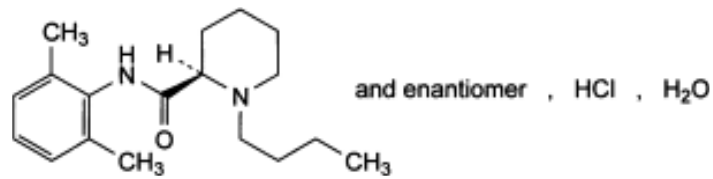


Figura 2: Fórmula estrutural do cloridrato de bupivacaína.

A solubilidade do cloridrato de bupivacaína em água é cerca de 100mg/mL a 20°C, o coeficiente de partição (álcool oleílico/água) é 1565 e o pKa é 8,09 (THE MERCK INDEX, 2006).

A solução injetável de cloridrato de bupivacaína é usada como anestésico local na forma de mistura racêmica. Esse fármaco apresenta em sua estrutura um carbono assimétrico, apresentando assim, dois isômeros, a levobupivacaína (S (-) BVC) e a dextrobupivacaína (R (+) BVC) (figura 3), com comportamentos farmacológicos independentes em decorrência da estereosseletividade (BRAGA, 2009).

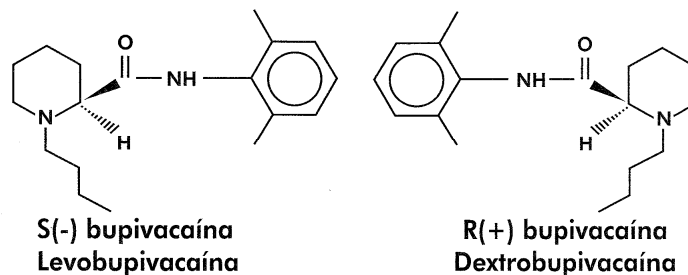


Figura 3: Fórmula estrutural da levobupivacaína e dextrobupivacaína

O cloridrato de bupivacaína tem, na sua potência e no tempo de duração de sua ação, os grandes diferenciais clínicos que o tornam o anestésico mais utilizado em procedimentos de anestesia locorregional. Além disso, a capacidade de promover bloqueio diferencial sensitivo-motor o posicionou como agente de grande valia para a anestesia obstétrica e outras que demandassem necessidade de deambulação precoce. Contudo, o potencial cardiotoxico da droga tem impedido sua utilização com a segurança necessária ao anestesiológico e ao paciente (ABERG, 1972).

A obtenção dos enantiômeros isolados da bupivacaína permitiu um melhor conhecimento das características individuais na ação da bupivacaína racêmica. Estudos demonstraram que ambos os isômeros possuem atividade anestésica local,

porém a R (+) BVC é responsável pela cardiotoxicidade da bupivacaína racêmica. Já a S (-) BVC, quando comparada à bupivacaína racêmica, é menos cardiotóxica (BRAGA, 2009) mas, segundo Lacassie e Columb (2003), este isômero possui menor grau de bloqueio motor.

A interação fármaco-receptor se faz de maneira tridimensional, resultando em diferenças significativas na afinidade e na atividade intrínseca de cada enantiômero com seu receptor específico. Assim, o efeito farmacológico varia potencialmente em relação direta com a quiralidade da droga e do receptor (DELFINO & VALE, 2000).

A menor toxicidade do isômero S (-) BVC deve-se à sua menor afinidade pelos canais de sódio das células cardíacas (VALENZUELA, 1995). Entretanto, o isômero R (+) BVC é três vezes mais potente em se ligar ao canal de sódio, o que torna a ligação iônica mais estável e o desacoplamento mais lento, resultando num maior efeito cardiotóxico, bem como maior duração do bloqueio motor (DELFINO & VALE, 2000).

Trabalhos experimentais realizados com os isômeros isolados da bupivacaína demonstraram que além de maior segurança, o isômero S(-) BVC possui boa eficácia clínica. Simonetti e colaboradores (1997) avaliaram a atividade anestésica local da S(-) BVC em nervo ciático de ratos e concluíram que este enantiômero possui a mesma potência anestésica e a mesma duração de bloqueios motor e sensitivo que a bupivacaína racêmica (SIMONETTI; VALINETTI; FERREIRA, 1997). Entretanto, alguns relatos apontam para relativa perda da eficiência anestésica da S(-) BVC em relação à bupivacaína racêmica. Mathias e colaboradores (1997) apresentaram resultados não favoráveis à S(-) BVC em termos de qualidade de bloqueio, requerendo, com frequência significativamente maior que a forma racêmica, complementação da anestesia (MATHIAS *et al*, 1997). Esta tentativa de otimizar o bloqueio motor se faz às custas do aumento da toxicidade, pois sendo a toxicidade dose-dependente, o aumento em miligramas da dose total invalida a finalidade para a qual a S(-) BVC foi obtida, ou seja, para redução do potencial cardiotóxico em relação a mistura racêmica (SIMONETTI, 1999).

Anestésias loco-regionais requerem, às vezes, doses elevadas de anestésicos locais, podendo ocorrer reações tóxicas, principalmente nos sistemas cárdio-vascular e nervoso central se injetadas inadvertidamente em estruturas vasculares, ou se infiltradas localmente em grandes extensões do organismo, permitindo absorção em quantidades consideráveis (TRACHEZ, 1999).

As observações realizadas com os isômeros isolados da bupivacaína levantaram a idéia de que misturas não racêmicas pudessem manter a eficácia anestésica da bupivacaína racêmica, e a segurança do isômero levógeno. Alguns pesquisadores passaram então a avaliar estas possibilidades para misturas com diferentes proporções entre o dextro e o levo enantiômero (SIMONETTI, 1999; FERREIRA, 1999).

Ferreira (1999) avaliou comparativamente em nervo ciático de rato, parâmetros de qualidade anestésica para a bupivacaína racêmica, levobupivacaína pura (100%), ropivacaína e para misturas com 90/10% e 75/25% de levo e dextrobupivacaína respectivamente. Seus achados mostraram que, para concentrações de 0,5%, a mistura com 75% levo e 25% dextrobupivacaína obteve tempo de latência significativamente menor que a mistura racêmica, além de tempo de analgesia superior a quaisquer das outras misturas avaliadas (FERREIRA, 1999).

Porém, Côrtes e colaboradores (2003), com o objetivo de avaliar a qualidade da anestesia com o emprego da bupivacaína racêmica a 0,5%, da mistura enantiomérica da bupivacaína (S75 – R25) a 0,5% e ropivacaína a 0,75% associadas ao fentanil em anestesia peridural em gestantes submetidas a cesarianas, observaram que não houve diferença entre os grupos, exceto na qualidade da anestesia que foi inferior sob o aspecto clínico nos grupos com predominância da fração levógira, havendo necessidade de complementação da anestesia em alguns casos (CORTES *et al*, 2003).

Com o objetivo de encontrar uma relação enantiomérica que assegurasse bloqueio motor e maior margem de segurança em relação a bupivacaína racêmica, pesquisas sobre estereosseletividade levaram ao desenvolvimento de novas rotas de síntese, permitindo uma nova formulação de bupivacaína que contém 25% do isômero R (+) e 75% do isômero S (-), fruto de trabalho genuinamente nacional (SIMONETTI, 2006; BRAGA, 2009).

Até o momento, os métodos analíticos presentes nos compêndios oficiais avaliam o total de isômeros em solução, não havendo separação e quantificação das proporções de cada isômero na solução injetável de cloridrato de bupivacaína (USP 34, 2011; FARMACOPÉIA, 2010; BRITISH, 2009). Assim, durante a análise realizada pelos laboratórios oficiais de controle da qualidade, não é possível através das metodologias farmacopéicas, avaliar diferentes proporções dos isômeros presentes na nova formulação de bupivacaína que já está sendo comercializado no

Brasil. Como também observado por Rio (2009), não é possível avaliar se as proporções dos isômeros na solução racêmica de cloridrato de bupivacína, provenientes de denúncias com suspeita de ineficácia terapêutica, contêm realmente 50% de cada um desses isômeros (RIO, 2009).

1.11 – Desenvolvimento de método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Fase Estacionária Quiral (CLAE-FEQ)

O desenvolvimento de métodos analíticos adequados para determinar precisamente as concentrações dos enantiômeros de um fármaco em preparações farmacêuticas é, segundo Bonato, Jabor e Gaitani (2005), um pré-requisito essencial para controlar a qualidade. As principais técnicas analíticas capazes de fornecer essas informações são baseadas na ciência da separação (BONATO, JABOR, GAITANI, 2005).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a técnica mais utilizada para a separação de enantiômeros e pode ser realizada através de procedimentos indiretos e diretos. No procedimento indireto, o par de enantiômeros é submetido a uma reação de derivação com um reagente quiral e enantiomericamente puro, visando obter os diastereoisômeros, que podem ser separados empregando fases estacionárias não quirais. Nos procedimentos diretos, a separação do par de enantiômeros acontece pelo uso de fases móveis contendo aditivos quirais, ou então, pelo uso de fases estacionárias quirais. Não há dúvidas de que o desenvolvimento e a comercialização das fases estacionárias quirais empregadas em CLAE facilitou enormemente a obtenção de separações enantiosseletivas de fármacos quirais (BONATO, JABOR, GAITANI, 2005).

1.11.1 – Fases estacionárias quirais (FEQs)

O conceito básico de resolução quiral teve início em 1809, com o cristalógrafo Hauy, mas foi Pasteur, em 1848, que efetivamente descobriu a diferença de atividade entre dois enantiômeros, ao publicar que a enzima *Penicillium glaucum* consome mais rapidamente o enantiômero (+) tartarato de amônio do que o (-) tartarato de amônio (BERTHOD, 2006).

Pasteur também foi responsável pela primeira resolução de enantiômeros. Após observar que os cristais do racemato de amônio tartarato de sódio possuíam duas formas enantiomórficas distintas, ele separou-os manualmente, com o auxílio de uma pinça e uma lente de aumento, e demonstrou que os dois tipos de cristais rotacionavam a luz polarizada em sentidos opostos. Este experimento de Pasteur é conhecido como marco da resolução quiral (KOSTYANOVSKY, 2003).

A primeira técnica de relativo sucesso na resolução de enantiômeros foi a cromatografia em papel, tendo sido eficiente na separação de alguns aminoácidos aromáticos. Baseado nestes trabalhos de separação em papel, Dalgliesh, em 1952, propôs o modelo de “interação de três pontos” entre enantiômeros e o seletor quiral (DALGLIESH, 1952). Segundo este modelo, são necessárias três interações simultâneas entre um dos enantiômeros e o seletor quiral, sendo que pelo menos uma delas deve ser dependente da estereoquímica do analíto. Além disso, estas interações devem ser de sítios distintos tanto no enantiômero quanto no seletor quiral (figura 4a). O outro enantiômero interage somente com dois sítios do seletor quiral, conforme mostrado na figura 4b.

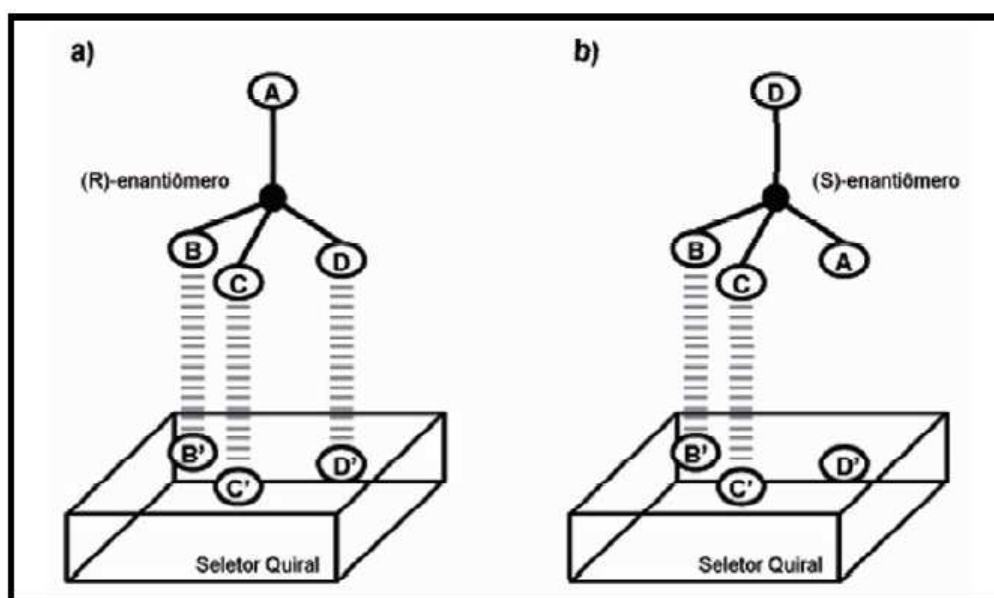


Figura 4: Representação do modelo de interação de três pontos.

Este modelo considera que apenas as interações atrativas são responsáveis pela discriminação quiral. Atualmente, porém, é aceito que as interações repulsivas também participam do mecanismo de resolução enantiomérica. Assim, por exemplo, duas interações podem ser repulsivas se uma terceira for atrativa e forte o suficiente

para promover a formação de, no mínimo, um dos complexos diastereoisoméricos transitórios enantiômero/seletor quiral. Se as três interações são atrativas, então o enantiômero da figura 4a estará mais fortemente ligado ao seletor do que o enantiômero na figura 4b (DAVANKOV, 1997).

Os principais tipos de interações, responsáveis pela discriminação, entre os enantiômeros de um analito e o seletor quiral, no sentido decrescente de intensidade, são: interação coulômbica, ligação de hidrogênio e interação estérica (muito forte), interação π - π e íon-dipolo (fortes), interação dipolo-dipolo (intermediária), interação dipolo-dipolo induzido (fraca) e dispersão de London (muito fraca). As interações coulômbicas e do tipo π - π podem ser atrativas ou repulsivas, a estérica é repulsiva e as demais são todas atrativas (BERTHOD, 2006).

O modelo de “interação de três pontos” é bem aceito no meio científico, principalmente para explicar a discriminação de aminoácidos em FEQ do tipo troca de ligantes. Entretanto, este mesmo modelo é freqüentemente questionado para explicar as separações em seletos quirais de proteínas. Devido à complexa estrutura tridimensional das proteínas, o mecanismo de discriminação quiral não é completamente conhecido, sendo considerado estereo-específico para cada mistura enantiomérica (YANG & HAGE, 1997).

Os processos envolvidos na formação dos complexos diastereoisoméricos transitórios analito/FEQ não são simples e singulares, visto que várias interações simultâneas são requeridas para discriminar um enantiômero do outro. Nos mecanismos enantiosseletivos, muitas vezes as interações fracas podem desempenhar um papel tão decisivo quanto as interações fortes (PIRKLE & POCHAPSKY, 1986). Além disso, geralmente os seletos quirais possuem vários grupos que podem apresentar mais de um tipo de interação com o analito. Adicionalmente, a fase móvel desempenha um papel importante na resolução enantiomérica. Mesmo assim, usualmente a escolha do seletor quiral é feita considerando as interações mais fortes entre os enantiômeros e a fase estacionária quiral (BERTHOD, 2006).

O crescente número de FEQs desenvolvidas e comercialmente disponíveis se, por um lado, possibilita a separação de enantiômeros de uma variedade de compostos, ao mesmo tempo dificulta a escolha da fase estacionária mais apropriada para cada tipo de separação. Em vista disto, Wainer (1993) classificou as

FEQs em cinco tipos diferentes (I-V), de acordo com as interações analito/FEQ que levam ao reconhecimento quiral:

Tipo I: A grande maioria das fases do tipo I é baseada em derivados de aminoácidos, cujos grupos funcionais atuam como sítios de interação entre o analito e a FEQ. Os complexos diastereoisoméricos analito/FEQ são formados, principalmente, por meio de interações π - π , ligação de hidrogênio e interações dipolo-dipolo e estéricas.

Tipo II: Neste grupo estão classificadas as FEQs baseadas em derivados de polissacarídeos. A formação dos complexos diastereoisoméricos analito/FEQ ocorre, principalmente, devido a interações π - π , ligação de hidrogênio e interações dipolo-dipolo. Entretanto, a formação de complexos de inclusão contribui de forma efetiva para o mecanismo de discriminação quiral.

Tipo III: O reconhecimento quiral é devido a formação de complexos de inclusão decorrente da entrada do analito na cavidade quiral da fase estacionária. Interações secundárias, tais como ligação de hidrogênio e interações estéricas, estabilizam os complexos diastereoisoméricos formados. Ciclodextrinas, polímeros impressos molecularmente (MIPs), éteres de coroa e alguns polímeros sintéticos, são fases quirais pertencentes a este grupo.

Tipo IV: O mecanismo de separação dos enantiômeros é baseado na formação de complexos diastereoisoméricos ternários envolvendo enantiômero de uma molécula quiral (L), usualmente um aminoácido; um íon de um metal de transição (M), normalmente Cu^{2+} ; e os enantiômeros do analito racêmico (R e S). Os complexos formados, representados por L-M-R e L-M-S, podem ser separados se possuírem estabilidades diferentes. As FEQs baseadas em troca de ligantes são classificadas neste tipo IV.

Tipo V: Quando a FEQ é uma proteína, o mecanismo de reconhecimento quiral é baseado, principalmente, em interações polares e hidrofóbicas.

Em outra classificação, sugerida por Berthod (2006), as FEQs foram agrupadas de acordo com o tipo de seletor quiral, natural ou sintético, da fase estacionária (tabela 1).

Tabela 1: Seletores quirais e principais interações com analitos quirais

Seletor Quiral	FEQs	Principais Interações	
Natural	Proteínas	Interações hidrofóbicas e eletrostáticas	
	Ciclodextrinas	Complexo de inclusão e ligação de hidrogênio	
	Polissacarídeos	Complexo de inclusão e interação atrativas	
	Glicopeptídeos	Complexo de inclusão e interações iônicas	
	Macrocíclicos		
Cinchona	Interações eletrostáticas		
Sintético	Tipo Pirkle	Interação π - π e ligação de hidrogênio	
	Troca de Ligantes	Interações coulômbicas e íon-dipolo	
	Éteres de Coroa	Complexo de inclusão e íon-dipolo	
	Polímeros Sintéticos	Interação π - π , ligação de hidrogênio e interação dipolo-dipolo	
		MIPs	Específico para cada analito

Fonte: BERTHOD, 2006.

Neste estudo, 2 tipos diferentes de colunas com fase estacionária quiral serão usadas, uma baseada em proteínas e a outra baseada em glicopeptídeos macrocíclicos.

1.11.1.1 – Proteínas

As proteínas apresentam uma estrutura altamente complexa e possuem diferentes sítios que podem interagir com analitos quirais. Apesar do mecanismo de reconhecimento quiral não estar totalmente elucidado, é conhecido que as principais interações envolvidas na discriminação quiral são eletrostáticas, hidrofóbicas e ligações de hidrogênio (ALLENMARK, 1989).

As fases quirais protéicas podem ser preparadas por dois métodos distintos. Em um deles, o seletor quiral é adsorvido no suporte da fase estacionária, usualmente sílica, enquanto no outro a proteína é quimicamente ligada ao suporte cromatográfico por meio de ligações covalentes (HAGINAKA, 2001).

Diferentes proteínas têm sido utilizadas no preparo de colunas comerciais e dentre elas destacam-se a albumina sérica bovina, a albumina sérica humana, a ovomucóide e a α_1 -glicoproteína ácida (HAGINAKA, 2008). Estas FEQs são altamente sensíveis a variações nas condições cromatográficas, uma vez que alterações no pH da fase móvel, solventes orgânicos, aditivos e temperatura podem

modificar a conformação espacial e os sítios de discriminação quiral destes seletores. Desta forma, a alteração nestes parâmetros pode afetar a retenção e a enantioseletividade dos analitos (HAGINAKA, 2001).

Devido a sua baixa capacidade de carga, decorrente da pequena quantidade de seletor quiral que pode ser imobilizado por grama de sílica, as fases estacionárias protéicas não são utilizadas para a separação de enantiômeros em escala preparativa. Entretanto, as mesmas encontram grande aplicabilidade na área biomédica, principalmente em estudos de interação fármaco-proteína (FRANCOTTE, 2001).

1.11.1.2 – Glicopeptídeos Macrocíclicos

As fases quirais baseadas em glicopeptídeos macrocíclicos foram introduzidas por Armstrong em 1994. Vancomicina, rifamicina B e tiostreptona, covalentemente ligadas à sílica gel, demonstraram excelente enantiosseletividade para uma grande variedade de compostos quirais (ARMSTRONG *et al*, 1994).

A molécula de vancomicina possui 18 centros quirais; 3 cavidades macrocíclicas, as quais contêm 5 anéis aromáticos; além de duas cadeias laterais, uma é um carboidrato dímero e a outra um N-metil aminoácido. Há também diversos grupos funcionais: 9 grupos hidroxila, 2 amino, 7 amida e 2 átomos de cloro substituintes em dois anéis aromáticos diferentes (ILISZ; BERKECZ; PETER, 2006).

Devido à presença das cavidades quirais e de diversos tipos de grupos funcionais, a enantiosseparação pode ocorrer por diferentes mecanismos: formação de complexos de inclusão, ligação de hidrogênio, interação π - π , eletrostáticas, estéricas, dipolo-dipolo e dispersão de London. A fase móvel determina quais destas interações irão predominar no mecanismo de reconhecimento quiral (ILISZ; BERKECZ; PETER, 2006).

Um dos grandes atrativos deste tipo de FEQ é que elas podem ser usadas no modo normal, reverso, polar orgânico e polar iônico. Entretanto, os modos reverso e polar iônico são os mais eficientes para este tipo de FEQ (BERTHOD, 2009).

1.11.2 – Adequação do Sistema Cromatográfico

A adequação do sistema é formada por um conjunto de testes aplicados a métodos cromatográficos. Para verificar se os sistemas cromatográficos estão adequados quanto à resolução e a repetitividade são usados vários parâmetros (fator de retenção, número de pratos teóricos, fator de seletividade, resolução, fator de cauda e desvio padrão relativo entre as replicatas). Estes testes são baseados no conceito de os que equipamentos, as operações analíticas e as amostras para análise constituem um sistema integral que devem ser avaliados como um todo (USP 34, 2011).

1.11.2.1 – Volume interno (V_i) e o volume “morto” referente à coluna (V_o)

Para determinar os parâmetros anteriormente mencionados faz-se necessário calcular o volume “morto”(V_o) referente à coluna, que é o volume compreendido entre o injetor e o detector incluindo a coluna. O V_o da coluna representa cerca de 95% do V_o total. O fato de que o V_o dos injetores, das células de fluxo e dos detectores sejam minimizados pelos fabricantes faz com que o volume de solvente contido nestas partes seja relativamente pequeno (representa cerca de 5% do V_o total). O volume referente à coluna (V_o) poderá ser determinado experimentalmente ou calculado levando-se em conta as dimensões da coluna e o tamanho da partícula. As expressões abaixo correlacionam o volume interno da coluna vazia (V_i) com o V_o da coluna e o diâmetro da partícula de seu preenchimento (CASS & DEGANI, 2001; FERRAZ, 2001).

$$V_i = \pi R^2 C$$
$$V_o = (0,5 \text{ ou } 0,7) \times V_i$$

Sendo:

$\pi = 3,14159\dots$

R = raio interno da coluna

C = comprimento da coluna

0,5 e 0,7 são fatores matemáticos para tamanho de partícula igual a $5\mu\text{m}$ e $10\mu\text{m}$, respectivamente.

1.11.2.2 – Fator de retenção ou fator de capacidade (K)

O fator de retenção ou fator de capacidade (K) é a razão entre o tempo que um componente permanece imobilizado na fase estacionária e o tempo em que ele migra no seio da fase móvel. A retenção (K) indica o grau de afinidade que a coluna e a fase móvel possuem em relação ao componente (CASS *et al.*, 2001; FERRAZ, 2001).

O fator de retenção (K) é um parâmetro que permite comparar o tempo ou volume de retenção de um componente da amostra com o “volume morto” (Vo). Em outras palavras, revela em quanto tempo em relação ao valor de Vo o analito elui (CASS & DEGANI, 2001; FERRAZ, 2001).

Devem-se evitar valores de retenção (K) próximos ao Vo pois, neste caso, ocorrerá pouca interação do composto analisado com a fase estacionária podendo ocorrer a coeluição com um outro componente da amostra. Da mesma forma, não se deve trabalhar com valores excessivamente altos de retenção, porque isto fará com que ocorra o alargamento dos picos. Idealmente, o valor de (K) deveria variar entre um e vinte. A expressão a seguir correlaciona o fator de retenção (K) de um soluto com o seu volume de retenção (Vr) e o volume “morto” (Vo) referente à coluna (CASS & DEGANI, 2001; FERRAZ, 2001).

$$K = \frac{V_r - V_o}{V_o}$$

1.11.2.3 – Eficiência ou número de pratos teóricos (N)

A eficiência ou número de pratos teóricos (N) é uma medida de quanto o sistema incluindo injetor, tubulações, conexões, coluna, fase móvel, fase estacionária e detector está diluindo a banda do componente analisado durante a corrida cromatográfica. A eficiência (N) é uma medida do alargamento que o sinal sofre durante a passagem do analito pelo sistema. As expressões abaixo são usadas para o cálculo do número de pratos teóricos (N). Os cálculos que usam a largura à meia altura do pico são mais confiáveis, já que o erro na medida da largura do pico na meia altura é menor que a medida da largura do pico na linha de base (CASS & DEGANI, 2001; FERRAZ, 2001).

$$N = 16(Vn/W)^2 \quad \text{ou} \quad N = 5,54(Vn/W_{1/2})^2$$

Sendo:

V_n = Volume de eluição do pico

W = Largura do pico na linha de base

$W_{1/2}$ = Largura do pico na meia altura

1.11.2.4 – Fator de separação ou fator de seletividade (α)

O fator de separação ou fator de seletividade (α) compara a retenção de um componente (K_1) com a do outro componente (K_2) mais retido. A seletividade indica até que grau o sistema químico (depende da natureza química da coluna e da fase móvel) está resolvendo (separando) os componentes. Indica o quanto a fase estacionária ou a fase móvel interage com uma substância em comparação com outra. Valores de fator de separação maior que um indica que o sistema químico está resolvendo (separando) os componentes (CASS & DEGANI, 2001; FERRAZ, 2001).

$$\alpha = \frac{K_2}{K_1}$$

1.11.2.5 – Fator de resolução ou resolução (R)

A resolução (R_s) mede o grau e a qualidade da separação entre dois picos em um determinado sistema. Pode ser calculada a partir das larguras dos picos e seus respectivos tempo de retenção, pela expressão abaixo (CASS & DEGANI, 2001; FERRAZ, 2001).

$$R = \frac{(t_2 - t_1)}{\frac{1}{2}(W_1 + W_2)}$$

Sendo:

t_2 e t_1 = tempo de retenção de dois picos

W_2 e W_1 = Largura dos picos na meia altura

A resolução é afetada pela retenção (K), pela seletividade (α) e pela eficiência (N) de forma diferente conforme a equação da resolução abaixo (CASS & DEGANI, 2001; FERRAZ, 2001).

$$R = 1/4 \left((\alpha - 1) / \alpha \right) (\sqrt{N}) (K_2 / (1 + K_2))$$

Uma resolução entre picos de 1.0, significa 2,3 % de sobreposição, para resolução igual 1.5, somente 0,1 % e nenhuma sobreposição a partir de resolução superior a 1,8. (CASS & DEGANI, 2001; FERRAZ, 2001).

1.11.2.6 – Fator de cauda (FC) ou fator de assimetria do pico (As)

O fator de cauda (FC) determina o formato do pico. Geralmente os picos não são simétricos. A Farmacopéia Americana adota o fator de cauda, que é calculado a 5% da altura do pico (CASS & DEGANI, 2001; FERRAZ, 2001; USP 34, 2011).

$$FC = W_{0,05} / 2f$$

Sendo:

$W_{0,05}$ = Largura do pico a cinco por cento da altura

f = Distância da linha vertical do sinal máximo até a linha vertical e perpendicular à linha de base que intercepta o traço a cinco por cento da altura.

Outro modo de caracterizar o formato do pico é determinando o fator de assimetria (As), que é calculado a 10 % da altura do pico. A tabela 2 mostra os valores correspondentes aos dois fatores (FURMAN, DORSEY & SNYDER, 1998).

Tabela 2 - Relação entre fator de cauda e o fator de assimetria

<i>Fator de cauda (a 5 %)</i>	<i>Fator de assimetria (a 10 %)</i>
1,0	1,0
1,2	1,3
1,4	1,6
1,6	1,9
1,8	2,2
2,0	2,5

Fonte: FURMAN, DORSEY & SNYDER, 1998.

1.11.2.7 – Desvio padrão relativo (DPR)

O desvio padrão relativo das replicatas (DPR) é o parâmetro da adequação do sistema que mede a repetitividade do método analítico entre as injeções da mesma amostra contida no mesmo frasco.

$$\text{DPR} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100$$

Sendo:

DPR = desvio padrão relativo ou coeficiente de variação

DP = desvio padrão das replicatas

CMD = concentração média determinada

1.11.2.8 – Fatores que afetam no resultado de adequação do sistema

Vários fatores afetam a retenção (K), a seletividade (α) e a eficiência (N) e, conseqüentemente, alteram a resolução do sistema. A retenção (K) além de ser afetada pela polaridade da fase móvel, também é afetada pela polaridade da fase estacionária, pela área superficial do suporte, pela percentagem de recobrimento da fase estacionária (densidade de carga), tamanho do poro e temperatura da coluna (CASS & DEGANI, 2001; FERRAZ, 2001).

A seletividade (α), além de ser controlada pelas características químicas da fase móvel, também é afetada pelo pH da fase móvel e pelas características químicas da fase estacionária (CASS & DEGANI, 2001; FERRAZ, 2001).

A eficiência (N) é determinada pelo tamanho médio das partículas da fase estacionária e pela forma destas partículas (esférica ou irregular), uniformidade do leito da fase estacionária, temperatura da coluna, viscosidade da fase móvel, fluxo da fase móvel, volume de injeção, carga (massa) de amostra injetada, tempo de retenção do pico usado para o cálculo de N, fórmula usada para o cálculo de N, comprimento e diâmetro da coluna, polaridade (força de eluição) do solvente que contém a amostra e efeitos extracoluna (como conexões, tubulações, célula, injetor etc.) (CASS & DEGANI, 2001; FERRAZ, 2001).

1.11.2.9 – Limites dos parâmetros de adequação do sistema

Os parâmetros a serem medidos e seus limites recomendados para garantir a adequação do sistema de acordo com a US-FDA e da USP são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Limites dos parâmetros para a adequação do sistema

Parâmetros	(US-FDA, 2000)	(USP 34, 2011)
Fator de capacidade (K)	K > 2	K > 2
Nº. de pratos teóricos (N)	Em geral N > 2000	Em geral N > 2000
Resolução (R)	R > 2,0	R > 2,0
Fator de cauda (FC)	FC < 2	FC < 2
Repetitividade (DPR)	DPR < 1%, para n > 5	DPR < 2%

Fonte: USP 34, 2011.

1.12 – Validação de método analítico

A necessidade de se demonstrar qualidade nas análises químicas dos produtos farmacêuticos está sendo cada vez mais reconhecida e exigida, pois dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas, colocando os pacientes em risco em função de sua inadequabilidade em termos de segurança, qualidade ou eficácia (ROCA *et al*, 2007).

Para garantir a segurança do paciente, o INCQS está consciente da importância de possuir um efetivo Sistema da Qualidade que demonstre a sua competência técnica de produzir resultados tecnicamente válidos, de tal modo que os resultados ali produzidos possam subsidiar, se for necessário, o cumprimento da lei e da ação legal (ROCA *et al*, 2007). Assim, o INCQS deve atender aos requisitos da ABNT NBR ISO/IEC 17025 para seleção de métodos de ensaios (item 5.4.2), desenvolvimento de métodos de ensaio pelo laboratório (item 5.4.3), utilização de métodos não normalizados (item 5.4.4) e validação de métodos (item 5.4.5) (ABNT, 2005; INMETRO, 2010).

É fundamental que os laboratórios analíticos disponham de meios e critérios objetivos para demonstrar, por meio da validação, que os métodos de ensaio que executam conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida. Assim, os laboratórios devem validar: métodos não normalizados; métodos desenvolvidos pelo próprio laboratório; métodos normalizados usados fora dos escopos para os quais foram concebidos e ampliações e modificações de métodos normalizados (INMETRO, 2010).

Os parâmetros de validação podem variar de acordo com o tipo de ensaio, como mostra a quadro 1. Diferentes métodos de análise requerem diferentes esquemas de validação, e estão divididos em quatro categorias (INMETRO, 2010).

Quadro 1: Parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio

Parâmetros	Tipo de ensaio			
	Qualitativo	Determinação do componente (ou analito) em maior teor (1)	Análise de elementos menores e traços (2)	Propriedades Físicas
Precisão		✓	✓	✓
Seletividade	✓	✓	✓	✓
Tendência / Recuperação		✓	✓	✓
Robustez	✓	✓	✓	✓
Linearidade / Faixa de trabalho		✓	✓	✓
Limite de Detecção	✓		✓	
Limite de Quantificação			✓	

Fonte: In-House Method Validation – A guide for Chemical Laboratories KING, 2003.

1.12.1 – Seletividade

A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição. Os componentes podem aumentar ou reduzir o sinal devido ao analito, sendo que a magnitude do efeito também pode depender da concentração (INMETRO, 2010).

Se a matriz sem o analito não estiver disponível, a seletividade pode ser testada comparando-se as inclinações das curvas de adição padrão. Uma maneira de se fazer é preparando-se dois grupos de amostras que contenham a mesma adição de analito para cada nível de concentração. Um grupo inclui a matriz da amostra (contendo um nível básico do analito) e o outro grupo não inclui a matriz da amostra. Os resultados destas amostras podem ser representados em um mesmo gráfico em função da concentração do analito adicionado. Se as inclinações destas duas curvas de regressão linear forem as mesmas, o único efeito de matriz presente é a interferência natural causada pelo nível básico do analito. Uma segunda maneira é através da avaliação com detectores modernos (arranjo de diodos, espectrômetro de massas), que comparam o espectro do pico obtido na separação com o de um padrão e utiliza-se o resultado como uma indicação da presença do composto puro (HUBER, 1998; JENKE, 1996).

Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a tendência e a precisão estarão seriamente comprometidas (INMETRO, 2010).

1.12.2 – Faixa de trabalho

A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado e a concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro dos limites de quantificação superior e inferior do método analítico (INMETRO, 2010).

1.12.3 – Linearidade

É a capacidade de um método analítico de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, em uma dada faixa de concentração. A linearidade pode ser observada por meio da curva analítica, e é avaliada por intermédio da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO). É recomendado o uso de 7 concentrações equidistantes abrangendo a faixa especificada (INMETRO, 2010).

Souza & Junqueira (2005) realizaram esta avaliação através de uma planilha, que foi denominada de planilha de linearidade de curva analítica e onde, após verificação da ausência de valores discrepantes pelo teste de Jack-knife, são realizadas a estimativa dos parâmetros (coeficiente angular, coeficiente linear e coeficiente de correlação r), a avaliação do ajuste ao modelo através da análise dos resíduos (normalidade - teste de Ryan-Joiner; independência - teste de Durbin-Watson e homocedasticidade - teste de Brown-Forsythe) e a significância da regressão linear por análise de variância (ANOVA) (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005).

1.12.4 – Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito como, por exemplo, análise de traços, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectado pelo método. O limite de detecção (LD) é estabelecido por meio da análise de soluções de

concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável, mas não necessariamente quantificada (ICH, 1996; ANVISA, 2003; INMETRO, 2010).

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e veracidade. O limite de quantificação (LQ) é um parâmetro determinado, principalmente, para ensaios quantitativos de impurezas, produtos de degradação em fármacos e produtos de degradação em formas farmacêuticas e é expresso como concentração do analito na amostra. O limite de quantificação é estabelecido por meio de análise de soluções contendo concentrações decrescentes até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis (ICH, 1996; ANVISA, 2003; INMETRO, 2010).

Existem diferentes abordagens para a determinação do LQ e LD. A avaliação visual pode ser usada em métodos instrumentais e não instrumentais. A avaliação pela relação sinal/ruído é aplicável aos métodos instrumentais que apresentam ruído de linha de base. A relação é determinada pelas comparações dos sinais da amostra, em concentrações baixa do analito, com os sinais em branco. A relação sinal/ruído típica é 10/1 para o LQ e de 3/1 para o LD (ICH, 1996; ANVISA, 2003; INMETRO, 2007). O LQ e o LD também podem ser calculados graficamente a partir da curva analítica (THIER & KIRCHHOFF, 1992).

1.12.5 – Precisão

A precisão de um método analítico é o grau de concordância de uma série de resultados obtidos de múltiplas análises, de uma mesma amostra homogênea, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. É normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição e as duas formas mais comuns de expressá-la são por meio da repetitividade e precisão intermediária, sendo usualmente expressas pelo desvio-padrão que serão comparados pela tabela de *Horwitz* (HORWITZ, 1995; ICH, 1996; ANVISA, 2003; INMETRO, 2010).

1.12.5.1 – Repetitividade

A repetitividade é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição (condições de repetitividade), com o mesmo procedimento; mesmo

observador; mesmo instrumento usado sob as mesmas condições; mesmo local e repetições em curto espaço de tempo. Pode ser determinada por meio de análise de padrões, material de referência ou adição a branco em varias concentrações na faixa de trabalho. Sugere-se sete ou mais repetições para o calculo do desvio-padrão de repetitividade (DPR_r) (INMETRO, 2010).

1.12.5.2 – Precisão intermediária

A precisão intermediária refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), tais como: diferentes analistas, diferentes equipamentos e diferentes tempos. Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um laboratório e, como tal, mais aconselhável a usar. É recomendado um mínimo de 15 repetições para o cálculo do desvio-padrão de precisão intermediária (DPR_{spi}) (INMETRO, 2010).

1.12.6 – Tendência / Recuperação

É definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro e pode ser expressa como a percentagem de recuperação do analito. Os processos normalmente utilizados para avaliar a tendência de um método são, entre outros: uso de materiais de referência certificados, participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação. A tendência, quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica uma combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos (ANVISA, 2003; INMETRO, 2010).

No caso onde a matriz sem o analito não esteja disponível, a tendência pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas de adição do padrão a partir do 2º nível da curva analítica e a recuperação calculada em relação ao 1º nível da curva que não foi fortificado (INMETRO, 2010).

1.12.7 – Efeito Matriz

Segundo Miller & Miller (1993), utilizar soluções padrão simples para preparo da curva analítica, sem a realização prévia dos testes de efeitos de matriz, significa supor que estes efeitos não existem. Em diversas áreas, esta premissa é freqüentemente inválida (MILLER & MILLER, 1993).

Testes de efeito de matriz consistem no preparo de curvas analíticas simples (curvas de analito em solventes) e curvas de materiais de referência ou de adição do analito em amostras branco ou não (curvas de analito em matriz) (INMAN *et al*, 1987; NATA, 1997; BRUCE, MINKKINEN & RIEKKOLA, 1998; EURACHEM, 1998; THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002; INMETRO, 2007).

As curvas de analito em matriz são preparadas por adição do analito a soluções teste, obtidas de amostras ensaiadas nas mesmas condições dos procedimentos normais. A análise de dados e os testes de premissas são realizados conforme delineamento experimental da linearidade (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002). O efeito da matriz será avaliado pelas comparações das inclinações e interseções par a par com da curva de adição do analito na matriz com a da curva analítica em solvente; o teste preconizado para comparação das inclinações e interseções das curvas é o teste de t (ARMITAGE & BERRY, 1994).

1.12.8 – Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica a confiabilidade do método durante o uso normal. Durante o desenvolvimento do método, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método a variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento (INMETRO, 2007; INMETRO, 2010).

Para determinar a robustez de um método de ensaio, pode-se recorrer ao teste de *Youden*. Trata-se de um teste que permite não só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, as quais o método é submetido, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações (INMETRO, 2007; INMETRO, 2010).

1.13 – Relevância do estudo para a vigilância sanitária

O trabalho desenvolvido durante o curso de especialização consistiu na avaliação das denúncias de ineficácia terapêutica de medicamentos com resultados satisfatórios realizados no INCQS no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2008, onde o fármaco cloridrato de bupivacaína está entre os quatro princípios ativos que apresentaram maiores notificações de denúncias de ineficácia terapêutica com resultados satisfatórios (RIO, 2009).

O método farmacopéico utilizado para análise deste fármaco no INCQS é o método da Farmacopéia Brasileira que, no ensaio de teor, verifica o total de isômeros em solução, não havendo separação e quantificação de cada isômero individualmente (FARMACOPEIA, 2010).

A não determinação das proporções dos isômeros pode estar relacionada à não determinação da fonte de agravo que acarreta na diminuição da eficiência da ação de vigilância sanitária, tanto na proteção como na promoção da saúde da população. A ação da Vigilância Sanitária deve ocorrer quando verificada a existência de riscos ou situações prováveis de ocorrências de riscos, de modo que, encontradas as causas, atue-se para evitar a reincidência desses fatores.

Portanto, este estudo propõe desenvolver e validar um método analítico para avaliação das proporções dos enantiômeros da solução injetável de cloridrato de bupivacaína.

2 – OBJETIVO

2.1 – Objetivo geral

Desenvolver e validar método para o controle analítico dos enantiômeros da solução injetável de cloridrato de bupivacaína.

2.2 – Objetivos específicos

Desenvolver método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação das proporções dos enantiômeros da solução injetável de cloridrato de bupivacaína utilizando coluna com fase estacionária quiral.

Determinar os parâmetros de validação analítica no método desenvolvido e avaliá-los segundo exigências contidas em normas da Anvisa e do Inmetro.

3 – METODOLOGIA

3.1 – Aquisição e preparo dos produtos

Os produtos foram doados por dois fabricantes do medicamento. Foram utilizados 2 produtos de diferentes fabricantes da solução racêmica de cloridrato de bupivacaína, 2 produtos de diferentes fabricantes da solução racêmica de cloridrato de bupivacaína com glicose e 1 produto da nova formulação que contém 75% do isômero S(+) e 25% do isômero R(+) proveniente de um dos fabricantes, perfazendo um total de 5 produtos que participaram do estudo de validação, conforme quadro 2:

Quadro 2: Produtos que participaram do estudo de validação.

Produto	Fabricante	Lote	Descrição / Quantidade total
1 - Solução injetável de cloridrato de bupivacaína 5,0 mg/mL	1	11053582	Ampola de 20mL / 400mL
2 - Solução injetável de cloridrato de bupivacaína 5,0 mg/mL	2	11030261	Ampola de 20mL / 1000mL
3 - Solução injetável de cloridrato de bupivacaína 5,0 mg/mL com glicose	1	11053552	Ampola de 4mL / 480mL
4 - Solução injetável de cloridrato de bupivacaína 5,0 mg/mL com glicose	2	11050429B	Ampola de 4mL / 400mL
5 - Solução injetável de cloridrato de bupivacaína 5,0 mg/mL com 75% do isômero S e 25% do isômero R	1	11031672	Ampola de 20mL / 400mL

Foi realizado um pool de cada produto para realização dos ensaios neste estudo. Transferiu-se o equivalente a 200mL do conteúdo das ampolas de cada um dos 5 produtos para 5 frascos individualmente identificados e com tampa. Estes foram guardados em local seco e ao abrigo da luz.

3.2 – Equipamentos, materiais e reagentes

3.2.1 – Equipamentos

– Balança analítica com resolução de 0,01 mg, fabricante Mettler Toledo AX 205 (Departamento de Química do INCQS – Fiocruz).

– Cromatógrafo líquido de alta eficiência, fabricante Shimadzu com detector ultravioleta-visível com conjunto de fotodiodos SPD-M10A, forno CTO-20A, bomba

LC-10AD e injetor automático SIL-20A. Programa usado para aquisição de dados Class-vp. A maior parte dos experimentos foi realizada nesse sistema, que é mostrado na figura 5 (Departamento de Química do INCQS – Fiocruz; Identificação: HPLC 3).

– Cromatógrafo líquido de alta eficiência, fabricante Shimadzu com detector ultravioleta-visível SPD-10AV, forno waters modelo 1122, bomba LC-10AD e injetor automático SIL-20A. Programa usado para aquisição de dados Class-vp. (Departamento de Química do INCQS – Fiocruz; Identificação: HPLC 2).

– Equipamento de difração de raios X com detector contador de cintilação – NaI. Anodo: cobre. Velocidade de varredura: 4º/minuto. Potência: 30 mA x 40 kv. Arco de varredura: 5º a 80º. (UFRJ).

– Banho ultrassônico, fabricante Branson modelo 3210 (Departamento de Química do INCQS – Fiocruz).

– Sistema de purificação de água Milli-Q, fabricante Milipore modelo A-10 (Departamento de Química do INCQS – Fiocruz).



Figura 5: Cromatógrafo líquido, fabricante Shimadzu com detector ultravioleta-visível e conjunto de fotodiodos usado em todas as etapas da validação.

3.2.2 – Materiais e Reagentes

- Duas colunas Astec Chirobiotic V (glicopeptídeos macrocíclicos) (250 x 4,6) mm, 5µm. Fabricante: Supelco Sigma-Aldrich. Lotes: 7251 e 7341.
- Coluna Chiral-AGP (α 1-acid glycoprotein) (150 x 4,0) mm, 5 µm. Fabricante: Chrom Tech. Lote: 05-32.
- Os reagentes utilizados foram grau pró-análise e solventes grau CLAE. A água grau CLAE foi obtida passando água destilada por um sistema de purificação Millipore A-10.
- Substância Química de Referência cloridrato de bupivacaína apresentada como mistura racêmica. Lote: 1031. Fornecedor: Farmacopéia Brasileira (FB).
- Padrão secundário cloridrato de levobupivacaína. Lote: 0365/10. Fornecedor 1.
- Padrão secundário cloridrato de dextrobupivacaína. Lote: 0126/11. Fornecedor 1.
- Padrão cloridrato de bupivacaína (mistura racêmica). Lote: G1. Fornecedor: USP.
- Padrão cloridrato de bupivacaína (mistura racêmica). Lote: 172054. Fornecedor: WHO.
- Matérias-primas dos enantiômeros cloridrato de levobupivacaína lote: 0067/11, cloridrato de dextrobupivacaína lote: 0126/11 e mistura racêmica de cloridrato de bupivacaína lote: 04118/2011. Fornecedor 1.
- Matéria-prima mistura racêmica de cloridrato de bupivacaína lote: 2011014142. Fornecedor 2.
- Os produtos utilizados no estudo estão descritos no quadro 2 do item 3.1.

3.2.3 – Cuidados para demonstrar qualidade nas análises

Com a necessidade de demonstrar qualidade nas análises realizadas foram tomados alguns cuidados analíticos:

- Certificou-se que os cromatógrafos utilizados estivessem qualificados e verificados e a balança analítica calibrada durante todo o processo de desenvolvimento e validação do método analítico.
- O desempenho das colunas foi avaliado durante o uso através dos parâmetros de adequação do sistema.
- A pureza espectral dos sinais cromatográficos foi avaliada com auxílio do detector UV-VIS com arranjo de diodos (DAD) durante todo o desenvolvimento e validação do método analítico.
- Foi utilizada água deionizada com grau CLAE (0,22 µm) e reagentes grau CLAE.
- Toda a vidraria utilizada estava calibrada.

3.3 – Desenvolvimento do método analítico

O método foi desenvolvido pela técnica de análise por cromatografia líquida de alta eficiência com fase estacionária quiral (CLAE-FEQ). Foi utilizado o cromatógrafo fabricante Shimadzu com detector por absorção molecular na região do ultravioleta-visível com arranjo de diodos.

Neste estudo, 2 tipos diferentes de colunas com fase estacionária quiral foram usadas, uma empacotada com proteínas (chiral AGP α 1-acid glycoprotein 150 x 4,0mm – Chrom Tech 5 µm) e a outra com glicopeptídeos macrocíclicos (chirobiotic V - Vancomycin 250x4,6mm – Supelco 5 µm).

Para definir as condições analíticas inicialmente utilizadas em cada tipo de coluna no desenvolvimento do método, foram consultadas as informações contidas no catálogo geral de aplicação de cada tipo de coluna. A fim de complementar estas informações, foi realizado um estudo preliminar de algumas metodologias de

análises provenientes de artigos, onde os autores utilizaram as mesmas colunas quirais utilizadas nesse trabalho. Modificações adicionais nas condições analíticas inicialmente utilizada foram testadas conforme a necessidade para cada coluna.

Foi escolhida a coluna e as condições analíticas que apresentaram os melhores resultados em relação aos parâmetros de adequação do sistema: fator de cauda, resolução, pratos teóricos e fator de capacidade.

3.3.1 – Verificação da Adequação do Sistema Cromatográfico

Após definir a coluna e as condições analíticas a serem usadas, foram obtidos os parâmetros de adequação do sistema cromatográfico considerando que equipamento, partes eletrônicas, operações analíticas e amostras constituem um sistema integral que pode ser avaliado como um todo.

O teste de verificação da adequação do sistema foi executado para assegurar a performance do sistema cromatográfico no início e durante a realização das análises, provendo assim dados de qualidade aceitável.

Foi preparada solução da Substância Química de Referência – Farmacopéia Brasileira (SQR – FB) que é uma mistura racêmica dos enantiômeros do cloridrato de bupivacaína na concentração 1,6 mg/mL usando água deionizada como diluente e auxílio do ultrassom por 2 minutos; então, foram executadas 6 injeções desta solução no cromatógrafo. Foram avaliados os seguintes parâmetros: fator de cauda, resolução, número de pratos teóricos, fator de capacidade e desvio-padrão relativo entre as replicatas. Neste estudo, por se tratar de uma mistura de isômeros, também foi avaliada a pureza dos sinais de cada um desses isômeros.

3.3.2 – Verificação da estabilidade das soluções dos padrões e amostras

A estabilidade das soluções padrões e amostras, recém preparadas, foram avaliadas individualmente através das áreas dos sinais cromatográficos durante 24 horas consecutivas, com injeções de 15 minutos. O tempo médio de preparo para cada solução foi de 30 minutos.

Foi pesado cerca de 40,0 mg de SQR - FB de cloridrato de bupivacaína (mistura racêmica) para balão de 25 mL. Dissolveu-se com aproximadamente 15 mL de água deionizada e auxílio de ultrassom por 2 minutos, completou-se o volume

com o mesmo diluente. Concentração final de 1,6 mg/mL para o total de enantiômeros.

Foram pesados, individualmente e em dias diferentes, cerca de 20,0 mg de cada padrão secundário de cloridrato de levobupivacaína e cloridrato de dextrobupivacaína para respectivos balões de 25 mL. Dissolveu-se com aproximadamente 15 mL de água deionizada e auxílio de ultrassom por 2 minutos, completou-se o volume com o mesmo diluente, obtendo-se soluções de cada padrão de enantiômero com concentração final de 0,8 mg/mL.

Em dias diferentes, foram tomadas alíquotas de 8 mL de cada solução dos produtos para balões de 25 mL individualmente identificados. Diluiu-se com água deionizada até completar o volume. A concentração final das soluções foi de 1,6 mg/mL para o somatório de enantiômeros.

3.4 – Validação do método analítico

Definida a escolha da coluna e as condições analíticas que apresentaram os melhores resultados em relação aos parâmetros de adequação do sistema, o método foi submetido à validação analítica de acordo com as necessidades, tendo-se como base as exigências contidas em normas da Anvisa (2003), ICH (1996) e Inmetro (2010).

As figuras de mérito avaliadas foram: seletividade, linearidade, faixa linear de trabalho, precisão, tendência / recuperação, efeito matriz e robustez.

3.4.1 – Seletividade

Como neste estudo as matrizes sem o analito não estavam disponíveis, a seletividade foi testada comparando-se as inclinações das curvas de adição do padrão na matriz com as curvas analíticas dos padrões em sete diferentes níveis.

A pureza espectral do sinal também foi avaliada através da leitura na faixa de 200 a 400 nm, dos padrões e produtos em 3 diferentes pontos do tempo de retenção, avaliando a pureza espectral de todos os compostos a fim de confirmar a seletividade do método.

Adicionalmente, para cada um dos produtos, foram feitas comparações dos espectros de absorção molecular no ultravioleta em 3 diferentes pontos do tempo de retenção referentes a levobupivacaína e a dextrobupivacaína.

3.4.2 – Determinação da Linearidade

3.4.2.1 – Confeção da curva analítica

Definida a faixa de concentração de interesse, a linearidade foi determinada preparando-se individualmente 3 curvas analíticas para cada padrão dos enantiômeros. Cada um dos sete níveis de concentração das curvas foi preparado igualmente espaçado e injetado no cromatógrafo em triplicatas independentes de cada nível e ordem aleatória, tanto dos níveis, quanto das replicatas (SOUZA, 2007).

3.4.2.1.1 – Preparo da solução estoque (SE) de Levobupivacaína

Pesou-se individualmente com exatidão 3 massas com cerca de 100,0 mg do padrão secundário de cloridrato de levobupivacaína para balão volumétrico de 10 mL. Estas massas foram dissolvidas usando água deionizada como diluente e com auxílio do ultrassom por 2 minutos.

3.4.2.1.2 – Preparo da solução estoque (SE) de Dextrobupivacaína

Pesou-se individualmente com exatidão 3 massas com cerca de 100,0 mg do padrão secundário de cloridrato de dextrobupivacaína para balão volumétrico de 10 mL. Estas massas foram dissolvidas usando água deionizada como diluente e com auxílio do ultrassom por 2 minutos.

3.4.2.1.3 – Preparo das soluções de trabalho (ST) de Levobupivacaína

Foram tomadas alíquotas de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2 e 1,4 mL de cada uma das 3 soluções estoque de levobupivacaína para o preparo das soluções de trabalho. Todas as alíquotas foram retiradas com pipetas Eppendorf e transferidas individualmente para balões volumétricos de 10 mL, previamente identificados, os

quais foram completados com o água deionizada e homogenizados. As soluções preparadas foram injetadas no cromatógrafo em ordem aleatória.

3.4.2.1.4 – Preparo das soluções de trabalho (ST) de Dextrobupivacaína

Foram tomadas alíquotas de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2 e 1,4 mL de cada uma das 3 soluções estoque de dextrobupivacaína para o preparo das soluções de trabalho. Todas as alíquotas foram retiradas com pipetas eppendorf e transferidas individualmente para balões volumétricos de 10 mL, previamente identificados, os quais foram completados com água deionizada e homogeneizados. As soluções preparadas foram injetadas no cromatógrafo em ordem aleatória.

3.4.2.2 – Avaliação da curva analítica

Após a aquisição dos dados experimentais (cromatogramas), foi realizada uma inspeção visual dos dados no gráfico x-y referente às respostas das áreas *versus* as concentrações do analito.

Utilizando planilha de cálculo em Excel de Bazílio *et al.* (2011) adaptada de Souza e Junqueira (2005), foi realizada a avaliação da linearidade pelo Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO), incluindo a estimativa dos parâmetros da regressão e o tratamento dos valores extremos:

- i) estimativa da inclinação, interseção e coeficiente de correlação r ;
- ii) investigação e exclusão de valores extremos pelo método dos resíduos padronizados por Jackknife (SOUZA, 2007).

A verificação das premissas relativas aos resíduos da regressão e ajuste ao modelo linear foi avaliada através da:

- i) normalidade dos resíduos pelo teste de Ryan-Joiner;
- ii) independência dos resíduos pelo teste de Durbin-Watson;
- iii) homocedasticidade dos resíduos pelo teste de Brown-Forsythe; e
- iv) verificação da significância da regressão e do ajuste ao modelo linear por análise de variância (ANOVA) (SOUZA, 2007).

3.4.3 – Determinação da faixa de trabalho

Para a determinação quantitativa foi escolhida uma faixa de trabalho de 90% a 110% das concentrações teóricas para cada enantiômero. Esta faixa engloba a faixa para o ensaio de teor para todas as diferentes amostras do estudo.

3.4.4 – Determinação da Tendência / Recuperação

A tendência do método foi avaliada através da realização do ensaio de recuperação do analito, que pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas de adição do padrão a partir do 2º nível da curva analítica e a recuperação foi calculada em relação ao 1º nível da curva que não foi fortificado (INMETRO, 2010).

Foi preparada uma curva analítica de sete níveis para cada um dos padrões de levobupivacaína e dextrobupivacaína adicionados às soluções originadas de cada um dos 5 produtos, cujos teores de levobupivacaína e dextrobupivacaína foram previamente determinados pelo teste de precisão intermediária. A recuperação do analito foi calculada em cada nível da curva de adição padrão segundo:

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{C1 - C2}{C3} \right) \times 100$$

Sendo:

C1 = concentração do analito na amostra fortificada

C2 = concentração do analito na amostra não fortificada

C3 = concentração do analito adicionada à amostra fortificada

3.4.4.1 – Preparo da solução estoque (SE) dos padrões de levobupivacaína e dextrobupivacaína

Pesou-se individualmente 5 massas de 100,0 mg do padrão secundário de cloridrato de levobupivacaína para balão volumétrico de 10 mL e estas massas foram dissolvidas usando água deionizada e com auxílio de ultrassom por 2 minutos. Seguiu-se o mesmo procedimento para o padrão secundário de dextrobupivacaína.

3.4.4.2 – Preparo das soluções de trabalho

Para cada produto em estudo, tomou-se 7 alíquotas da quantidade referente a 0,2 mg de levobupivacaína e estas foram transferidas para 7 balões de 10 mL previamente identificados. A partir do segundo balão, adicionou-se a estas alíquotas, volumes de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 e 1,2 mL da solução estoque do padrão secundário de cloridrato de levobupivacaína e o volume foi completado com água deionizada, resultando em 7 soluções com concentrações finais de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2 e 1,4 mg/mL. Após homogeneização as soluções foram injetadas no cromatógrafo. Repetiu-se o mesmo procedimento com as soluções estoque de cloridrato de dextrobupivacaína.

3.4.5 – Determinação da Precisão: Repetitividade e Precisão Intermediária

A determinação da precisão foi realizada por meio da repetitividade e precisão intermediária, os valores dos respectivos desvios padrão foram comparados pela tabela de Horwitz (INMETRO, 2010):

3.4.5.1 – Determinação da Repetitividade

Neste estudo foram utilizados 2 diferentes analistas e cada um deles trabalhou com 15 alíquotas de cada produto. As 15 determinações de cada um dos produtos foram analisadas no mesmo dia, mesmo equipamento e pelo mesmo analista. A repetitividade foi avaliada pelo DPRr por meio da análise de 15 determinações com triplicatas de injeção a 100% da concentração de trabalho e foi determinada para cada um dos 5 diferentes produtos segundo a expressão:

$$\text{DPRr} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100$$

Sendo:

DP = desvio-padrão

CMD = concentração média determinada

3.4.5.1.1 – Preparo das soluções padrão de Levobupivacaína e Dextrobupivacaína

Pesou-se 20,0 mg do padrão secundário de levobupivacaína e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL. Dissolveu-se com cerca de 15 mL de água deionizada e com auxílio do ultrassom por 2 minutos. Completou-se o volume com o mesmo diluente. Seguiu-se o mesmo procedimento para o padrão secundário de Dextrobupivacaína.

3.4.5.1.2 – Preparo das soluções dos produtos

Tomou-se 15 alíquotas de 3,20 mL de cada um dos 5 produtos e estes foram transferidos para balão volumétrico de 10 mL e diluídos com água deionizada.

3.4.5.2 – Determinação da Precisão Intermediária

Neste estudo foram utilizados 2 cromatógrafos, em dias diferentes de análise e 2 diferentes analistas que trabalharam, cada um deles, com 15 determinações em triplicatas de injeção a 100% da concentração de trabalho. O desvio-padrão de precisão intermediária foi determinado utilizando o total de 30 determinações para cada um dos 5 diferentes produtos segundo a expressão:

$$Spi_{(j,k)} = \sqrt{\frac{1}{t(n-1)} \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y}_j)^2}$$

Sendo:

$Spi_{(j,k)}$ = desvio padrão de precisão intermediária

t = total de amostras ensaiadas (não confundir com o t de *Student*);

n = total de ensaios efetuados por amostra;

j = nº da amostra, $j = 1, t$

k = nº do ensaio da amostra j , $k = 1, n$

y_{jk} = valor do resultado k para a amostra j

y_j = representa a média aritmética dos resultados da amostra j .

3.4.6 – Avaliação do Efeito Matriz

O procedimento para avaliação do efeito da matriz foi realizado através da preparação de cinco curvas de adição do analito, com sete níveis de concentração igualmente espaçados, nas cinco diferentes matrizes (produtos) com os teores dos ativos previamente estabelecidos.

A avaliação do efeito da matriz incluiu a análise de dados e os testes de premissas conforme o delineamento experimental da linearidade descrito no item 3.4.2.2. Após a análise da linearidade, o efeito da matriz foi avaliado pelas comparações das inclinações e interseções par a par da curva de adição do analito na matriz com a da curva analítica em solvente.

A avaliação do efeito matriz neste trabalho se restringe as 5 matrizes testadas, não podendo ser extrapolada para todas as possíveis matrizes que contenham cloridrato de levobupivacaína e dextrobupivacaína.

3.4.7 – Determinação da Robustez

Na robustez do método, através do teste de Youden, foi ordenada a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações (INMETRO, 2010). O grau de variação para os fatores do método em estudo foi determinado segundo capítulo geral <621> da USP 34 (2011) sobre ajustes em métodos por CLAE.

Foram realizadas 6 injeções da solução de adequação do sistema da SQR - FB cloridrato de bupivacaína (preparadas conforme item 3.3.1), sob oito diferentes combinações de ensaios para variações maiores aos valores nominais e oito diferentes combinações de ensaios para variações menores aos valores nominais.

Um modelo de preparação de uma matriz de fatores para determinação da robustez do método é encontrado em INMETRO, 2007. A Tabela 4 a seguir representa esta matriz.

Tabela 4: Matriz dos fatores para determinação da robustez do método

Valor do fator	Combinação ensaiada							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A ou a	A	A	A	A	a	a	a	a
B ou b	B	B	b	b	B	B	b	b
C ou c	C	c	C	c	C	c	C	c
D ou d	D	D	d	d	d	d	D	D
E ou e	E	e	E	e	e	E	e	E
F ou f	F	f	f	F	F	f	f	F
G ou g	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultado	s	t	u	v	w	x	y	z

Fonte: APHA, AWWA, WEF. Standard Methods for the Examination of Water and St Wasterwater, 21 Edition, 2005

Depois de ensaiadas as combinações, os resultados obtidos foram analisados de acordo com os parâmetros de adequação do sistema. E então calculados e ordenados todos os efeitos de maneira a detectar os que foram significativos sobre o resultado. Para determinar a variação de um fator, foram ordenados em separados, os quatro valores correspondentes às letras maiúsculas e as quatro minúsculas, e então comparadas as médias desses dois grupos. Cada um dos sete efeitos foram calculados para obter as sete diferenças (E1 a E7), que foram ordenados para revelar aqueles, com efeito, significativo no resultado (INMETRO,2007).

3.5 – Avaliação das estruturas cristalinas dos padrões utilizados

A avaliação da difração de raios X (DRX) foi realizada através da comparação entre os resultados obtidos dos padrões utilizados neste estudo com padrões oficiais (quando disponíveis) e matérias-primas (MP) de diferentes fornecedores.

Foram obtidos difratogramas das substâncias cloridrato de bupivacaína (USP, WHO, SQR-FB, MP fornecedor 1 e MP fornecedor 2), cloridrato de levobupivacaína (padrão fornecedor 1 e MP fornecedor 1) e cloridrato de dextrobupivacaína (padrão fornecedor 1 e MP fornecedor 1).

Os resultados obtidos no ensaio de DRX foram utilizados apenas para uma avaliação exploratória adicional dos padrões utilizados neste estudo.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Desenvolvimento do método analítico

No desenvolvimento do método analítico objetivou-se encontrar condições analíticas que permitissem uma separação adequada em tempo razoável para uso em análises de rotina.

O método foi selecionado de modo a satisfazer requisitos específicos como qualidade dos resultados e limites de custo. Não significa encontrar a maneira de realizar a análise com a melhor qualidade possível, mas atingir os objetivos de qualidade dentro dos limites práticos. Em cromatografia, o custo de uma análise está relacionado com o tempo de corrida, de modo que esse tempo deve ser o menor possível. Outro critério para o desenvolvimento desse método incluiu as restrições impostas pelo equipamento, por exemplo, a pressão do equipamento foi mantida relativamente baixa para prolongar a vida útil das colunas e dos selos das bombas.

Durante o desenvolvimento do método, os critérios de adequação do sistema avaliados a fim de se obter uma separação adequada foram fator de cauda, resolução, número de pratos teóricos e fator de capacidade.

4.1.1 – Testes utilizando coluna Chiral AGP 150 x 4,0mm x 5 µm

As condições cromatográficas utilizadas inicialmente neste estudo foram baseadas nas informações contidas no catálogo do fabricante da coluna (CHROMTECH, 2000):

- Fase móvel: Tampão fosfato de potássio monobásico (Tp KH_2PO_4) 50mM pH=7,0:
2 - propanol (90: 10)
- Fluxo: 1,0 mL/minuto
- Comprimento de onda: 225nm
- Volume de injeção: 10µL
- Temperatura da coluna: 25°C
- Concentração de trabalho: 0,25 mg/mL de solução SQR cloridrato de bupivacaína

Adicionalmente, a fim de se obter melhores resultados, foram testadas diferentes composições de fase móvel (FM), como pode ser observado na figura 6. Os valores referentes à adequação do sistema, obtidos em cada sinal cromatográfico, resultantes das variações realizadas, estão descritas na tabela 5, os quais não estão dentro das recomendações para os parâmetros de adequação (USP 34, 2011). Utilizando-se a fase móvel 5, não foi possível identificar os sinais cromatográficos durante o tempo de 40 minutos de corrida.

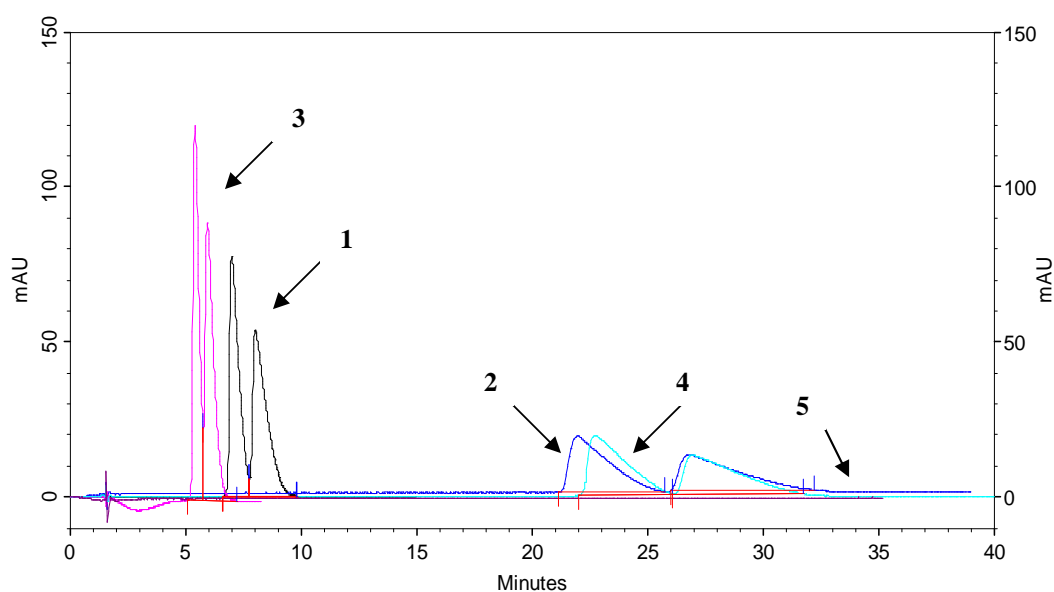


Figura 6: Sobreposição dos cromatogramas obtidos nas diferentes composições de fase móvel na coluna Chiral AGP.

onde:

- 1 - FM: 90% Tp KH_2PO_4 50mM pH=7,0 + 10% 2-propanol (fase móvel da condição inicial)
- 2 - FM: 95% Tp KH_2PO_4 50mM pH=7,0 + 5% 2-propanol
- 3 - FM: 85% Tp KH_2PO_4 50mM pH=7,0 + 15% 2-propanol
- 4 - FM: 90% Tp KH_2PO_4 50mM pH=7,0 + 10% acetonitrila
- 5 - FM: 90% Tp KH_2PO_4 50mM pH=7,0 + 10% metanol

Tabela 5: Resultados dos parâmetros de adequação do sistema para os cromatogramas da figura 6.

Fase móvel	Fator de cauda		Resolução		Pratos teóricos		Fator de capacidade	
	Levo	Dextro	Levo	Dextro	Levo	Dextro	Levo	Dextro
1	0	0	-	1,1	1275	799	7,4	8,6
2	3,2	4,0	-	0	0	0	21,0	25,8
3	0	0	-	0,9	1889	1148	4,4	5,0
4	3,4	3,3	-	0	0	0	25,7	30,7
5	-	-	-	-	-	-	-	-

Com a finalidade de melhorar o sinal cromatográfico obtido nas condições analíticas inicialmente utilizadas, diminuiu-se a concentração da solução teste de cloridrato de bupivacaína para 0,025 mg/mL. Outras modificações nas condições analíticas (composição da FM e fluxo) também foram realizadas e podem ser observadas na figura 7.

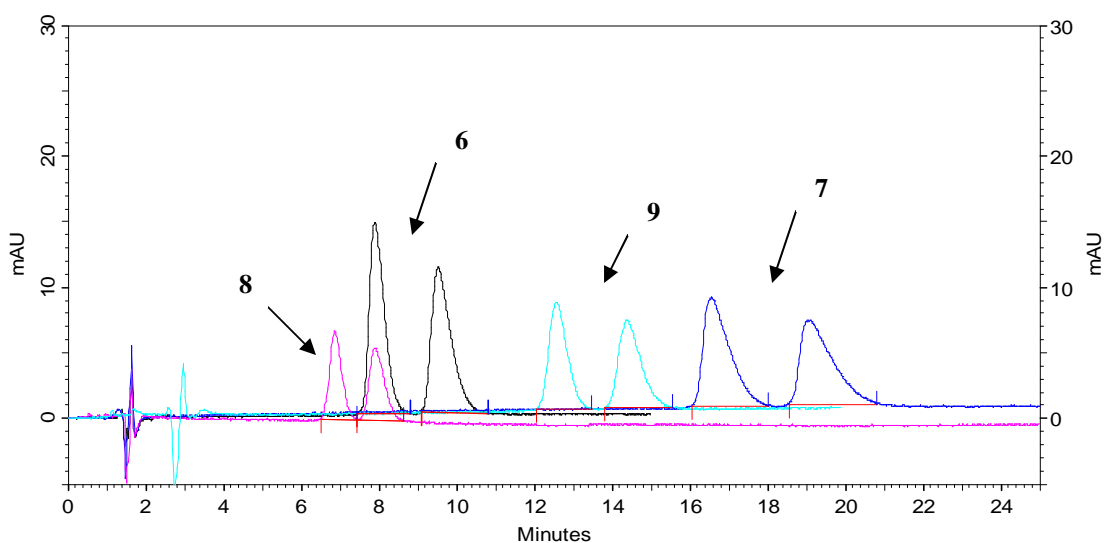


Figura 7: Sobreposição dos cromatogramas obtidos nas diferentes condições analíticas na coluna Chiral AGP.

onde:

6 – FM: 90% Tp KH_2PO_4 50mM pH=7,0 + 10% 2-propanol (fase móvel da condição inicial)

7 – FM: 90% Tp KH_2PO_4 10mM pH=7,0 + 10% 2-propanol

8 – FM: 90% Tp KH_2PO_4 100mM pH=7,0 + 10% 2-propanol

9 – FM: 90% Tp KH_2PO_4 100mM pH=7,0 + 10% 2-propanol / fluxo FM: 0,5mL/min

Tabela 6: Resultados dos parâmetros de adequação do sistema para os cromatogramas da figura 7.

Condição analítica	Fator de cauda		Resolução		Pratos teóricos		Fator de capacidade	
	Levo	Dextro	Levo	Dextro	Levo	Dextro	Levo	Dextro
6	1,5	1,7	-	2,0	1898	1635	6,9	8,5
7	1,8	2,2	-	1,7	2553	2400	15,6	18,0
8	1,3	1,3	-	1,6	2146	1889	5,87	6,93
9	1,3	1,4	-	1,8	3195	2817	11,6	13,4

Como pode-se observar na tabela 6, a condição analítica 6 apresentou a melhor resolução entre os sinais de levobupivacaína e dextrobupivacaína, porém o número de pratos teóricos está abaixo do recomendado (USP 34, 2011). Isso pode ser explicado pelo fato da coluna já estar um pouco desgastada devido ao longo tempo de uso.

4.1.2 – Testes utilizando coluna Chirobiotic V 250 x 4,6mm x 5 μm

Baseado em informações contidas no catálogo do fabricante da coluna e também em artigos onde os autores utilizaram esta mesma coluna, algumas composições de fase móvel foram inicialmente testadas (CHIROBIOTIC, 2008; BERTHOD, 2009; VINKOKIC *et al.*, 2005):

1 – Água: tetrahydrofurano (THF): trietilamina (TEA) (90: 10: 0,2) pH=4,7

2 – Água: metanol (MeOH): THF: TEA (70: 27: 3: 0,06) pH=4,8

3 – Água: MeOH: TEA (60: 40: 0,1) pH=4,5

4 – Água: acetonitrila: TEA (80: 20: 0,1) pH=4,5

Para todas as composições de fase móvel, mantiveram-se as seguintes condições analíticas:

- Fluxo: 0,8 mL/minuto
- Comprimento de onda: 230nm
- Volume de injeção: 5 μ L
- Temperatura da coluna: 30°C
- Concentração de trabalho: 2,0 mg/mL de solução SQR cloridrato de bupivacaína

Os cromatogramas resultantes das diferentes composições de fase móvel inicialmente testadas podem ser observadas na figura 8. Os valores referentes à adequação do sistema obtidos em cada sinal cromatográfico resultantes das variações realizadas, estão descritas na tabela 7.

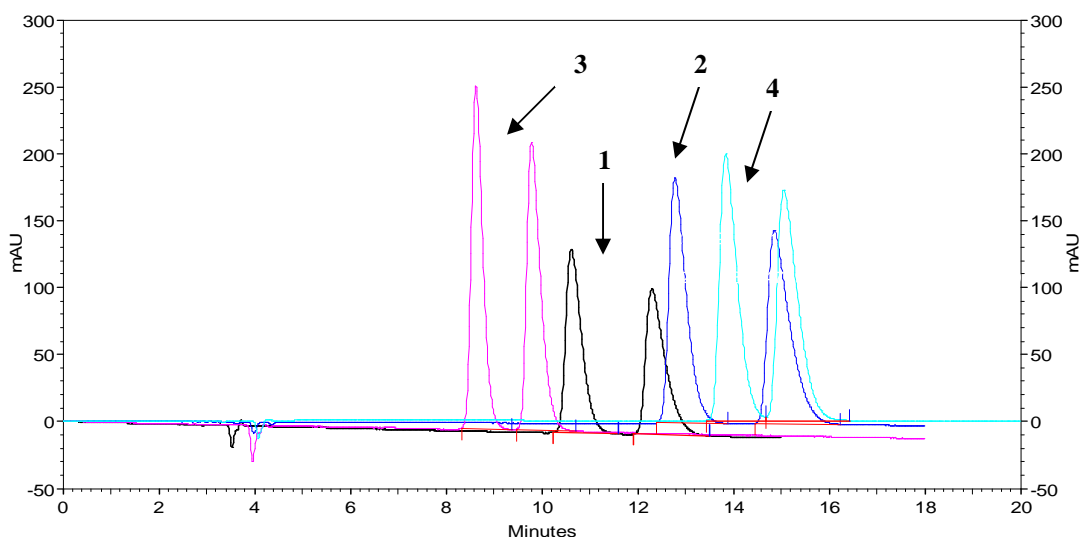


Figura 8: Sobreposição dos cromatogramas obtidos nas diferentes composições de fase móvel na coluna Chirobiotic V.

Tabela 7: Resultados dos parâmetros de adequação do sistema para os cromatogramas da figura 8.

Fase móvel	Fator de cauda		Resolução		Pratos teóricos		Fator de capacidade	
	Levo	Dextro	Levo	Dextro	Levo	Dextro	Levo	Dextro
1	1,6	2,0	-	2,5	5016	4242	9,6	11,3
2	1,6	2,1	-	2,7	5719	4793	11,8	13,9
3	1,4	1,6	-	2,3	5823	5248	7,6	8,8
4	1,7	1,8	-	1,6	6247	5476	8,2	9,0

Como pode ser observado na tabela 7, a fase móvel 3 permitiu uma separação com todos os parâmetros de adequação do sistema dentro dos valores recomendados.

A fim de melhorar a resolução entre os sinais cromatográficos, modificações adicionais foram testadas na composição da fase móvel 3, conforme figura 9. Os valores referentes à adequação do sistema obtidos em cada sinal cromatográfico resultantes das variações realizadas, estão descritas na tabela 8.

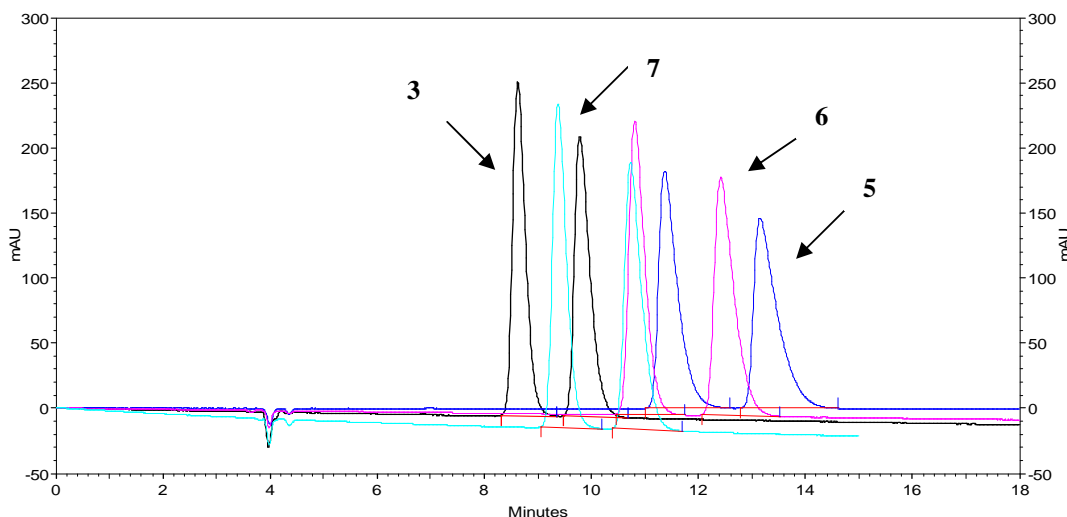


Figura 9: Sobreposição dos cromatogramas obtidos para modificações adicionais das composições de fase móvel na coluna Chirobiotic V.

onde:

- 3 – FM= água: MeOH: TEA (60:40:0,1) pH=4,5
- 5 – FM= água: MeOH: TEA (70:30:0,1) pH=4,5
- 6 – FM= água: MeOH: TEA (60:40:0,1) pH=5,0
- 7 – FM= água: MeOH: TEA (60:40:0,2) pH=5,0

Tabela 8: Resultados dos parâmetros de adequação do sistema para os cromatogramas da figura 9.

Condições analíticas	Fator de cauda		Resolução		Pratos teóricos		Fator de capacidade	
	Levo	Dextro	Levo	Dextro	Levo	Dextro	Levo	Dextro
3	1,4	1,6	-	2,3	5823	5248	7,6	8,8
5	1,9	2,3	-	2,5	5006	4294	19,3	22,5
6	1,5	1,8	-	2,6	6029	5221	9,8	11,4
7	1,4	1,7	-	2,5	5915	5230	8,4	9,7

O cromatograma referente a fase móvel 3 foi novamente colocado na figura 9 e tabela 8 para que pudesse usá-lo em comparação com as modificações de fase móvel 5, 6 e 7. Como pode ser observado na tabela 8, a composição de fase móvel 5, apresentou fator de cauda no sinal de dextrobupivacaína acima de 2,0. Já as modificações 6 e 7 apresentaram todos os parâmetros de adequação do sistema dentro dos valores recomendados. Porém, a composição de fase móvel 7 foi a que apresentou melhor razão fator de capacidade / fator de cauda, sendo assim o melhor resultado em comparação com as demais modificações.

4.1.3 – Escolha do método analítico

Comparando os resultados encontrados nos testes realizados para cada coluna utilizada neste estudo, foi escolhida a coluna e as condições analíticas que apresentaram melhores resultados na avaliação da adequação do sistema:

- Coluna: chirobiotic V - Vancomycin 250 x 4,6mm - 5 μ m
- Fase móvel: Água: MeOH: TEA (60: 40: 0,2) pH = 5,0 ajustado com ácido acético 50%.
- Fluxo: 0,8 mL/minuto
- Comprimento de onda: 230nm
- Volume de injeção: 5 μ L
- Temperatura da coluna: 30°C
- Tempo de corrida cromatográfica: 15 minutos

O fato da coluna Chirobiotic V – Vancomycin ter apresentado melhores resultados que a coluna Chiral AGP pode ser explicado devido a primeira apresentar, ligada à sílica gel, moléculas de vancomicina que possui diversos centros quirais e grupos funcionais, possibilitando assim uma melhor enantioseparação (ILISZ; BERKECZ; PETER, 2006).

Podemos observar nas figuras 10, 11 e 12 os cromatogramas da SQR cloridrato de bupivacaína e padrões secundários de levobupivacaína e dextrobupivacaína, obtidos com as condições analíticas escolhidas.

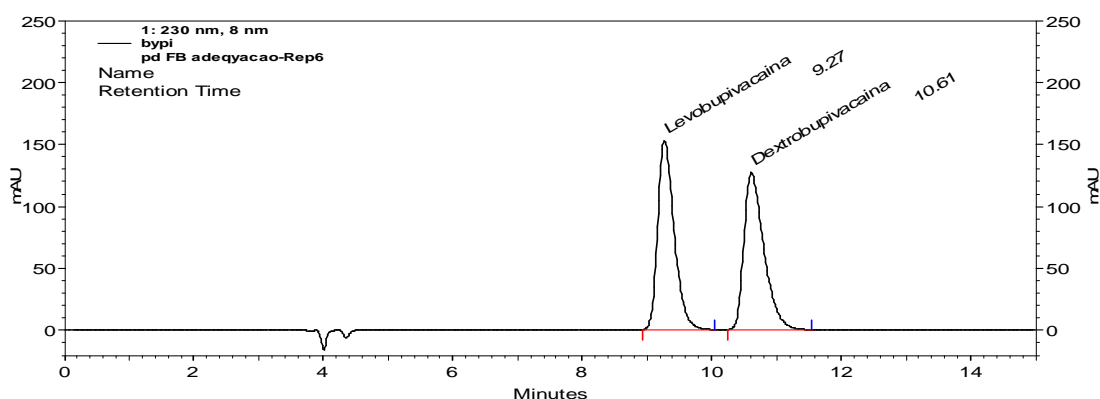


Figura 10: Cromatograma da SQR cloridrato de bupivacaína nas condições analíticas escolhidas.

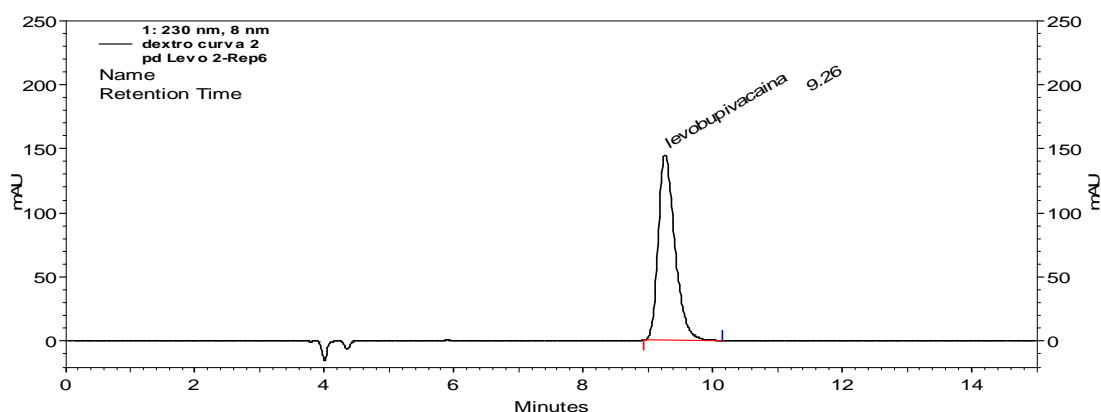


Figura 11: Cromatograma de levobupivacaína nas condições analíticas escolhidas.

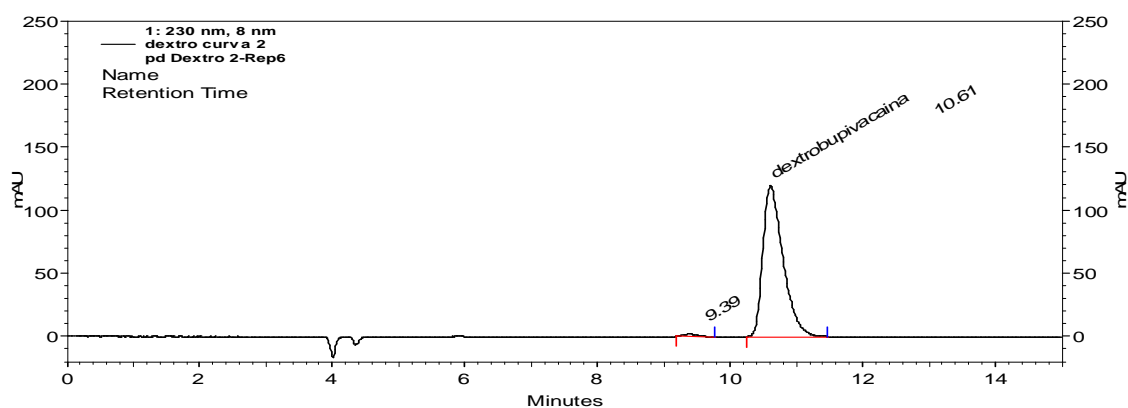


Figura 12: Cromatograma de dextrobupivacaína nas condições analíticas escolhidas.

O tempo de retenção obtido foi de cerca de 9,3 minutos para o sinal de levobupivacaína e 10,6 minutos para o sinal de dextrobupivacaína, caracterizando um tempo de corrida que permite a análise de um grande número de amostras em curto período de tempo, o que agrega a este estudo um caráter prático, econômico e viável.

4.1.4 – Verificação da Adequação do sistema

Este estudo foi realizado para assegurar a performance do sistema cromatográfico utilizado durante a realização das análises, provendo assim dados de qualidade aceitável (USP 34, 2011). Assim, ao longo da validação do método analítico, fez-se importante avaliar os parâmetros de adequação do sistema. Na tabela 9 estão indicados os valores médios para fator de cauda, resolução, pratos teóricos, fator de retenção, pureza dos picos e o desvio padrão relativo (DPR) das áreas entre as 6 replicatas da solução de cloridrato de bupivacaína 1,6 mg/mL.

Tabela 9: Valores da adequação do sistema no início e durante a validação do método analítico.

Parâmetros cromatográficos	Início dos procedimentos de validação		Durante os procedimentos de validação	
	Levobupivacaína	Dextrobupivacaína	Levobupivacaína	Dextrobupivacaína
Fator de cauda	1,38	1,54	1,36	1,52
Resolução	-	2,62	-	2,56
Pratos teóricos	6302	5732	6733	6202
Fator de retenção	8,27	9,61	8,61	9,92
Pureza dos picos	0,9973	0,9980	0,9965	0,9948
DPR das áreas (%)	0,5	0,7	0,6	0,5

Os fatores de cauda menores que 2 demonstram a simetria dos sinais. A resolução acima de 2 demonstra que os picos estão bem separados. O número de pratos teóricos está acima do valor normalmente recomendado de 2000. Os fatores de capacidade encontram-se dentro da faixa de 1 a 20, demonstrando uma boa retenção da coluna e capacidade eluente adequada da fase móvel. O desvio padrão relativo das áreas dos sinais das duas substâncias estudadas foi satisfatório, situando-se abaixo do valor preconizado de 2%. Pode-se observar que a *performance* de todo o sistema de cromatografia líquida de alta eficiência manteve-se estável durante todos os procedimentos da validação.

4.1.5 – Verificação da estabilidade das soluções dos padrões e amostras

Para gerar resultados confiáveis e reprodutíveis, as soluções preparadas, a partir dos padrões e produtos, devem ser estáveis por um período razoável e conhecido do analista (um dia, uma semana, dependendo da necessidade).

Neste estudo, a estabilidade das soluções, individualmente preparadas dos padrões e dos 5 produtos, foi avaliada durante 24 horas consecutivas com injeções de 15 minutos, totalizando 96 injeções para cada uma das soluções preparadas. Com os resultados obtidos, foi construído um gráfico das áreas dos sinais cromatográficos em função do tempo para cada uma das soluções dos padrões e produtos, conforme itens 4.1.5.1 e 4.1.5.2.

4.1.5.1 – Avaliação da estabilidade das soluções dos padrões

A figura 13 representa as áreas obtidas a partir da solução de cloridrato de bupivacaína SQR – FB (mistura racêmica). Pode-se observar que não houve variação significativa tanto nas áreas dos picos de levobupivacaína quanto nas áreas dos picos de dextrobupivacaína.

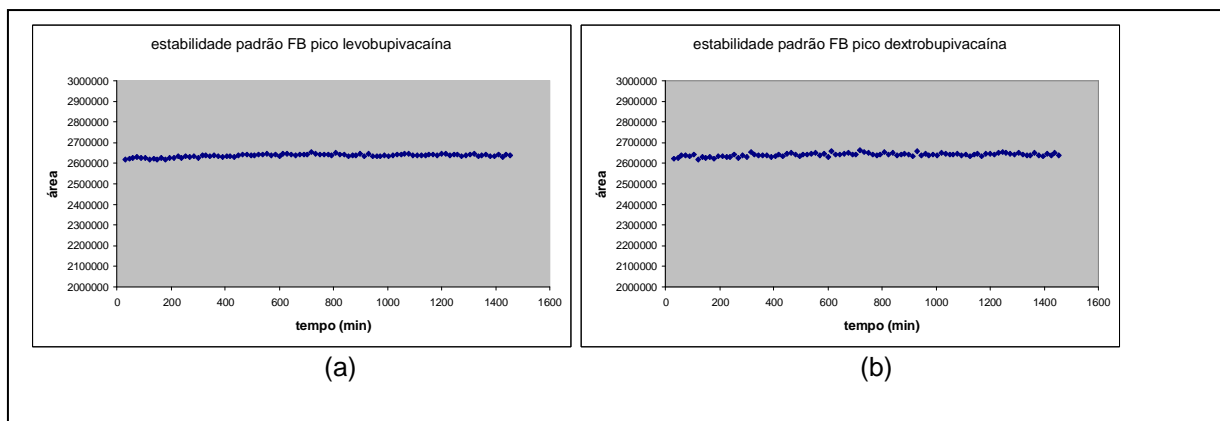


Figura 13: Gráfico das áreas obtidas da solução SQR – FB de cloridrato de bupivacaína (a) áreas referentes ao sinal de levobupivacaína (b) áreas referentes ao sinal de dextrobupivacaína.

A figura 14 representa as áreas obtidas para solução do padrão de cloridrato de levobupivacaína. Pode-se observar que não houve variação significativa nas áreas. Este padrão não possui impureza de síntese de dextrobupivacaína em quantidade significativa que seja detectável pelo método. Também se pode observar que durante as 24 horas de injeção, não houve conversão de levobupivacaína em dextrobupivacaína, ou seja, rotação da ligação dos carbonos assimétricos.

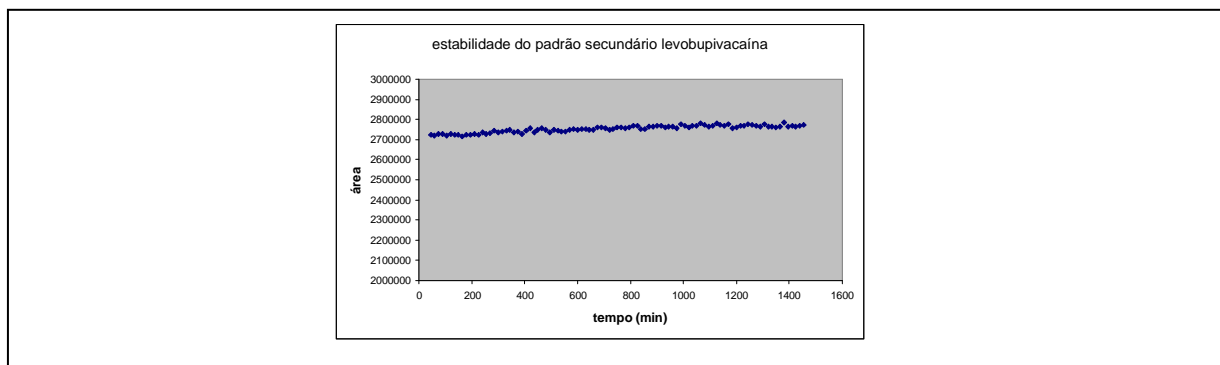


Figura 14: Gráfico das áreas obtidas da solução padrão de cloridrato de levobupivacaína

A figura 15 representa as áreas obtidas a partir da solução do padrão de cloridrato de dextrobupivacaína. Este padrão possui cerca de 1,5 % de impureza de síntese de levobupivacaína. Pode-se observar nos gráficos abaixo que não houve variação significativa nas áreas do pico de dextrobupivacaína e nem nas áreas da impureza de levobupivacaína. Isso sugere que não houve conversão de dextrobupivacaína em levobupivacaína no período de 24 horas.

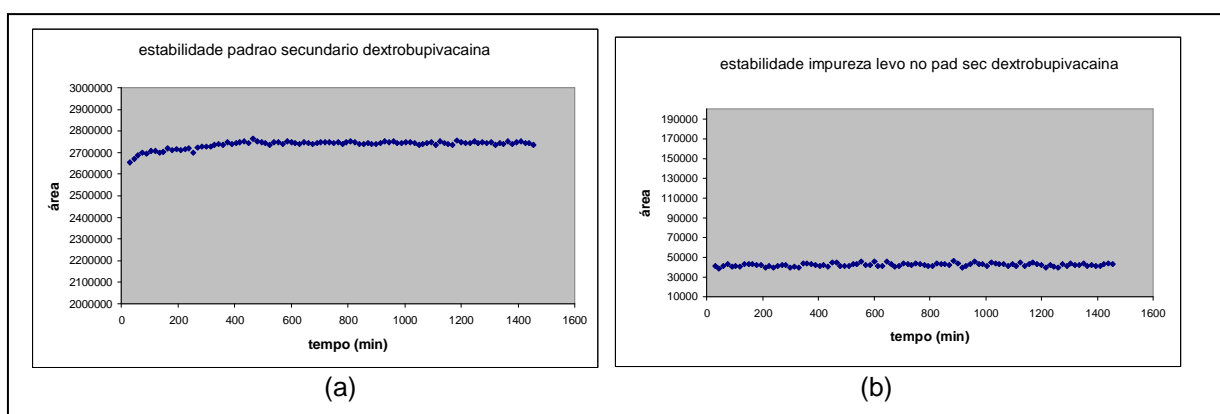


Figura 15: Gráfico das áreas obtidas da solução padrão de cloridrato de dextrobupivacaína (a) áreas referentes ao sinal de dextrobupivacaína (b) áreas referentes ao sinal da impureza de síntese de levobupivacaína.

4.1.5.2 – Avaliação da estabilidade das soluções dos produtos

As figuras 16 e 17, representam as áreas obtidas a partir das soluções dos produtos 1 e 2 (mistura racêmica), respectivamente.

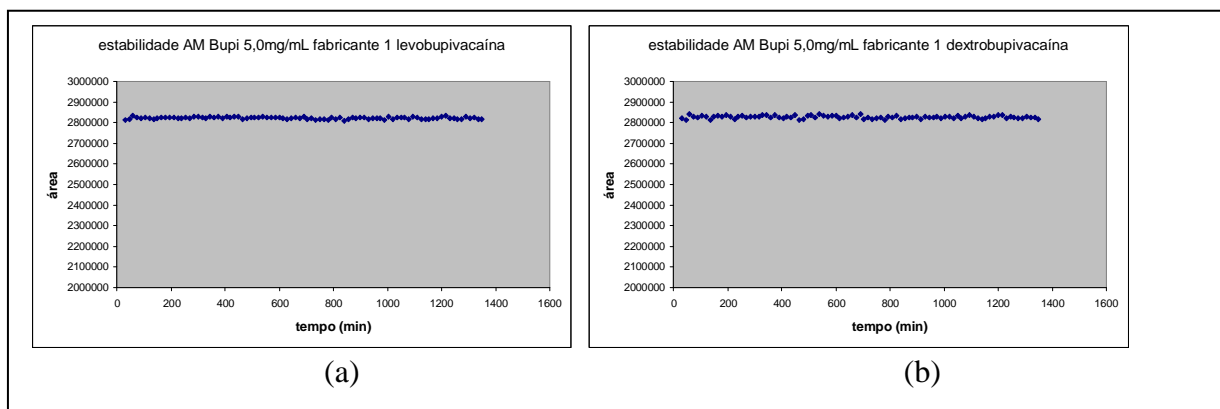


Figura 16: Gráfico das áreas obtidas da solução do produto 1 (a) áreas referentes ao sinal de levobupivacaína (b) áreas referentes ao sinal de dextrobupivacaína.

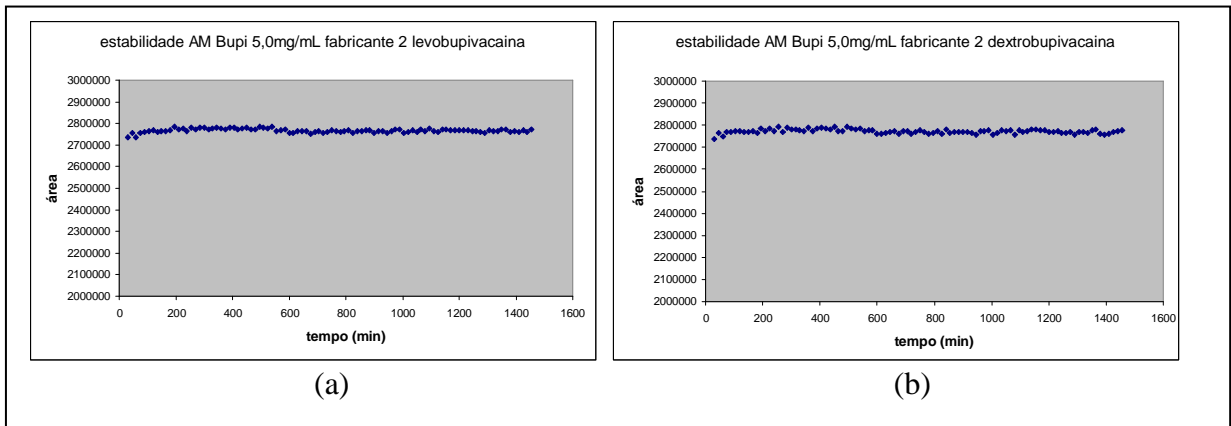


Figura 17: Gráfico das áreas obtidas da solução do produto 2 (a) áreas referentes ao sinal de levobupivacaina (b) áreas referentes ao sinal de dextropropivacaina.

As figuras 18 e 19 , representam as áreas obtidas a partir das soluções dos produtos 3 e 4 (mistura racêmica + glicose), respectivamente.

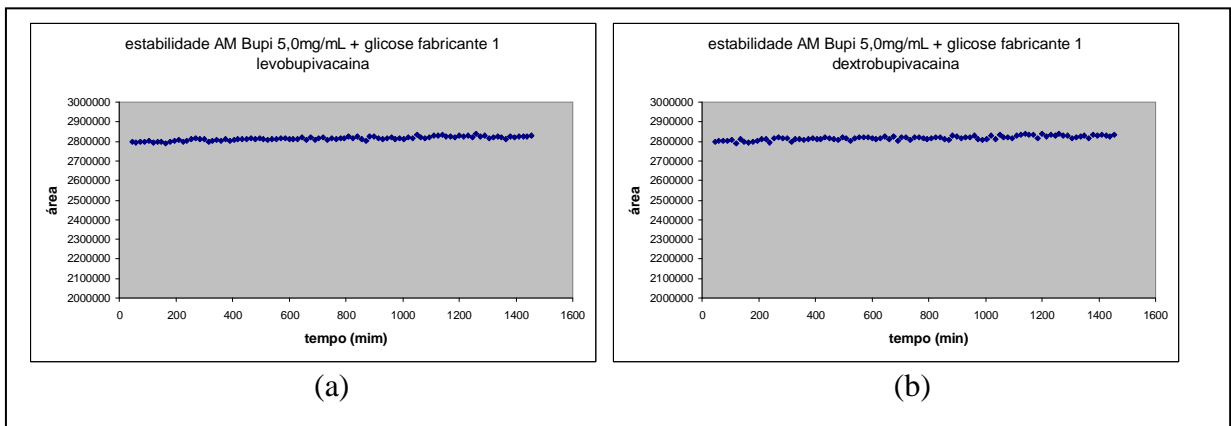


Figura 18: Gráfico das áreas obtidas da solução do produto 3 (a) áreas referentes ao sinal de levobupivacaina (b) áreas referentes ao sinal de dextropropivacaina.

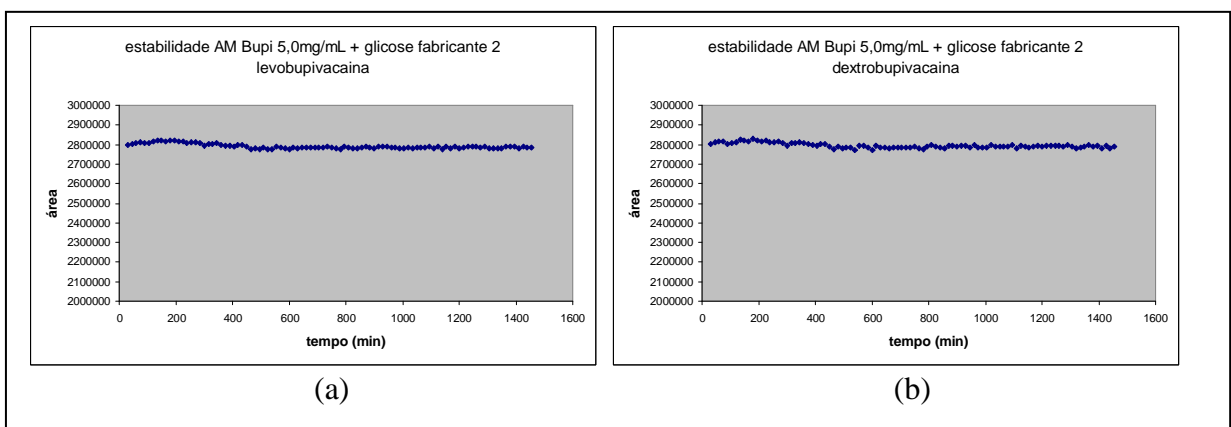


Figura 19: Gráfico das áreas obtidas da solução do produto 4 (a) áreas referentes ao sinal de levobupivacaina (b) áreas referentes ao sinal de dextropropivacaina.

A figura 20 representa as áreas obtidas a partir das soluções do produto 5 (mistura não racêmica - 75% do isômero S(-) e 25% do isômero R(+)).

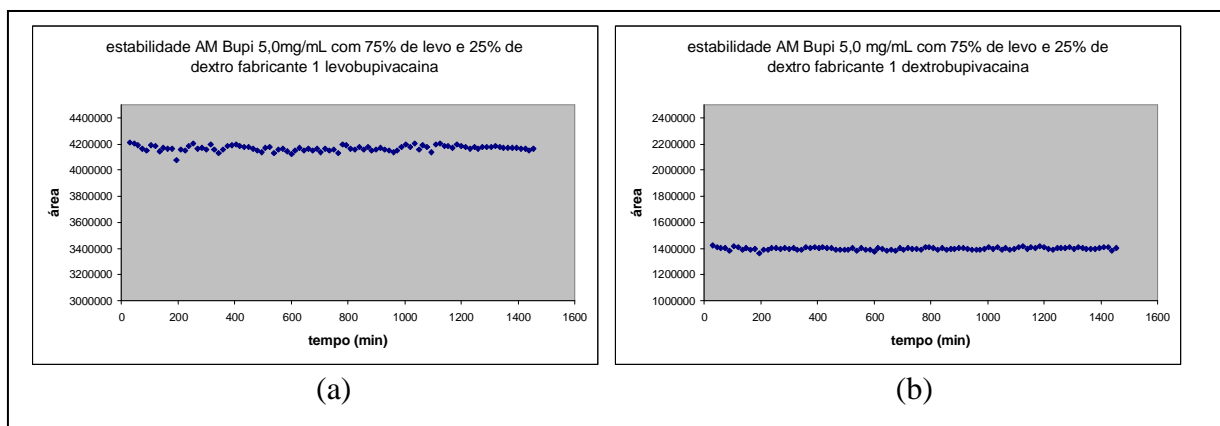


Figura 20: Gráfico das áreas obtidas da solução do produto 5 (a) áreas referentes ao sinal de levobupivacaína (b) áreas referentes ao sinal de dextropropivacaína.

Para todas as soluções avaliadas, verifica-se que não houve indícios de degradação e conversão das áreas de levobupivacaína e dextropropivacaína. Pode-se assegurar a estabilidade das preparações analíticas por até 24 horas.

4.2 – Validação do método analítico

Os parâmetros avaliados durante o processo de validação foram aqueles exigidos para ensaio de teor (ANVISA, 2003; ICH, 1996; INMETRO, 2010). Foram avaliados os parâmetros seletividade, linearidade, faixa linear de trabalho, precisão, tendência / recuperação, efeito matriz e robustez.

4.2.1 – Seletividade

Como neste estudo as matrizes sem o analito não estavam disponíveis, a seletividade foi testada comparando-se as inclinações das curvas de adição dos padrões de levobupivacaína e dextropropivacaína nas cinco diferentes matrizes dos produtos estudados com as inclinações das curvas analíticas dos padrões em solvente, nos sete diferentes níveis, como mostram respectivamente as figuras 21 e 22.

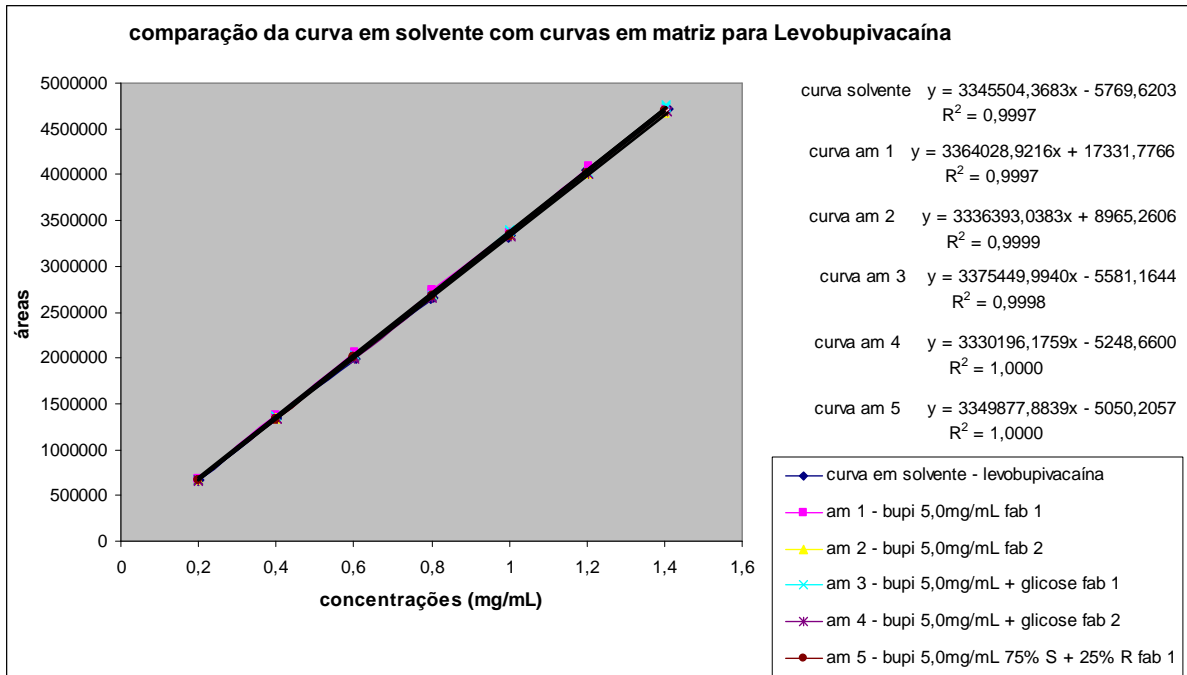


Figura 21: Gráfico de comparação das inclinações das curvas de adição do padrão de levobupivacaína nas matrizes com a curva analítica em solvente nos sete diferentes níveis.

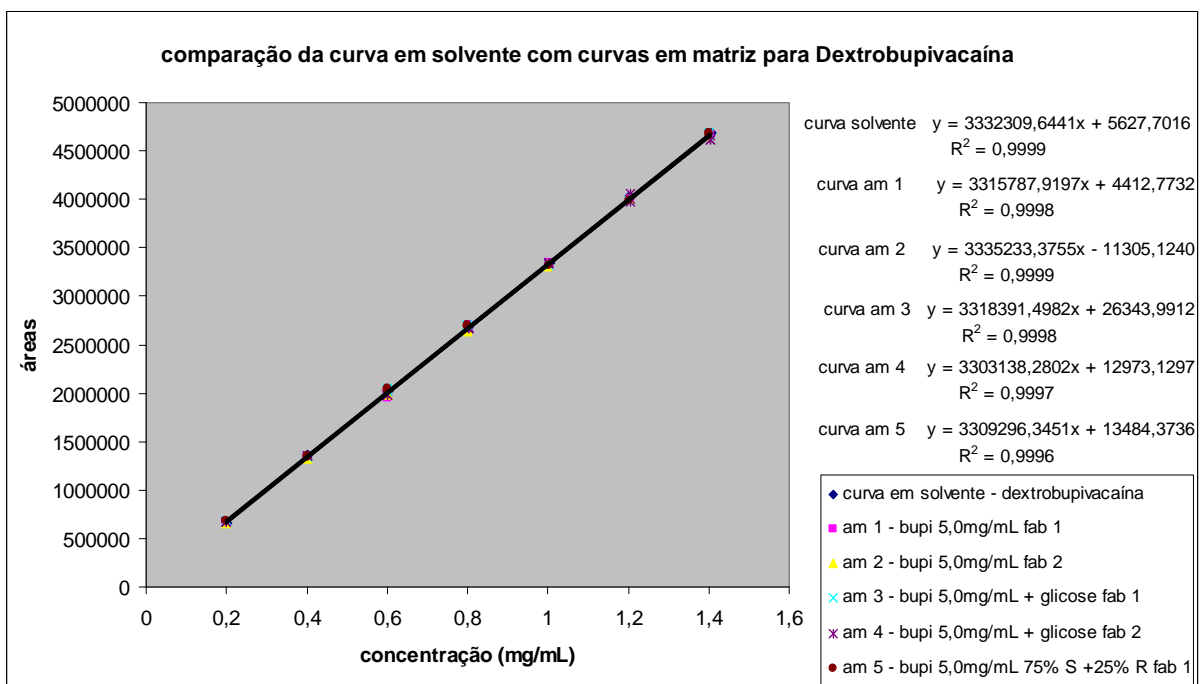


Figura 22: Gráfico de comparação das inclinações das curvas de adição do padrão de dextrobupivacaína nas matrizes com a curva analítica em solvente nos sete diferentes níveis.

A fim de confirmar a seletividade do método, a pureza espectral do sinal referente a levobupivacaína e dextrobupivacaína dos padrões e amostras também

foi avaliada, em 3 diferentes pontos do tempo de retenção, conforme mostrado na tabela 10.

Tabela 10: Média dos resultados obtidos para avaliação da pureza espectral de levobupivacaína e dextrobupivacaína nas soluções dos padrões e produtos.

Descrição das soluções avaliadas	Pureza do sinal de Levobupivacaína	Pureza do sinal de Dextrobupivacaína
Padrão Levobupivacaína	0,9972	-
Padrão Dextrobupivacaína	-	0,9984
Produto 1	0,9968	0,9964
Produto 2	0,9969	0,9973
Produto 3	0,9967	0,9977
Produto 4	0,9972	0,9984
Produto 5	0,9975	0,9973

Adicionalmente, para cada um dos produtos, foram feitas comparações dos espectros no ultravioleta em 3 diferentes pontos do tempo de retenção (antes, durante e depois do sinal), referentes aos picos cromatográficos da levobupivacaína e dextrobupivacaína, conforme APÊNDICE A.

Os espectros no ultravioleta das amostras em estudo se sobrepuseram aos espectros das respectivas substâncias puras dos padrões, demonstrando a pureza e a seletividade dos sinais.

4.2.2 – Determinação da linearidade

Com a seletividade do método demonstrada, iniciou-se a validação da parte quantitativa do método, avaliando-se inicialmente a curva analítica. Nos quadros 3 e 4 abaixo estão descritas as concentrações dos 7 níveis das curvas analíticas para os padrões de levobupivacaína e dextrobupivacaína, respectivamente.

Quadro 3 - Concentrações das soluções de trabalho da curva analítica levobupivacaína (mg/mL).

	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 4	Nível 5	Nível 6	Nível 7
Levobupivacaína	0,20	0,40	0,60	0,80	1,00	1,20	1,40
1ª Curva	0,2015	0,4030	0,6045	0,8060	1,0075	1,2090	1,4105
2ª Curva	0,2008	0,4015	0,6023	0,8030	1,0038	1,2046	1,4053
3ª Curva	0,1998	0,3996	0,5993	0,7991	0,9989	1,1987	1,3985

Quadro 4 - Concentrações das soluções de trabalho da curva analítica dextrobupivacaína (mg/mL).

<i>Dextrobupivacaína</i>	<i>Nível 1</i> <i>0,20</i>	<i>Nível 2</i> <i>0,40</i>	<i>Nível 3</i> <i>0,60</i>	<i>Nível 4</i> <i>0,80</i>	<i>Nível 5</i> <i>1,00</i>	<i>Nível 6</i> <i>1,20</i>	<i>Nível 7</i> <i>1,40</i>
1ª Curva	0,2008	0,4016	0,6024	0,8032	1,0040	1,2048	1,4056
2ª Curva	0,2004	0,4008	0,6011	0,8015	1,0019	1,2023	1,4027
3ª Curva	0,2009	0,4018	0,6028	0,8037	1,0046	1,2055	1,4064

Após a aquisição dos dados experimentais (cromatogramas), foi realizada uma inspeção visual a partir da construção de um gráfico de concentração (eixo x) versus áreas obtidas após injeção das soluções (eixo y). A linearidade dos dados experimentais foi avaliada por regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), utilizando uma planilha de cálculo em Excel de Basílio (2011), adaptada de Souza e Junqueira (2005). Através da planilha foi realizada a estimativa dos parâmetros (coeficiente angular, coeficiente linear e coeficiente de correlação R), a avaliação do ajuste ao modelo e a significância da regressão linear por análise de variância (ANOVA). Além disso, foi feita a verificação da ausência de valores discrepantes pelo teste de Jacknife. A verificação das premissas do modelo foi realizada através da análise dos resíduos de acordo com os seguintes testes:

- normalidade dos resíduos pelo teste de Ryan-Joiner;
- independência dos resíduos pelo teste de Durbin-Watson;
- homocedasticidade dos resíduos pelo teste de Brown-Forsythe;

As avaliações para os sinais referentes a levobupivacaína e dextrobupivacaína são mostradas nos APÊNDICES B e C, respectivamente. As curvas analíticas podem ser visualizadas nos itens 4.2.2.1 e 4.2.2.2.

4.2.2.1 – Avaliação da curva analítica para Levobupivacaína

A linearidade da curva analítica para levobupivacaína na faixa de concentração de 0,20 a 1,40 mg/mL foi confirmada, conforme figura 23. Foram retirados três valores extremos pelo teste de Jacknife, marcados em vermelho na planilha (APÊNDICE B). Esses dados não foram considerados na avaliação das premissas.

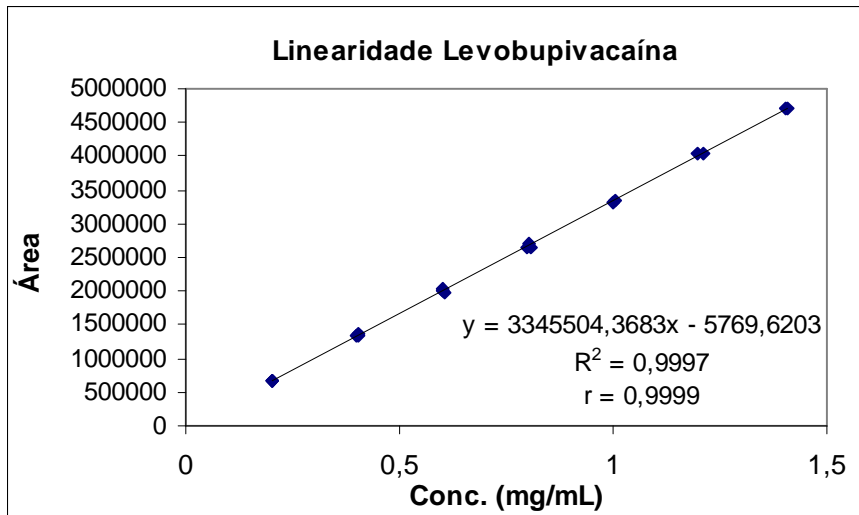


Figura 23: Gráfico da curva analítica levobupivacaína na faixa de concentração 0,20 a 1,40 mg/mL.

As premissas para a curva analítica de levobupivacaína descritas no item 4.2.2 foram atendidas. A planilha Excel de Bazílio (2011) adaptada de Souza e Junqueira (2005), encontra-se no APÊNDICE B.

4.2.2.2 – Avaliação da curva analítica para Dextrobupivacaína

A linearidade da curva analítica para dextrobupivacaína na faixa de concentração de 0,20 a 1,40 mg/mL foi confirmada, conforme figura 24. Foram retirados dois valores extremos pelo teste de Jacknife, marcados em vermelho na planilha (APÊNDICE C). Esses dados não foram considerados na avaliação das premissas.

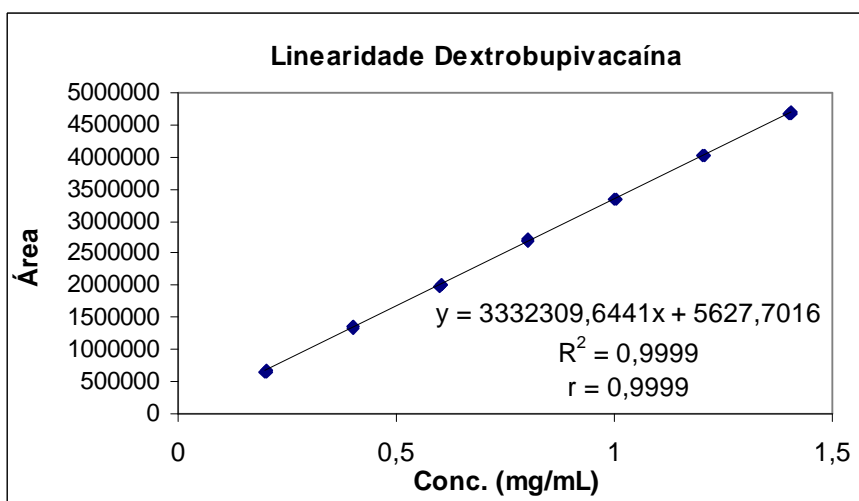


Figura 24: Gráfico da curva analítica dextrobupivacaína na faixa de concentração 0,20 a 1,40 mg/mL.

As premissas para a curva analítica de dextrobupivacaína descritas no item 4.2.2 foram atendidas. A planilha Excel de Bazílio (2011) adaptada de Souza e Junqueira (2005), encontra-se no APÊNDICE C.

4.2.3 – Determinação da faixa de trabalho

Para a determinação quantitativa, foi escolhida uma faixa de trabalho de 90 a 110% das concentrações teóricas para cada enantiômero. Esta faixa engloba a faixa para o ensaio de teor para todas as diferentes amostras do estudo. A concentração teórica da amostra (100%) encontra-se no centro da faixa de trabalho, conforme mostra o quadro 5.

Quadro 5 – Determinação da faixa linear de trabalho.

Produtos	Concentração teórica para cada enantiômero	90% da concentração teórica	110% da concentração teórica
AM bupi 5,0 mg/mL (fabricante 1 e 2)	0,8 mg/mL para cada enantiômero	0,72 mg/mL para cada enantiômero	0,88 mg/mL para cada enantiômero
AM bupi 5,0 mg/mL + glicose (fabricante 1 e 2)	0,8 mg/mL para cada enantiômero	0,72 mg/mL para cada enantiômero	0,88 mg/mL para cada enantiômero
AM bupi 5,0 mg/mL com 75% S (3,75 mg/mL) e 25% R (1,25 mg/mL) (fabricante 1)	1,20 mg/mL para S e 0,40 mg/mL para R	1,08 mg/mL para S e 0,36 mg/mL para R	1,32 mg/mL para S e 0,44 mg/mL para R

4.2.4 – Determinação da Tendência / Recuperação

A tabela 11 mostra as recuperações para cada nível das curvas de adição de levobupivacaína e dextrobupivacaína nos produtos em estudo. Verifica-se que os resultados encontram-se dentro dos limites recomendados (95 a 105%), para o nível de concentração do estudo (CODEX, 2010), comprovando assim adequada recuperação do método para estas substâncias.

Tabela 11: Recuperações para cada nível de concentração das curvas de adição de levobupivacaína e dextrobupivacaína.

	Produto 1		Produto 2		Produto 3		Produto 4		Produto 5	
	Levo	Dextro	Levo	Dextro	Levo	Dextro	Levo	Dextro	Levo	Dextro
Nível 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nível 2	102,47	99,13	102,08	99,90	103,29	100,28	100,17	101,91	99,95	102,30
Nível 3	102,92	98,33	101,12	98,36	101,11	101,91	99,92	97,89	100,35	100,18
Nível 4	102,37	101,00	101,01	99,31	99,69	100,79	99,13	99,64	100,12	98,14
Nível 5	100,07	99,74	99,95	99,69	101,59	95,75	99,17	99,9	98,96	99,13
Nível 6	101,31	99,34	99,04	100,36	99,64	98,33	99,34	99,84	99,47	98,18
Nível 7	101,89	99,38	99,52	97,95	101,20	99,85	99,87	98,73	100,15	100,40

4.2.5 – Determinação da Precisão: Repetitividade e Precisão Intermediária

4.2.5.1 – Repetitividade

Os resultados das repetitividades das análises efetuadas por cada analista nos 5 produtos em estudo estão indicados na Tabela 12 e 13 para os sinais cromatográficos referentes a levobupivacaína e dextrobupivacaína, respectivamente. Os valores calculados para DPRr, atestam a repetitividade do método. Segundo Horwitz (1995), os limites estabelecidos de DPRr em função do nível de concentração do analito em solução não podem ultrapassar 5,6 %.

Tabela 12: Repetitividade do método para o sinal referente a levobupivacaína.

	Teor (%) Produto 1		Teor (%) Produto 2		Teor (%) Produto 3		Teor (%) Produto 4		Teor (%) Produto 5	
	Analista		Analista		Analista		Analista		Analista	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
	103,40	102,10	100,81	102,34	102,48	99,03	102,48	101,72	104,46	102,82
	103,88	101,69	102,62	103,00	102,32	101,39	102,32	99,33	104,87	106,29
	103,61	102,72	102,52	102,79	102,95	101,56	102,86	106,70	105,53	104,18
	100,97	101,02	103,33	102,15	103,13	103,36	103,13	101,87	104,09	104,85
	102,93	101,97	101,25	102,45	103,56	103,81	103,56	103,85	105,51	103,38
	102,87	101,36	104,72	102,61	103,25	102,44	103,25	101,83	105,44	106,87
	104,67	101,94	104,12	102,61	102,90	104,01	102,90	100,44	104,72	104,31
	104,31	101,45	102,73	102,53	104,29	104,82	104,29	101,91	105,77	103,30
	102,63	98,51	101,69	103,97	106,49	104,67	106,49	100,36	107,75	105,29
	103,65	100,16	102,11	101,98	103,50	102,52	103,50	102,08	104,95	101,93
	105,79	101,47	101,28	102,01	102,31	100,52	102,31	100,69	103,22	106,91
	103,87	100,71	101,31	102,04	102,92	101,70	102,92	102,46	107,79	104,93
	103,38	101,96	102,50	101,98	104,32	105,01	104,32	100,43	105,34	104,38
	105,16	101,39	102,66	101,88	102,74	102,70	102,74	101,99	104,88	104,92
	103,88	102,69	101,87	101,92	102,98	102,62	102,98	100,81	105,40	104,89
média	103,67	101,41	102,37	102,42	103,34	102,68	103,34	101,76	105,31	104,62
DPRr	1,09	1,04	1,06	0,54	1,03	1,63	1,03	1,72	1,13	1,35

Tabela 13: Repetitividade do método para o sinal referente a dextrobupivacaína.

Teor (%) Produto 1		Teor (%) Produto 2		Teor (%) Produto 3		Teor (%) Produto 4		Teor (%) Produto 5		
Analista		Analista		Analista		Analista		Analista		
1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
104,08	103,21	101,89	102,80	101,00	101,97	101,00	104,39	103,63	103,33	
104,58	102,75	103,56	103,55	100,88	104,38	100,88	101,96	103,91	106,78	
104,37	103,81	103,50	103,36	101,54	104,62	101,39	109,53	104,49	104,68	
101,61	102,09	104,30	102,71	101,74	106,39	101,74	104,63	103,33	105,51	
103,65	103,05	102,04	102,97	102,22	106,92	102,22	106,65	104,17	103,89	
103,45	102,41	105,66	103,16	101,84	105,50	101,84	104,67	104,37	107,42	
105,12	103,03	105,01	103,11	101,63	107,09	101,63	103,11	104,27	104,93	
104,85	102,53	103,71	103,09	102,91	107,96	102,91	104,71	104,72	103,79	
103,35	99,51	102,69	104,47	105,08	107,82	105,08	103,07	107,11	105,76	
104,28	101,18	103,19	102,48	102,16	105,53	102,16	104,80	104,04	102,50	
106,52	102,49	102,25	102,53	100,93	103,53	100,93	103,39	102,25	107,57	
104,56	101,84	102,20	102,55	101,62	104,74	101,62	105,20	107,12	105,50	
103,90	103,05	103,59	102,51	100,37	108,13	100,37	103,12	104,77	104,93	
105,75	102,46	103,73	102,38	101,43	105,77	101,43	104,74	104,58	105,53	
104,55	103,81	102,85	102,43	101,68	105,69	101,68	103,51	104,97	105,46	
média	104,31	102,48	103,34	102,94	101,80	105,74	101,79	104,50	104,52	105,17
DPRr	1,08	1,05	1,05	0,54	1,08	1,64	1,08	1,72	1,20	1,36

4.2.5.2 – Precisão Intermediária

Os resultados das precisões intermediária das análises efetuadas nos 5 produtos, por 2 analistas, estão indicados nas tabelas 14 e 15 para os sinais cromatográficos referentes a levobupivacaína e dextrobupivacaína, respectivamente. Os valores calculados dos desvios-padrão relativos de precisão intermediária (DPR_{Spi}) atestam que a variabilidade dos resultados em um laboratório, estão de acordo com o DPR_{Spi} reportado por Horwitz (1995) em função do nível de concentração do analito em solução, que não podem ultrapassar 5,6 %. Observa-se que os resultados obtidos pelos 2 analistas apresentaram DPR_{Spi} muito abaixo do desvio máximo recomendado.

Tabela 14: Avaliação da precisão intermediária do método a partir dos resultados de teor de levobupivacaína obtidos por dois diferentes analistas para os cinco produtos estudados.

$(Y1-MdY1)^2$ Produto 1		$(Y1-MdY1)^2$ Produto 2		$(Y1-MdY1)^2$ Produto 3		$(Y1-MdY1)^2$ Produto 4		$(Y1-MdY1)^2$ Produto 5	
Analista		Analista		Analista		Analista		Analista	
1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
0,0711	0,4770	2,4166	0,0054	0,7442	13,3030	0,7339	0,0020	0,7305	3,2280
0,0455	0,0788	0,0626	0,3434	1,0458	1,6572	1,0336	5,9276	0,1977	2,8000
0,0032	1,7178	0,0233	0,1391	0,1542	1,2484	0,2272	24,3575	0,0464	0,1907
7,2720	0,1516	0,9235	0,0718	0,0452	0,4660	0,0427	0,0111	1,4998	0,0544
0,5427	0,3143	1,2528	0,0010	0,0472	1,2829	0,0499	4,3486	0,0382	1,5293
0,6347	0,0024	5,5337	0,0370	0,0086	0,0563	0,0075	0,0043	0,0157	5,0775
1,0067	0,2816	3,0672	0,0361	0,1960	1,7760	0,1907	1,7547	0,3536	0,0940
0,4139	0,0017	0,1287	0,0125	0,8974	4,5910	0,9088	0,0211	0,2073	1,7336
1,0747	8,4061	0,4618	2,4168	9,9057	3,9707	9,9435	1,9731	5,9308	0,4534
0,0003	1,5608	0,0675	0,1961	0,0248	0,0248	0,0267	0,0994	0,1330	7,2182
4,5085	0,0037	1,1788	0,1670	1,0664	4,6541	1,0540	1,1549	4,3876	5,2594
0,0413	0,4891	1,1158	0,1411	0,1786	0,9552	0,1736	0,4835	6,1273	0,0982
0,0822	0,3032	0,0164	0,1888	0,9552	5,4413	0,9669	1,7813	0,0006	0,0560
2,2300	0,0004	0,0864	0,2904	0,3632	0,0005	0,3560	0,0508	0,1889	0,0920
0,0455	1,6401	0,2432	0,2462	0,1315	0,0033	0,1272	0,9114	0,0073	0,0747
Spi	1,0922	0,8634		1,4040		1,4482		1,3069	
média	102,54	102,39		103,01		102,55		104,97	
DPR_{Spi}	1,0652	0,8432		1,3630		1,4122		1,2451	

Tabela 15: Avaliação da precisão intermediária do método a partir dos resultados de teor de dextrobupivacaína obtidos por dois diferentes analistas para os cinco produtos estudados.

$(Y1-MdY1)^2$ Produto 1		$(Y1-MdY1)^2$ Produto 2		$(Y1-MdY1)^2$ Produto 3		$(Y1-MdY1)^2$ Produto 4		$(Y1-MdY1)^2$ Produto 5	
Analista		Analista		Analista		Analista		Analista	
1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
0,0520	0,5310	2,1203	0,2943	0,6432	14,1828	0,6273	0,0118	0,7838	3,3930
0,0740	0,0722	0,0460	0,0432	0,8501	1,8387	0,8317	6,4448	0,3664	2,5857
0,0038	1,7654	0,0244	0,0002	0,0686	1,2455	0,1616	25,3143	0,0006	0,2421
7,2792	0,1531	0,9165	0,4022	0,0038	0,4277	0,0027	0,0172	1,4050	0,1142
0,4330	0,3234	1,7131	0,1395	0,1747	1,4019	0,1832	4,6282	0,1193	1,6435
0,7362	0,0051	5,3486	0,0334	0,0014	0,0557	0,0023	0,0294	0,0211	5,0535
0,6593	0,3010	2,7595	0,0557	0,0296	1,8333	0,0262	1,9284	0,0602	0,0586
0,2938	0,0024	0,1326	0,0656	1,2277	4,9462	1,2499	0,0447	0,0419	1,9099
0,9178	8,8288	0,4280	1,2564	10,7453	4,3431	10,8109	2,0411	6,7323	0,3457
0,0008	1,6935	0,0231	0,7547	0,1282	0,0424	0,1354	0,0908	0,2259	7,1396
4,8929	0,0001	1,1951	0,6639	0,7604	4,8664	0,7430	1,2291	5,1317	5,7504
0,0635	0,4113	1,3010	0,6369	0,0331	0,9920	0,0296	0,4919	6,7843	0,1076
0,1665	0,3234	0,0598	0,6941	2,0506	5,7312	2,0221	1,9007	0,0649	0,0586
2,0794	0,0005	0,1478	0,9272	0,1384	0,0012	0,1310	0,0582	0,0042	0,1282
0,0586	1,7654	0,2400	0,8294	0,0149	0,0021	0,0125	0,9775	0,2067	0,0829
Spi	1,1001	0,9113		1,4489		1,4902		1,3438	
média	103,39	103,14		103,77		103,15		104,84	
DPR_{Spi}	1,0640	0,8835		1,3963		1,4447		1,2817	

4.2.6 – Verificação do Efeito Matriz

A avaliação da linearidade da curva matriz pelo MMQO foi realizada através das planilhas de Bazílio (2011) adaptadas de Souza e Junqueira (2005), apresentadas nos APÊNDICES D, E, F, G e H para o sinal da levobupivacaína e nos APÊNDICES I, J, K, L e M para o sinal da dextrobupivacaína. É possível observar, nestas planilhas, a adequação dos resultados para os parâmetros da regressão e verificação das premissas relativas aos resíduos da regressão. Porém, como neste estudo foi realizada apenas uma curva para cada uma das 5 matrizes, não há significado prático para o desvio de linearidade encontrado nas curvas para o sinal de levobupivacaína nos produtos 1 e 3, e para o sinal de dextrobupivacaína nos produtos 3, 4 e 5. Como as injeções repetidas não podem ser consideradas réplicas genuínas, o quadrado médio do erro puro tende a subestimar a variância. Neste caso, o teste da falta de ajuste tende a detectar uma inadequação do modelo de regressão que na verdade não existe (WERKEMA & AGUIAR, 1996).

Foram realizadas comparações das inclinações e interseções par a par das curvas de adição do analito nas matrizes com a da curva analítica em solvente, conforme APÊNDICES N, O, P, Q e R para o sinal de levobupivacaína e APÊNDICES S, T, U, V e W para o sinal de dextrobupivacaína. O teste preconizado para comparação das inclinações e interseções das curvas é o teste t (ARMITAGE & BERRY, 1994). Os dados obtidos indicam que não ocorreu efeito da matriz para as 5 matrizes em estudo ($t_{\text{calc}} < t_{\text{tab}}$). É importante ressaltar que este resultado não pode ser extrapolado para todas as possíveis matrizes que contenham cloridrato de levobupivacaína e dextrobupivacaína.

4.2.7 – Avaliação da Robustez

Foram realizadas oito diferentes combinações de ensaios para variações superiores em relação aos valores nominais e oito diferentes combinações de ensaios para variações inferiores em relação aos valores nominais, conforme tabela 4 do item 3.4.7 (matriz de fatores).

O grau de variação para os fatores do método em estudo foi determinado com base nos ajustes em métodos por CLAE descritos no capítulo geral <621> da USP

34 (2011). A Tabela 16 mostra os efeitos das variações sobre os fatores escolhidos para esse estudo.

Tabela 16: Variações nos fatores (parâmetros operacionais) para a determinação da robustez.

Fatores Variados	Nominal / Letra	Varição / Letra
1. Quantidade de meOH na FM	40% / A	+/- 5% / a
2. Quantidade de TEA na FM	0,20% / B	+/- 0,05% / b
3. pH da FM	5,0 / C	+/- 0,2 / c
4. Lote da coluna	7251 / D	7341 / d
5. Fluxo	0,8 mL/minuto / E	+/- 0,1 mL/minuto / e
6. Temperatura do forno	30°C / F	+/- 5°C / f
7. Tempo de ultrassom	2 minutos / G	+/- 1 minuto / g

Depois de ensaiadas as oito combinações, os resultados obtidos foram analisados de acordo com os parâmetros de adequação do sistema fator de cauda, resolução, pratos teóricos e fator de capacidade. As tabelas 17 e 18 mostram, respectivamente, os resultados obtidos para as variações superiores e inferiores às nominais.

Tabela 17: Resultados obtidos para as variações superiores às nominais.

condição	Fator de cauda		Resolução		Pratos teóricos		Fator de capacidade	
	Levo	Dextro	Levo	Dextro	Levo	Dextro	Levo	Dextro
S	1,36	1,52	0	2,56	6732,8	6202,0	8,61	9,92
T	1,28	1,43	0	2,35	7026,2	6534,1	7,12	8,10
U	1,28	1,43	0	2,45	5855,6	5460,7	7,02	8,15
V	1,32	1,51	0	2,49	4758,8	4348,7	6,76	8,00
W	1,26	1,39	0	2,32	5066,2	4639,3	5,90	6,88
X	1,24	1,39	0	2,37	6225,1	5812,8	6,86	7,89
Y	1,20	1,31	0	2,13	7133,7	6754,7	6,23	7,02
Z	1,28	1,40	0	2,38	6863,1	6365,7	7,81	8,91

Tabela 18: Resultados obtidos para as variações inferiores às nominais.

condição	Fator de cauda		Resolução		Pratos teóricos		Fator de capacidade	
	Levo	Dextro	Levo	Dextro	Levo	Dextro	Levo	Dextro
Si	1,36	1,52	0,00	2,56	6732,8	6202,0	8,61	9,92
Ti	1,42	1,61	0,00	2,71	6464,4	5782,6	9,90	11,53
Ui	1,41	1,72	0,00	2,67	4697,7	4105,6	8,27	9,90
Vi	1,39	1,62	0,00	2,63	5597,5	4998,6	8,74	10,26
Wi	1,52	1,81	0,00	2,78	5430,1	4826,0	10,36	12,27
Xi	1,51	1,82	0,00	2,66	4403,2	3861,0	8,71	10,47
Yi	1,59	1,86	0,00	2,92	6120,6	5320,1	12,77	15,07
Zi	1,47	1,68	0,00	2,64	6417,8	5785,1	9,98	11,57

Os valores de fator de cauda foram sempre inferiores a 2, demonstrando um bom formato dos sinais. A resolução entre os picos cromatográficos de levobupivacaína e dextrobupivacaína sempre foi superior a 2,0, assegurando a não sobreponibilidade. O número de pratos teóricos apresentou-se superior ao recomendado ($N > 2000$) em relação ao fator de capacidade obtido para os picos de levobupivacaína e dextrobupivacaína.

Foram calculados os sete efeitos (E1 a E7), e as Tabelas 19 e 20 mostram respectivamente os resultados dos efeitos determinados para as variações superiores e inferiores em relação às nominais.

Tabela 19: Resultados dos efeitos para as variações superiores às nominais.

Fatores	Fator de cauda		Resolução		Pratos teóricos		Fator de capacidade	
	Levo	Dextro	Levo	Dextro	Levo	Dextro	Levo	Dextro
E1	0,068	0,101	-	0,16	-228,7	-256,8	0,68	0,87
E2	0,014	0,018	-	0,04	109,8	64,6	0,17	0,18
E3	-0,005	-0,016	-	-0,03	-21,2	-1,2	-0,20	-0,23
E4	0,006	-0,014	-	-0,05	1462,6	1398,8	0,81	0,76
E5	0,023	0,028	-	0,12	422,9	391,1	1,08	1,22
E6	0,056	0,066	-	0,11	-705,0	-751,7	0,46	0,64
E7	0,008	0,021	-	0,01	9,8	29,6	0,15	0,20

Onde: E1: quantidade de meOH na FM; E2: quantidade de TEA na FM; E3: pH da FM; E4: lote da coluna; E5: fluxo; E6: temperatura do forno; E7: tempo de ultrassom.

Tabela 20: Resultados dos efeitos para as variações inferiores às nominais.

Fatores	Fator de cauda		Resolução		Pratos teóricos		Fator de capacidade	
	Levo	Dextro	Levo	Dextro	Levo	Dextro	Levo	Dextro
E1	0,127	-0,175	-	-0,10	280,2	324,2	-1,57	-1,94
E2	-0,012	-0,028	-	-0,04	49,2	115,6	-0,55	-0,65
E3	0,023	0,047	-	0,07	24,6	6,6	0,67	0,84
E4	-0,002	-0,075	-	0,02	1401,8	1324,7	1,30	1,30
E5	-0,041	-0,041	-	-0,13	-340,3	-243,4	-1,55	-1,82
E6	-0,046	-0,096	-	-0,09	623,1	685,6	-0,49	-0,73
E7	0,009	0,002	-	-0,01	-39,0	-29,4	0,08	0,11

Onde: E1: quantidade de meOH na FM; E2: quantidade de TEA na FM; E3: pH da FM; E4: lote da coluna; E5: fluxo; E6: temperatura do forno; E7: tempo de ultrassom.

Os efeitos foram avaliados com a finalidade de revelar aqueles mais significantes sobre os resultados dos parâmetros de adequação do sistema, para os picos cromatográficos, tanto nas variações superiores, como nas inferiores:

- Fator de cauda: não houve efeito capaz de causar variações significativas, todos os valores foram próximos de zero.
- Resolução: não houve efeito capaz de causar variações significativas.

- Número de pratos teóricos: a diferença entre os lotes da coluna é o efeito mais significativo, tanto na variação superior como na inferior, devido ao fato de uma das colunas ter sido mais desgastada durante a validação.
- Fator de capacidade: os efeitos de variação da composição da fase móvel e fluxo foram significativos na variação inferior à nominal. Sugere-se não diminuir a quantidade de metanol na composição da fase móvel e nem diminuir o fluxo da condição analítica que foi determinada nesta validação.

4.3 – Avaliação das estruturas cristalinas dos padrões utilizados

Os difratogramas da substância cloridrato de bupivacaína (mistura racêmica) oriundos da USP, WHO, SQR-FB e MP dos fornecedores 1 e 2 encontram-se no APÊNDICE X. Ao comparar os difratogramas dos padrões USP, WHO e SQR-FB, observa-se que estes apresentam pouca similaridade entre si. Em contrapartida, os picos mais intensos, encontrados nos difratogramas das MPs dos fornecedores 1 e 2, são similares. Estes ainda quando comparados com os difratogramas dos padrões, observa-se que se aproximam mais do grau de cristalinidade do padrão WHO.

Os difratogramas dos padrões e MPs das substâncias cloridrato de levobupivacaína e cloridrato de dextrobupivacaína encontram-se no APÊNDICE Y. Pode-se observar que os picos mais intensos encontrados no difratograma do padrão de cloridrato de levobupivacaína são similares aos encontrados na MP. O mesmo foi observado entre os difratogramas do padrão e MP da substância cloridrato de dextrobupivacaína. Porém, ao comparar os difratogramas entre as substâncias cloridrato de levobupivacaína e dextrobupivacaína, percebe-se que há pouca similaridade entre eles.

Estudo mais detalhado faz-se necessário para avaliar se as diferenças de cristalinidade, encontradas neste trabalho, podem comprometer a eficácia e segurança do produto.

5 – CONCLUSÃO

Foi desenvolvido método analítico para determinação das proporções dos enantiômeros da solução injetável cloridrato de bupivacaína por CLAE com fase estacionária quiral. As condições cromatográficas estabelecidas para este método foram: coluna cromatográfica com fase estacionária quiral baseada em glicopeptídeos macrocíclicos (chirobiotic V – Vancomycin 250 x 4,6 mm; 5 μ m - Supelco), fase móvel constituída de uma mistura de água: MeOH: TEA (60: 40: 0,2) pH= 5,0 ajustado com ácido acético 50%. O fluxo empregado foi de 0,8 mL/min e detecção UV/VIS a 230 nm.

A adequação do sistema cromatográfico foi assegurada durante todo o procedimento de validação do método através da avaliação dos parâmetros para fator de cauda, resolução, número de pratos teóricos, fator de capacidade, DPR das áreas e pureza dos sinais cromatográficos.

O novo método foi avaliado e se mostrou apto à validação, onde os parâmetros analíticos avaliados foram seletividade, linearidade, faixa de trabalho, tendência / recuperação, precisão, efeito matriz e robustez.

O método mostrou ser seletivo para a quantificação dos enantiômeros presentes na solução injetável de cloridrato de bupivacaína. A estabilidade das soluções dos padrões e produtos foi assegurada por até 24 horas.

A linearidade do método foi assegurada para levobupivacaína e dextrobupivacaína no intervalo de concentração de 0,20 a 1,40 mg/mL. As premissas do modelo para as curvas analíticas, avaliadas através da análise dos resíduos, foram atendidas. Esse intervalo de concentração das curvas analíticas engloba a faixa de trabalho de 90 a 110% das concentrações teóricas para cada enantiômero, na determinação quantitativa do método.

O método demonstrou adequada recuperação nos 5 produtos avaliados, encontrando-se dentro dos limites (95 a 105%) para o nível de concentração do estudo. Na precisão, a variabilidade dos resultados representada pelo DPR_r e DPR_{Spi} , não ultrapassou o limite recomendado de 5,6% em função da concentração do analito.

A comparação das inclinações e interseções, entre as curvas de adição do analito nas matrizes e as curvas analíticas em solvente, indicam que não ocorreu efeito matriz para os 5 produtos em estudo ($t_{calc} < t_{tab}$).

O método se mostrou robusto às variações das condições analíticas testadas, onde os resultados encontrados para os parâmetros de adequação do sistema apresentaram-se dentro dos valores recomendados nos compêndios oficiais.

Segundo o tratamento estatístico realizado, o método analítico proposto foi capaz de determinar as proporções dos enantiômeros presentes na solução injetável de cloridrato de bupivacaína de diferentes produtos, produzindo resultados confiáveis e reprodutíveis.

Esse método poderá ser empregado no laboratório de controle de qualidade do INCQS a fim de elucidar possível fonte de agravo à saúde, relacionada as diferentes proporções dos enantiômeros presentes na solução injetável de cloridrato de bupivacaína, gerando resultados capazes de auxiliar na atuação de vigilância sanitária, tanto na proteção como na promoção da saúde da população.

6 – PERSPECTIVAS

Em virtude da inexistência de monografia, descrita em compêndios oficiais reconhecidos pela ANVISA, para determinação das proporções dos enantiômeros da solução injetável de Cloridrato de bupivacaína, propor a inclusão na Farmacopéia Brasileira do método desenvolvido e validado neste trabalho.

Sugerir que as substâncias cloridrato de levobupivacaína e cloridrato de levobupivacaína sejam estabelecidas como SQR-FB.

Propor um programa de monitoramento, para o controle de qualidade das soluções injetáveis de cloridrato de bupivacaína utilizando o método analítico proposto neste trabalho, a fim de elucidar possível causa de risco à saúde conforme exposto por Rio (2009), incluindo também uma avaliação dos principais fatores que podem influenciar na eficácia terapêutica.

Propor um estudo para determinação das diferentes estruturas cristalinas presentes nos fármacos cloridrato de levobupivacaína e cloridrato de dextrobupivacaína e avaliar se essas diferenças podem comprometer a eficácia e segurança do produto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABERG, G. Toxicological and local anaesthetics effects of optically active isomers of two local anaesthetics compounds. **Acta pharmacol toxicol**, 1972, v. 31, p. 273-286.

ABNT. **NBR ISO/IEC 17025:2005**: Requisitos Gerais para Competência de laboratórios de Ensaio e Calibração. Rio de Janeiro, 2005.

AGUIAR, M.R.; GEMAL, A.L.; GIL, R.A. Caracterização de Polimorfismo em Fármacos por Ressonância Magnética Nuclear no Estado Sólido. **Química Nova**, v.22, n. 4, p. 553-563, 1999.

AGUIAR, J. L. N. **Validação intralaboratorial de um novo método analítico por cromatografia em fase líquida do ácido acetilsalicílico e do ácido salicílico em comprimidos**. 2007. 90 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária)- Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.

ALLENMARK, S.G. Protein based phases. In: **Chiral Separations by HPLC: Applications to Pharmaceutical compounds**. KRSTULOVIC, A.M. (Ed), New York: Ellis Horwood, 1989. cap.11.

ANSEL, H.C. *et al.* **Farmacotécnica**: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. 6. ed. São Paulo: Premier, 2000. 568p.

ANVISA. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2 jun. 2003. Seção 1.

ARMITAGE, P.; BERRY, G. **Statistical methods in medical research**. Oxford: Blackwell Science Ltda., 1994. 620 p.

ARMSTRONG, D.W. *et al.* Macrocyclic antibiotics as a new class of chiral selectors for liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v.66, n.9, p.1473, 1994.

BARREIRO, E.J. Substâncias enantiomericamente puras: a questão dos fármacos quirais. **Química Nova**, v. 20, n. 6. 1997.

BAUER, M.; LEEDE L.; WAART, M.V.D. Purity as an issue in pharmaceutical research and development. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.6, p.331-335, 1998.

BAZILIO, F.S.; BOMFIM, M. V. J.; ALMEIDA, R. J.; ABRANTES, S. M. P. Uso de planilha eletrônica na verificação da adequação de curva analítica ao modelo linear. **Analytica**. [2011]. No prelo.

BERTHOD, A. Chiral recognition mechanisms. **Analytical Chemistry**. v.78, n.7, p.2093, 2006.

BERTHOD, A. Chiral recognition mechanisms with macrocyclic glycopeptide selectors. **Chirality**, v.21, n.1, p.167, 2009.

BEZERRA, L.S. **Cancelamento de amostras submetidas às análises previstas na legislação sanitária: um problema de saúde pública**. 2000. Monografia (Especialização em Saúde Pública)- Pós-Graduação em Saúde Pública, Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2000.

BITTENCOURT, C.F. O Desenvolvimento da Farmacopéia Brasileira IV. In: Bonfim, J.R.A.; Mercucci, V.L., (Org). **A Construção da Política de Medicamentos**. São Paulo: Hucitec, 1997. p. 241-250

BRAGA, A.F.A. *et al.*, Anestesia Peridural para Cesariana. Estudo Comparativo entre Bupivacaína Racêmica (S50-R50) e Bupivacaína com Excesso Enantiomérico de 50% (S75-R25) a 0,5% Associadas ao Sufentanil. **Rev. Bras. Anestesiol**, v.59, n.3, p.261-272, 2009.

BRASIL. Lei nº 5.991, de 17 de dezembro de 1973. Dispõe sobre o controle sanitário do comércio de drogas, medicamentos, insumos farmacêuticos e correlatos, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 dez. 1973. Seção 1. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em: 22 maio 2009.

_____. Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 set. 1976. Seção 1. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em: 21 maio 2009.

_____. Decreto nº 79.094, de 05 de janeiro de 1977. Regulamenta a Lei no 6.360, de 23 de setembro de 1976. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**,

Poder Executivo, Brasília, DF, 7 jan. 1977. Seção 1. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em: 21 maio 2009.

_____. **Constituição da República Federativa do Brasil**: de 05 de outubro de 1988. São Paulo. Editora: Saraiva, 2001.

_____. Portaria nº 3.916, de 30 de outubro de 1998. Dispõe sobre a Política Nacional de Medicamentos. Brasília, DF, em 10 de novembro de 1998. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 1 nov. 1998. Seção 1. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em: 24 set. 2009.

_____. Resolução da Diretoria Colegiada, RDC nº 16, de 02 de março de 2007. Aprova o Regulamento Técnico para Medicamentos Genéricos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 5 mar. 2007. Seção 1. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em: 20 abril 2009.

_____. Resolução da Diretoria Colegiada, RDC nº 17, de 02 de março de 2007a. Dispõe sobre o registro de Medicamento Similar. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 5 mar. 2007. Seção 1. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em: 20 abril 2009.

_____. Resolução da Diretoria Colegiada, RDC nº 37, de 06 de julho de 2009. Trata da admissibilidade das Farmacopéias estrangeiras. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 8 jul. 2009. Seção 1. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em: 10 nov 2009.

BRITISH Pharmacopeia 2009. London. The stationery Office, 2008. 1 CD-ROM.

BONATO, P.S.; JABOR, V.A.; GAITANI, C.M. Análise enantiosseletiva de fármacos: contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. **Química Nova**, v.28, n.4, p.683-691, 2005.

BRUCE, B.; MINKKINEN, P.; RIEKKOLA, M.L. Practical method validation: validation sufficient for an analysis method. **Mikrochim. Acta**, v. 128, p. 93-106, 1998.

BUCKTON, G. Propriedades do Estado Sólido. In: AULTON, M.E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p.151-161

CALDWELL, J. Stereochemical determinants of the nature and consequences of drugs metabolism. **Journal of chromatography**, v.694, p.39-48, 1995.

CALVEY, T.N. Isomerism and anaesthetic drugs. **Acta Anaesthesiol Scand**, v. 39, suppl. 106, p. 83-90, 1995.

CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: Fundamentos, estratégias e validação**. São Carlos, SP: Ed. UFSCar, 2001. (Série apontamentos).

CHIROBIOTIC. **Chiral by Nature**: Supelco-Analytical. Washington: Sigma-Aldrich, 2008.

CHROMTECH. **Chiral Application Handbook**: a comprehensive guide on Chiral HPLC Separations. Minnesota, [2000]. (Application Note, n.22).

CODEX Alimentarius. Guidelines for establishing numeric values for the criteria. 19. ed. Geneva: FAO, 2010.

CORTES *et al.* Estudo comparativo entre a bupivacaína, mistura enantiomérica de bupivacaína (S75-R25) a 0,5% e ropivacaína a 0,75% associadas ao fentanil em anestesia peridural para cesarianas. **Rev. Bras. Anesthesiol**, 2003; v.53, p.177-187.

COSTA, E.A.; ROZENFELD, S. Constituição da Vigilância Sanitária no Brasil. In: Rosenfeld, S., (Org.). **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2000. p.15-39.

COSTA, L. **Avaliação do polimorfismo de fármacos utilizados para a produção de medicamentos genéricos no Brasil**. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2005.

CULLITY, B.D.; STOCK, S.R. **Elements of X-Ray Diffraction**, 3. ed. New Jersey: Prentice Hall, Inc., 2001.

DALGLIESH, C.E. Optical resolution of aromatic amino acids on paper chromatograms. **Journal of the Chemical Society**. 1952, p. 3940-3942.

DAVANKOV, V.A. The nature of chiral recognition: is it a three-point interaction? **Chirality**, v.9, n.2, p.99, 1997.

DELFINO, J; VALE, N.B. Levobupivacaína em volumes fixos e concentrações diferentes associada a opióides em anestesia peridural para cesarianas. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. 2000; v.50, p.437-441.

DURBIN, J.; WATSON, G.S. Testing for serial correlation in least squares regression ii. **Biometrika**, v. 38, p. 159-178, 1951.

EURACHEM. The fitness for purpose of analytical methods, a laboratory guide to method validation and related topics. **Teddington: LGC**, 1998. 61 p.

FARMACOPÉIA Brasileira. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010. 2 v.

FERRAZ, V. **Cromatografia líquida de alta eficiência**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2001. 32 p.

FERREIRA F.M.C. **Importância da estereoisomeria na atividade bloqueadora neuronal: Estudo experimental com anestésicos locais em nervo ciático de rato**. 1999. Dissertação (Mestrado em Medicina). Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. São Paulo, 1999.

FIOCRUZ. **Institutos – Conheça a Fiocruz**. Rio de Janeiro, [2009a]. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/incqs>>. Acesso em 02 junho 2009.

FIOCRUZ. **Análise Fiscal**. Rio de Janeiro, [2009b]. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/incqs>>. Acesso em 02 junho 2009b.

FRANCOTTE, E.R. Enantioselective chromatography as a powerful alternative for the preparation of drug enantiomers. **Journal of chromatography, A**. v.906, p.379, 2001.

FURMAN, W. B.; DORSEY, J.G.; SNYDER, L.R. System suitability tests in regulatory liquid and gas chromatographic methods: adjustments versus modifications. **Pharm. Techno.**, v. 22, n.6, p.58-64, 1998.

GASPAROTO, F.S. **Fatores relacionados à síntese de matérias-primas que podem alterar a biodisponibilidade do medicamento genérico**. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Alegrete, 2005.

HAGINAKA, J. Protein-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography enantioseparations. **Journal of chromatography, A.** v.906, p.253, 2001.

HAGINAKA, J. Recent progresses in protein-based chiral stationary phases for enantioseparations in liquid chromatography. **Journal of chromatography, B.** v.875, n.1, p.12, 2008.

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

HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. *LC/GC Int.*, Feb., p. 96-105, 1998.

ICH. **Validation of analytical procedures: methodology.** Geneva: ICH/IFPMA, 1996. 8 p.

ILISZ, I.; BERKECZ, R.; PETER, A. HPLC separation of amino acid enantiomers and small peptides on macrocyclic antibiotic-based chiral stationary phases: A review. **Journal of Separation Science**, v.29, n.10, p.1305, 2006.

INCQS. **Apresentação.** Rio de Janeiro, [2009]. Disponível em: <<http://www.incqs.fiocruz.br>>. Acesso em 02 jun. 2009.

INMAN, E.L. et al. General method validation guidelines for pharmaceutical samples. **J. Chromatogr. Sci.**, v. 25, p. 252-256, 1987.

INMETRO. **DOQ-CGCRE-008:** orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro, 2007.

INMETRO. **DOQ-CGCRE-008. Rev. 3:** orientações sobre validação de métodos analíticos. Rio de Janeiro, 2010.

JENKE, D.R. Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. I. General concepts and guidelines. **J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.**, v. 19, p. 719-736, 1996.

KALINKOVA, G.N. Infrared spectroscopy in pharmacy. **Vibrational Spectroscopy**, v.19, p.307-320, 1999.

KING, B. **In-House Method Validation: A Guide for Chemical Laboratories**. London: LGC, 2003.

KOSTYANOVSKY, R.G. Louis Pasteur did it for us especially. **Mendeleev Communications**, v.3, p.85, 2003.

KRSTULOVIC, A.M. Racemates versus enantiomerically pure drugs: putting high-performance liquid chromatography to work in the selection process. **Journal of chromatography**, v.488, p.53-72, 1989.

LACASSIE, H.J.; COLUMB, M.O. The relative motor blocking potencies of bupivacaine and levobupivacaine in labor. **Anesth Analg**, v. 97, p. 1509-1513, 2003.

LIMA, V.L.E. Os fármacos e a quiralidade: uma breve abordagem. **Química Nova**, v.20, p.657-663, 1997.

MAIA, R.J.F.; FERNANDES, C.R. O alvorecer da anestesia inalatória: Uma perspectiva histórica. **Rev. Bras. Anesthesiol**, 2002, v.52, n.6 , p.774-782.

MARTÍN, I.D.; VILADROSA, J.L. Liberación: factores fisicoquímicos: In: BERROZPE, J.D.; LANAO, J.M.; DELFINA, J.M.P.; **Biofarmacia y farmacocinética**. Madrid: Editorial Síntesis, 2000. Vol.II, Cap.13, p. 276-292.

MATHIAS, R. et al. Comparação da qualidade da anestesia peridural para cesarianas com bupivacaína racêmica, levobupivacaína e ropivacaína. **Cong. bras. de anesthesiol.**, Belo Horizonte, UFMG, 1997.

MILLER, J.C.; MILLER, J.N. **Statistics for analytical chemistry**. New York: Ellis Horwood Limited. 1993. p. 101-141.

MOURA, M.R.L.; REYES, F.G.R. Interação fármaco-nutriente: uma revisão. **Revista de Nutrição**, v.15, p.223-238, 2002.

NATIONAL ASSOCIATION OF TESTING AUTHORITIES. **Format and content of test methods and procedures for validation and verification of chemical test methods**. Sydney: NATA, 1997. (Technical note 17).

PIRKLE, W.H.; POCHAPSKY, T.C. Intermolecular próton nuclear overhauser effects in diastereomeric complexes: support for a chromatographically derived chiral

recognition model. **Journal of the American Chemical Society**, v.108, n.18, p.5627, 1986.

REIS, Jr A. O primeiro a utilizar anestesia em cirurgia não foi um dentista. Foi o médico Crawford Williamson Long. **Rev. Bras. Anesthesiol**, v.56, n.3, p.304-324. 2006.

REIS, Jr A. Anestesia Regional Intravenosa – Primeiro Centenário (1908-2008). Início, Desenvolvimento e Estado Atual. **Rev. Bras. Anesthesiol**, v.58, n.3 , p.299-321. 2008.

REIS, Jr A. Sigmund Freud (1856-1939) e Karl Köller (1857-1944) e a Descoberta da Anestesia Local. **Rev. Bras. Anesthesiol**, v.59, n.2 , p.244-257. 2009.

RENTSCH, K.M. The importance of stereoselective determination of drugs in the clinical laboratory. **Journal of biochemical and biophysical methods**, v.54, p.1-9, 2002.

RIO A.S. **Avaliação das denúncias de ineficácia terapêutica de medicamentos com resultados satisfatórios realizados no INCQS no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2008**. 2009. Monografia (Especialização em Vigilância Sanitária)- Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2009.

ROSENBERG, F.J.; SILVA, A.B.M. As Farmacopéias e o Laboratório Oficial de Controle de Qualidade. In: Bonfim, J.R.A.; Mercucci, V.L., org. **A Construção da Política de Medicamentos**. São Paulo: Editora Hucitec, 1997. p. 251-255.

RYAN, T.A.; JOINER, B.L. **Normal probability plots and tests for normality**. Pennsylvania: The State College of Pennsylvania State University, 1976. 15 p.

ROCA, M.F, et al. Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos. **Rev. Bras. Farm.**, v.88, n.4, p.177-180, 2007.

SANTORO, M.I.R. Controle integral de medicamentos. In: **INTRODUÇÃO ao Controle de Qualidade de Medicamentos**. São Paulo: Atheneu, p. 6-12, 1988.

SILVA, A.C.P. O laboratório Oficial na avaliação analítica. In: Rosenfeld, S., (Org.). **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, p.271-300, 2000.

SILVA, Z.P., COROA, M.L. Vigilância Sanitária: um histórico discursivo. **REVISA**, v.1, p.3-15, 2005.

SINGH, A.K; HACKMANN, E.R.M.; SANTORO, M.I.R. Cromatografia Líquida com fase quiral aplicada na separação enantiomérica de fármacos cardiovasculares. **Rev. Bras. de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.4, 2006.

SIMONETTI, M.P.B.; VALINETTI, E.A.; FERREIRA, F.M.C. Avaliação da atividade anestésica local da S(-) bupivacaína: Estudo experimental *in vivo* no nervo ciático de rato. **Rev. Bras. Anestesiol**, v.47, 1997, p.425-434.

SIMONETTI, M.P.B. Manipulação da relação enantiomérica da bupivacaína. **Rev. Bras. Anestesiol**, v.49, 1999, p.416-418.

SIMONETTI, M.P.B. Comparação entre os efeitos hemodinâmicos da intoxicação aguda com bupivacaína racêmica e a mistura com excesso enantiomérico de 50% (S75:R25). Estudo experimental em cães. **Rev. Bras. Anestesiol**, v.56, 2006, p.679-682.

SKOOG, D.A.; Holler, F.J.; Nieman, T.A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman Companhia Editora, 2002.

SOLOMONS, T.W. Graham; FRYHLE, Craig B. **Química Orgânica: 1**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000, v.1, 645p.

SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, n. 1-2, p. 25-35, 2005

SOUZA, Scheilla Vitorino Carvalho. **Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos**. 2007. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)- Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Departamento de Alimentos, Belo Horizonte. 2007.

STRENG, W.H. Physical chemical characterization of drugs substances. **DDT**, v.2, p.415-426, 1997.

THE MERCK INDEX: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 14 ed. New Jersey: Merck & Co., 2006. 2520p.

THIER P.; KIRCHHOFF J. Manual of pesticide residue analysis. DFG-Konzept. Federal Republic of German, 1992.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure Appl. Chem.**, v. 74, p. 835-855, 2002.

TRACHEZ, M.M. **Toxicidade e farmacologia comparativa dos enantiômeros da bupivacaína e da S(-)ropivacaína**. Tese (Doutorado em Medicina)- Departamento de Cirurgia, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 1999.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. US-FDA; Guidance for Industry, **Analytical Procedures and Method Validation**, 2000.

UNITED State Pharmacopeia, 34. ed., Rochville, 2011. 5 v.

VALENZUELA, C *et al.* Stereoselective block of cardiac sodium channels by bupivacaine in guinea pig ventricular myocytes. **Circulation**. 1995; 92: 3014-24.

VIPPAGUNTA, S.; BRITTAIN, H.G.; GRANT, D.J.W.; Crystalline solids. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.48, p.3-26, 2001.

VINKOKIC V.; BARTOLINCIC A.; DRUSKOVIC V.; SPOREC A. Development and validation of HPLC methods for the enantioselective analysis of bambuterol and albuterol. **Journal Pharmaceutical and biomedical analysis**, v.36, p.1003-1010, 2005.

WAINER, I.W. HPLC chiral stationary phases for the stereochemical resolution of enantiomeric compounds. The current state of the art. 2. ed. **Clinical Pharmacology**, v.18, 1993, 139p.

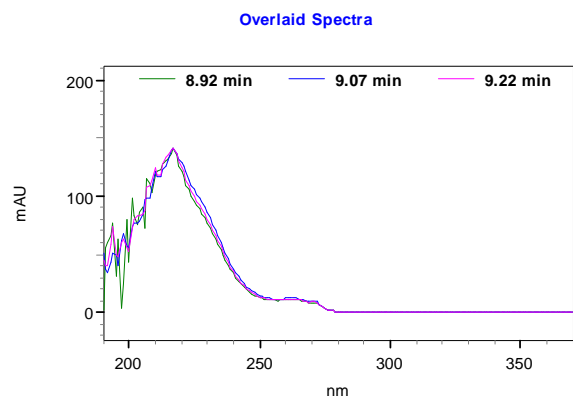
WERKEMA, M.C.C.; AGUIAR, S. Estudo da falta de ajuste. In: ANÁLISE de Regressão: como entender o relacionamento entre as variâncias de um processo. Belo Horizonte: Fundação Christiano Ottoni, Escola de Engenharia da UFMG, 1996.

YANG, J.; HAGE, D.S. Effect of mobile phase composition on the binding kinetics of chiral solutes on a protein-based high-performance liquid chromatography column: Interactions of D and L tryptophan with immobilized human serum albumin. **Journal of chromatography, A**, v.766, p.15, 1997.

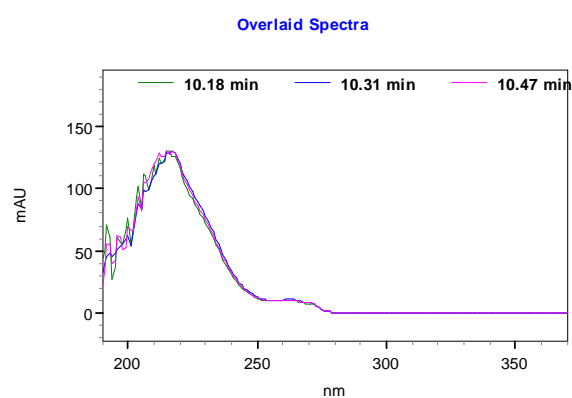
ZHANG, G.G.Z.; LAW, D.; SCHMITT, E.A.; QIU, Y. Phase transformation considerations during process development and manufacture of solid oral dosage forms. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 371-391, 2004.

APÊNDICE A – ESPECTROS DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA

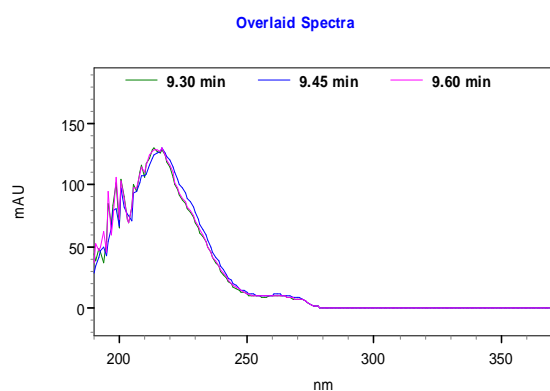
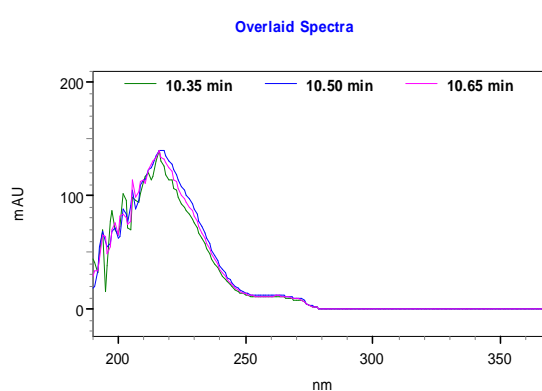
Padrão Cloridrato de Levobupivacaína



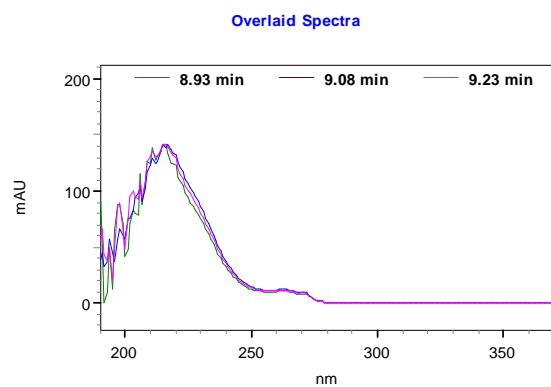
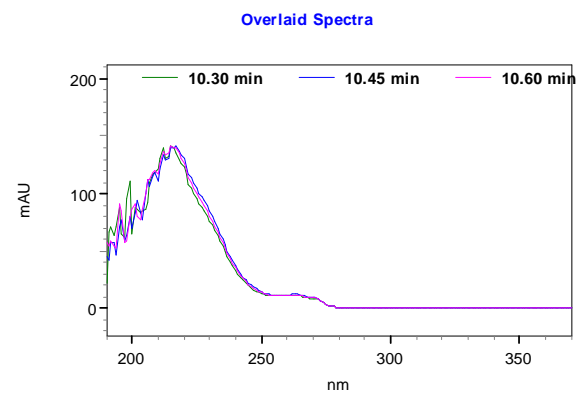
Padrão Cloridrato de Dextrobupivacaína

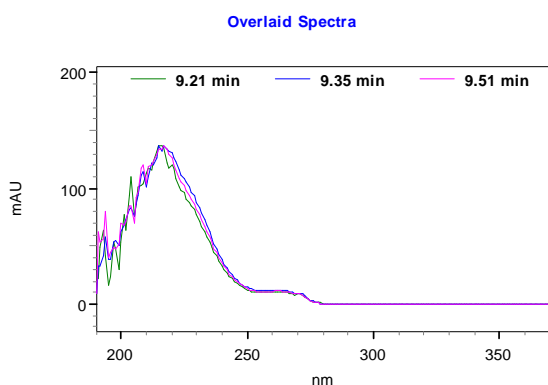
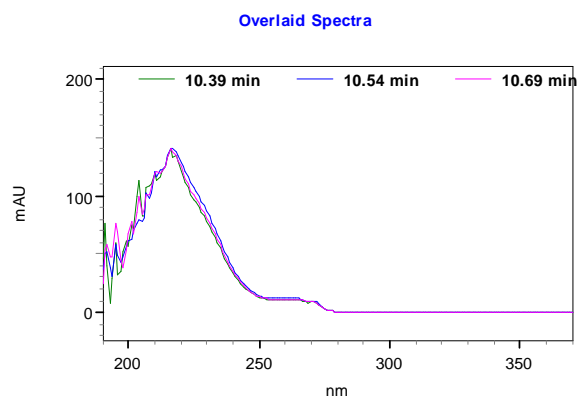
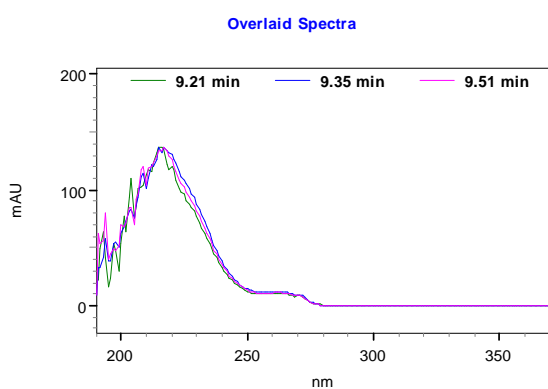
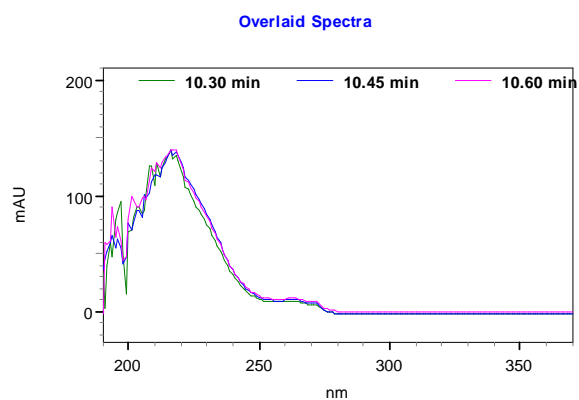
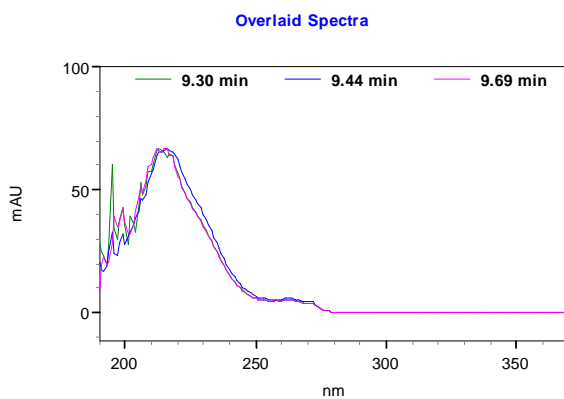
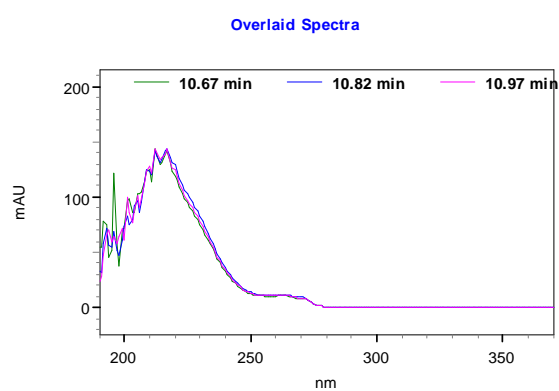


Produto 1

senal levobupivacaínasenal dextrobupivacaína

Produto 2

senal levobupivacaínasenal dextrobupivacaína

Produto 3sinal levobupivacaínasinal dextrobupivacaína**Produto 4**sinal levobupivacaínasinal dextrobupivacaína**Produto 5**sinal levobupivacaínasinal dextrobupivacaína

APÊNDICE B – CURVA ANALÍTICA LEVOBUPIVACAÍNA

	Ministério da Saúde FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde	
---	---	---

AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA

Dados da Curva Analítica

Análise:	Levobupivacaina curva final		
Data de Confeção da Curva:	07/07/2011	Curva N°:	final
Replicatas por Nível (k):	3	N° de Níveis (n):	7
Equipamento:	HPLC 3	Responsável:	Amanda

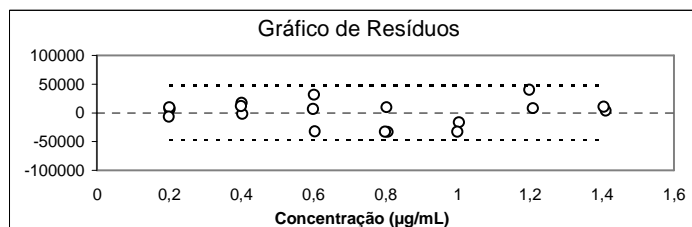
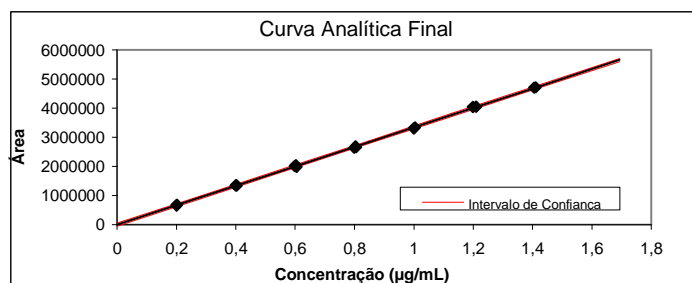
Tabela de dados originais

Nível (k)	i	Conc. µg/mL	Resposta Área
1	01	0,2015	674822
	02	0,2008	675786
	03	0,1998	656131
2	04	0,403	1340630
	05	0,4015	1354859
	06	0,3996	1343035
3	07	0,6045	1984066
	08	0,6023	2040787
	09	0,5993	2005922
4	10	0,806	2657687
	11	0,803	2690132
	12	0,7991	2634730
5	13	1,0075	3419976
	14	1,0038	3336159
	15	0,9989	3303292
6	16	1,209	4046746
	17	1,2046	3959370
	18	1,1987	4044719
7	19	1,4105	4716914
	20	1,4053	4706288
	21	1,3985	4587562

Avaliação de Valores Extremos

(Teste de Jack-Knife para avaliação de valores extremos)

Os dados da tabela marcados em vermelho foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores extremos (outliers). Estes dados não serão considerados na avaliação das premissas.



Normalidade dos Resíduos

(Teste de Ryan-Joiner)

Req	0,96
Rcrit ($\alpha = 0,05$)	0,95

Autocorrelação dos Resíduos

(Teste de Durbin-Watson)

d (calculado)	2,11
dL (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$	1,16
dU (Limite Superior) $\alpha = 0,05$	1,39

Homogeneidade da Variância dos Resíduos

(Teste de Brown-Forsythe)

Variância Combinada	5,27E+08
t_L calculado	-8,01E-01
$t_{\text{tabelado}} (\alpha = 0,05)$	2,12E+00
p	4,35E-01

Resumo da Avaliação

Homogeneidade de variância	
Há Homocedasticidade	$p > 0,05$
Regressão e Teste de Desvio de Linearidade	
A regressão é significativa	$p < 0,001$
Não há desvio de Linearidade	$p > 0,05$
Autocorrelação dos Resíduos ($\alpha = 0,05$)	
Não há autocorrelação	$d > dU$
Teste de Normalidade ($\alpha = 0,05$)	
Segue a Normal	$Req > Rcrit$

Estatísticas da Regressão Linear (Modelo: $Y = a + bx$)

Coefficiente Angular (b):	3,35E+06	Coefficiente Linear (a):	-5,77E+03
r	0,9999	R ²	0,9997
N	18	Graus de Liberdade	16

Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)

Limite de Detecção	1,60E-02	Limite de Quantificação	4,79E-02
--------------------	----------	-------------------------	----------

ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste)

fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	3,07E+13	3,07E+13	6,04E+04	4,75E-30
resíduos	16	8,14E+09	5,08E+08		
Ajuste	5	3,99E+09	7,98E+08	2,12E+00	1,39E-01
erro puro	11	4,15E+09	3,77E+08		
total	17	3,07E+13			

Observações

Responsável: _____ Data: ___/___/___ Verificado por: _____ Data: ___/___/___

APÊNDICE C – CURVA ANALÍTICA DEXTROBUPIVACAÍNA

 Ministério da Saúde FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde	
---	---

AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA

Dados da Curva Analítica

Análise:	Dextrobutipivacaina curva final		
Data de Confeção da Curva:	18/07/2011	Curva N°:	final
Replicatas por Nível (k):	3	N° de Níveis (n):	7
Equipamento:	HPLC 3	Responsável:	Amanda

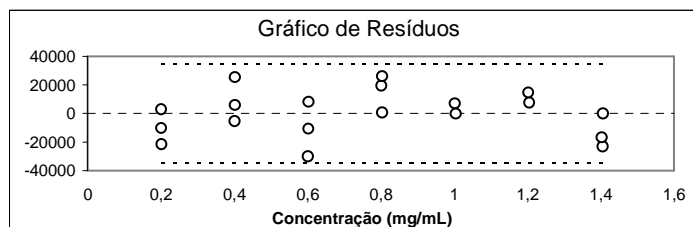
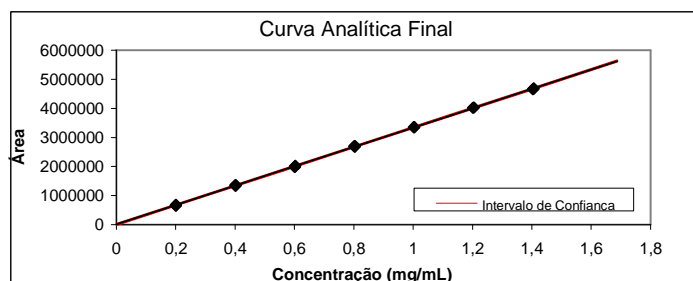
Tabela de dados originais

Nível (k)	i	Conc. mg/mL	Resposta Área
1	01	0,2008	677611
	02	0,2004	663167
	03	0,2009	653553
2	04	0,4016	1369299
	05	0,4008	1335825
	06	0,4018	1350380
3	07	0,6024	2002371
	08	0,6011	1978632
	09	0,6028	2022524
4	10	0,8032	2682764
	11	0,8015	2695929
	12	0,8037	2709898
5	13	1,004	3387345
	14	1,0019	3351344
	15	1,0046	3353080
6	16	1,2048	4028021
	17	1,2023	4026646
	18	1,2055	4122215
7	19	1,4056	4666496
	20	1,4027	4663161
	21	1,4064	4692229

Avaliação de Valores Extremos

(Teste de Jack-Knife para avaliação de valores extremos)

Os dados da tabela marcados em vermelho foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores extremos (outliers). Estes dados não serão considerados na avaliação das premissas.



Normalidade dos Resíduos

(Teste de Ryan-Joiner)

Req	0,99
Rcrit ($\alpha = 0,05$)	0,95

Autocorrelação dos Resíduos

(Teste de Durbin-Watson)

d (calculado)	1,84
dL (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$	1,18
dU (Limite Superior) $\alpha = 0,05$	1,40

Estatísticas da Regressão Linear (Modelo: $Y = a + bx$)

Coefficiente Angular (b):	3,33E+06	Coefficiente Linear (a):	5,63E+03
r	0,9999	R ²	0,9999
N	19	Graus de Liberdade	17

Homogeneidade da Variância dos Resíduos

(Teste de Brown-Forsythe)

Variância Combinada	2,68E+08
t _L calculado	4,97E-01
t _{tabelado} ($\alpha = 0,05$)	2,11E+00
p	6,26E-01

Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)

Limite de Detecção	1,15E-02	Limite de Quantificação	3,46E-02
--------------------	----------	-------------------------	----------

ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste)

fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	3,51E+13	3,51E+13	1,31E+05	1,75E-34
resíduos	17	4,56E+09	2,68E+08		
Ajuste	5	1,86E+09	3,72E+08	1,65E+00	2,20E-01
erro puro	12	2,70E+09	2,25E+08		
total	18	3,51E+13			

Resumo da Avaliação

Homogeneidade de variância	
Há Homocedasticidade	$p > 0,05$
Regressão e Teste de Desvio de Linearidade	
A regressão é significativa	$p < 0,001$
Não há desvio de Linearidade	$p > 0,05$
Autocorrelação dos Resíduos ($\alpha = 0,05$)	
Não há autocorrelação	$d > dU$
Teste de Normalidade ($\alpha = 0,05$)	
Segue a Normal	$Req > Rcrit$

Observações

Responsável: _____ Data: ___/___/___ Verificado por: _____ Data: ___/___/___

APÊNDICE D – CURVA MATRIZ PRODUTO 1 - LEVOBUPIVACAÍNA

	Ministério da Saúde FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde	
---	---	---

AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA

Dados da Curva Analítica

Análise:	Produto 1 (sinal de levobupivacaína)		
Data de Confeção da Curva:	17/10/2011	Curva N°:	1
Replicatas por Nível (k):	3	N° de Níveis (n):	7
Equipamento:	HPLC 3	Responsável:	Amanda

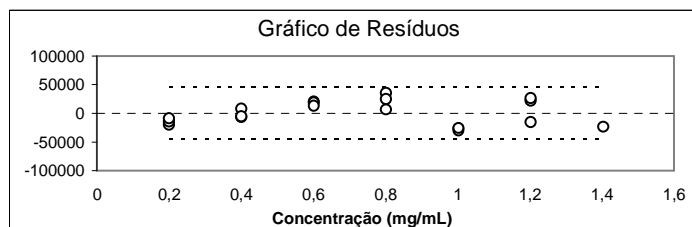
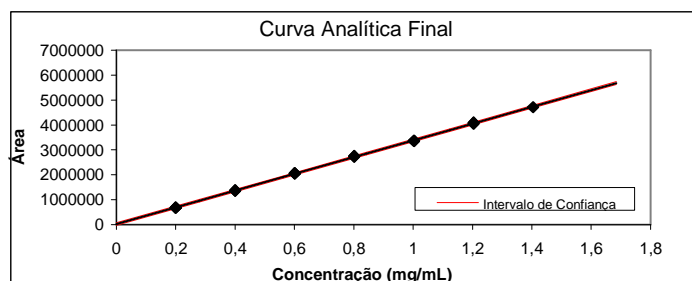
Tabela de dados originais

Nível (k)	i	Conc. mg/mL	Resposta Área
1	01	0,2	670206
	02	0,2	675911
	03	0,2	681375
2	04	0,4006	1372815
	05	0,4006	1358243
	06	0,4006	1359433
3	07	0,6013	2060504
	08	0,6013	2059011
	09	0,6013	2053192
4	10	0,8019	2721546
	11	0,8019	2750365
	12	0,8019	2739741
5	13	1,0026	3363670
	14	1,0026	3360322
	15	1,0026	3364511
6	16	1,2032	4087264
	17	1,2032	4049596
	18	1,2032	4091258
7	19	1,4038	4806896
	20	1,4038	4814712
	21	1,4038	4716413

Avaliação de Valores Extremos

(Teste de Jack-Knife para avaliação de valores extremos)

Os dados da tabela marcados em vermelho foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores extremos (outliers). Estes dados não serão considerados na avaliação das premissas.



Normalidade dos Resíduos

(Teste de Ryan-Joiner)

Req	0,97
Rcrit ($\alpha = 0,05$)	0,95

Autocorrelação dos Resíduos

(Teste de Durbin-Watson)

d (calculado)	1,63
dL (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$	1,18
dU (Limite Superior) $\alpha = 0,05$	1,40

Estatísticas da Regressão Linear (Modelo: $Y = a + bX$)

Coefficiente Angular (b):	3,36E+06	Coefficiente Linear (a):	1,73E+04
r	0,9999	R ²	0,9997
N	19	Graus de Liberdade	17

Homogeneidade da Variância dos Resíduos

(Teste de Brown-Forsythe)

Variância Combinada	4,67E+08
t _L calculado	-2,30E-01
t _{tabelado} ($\alpha = 0,05$)	2,11E+00
p	8,20E-01

Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)

Limite de Detecção	1,52E-02	Limite de Quantificação	4,54E-02
--------------------	----------	-------------------------	----------

Resumo da Avaliação

Homogeneidade de variância	
Há Homocedasticidade	$p > 0,05$
Regressão e Teste de Desvio de Linearidade	
A regressão é significativa	$p < 0,001$
Há desvio de linearidade	$p < 0,05$
Autocorrelação dos Resíduos ($\alpha = 0,05$)	
Não há autocorrelação	$d > dU$
Teste de Normalidade ($\alpha = 0,05$)	
Segue a Normal	$Req > Rcrit$

ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste)

fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	2,92E+13	2,92E+13	6,30E+04	8,81E-32
resíduos	17	7,88E+09	4,64E+08		
Ajuste	5	6,17E+09	1,23E+09	8,63E+00	1,14E-03
erro puro	12	1,71E+09	1,43E+08		
total	18	2,92E+13			

Observações

Responsável: _____ Data: ___/___/___ Verificado por: _____ Data: ___/___/___

APÊNDICE E – CURVA MATRIZ PRODUTO 2 - LEVOBUPIVACAÍNA

	Ministério da Saúde FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde	
---	---	---

AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA

Dados da Curva Analítica

Análise:	Produto 2 (sinal de levobupivacaína)		
Data de Confeção da Curva:	28/09/2011	Curva N°:	1
Replicatas por Nível (k):	3	N° de Níveis (n):	7
Equipamento:	HPLC 3	Responsável:	Amanda

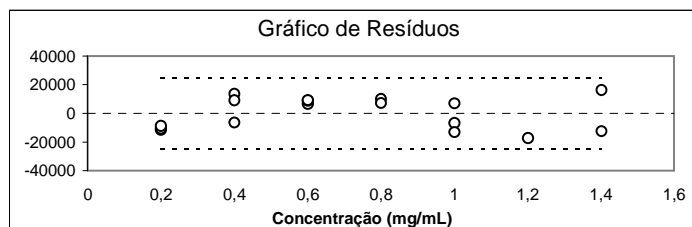
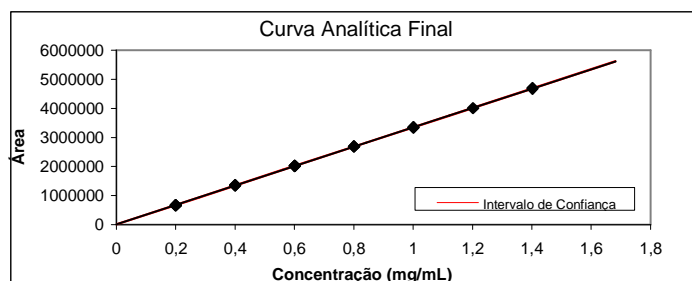
Tabela de dados originais

Nível (k)	i	Conc. mg/mL	Resposta Área
1	01	0,2	664576
	02	0,2	665645
	03	0,2	667333
2	04	0,4	1357047
	05	0,4	1352561
	06	0,4	1337086
3	07	0,601	2020756
	08	0,601	2022996
	09	0,601	2023347
4	10	0,801	2691353
	11	0,801	2688503
	12	0,801	2710836
5	13	1,001	3341819
	14	1,001	3355725
	15	1,001	3335499
6	16	1,202	4002014
	17	1,202	3987683
	18	1,202	3967672
7	19	1,402	4702775
	20	1,402	4674079
	21	1,402	4626766

Avaliação de Valores Extremos

(Teste de Jack-Knife para avaliação de valores extremos)

Os dados da tabela marcados em vermelho foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores extremos (outliers). Estes dados não serão considerados na avaliação das premissas.



Normalidade dos Resíduos

(Teste de Ryan-Joiner)

Req	0,95
Rcrit ($\alpha = 0,05$)	0,94

Autocorrelação dos Resíduos

(Teste de Durbin-Watson)

d (calculado)	1,88
dL (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$	1,13
dU (Limite Superior) $\alpha = 0,05$	1,38

Estatísticas da Regressão Linear (Modelo: $Y = a + bx$)

Coefficiente Angular (b):	3,34E+06	Coefficiente Linear (a):	8,97E+03
r	1,0000	R ²	0,9999
N	17	Graus de Liberdade	15

Homogeneidade da Variância dos Resíduos

(Teste de Brown-Forsythe)

Variância Combinada	1,50E+08
t _L calculado	-4,32E-01
t _{tabelado} ($\alpha = 0,05$)	2,13E+00
p	6,72E-01

Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)

Limite de Detecção	8,23E-03	Limite de Quantificação	2,47E-02
--------------------	----------	-------------------------	----------

ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste)

fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	2,86E+13	2,86E+13	2,17E+05	1,26E-32
resíduos	15	1,98E+09	1,32E+08		
Ajuste	5	1,12E+09	2,24E+08	2,62E+00	9,17E-02
erro puro	10	8,57E+08	8,57E+07		
total	16	2,86E+13			

Resumo da Avaliação

Homogeneidade de variância	
Há Homocedasticidade	$p > 0,05$
Regressão e Teste de Desvio de Linearidade	
A regressão é significativa	$p < 0,001$
Não há desvio de Linearidade	$p > 0,05$
Autocorrelação dos Resíduos ($\alpha = 0,05$)	
Não há autocorrelação	$d > dU$
Teste de Normalidade ($\alpha = 0,05$)	
Segue a Normal	$Req > Rcrit$

Observações

Responsável: _____ Data: ___/___/___ Verificado por: _____ Data: ___/___/___

APÊNDICE F – CURVA MATRIZ PRODUTO 3 - LEVOBUPIVACAÍNA

	Ministério da Saúde FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde	
---	---	---

AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA

Dados da Curva Analítica

Análise:	Produto 3 (sinal de levobupivacaína)		
Data de Confeção da Curva:	30/09/2011	Curva N°:	1
Replicatas por Nível (k):	3	N° de Níveis (n):	7
Equipamento:	HPLC 3	Responsável:	Amanda

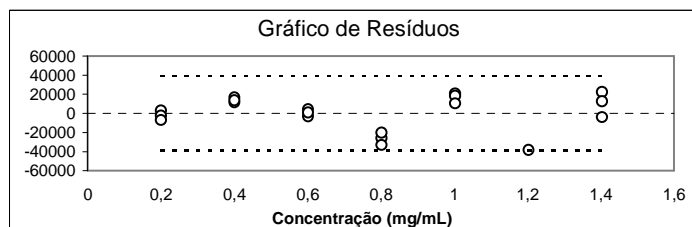
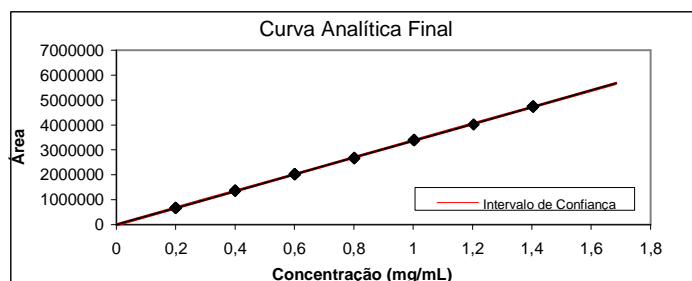
Tabela de dados originais

Nível (k)	i	Conc. mg/mL	Resposta Área
1	01	0,2	672585
	02	0,2	666990
	03	0,2	662388
2	04	0,4006	1358207
	05	0,4006	1363261
	06	0,4006	1360097
3	07	0,6013	2028424
	08	0,6013	2020735
	09	0,6013	2025003
4	10	0,8019	2675334
	11	0,8019	2680920
	12	0,8019	2668132
5	13	1,0026	3399517
	14	1,0026	3396858
	15	1,0026	3389058
6	16	1,2032	4005416
	17	1,2032	4017532
	18	1,2032	4011051
7	19	1,4038	4728854
	20	1,4038	4755227
	21	1,4038	4745406

Avaliação de Valores Extremos

(Teste de Jack-Knife para avaliação de valores extremos)

Os dados da tabela marcados em vermelho foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores extremos (outliers). Estes dados não serão considerados na avaliação das premissas.



Normalidade dos Resíduos

(Teste de Ryan-Joiner)

Req	0,96
Rcrit ($\alpha = 0,05$)	0,95

Autocorrelação dos Resíduos

(Teste de Durbin-Watson)

d (calculado)	1,50
dL (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$	1,18
dU (Limite Superior) $\alpha = 0,05$	1,40

Estatísticas da Regressão Linear (Modelo: $Y = a + bX$)

Coefficiente Angular (b):	3,38E+06	Coefficiente Linear (a):	-5,58E+03
r	0,9999	R ²	0,9998
N	19	Graus de Liberdade	17

Homogeneidade da Variância dos Resíduos

(Teste de Brown-Forsythe)

Variância Combinada	3,44E+08
t _L calculado	-1,67E-01
t _{tabelado} ($\alpha = 0,05$)	2,11E+00
p	8,69E-01

Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)

Limite de Detecção	1,30E-02	Limite de Quantificação	3,88E-02
--------------------	----------	-------------------------	----------

ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste)

fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	3,45E+13	3,45E+13	9,98E+04	1,76E-33
resíduos	17	5,87E+09	3,45E+08		
Ajuste	5	5,28E+09	1,06E+09	2,14E+01	1,34E-05
erro puro	12	5,91E+08	4,93E+07		
total	18	3,45E+13			

Resumo da Avaliação

Homogeneidade de variância	
Há Homocedasticidade	$p > 0,05$
Regressão e Teste de Desvio de Linearidade	
A regressão é significativa	$p < 0,001$
Há desvio de linearidade	$p < 0,05$
Autocorrelação dos Resíduos ($\alpha = 0,05$)	
Não há autocorrelação	$d > dU$
Teste de Normalidade ($\alpha = 0,05$)	
Segue a Normal	$Req > Rcrit$

Observações

--

Responsável: _____ Data: ___/___/___ Verificado por: _____ Data: ___/___/___

APÊNDICE G – CURVA MATRIZ PRODUTO 4 - LEVOBUPIVACAÍNA

	Ministério da Saúde FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde	
---	---	---

AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA

Dados da Curva Analítica

Análise:	Produto 4 (sinal de levobupivacaína)		
Data de Confeção da Curva:	03/10/2011	Curva N°:	1
Replicatas por Nível (k):	3	N° de Níveis (n):	7
Equipamento:	HPLC 3	Responsável:	Amanda

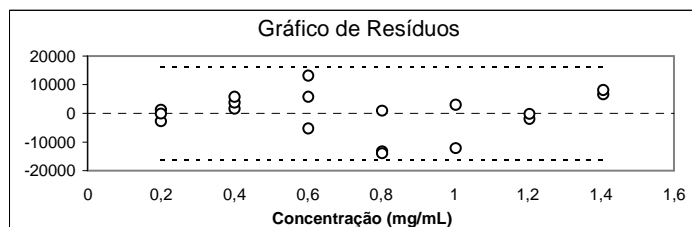
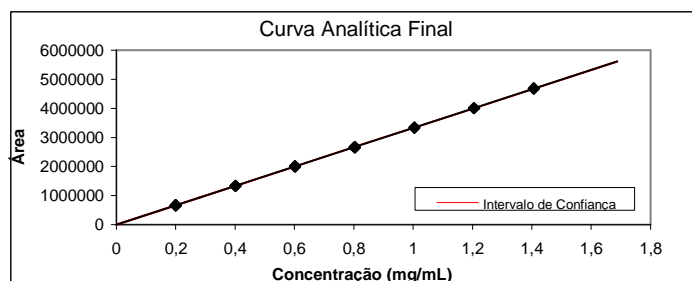
Tabela de dados originais

Nível (k)	i	Conc. mg/mL	Resposta Área
1	01	0,2	658027
	02	0,2	662029
	03	0,2	660673
2	04	0,4011	1332104
	05	0,4011	1334195
	06	0,4011	1336187
3	07	0,6022	2013355
	08	0,6022	2005890
	09	0,6022	1994948
4	10	0,8033	2656631
	11	0,8033	2670776
	12	0,8033	2655955
5	13	1,0044	3317583
	14	1,0044	3342563
	15	1,0044	3327397
6	16	1,2055	3989204
	17	1,2055	4007400
	18	1,2055	4009078
7	19	1,4066	4702450
	20	1,4066	4685594
	21	1,4066	4687146

Avaliação de Valores Extremos

(Teste de Jack-Knife para avaliação de valores extremos)

Os dados da tabela marcados em vermelho foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores extremos (outliers). Estes dados não serão considerados na avaliação das premissas.



Normalidade dos Resíduos

(Teste de Ryan-Joiner)

Req	0,97
Rcrit ($\alpha = 0,05$)	0,95

Autocorrelação dos Resíduos

(Teste de Durbin-Watson)

d (calculado)	1,52
dL (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$	1,16
dU (Limite Superior) $\alpha = 0,05$	1,39

Homogeneidade da Variância dos Resíduos

(Teste de Brown-Forsythe)

Variância Combinada	5,45E+07
t_L calculado	-7,90E-01
$t_{\text{tabelado}} (\alpha = 0,05)$	2,12E+00
p	4,41E-01

Resumo da Avaliação

Homogeneidade de variância	
Há Homocedasticidade	$p > 0,05$
Regressão e Teste de Desvio de Linearidade	
A regressão é significativa	$p < 0,001$
Não há desvio de Linearidade	$p > 0,05$
Autocorrelação dos Resíduos ($\alpha = 0,05$)	
Não há autocorrelação	$d > dU$
Teste de Normalidade ($\alpha = 0,05$)	
Segue a Normal	$Req > Rcrit$

Estatísticas da Regressão Linear (Modelo: $Y = a + bx$)

Coefficiente Angular (b):	3,33E+06	Coefficiente Linear (a):	-5,25E+03
r	1,0000	R ²	1,0000
N	18	Graus de Liberdade	16

Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)

Limite de Detecção	5,44E-03	Limite de Quantificação	1,63E-02
--------------------	----------	-------------------------	----------

ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste)

fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	3,05E+13	3,05E+13	5,23E+05	1,51E-37
resíduos	16	9,33E+08	5,83E+07		
Ajuste	5	4,88E+08	9,75E+07	2,41E+00	1,04E-01
erro puro	11	4,46E+08	4,05E+07		
total	17	3,05E+13			

Observações

Responsável: _____ Data: ___/___/___ Verificado por: _____ Data: ___/___/___

APÊNDICE H – CURVA MATRIZ PRODUTO 5 - LEVOBUPIVACAÍNA

 Ministério da Saúde FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde	 INCQS
---	---

AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA

Dados da Curva Analítica

Análise:	Produto 5 (sinal de levobupivacaína)		
Data de Confeção da Curva:	10/10/2011	Curva N°:	1
Replicatas por Nível (k):	3	N° de Níveis (n):	7
Equipamento:	HPLC 3	Responsável:	Amanda

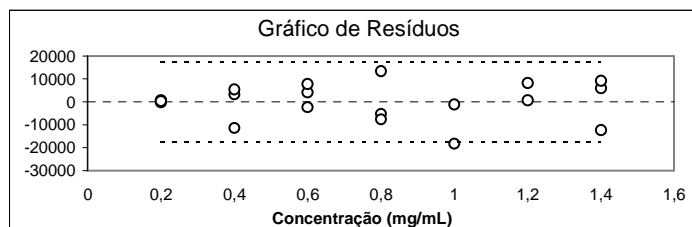
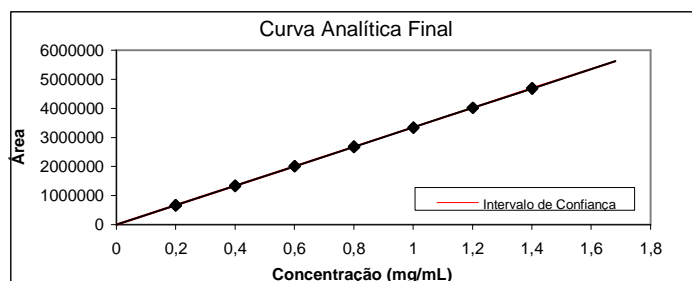
Tabela de dados originais

Nível (k)	i	Conc. mg/mL	Resposta Área
1	01	0,2	664739
	02	0,2	665658
	03	0,2	665203
2	04	0,4002	1338819
	05	0,4002	1340903
	06	0,4002	1324187
3	07	0,6004	2010250
	08	0,6004	2003862
	09	0,6004	2013994
4	10	0,8005	2671220
	11	0,8005	2689900
	12	0,8005	2668850
5	13	1,0007	3346030
	14	1,0007	3328944
	15	1,0007	3273706
6	16	1,2009	4018447
	17	1,2009	3943329
	18	1,2009	4026018
7	19	1,4011	4694370
	20	1,4011	4697565
	21	1,4011	4676133

Avaliação de Valores Extremos

(Teste de Jack-Knife para avaliação de valores extremos)

Os dados da tabela marcados em vermelho foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores extremos (outliers). Estes dados não serão considerados na avaliação das premissas.



Normalidade dos Resíduos

(Teste de Ryan-Joiner)

Req	0,98
Rcrit ($\alpha = 0,05$)	0,95

Autocorrelação dos Resíduos

(Teste de Durbin-Watson)

d (calculado)	2,41
dL (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$	1,18
dU (Limite Superior) $\alpha = 0,05$	1,40

Estatísticas da Regressão Linear (Modelo: $Y = a + bx$)

Coefficiente Angular (b):	3,35E+06	Coefficiente Linear (a):	-5,05E+03
r	1,0000	R ²	1,0000
N	19	Graus de Liberdade	17

Homogeneidade da Variância dos Resíduos

(Teste de Brown-Forsythe)

Variância Combinada	7,04E+07
t _L calculado	-6,89E-01
t _{tabelado} ($\alpha = 0,05$)	2,11E+00
p	5,00E-01

Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)

Limite de Detecção	5,87E-03	Limite de Quantificação	1,76E-02
--------------------	----------	-------------------------	----------

ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste)

fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	3,53E+13	3,53E+13	5,05E+05	1,82E-39
resíduos	17	1,19E+09	6,99E+07		
Ajuste	5	2,62E+08	5,23E+07	6,78E-01	6,49E-01
erro puro	12	9,27E+08	7,72E+07		
total	18	3,53E+13			

Resumo da Avaliação

Homogeneidade de variância	
Há Homocedasticidade	$p > 0,05$
Regressão e Teste de Desvio de Linearidade	
A regressão é significativa	$p < 0,001$
Não há desvio de Linearidade	$p > 0,05$
Autocorrelação dos Resíduos ($\alpha = 0,05$)	
Não há autocorrelação	$d > dU$
Teste de Normalidade ($\alpha = 0,05$)	
Segue a Normal	$Req > Rcrit$

Observações

Responsável: _____ Data: ___/___/___ Verificado por: _____ Data: ___/___/___

APÊNDICE I – CURVA MATRIZ PRODUTO 1 - DEXTROBUPIVACAÍNA

	Ministério da Saúde FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde	
---	---	---

AValiação DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA

Dados da Curva Analítica

Análise:	Produto 1 (sinal de dextrobupivacaína)		
Data de Confeção da Curva:	27/09/2011	Curva N°:	1
Replicatas por Nível (k):	3	N° de Níveis (n):	7
Equipamento:	HPLC 3	Responsável:	Amanda

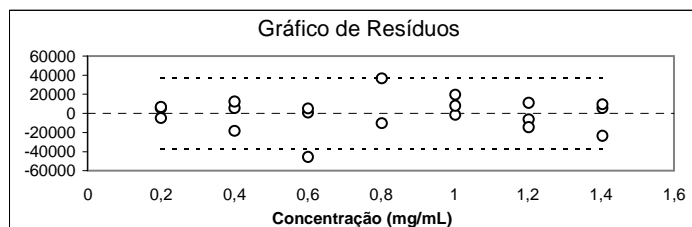
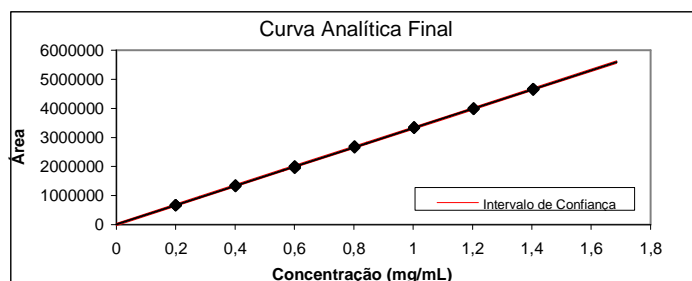
Tabela de dados originais

Nível (k)	i	Conc. mg/mL	Resposta Área
1	01	0,2	662568
	02	0,2	673067
	03	0,2	674074
2	04	0,4008	1339054
	05	0,4008	1315048
	06	0,4008	1345608
3	07	0,6016	1999934
	08	0,6016	2004171
	09	0,6016	1953480
4	10	0,8024	2654563
	11	0,8024	2701594
	12	0,8024	2736232
5	13	1,0032	3350407
	14	1,0032	3329035
	15	1,0032	3338752
6	16	1,204	3990226
	17	1,204	3982165
	18	1,204	4007608
7	19	1,4048	4638782
	20	1,4048	4668102
	21	1,4048	4671782

Avaliação de Valores Extremos

(Teste de Jack-Knife para avaliação de valores extremos)

Os dados da tabela marcados em vermelho foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores extremos (outliers). Estes dados não serão considerados na avaliação das premissas.



Normalidade dos Resíduos

(Teste de Ryan-Joiner)

Req	0,96
Rcrit ($\alpha = 0,05$)	0,95

Autocorrelação dos Resíduos

(Teste de Durbin-Watson)

d (calculado)	2,05
dL (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$	1,20
dU (Limite Superior) $\alpha = 0,05$	1,41

Estatísticas da Regressão Linear (Modelo: $Y = a + bx$)

Coefficiente Angular (b):	3,32E+06	Coefficiente Linear (a):	4,41E+03
r	0,9999	R ²	0,9998
N	20	Graus de Liberdade	18

Homogeneidade da Variância dos Resíduos

(Teste de Brown-Forsythe)

Variância Combinada	3,46E+08
t _L calculado	3,28E-01
t _{tabelado} ($\alpha = 0,05$)	2,10E+00
p	7,47E-01

Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)

Limite de Detecção	1,25E-02	Limite de Quantificação	3,75E-02
--------------------	----------	-------------------------	----------

ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste)

fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	3,72E+13	3,72E+13	1,18E+05	8,25E-36
resíduos	18	5,68E+09	3,15E+08		
Ajuste	5	1,17E+09	2,34E+08	6,75E-01	6,50E-01
erro puro	13	4,51E+09	3,47E+08		
total	19	3,72E+13			

Resumo da Avaliação

Homogeneidade de variância	
Há Homocedasticidade	$p > 0,05$
Regressão e Teste de Desvio de Linearidade	
A regressão é significativa	$p < 0,001$
Não há desvio de Linearidade	$p > 0,05$
Autocorrelação dos Resíduos ($\alpha = 0,05$)	
Não há autocorrelação	$d > dU$
Teste de Normalidade ($\alpha = 0,05$)	
Segue a Normal	$Req > Rcrit$

Observações

Responsável: _____ Data: ___/___/___ Verificado por: _____ Data: ___/___/___

APÊNDICE J – CURVA MATRIZ PRODUTO 2 - DEXTROBUPIVACAÍNA

 Ministério da Saúde FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde	 INCQS
---	---

AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA

Dados da Curva Analítica

Análise:	Produto 2 (sinal de dextrobutipivacaína)		
Data de Confeção da Curva:	13/10/2011	Curva N°:	1
Replicatas por Nível (k):	3	N° de Níveis (n):	7
Equipamento:	HPLC 3	Responsável:	Amanda

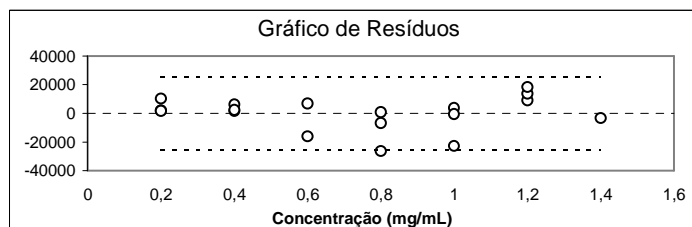
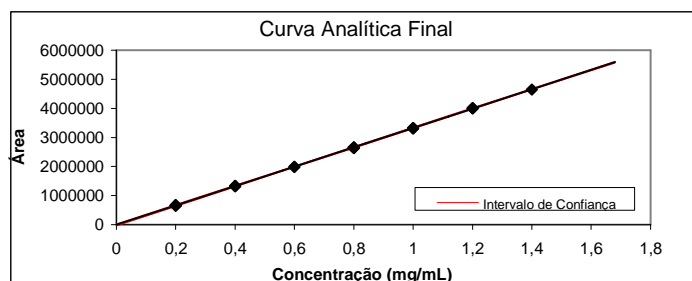
Tabela de dados originais

Nível (k)	i	Conc. mg/mL	Resposta Área
1	01	0,2	657756
	02	0,2	665955
	03	0,2	657357
2	04	0,4	1324442
	05	0,4	1328831
	06	0,4	1325092
3	07	0,6	1996631
	08	0,6	1943882
	09	0,6	1973779
4	10	0,8	2630458
	11	0,8	2650011
	12	0,8	2657586
5	13	1	3327706
	14	1	3323335
	15	1	3301180
6	16	1,2	3999936
	17	1,2	4004626
	18	1,2	4009237
7	19	1,4	4719946
	20	1,4	4654717
	21	1,4	4356507

Avaliação de Valores Extremos

(Teste de Jack-Knife para avaliação de valores extremos)

Os dados da tabela marcados em vermelho foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores extremos (outliers). Estes dados não serão considerados na avaliação das premissas.



Normalidade dos Resíduos

(Teste de Ryan-Joiner)

Req	0,95
Rcrit ($\alpha = 0,05$)	0,95

Autocorrelação dos Resíduos

(Teste de Durbin-Watson)

d (calculado)	1,40
dL (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$	1,16
dU (Limite Superior) $\alpha = 0,05$	1,39

Estatísticas da Regressão Linear (Modelo: $Y = a + bx$)

Coefficiente Angular (b):	3,34E+06	Coefficiente Linear (a):	-1,13E+04
r	1,0000	R ²	0,9999
N	18	Graus de Liberdade	16

Homogeneidade da Variância dos Resíduos

(Teste de Brown-Forsythe)

Variância Combinada	1,50E+08
t _L calculado	-4,86E-01
t _{tabelado} ($\alpha = 0,05$)	2,12E+00
p	6,33E-01

Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)

Limite de Detecção	8,69E-03	Limite de Quantificação	2,60E-02
--------------------	----------	-------------------------	----------

ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste)

fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	2,83E+13	2,83E+13	1,93E+05	4,41E-34
resíduos	16	2,35E+09	1,47E+08		
Ajuste	5	1,19E+09	2,38E+08	2,26E+00	1,21E-01
erro puro	11	1,16E+09	1,05E+08		
total	17	2,83E+13			

Resumo da Avaliação

Homogeneidade de variância	
Há Homocedasticidade	$p > 0,05$
Regressão e Teste de Desvio de Linearidade	
A regressão é significativa	$p < 0,001$
Não há desvio de Linearidade	$p > 0,05$
Autocorrelação dos Resíduos ($\alpha = 0,05$)	
Não há autocorrelação	$d > dU$
Teste de Normalidade ($\alpha = 0,05$)	
Segue a Normal	$Req > Rcrit$

Observações

Responsável: _____ Data: ___/___/___ Verificado por: _____ Data: ___/___/___

APÊNDICE K – CURVA MATRIZ PRODUTO 3 - DEXTROBUPIVACAÍNA

 Ministério da Saúde FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde	
---	---

AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA

Dados da Curva Analítica

Análise:	Produto 3 (sinal de dextrobupivacaína)		
Data de Confeção da Curva:	07/10/2011	Curva N°:	1
Replicatas por Nível (k):	3	N° de Níveis (n):	7
Equipamento:	HPLC 3	Responsável:	Amanda

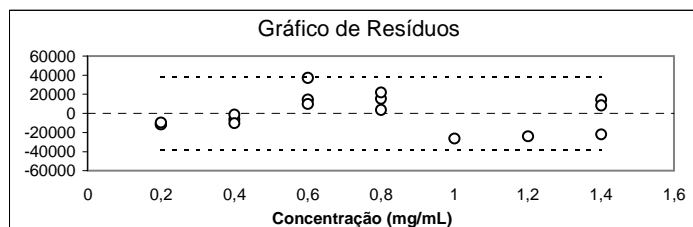
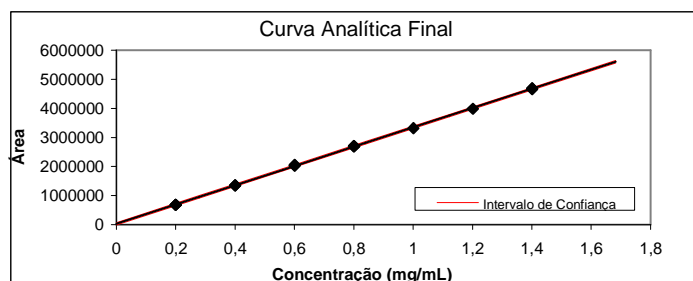
Tabela de dados originais

Nível (k)	i	Conc. mg/mL	Resposta Área
1	01	0,2	678921
	02	0,2	678235
	03	0,2	680417
2	04	0,4003	1348015
	05	0,4003	1353375
	06	0,4003	1344171
3	07	0,6006	2056345
	08	0,6006	2033676
	09	0,6006	2029008
4	10	0,8008	2687161
	11	0,8008	2698749
	12	0,8008	2705465
5	13	1,0011	3322008
	14	1,0011	3213337
	15	1,0011	3170698
6	16	1,2014	3989025
	17	1,2014	3933656
	18	1,2014	3958230
7	19	1,4017	4655697
	20	1,4017	4691974
	21	1,4017	4685804

Avaliação de Valores Extremos

(Teste de Jack-Knife para avaliação de valores extremos)

Os dados da tabela marcados em vermelho foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores extremos (outliers). Estes dados não serão considerados na avaliação das premissas.



Normalidade dos Resíduos

(Teste de Ryan-Joiner)

Req	0,98
Rcrit ($\alpha = 0,05$)	0,94

Autocorrelação dos Resíduos

(Teste de Durbin-Watson)

d (calculado)	1,39
dL (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$	1,13
dU (Limite Superior) $\alpha = 0,05$	1,38

Homogeneidade da Variância dos Resíduos

(Teste de Brown-Forsythe)

Variância Combinada	3,89E+08
t_L calculado	-4,81E-01
t_{tabela} ($\alpha = 0,05$)	2,13E+00
p	6,37E-01

Resumo da Avaliação

Homogeneidade de variância	
Há Homocedasticidade	$p > 0,05$
Regressão e Teste de Desvio de Linearidade	
A regressão é significativa	$p < 0,001$
Há desvio de linearidade	$p < 0,05$
Autocorrelação dos Resíduos ($\alpha = 0,05$)	
Não há autocorrelação	$d > dU$
Teste de Normalidade ($\alpha = 0,05$)	
Segue a Normal	$Req > Rcrit$

Estatísticas da Regressão Linear (Modelo: $Y = a + bx$)

Coefficiente Angular (b):	3,32E+06	Coefficiente Linear (a):	2,63E+04
r	0,9999	R ²	0,9998
N	17	Graus de Liberdade	15

Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)

Limite de Detecção	1,30E-02	Limite de Quantificação	3,88E-02
--------------------	----------	-------------------------	----------

ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste)

fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	3,18E+13	3,18E+13	9,69E+04	5,36E-30
resíduos	15	4,91E+09	3,28E+08		
Ajuste	5	3,52E+09	7,03E+08	5,03E+00	1,46E-02
erro puro	10	1,40E+09	1,40E+08		
total	16	3,18E+13			

Observações

Responsável: _____ Data: ___/___/___ Verificado por: _____ Data: ___/___/___

APÊNDICE L – CURVA MATRIZ PRODUTO 4 - DEXTROBUPIVACAÍNA

	Ministério da Saúde FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde	
---	---	---

AValiação DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA

Dados da Curva Analítica

Análise:	Produto 4 (sinal de dextrobutipivacaína)		
Data de Confeção da Curva:	05/10/2011	Curva N°:	1
Replicatas por Nível (k):	3	N° de Níveis (n):	7
Equipamento:	HPLC 3	Responsável:	Amanda

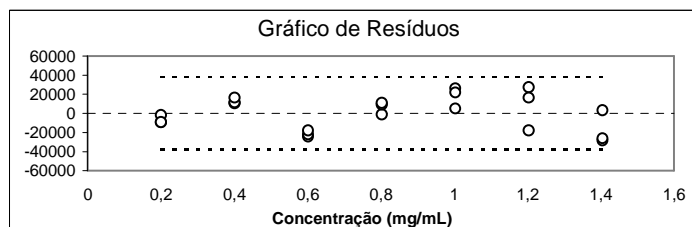
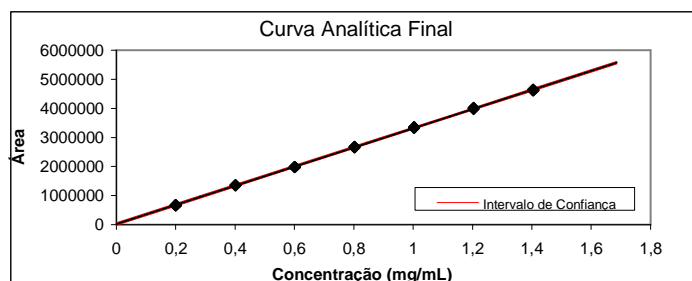
Tabela de dados originais

Nível (k)	i	Conc. mg/mL	Resposta Área
1	01	0,2	665180
	02	0,2	672670
	03	0,2	665316
2	04	0,4008	1347275
	05	0,4008	1348405
	06	0,4008	1353246
3	07	0,6016	1974717
	08	0,6016	1977145
	09	0,6016	1981254
4	10	0,8024	2660438
	11	0,8024	2670625
	12	0,8024	2672532
5	13	1,0032	3350126
	14	1,0032	3328839
	15	1,0032	3345661
6	16	1,204	3968196
	17	1,204	4013393
	18	1,204	4002501
7	19	1,4048	4620252
	20	1,4048	4651662
	21	1,4048	4622204

Avaliação de Valores Extremos

(Teste de Jack-Knife para avaliação de valores extremos)

Os dados da tabela marcados em vermelho foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores extremos (outliers). Estes dados não serão considerados na avaliação das premissas.



Normalidade dos Resíduos

(Teste de Ryan-Joiner)

Req	0,98
Rcrit ($\alpha = 0,05$)	0,95

Autocorrelação dos Resíduos

(Teste de Durbin-Watson)

d (calculado)	1,77
dL (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$	1,22
dU (Limite Superior) $\alpha = 0,05$	1,42

Homogeneidade da Variância dos Resíduos

(Teste de Brown-Forsythe)

Variância Combinada	3,27E+08
t_L calculado	-7,55E-01
$t_{\text{tabelado}} (\alpha = 0,05)$	2,09E+00
p	4,59E-01

Resumo da Avaliação

Homogeneidade de variância	
Há Homocedasticidade	$p > 0,05$
Regressão e Teste de Desvio de Linearidade	
A regressão é significativa	$p < 0,001$
Há desvio de linearidade	$p < 0,05$
Autocorrelação dos Resíduos ($\alpha = 0,05$)	
Não há autocorrelação	$d > dU$
Teste de Normalidade ($\alpha = 0,05$)	
Segue a Normal	$Req > Rcrit$

Estatísticas da Regressão Linear (Modelo: $Y = a + bx$)

Coefficiente Angular (b):	3,30E+06	Coefficiente Linear (a):	1,49E+04
r	0,9999	R ²	0,9998
N	21	Graus de Liberdade	19

Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)

Limite de Detecção	1,29E-02	Limite de Quantificação	3,86E-02
--------------------	----------	-------------------------	----------

ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste)

fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	3,68E+13	3,68E+13	1,11E+05	3,03E-37
resíduos	19	6,32E+09	3,33E+08		
Ajuste	5	4,17E+09	8,34E+08	5,44E+00	5,49E-03
erro puro	14	2,15E+09	1,53E+08		
total	20	3,69E+13			

Observações

--

Responsável: _____ Data: ___/___/___ Verificado por: _____ Data: ___/___/___

APÊNDICE M – CURVA MATRIZ PRODUTO 5 - DEXTROBUPIVACAÍNA

	Ministério da Saúde FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde	
---	---	---

AValiação DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA

Dados da Curva Analítica

Análise:	Produto 5 (sinal de dextrobutipivacaína)		
Data de Confeção da Curva:	11/10/2011	Curva N°:	1
Replicatas por Nível (k):	3	N° de Níveis (n):	7
Equipamento:	HPLC 3	Responsável:	Amanda

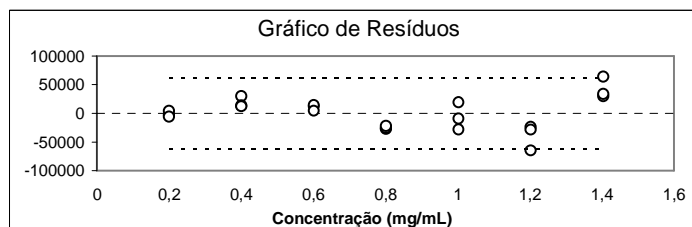
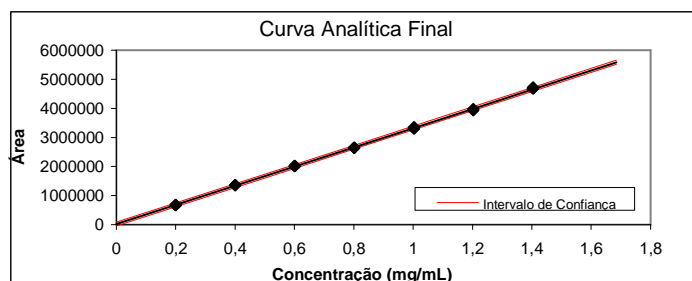
Tabela de dados originais

Nível (k)	i	Conc. mg/mL	Resposta Área
1	01	0,2	672860
	02	0,2	679577
	03	0,2	669435
2	04	0,4006	1369039
	05	0,4006	1352941
	06	0,4006	1351275
3	07	0,6012	2015195
	08	0,6012	2017258
	09	0,6012	2007631
4	10	0,8019	2639986
	11	0,8019	2641744
	12	0,8019	2645229
5	13	1,0025	3302881
	14	1,0025	3350396
	15	1,0025	3321700
6	16	1,2031	3971136
	17	1,2031	3966093
	18	1,2031	3930371
7	19	1,4037	4722671
	20	1,4037	4688585
	21	1,4037	4692410

Avaliação de Valores Extremos

(Teste de Jack-Knife para avaliação de valores extremos)

Os dados da tabela marcados em vermelho foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores extremos (outliers). Estes dados não serão considerados na avaliação das premissas.



Normalidade dos Resíduos

(Teste de Ryan-Joiner)

Req	0,98
Rcrit ($\alpha = 0,05$)	0,95

Autocorrelação dos Resíduos

(Teste de Durbin-Watson)

d (calculado)	1,53
dL (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$	1,22
dU (Limite Superior) $\alpha = 0,05$	1,42

Homogeneidade da Variância dos Resíduos

(Teste de Brown-Forsythe)

Variância Combinada	9,08E+08
t_L calculado	-1,40E+00
t_{tabela} ($\alpha = 0,05$)	2,09E+00
p	1,76E-01

Resumo da Avaliação

Homogeneidade de variância	
Há Homocedasticidade	$p > 0,05$
Regressão e Teste de Desvio de Linearidade	
A regressão é significativa	$p < 0,001$
Há desvio de linearidade	$p < 0,05$
Autocorrelação dos Resíduos ($\alpha = 0,05$)	
Não há autocorrelação	$d > dU$
Teste de Normalidade ($\alpha = 0,05$)	
Segue a Normal	$Req > Rcrit$

Estatísticas da Regressão Linear (Modelo: $Y = a + bx$)

Coefficiente Angular (b):	3,31E+06	Coefficiente Linear (a):	1,35E+04
r	0,9998	R ²	0,9996
N	21	Graus de Liberdade	19

Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)

Limite de Detecção	2,07E-02	Limite de Quantificação	6,20E-02
--------------------	----------	-------------------------	----------

ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste)

fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	3,70E+13	3,70E+13	4,28E+04	2,56E-33
resíduos	19	1,65E+10	8,66E+08		
Ajuste	5	1,33E+10	2,66E+09	1,19E+01	1,25E-04
erro puro	14	3,14E+09	2,24E+08		
total	20	3,70E+13			

Observações

Responsável: _____ Data: ___/___/___ Verificado por: _____ Data: ___/___/___

APÊNDICE N – EFEITO MATRIZ PRODUTO 1 - LEVOBUPIVACAÍNA

Efeito Matriz Produto 1 (sinal de Levobupivacaína)

Curva com Solvente

Padrão	Conc. (mg/mL) (X ₁)	Área (Y ₁)	Y ₁ est	Y ₁ -Y ₁ est	(X ₁ -X ₁ med) ²	X ₁ ²
S1	0,2015	674822	668349,5099	6472,49006	0,285607112	0,04060225
S2	0,2008	675786	666007,6569	9778,34312	0,286355793	0,04032064
S3	0,1998	656131	662662,1525	-6531,15251	0,287427037	0,03992004
S1	0,403	1340630	1342468,64	-1838,64015	0,110837206	0,162409
S2	0,4015	1354859	1337450,384	17408,6164	0,111838223	0,16120225
S3	0,3996	1343035	1331093,925	11941,0747	0,113112637	0,15968016
S1	0,6045	1984066	2016587,77	-32521,7704	0,0172718	0,36542025
S2	0,6023	2040787	2009227,661	31559,3393	0,017854898	0,36276529
S3	0,5993	2005922	1999191,148	6730,85236	0,018665632	0,35916049
S1	0,806	2657687	2690706,901	-33019,9006	0,004910895	0,649636
S2	0,803	2690132	2680670,387	9461,61254	0,004499428	0,644809
S3	0,7991	2634730	2667622,92	-32892,9204	0,003991432	0,63856081
S1						
S2	1,0038	3336159	3352447,665	-16288,6646	0,071758504	1,00761444
S3	0,9989	3303292	3336054,693	-32762,6932	0,069157312	0,99780121
S1	1,209	4046746	4038945,161	7800,83902	0,223802584	1,461681
S2						
S3	1,1987	4044719	4004486,466	40232,534	0,214163272	1,43688169
S1	1,4105	4716914	4713064,291	3849,70881	0,455055178	1,98951025
S2	1,4053	4706288	4695667,668	10620,3315	0,448066609	1,97486809
S3						

Homocedasticidade das variâncias dos resíduos (Teste F Snedecor)	
S ² res Solv	478574887
S ² res Matriz	437930386,6
GL (n ₁ +n ₂)-4	33
F _(1-α/2;GL)	2,32
Teste F	1,092810414

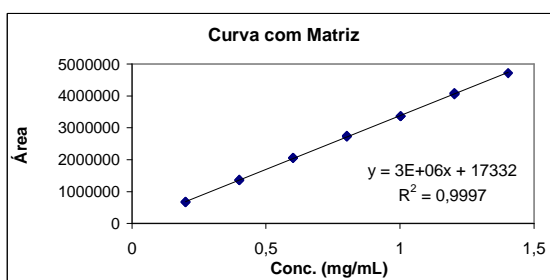
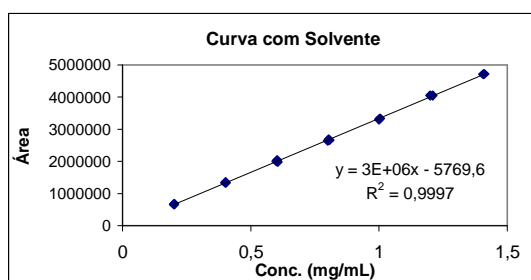
Estatísticas (Solvente)	
Inclinação	3345504,368
Interceção	-5769,62027
Sxx ₁	2,744375551
s ² res ₁	478574887
n ₁	18
ΣX ₁ ²	12,49284286
X ₁ med	0,735922222

Estatísticas (Matriz)	
Inclinação	3364028,922
Interceção	17331,77658
Sxx ₂	2,580714906
s ² res ₂	437930386,6
n ₂	19
ΣX ₂ ²	12,94460242
X ₂ med	0,738557895

Curva com Matriz

Padrão	Conc. (mg/mL) (X ₂)	Área (Y ₂)	Y ₂ est	Y ₂ -Y ₂ est	(X ₂ -X ₂ med) ²	X ₂ ²
S1	0,2	670206	690137,5609	-19931,5609	0,290044606	0,04
S2	0,2	675911	690137,5609	-14226,5609	0,290044606	0,04
S3	0,2	681375	690137,5609	-8762,56089	0,290044606	0,04
S1	0,4006	1372815	1364961,763	7853,23744	0,114215539	0,16048036
S2	0,4006	1358243	1364961,763	-6718,76256	0,114215539	0,16048036
S3	0,4006	1359433	1364961,763	-5528,76256	0,114215539	0,16048036
S1	0,6013	2060504	2040122,367	20381,6329	0,01883973	0,36156169
S2	0,6013	2059011	2040122,367	18888,6329	0,01883973	0,36156169
S3	0,6013	2053192	2040122,367	13069,6329	0,01883973	0,36156169
S1	0,8019	2721546	2714946,569	6599,4312	0,0	0,64304361
S2	0,8019	2750365	2714946,569	35418,4312	0,0	0,64304361
S3	0,8019	2739741	2714946,569	24794,4312	0,0	0,64304361
S1	1,0026	3363670	3390107,173	-26437,1734	0,069718233	1,00520676
S2	1,0026	3360322	3390107,173	-29785,1734	0,069718233	1,00520676
S3	1,0026	3364511	3390107,173	-25596,1734	0,069718233	1,00520676
S1	1,2032	4087264	4064931,375	22332,625	0,215892286	1,44769024
S2	1,2032	4049596	4064931,375	-15335,375	0,215892286	1,44769024
S3	1,2032	4091258	4064931,375	26326,625	0,215892286	1,44769024
S1						
S2						
S3	1,4038	4716413	4739755,577	-23342,5767	0,442547059	1,97065444

Avaliação	
s ² _D	457636811
t _α	0,998655183
t _β	1,502026648
GL (n ₁ +n ₂)-4	33
t _(1-α/2;GL)	2,03



APÊNDICE O – EFEITO MATRIZ PRODUTO 2 - LEVOBUPIVACAÍNA

Efeito Matriz Produto 2 (sinal de Levobupivacaína)

Curva com Solvente

Padrão	Conc. (mg/mL) (X ₁)	Área (Y ₁)	Y ₁ est	Y ₁ -Y ₁ est	(X ₁ -X ₁ med) ²	X ₁ ²
S1	0,2015	674822	668349,5099	6472,49006	0,285607112	0,04060225
S2	0,2008	675786	666007,6569	9778,34312	0,286355793	0,04032064
S3	0,1998	656131	662662,1525	-6531,15251	0,287427037	0,03992004
S1	0,403	1340630	1342468,64	-1838,64015	0,110837206	0,162409
S2	0,4015	1354859	1337450,384	17408,6164	0,111838223	0,16120225
S3	0,3996	1343035	1331093,925	11941,0747	0,113112637	0,15968016
S1	0,6045	1984066	2016587,77	-32521,7704	0,0172718	0,36542025
S2	0,6023	2040787	2009227,661	31559,3393	0,017854898	0,36276529
S3	0,5993	2005922	1999191,148	6730,85236	0,018665632	0,35916049
S1	0,806	2657687	2690706,901	-33019,9006	0,004910895	0,649636
S2	0,803	2690132	2680670,387	9461,61254	0,004499428	0,644809
S3	0,7991	2634730	2667622,92	-32892,9204	0,003991432	0,63856081
S1						
S2	1,0038	3336159	3352447,665	-16288,6646	0,071758504	1,00761444
S3	0,9989	3303292	3336054,693	-32762,6932	0,069157312	0,99780121
S1	1,209	4046746	4038945,161	7800,83902	0,223802584	1,461681
S2						
S3	1,1987	4044719	4004486,466	40232,534	0,214163272	1,43688169
S1	1,4105	4716914	4713064,291	3849,70881	0,455055178	1,98951025
S2	1,4053	4706288	4695667,668	10620,3315	0,448066609	1,97486809
S3						

Homocedasticidade das variâncias dos resíduos (Teste F Snedecor)	
S ² res Solv	478574887
S ² res Matriz	123652148,9
GL (n ₁ + n ₂) - 4	31
F _(1-α/2;GL)	2,38
Teste F	3,870332148

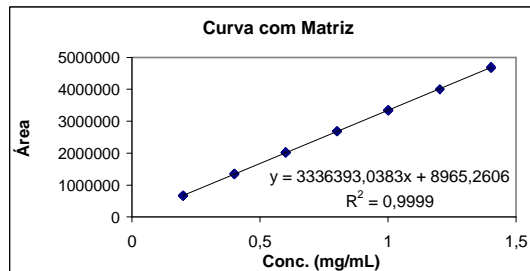
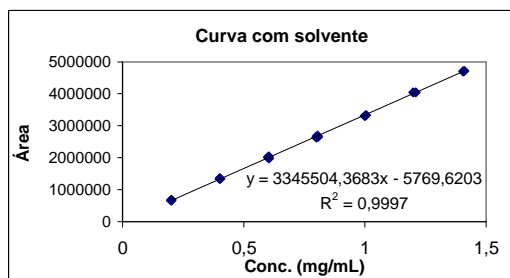
Estatísticas (Solvente)	
Inclinação	3345504,368
Interceção	-5769,62027
Sxx ₁	2,744375551
s ² res ₁	478574887
n ₁	18
ΣX ₁ ²	12,49284286
X ₁ med	0,735922222

Estatísticas (Matriz)	
Inclinação	3336393,038
Interceção	8965,26057
Sxx ₂	2,573420235
s ² res ₂	123652148,9
n ₂	17
ΣX ₂ ²	11,34882
X ₂ med	0,718470588

Curva com Matriz

Padrão	Conc. (mg/mL) (X ₂)	Área (Y ₂)	Y ₂ est	Y ₂ -Y ₂ est	(X ₂ -X ₂ med) ²	X ₂ ²
S1	0,2	664576	676243,8682	-11667,8682	0,268811751	0,04
S2	0,2	665645	676243,8682	-10598,8682	0,268811751	0,04
S3	0,2	667333	676243,8682	-8910,86824	0,268811751	0,04
S1	0,4	1357047	1343522,476	13524,5241	0,101423516	0,16
S2	0,4	1352561	1343522,476	9038,52409	0,101423516	0,16
S3	0,4	1337086	1343522,476	-6436,47591	0,101423516	0,16
S1	0,601	2020756	2014137,477	6618,52339	0,013799339	0,361201
S2	0,601	2022996	2014137,477	8858,52339	0,013799339	0,361201
S3	0,601	2023347	2014137,477	9209,52339	0,013799339	0,361201
S1	0,801	2691353	2681416,084	9936,91572	0,006811104	0,641601
S2	0,801	2688503	2681416,084	7086,91572	0,006811104	0,641601
S3						
S1	1,001	3341819	3348694,692	-6875,69195	0,079822869	1,002001
S2	1,001	3355725	3348694,692	7030,30805	0,079822869	1,002001
S3	1,001	3335499	3348694,692	-13195,692	0,079822869	1,002001
S1	1,202	4002014	4019309,693	-17295,6927	0,233800692	1,444804
S2						
S3						
S1	1,402	4702775	4686588,3	16186,6997	0,467212457	1,965604
S2	1,402	4674079	4686588,3	-12509,3003	0,467212457	1,965604
S3						

Avaliação	
s ² _D	306838078,2
t _α	0,610916081
t _β	1,190826192
GL (n ₁ + n ₂) - 4	24,03323351
t _(1-α/2;GL)	2,06



APÊNDICE P – EFEITO MATRIZ PRODUTO 3 - LEVOBUPIVACAÍNA

Efeito Matriz Produto 3 (sinal de Levobupivacaína)**Curva com Solvente**

Padrão	Conc. (mg/mL) (X ₁)	Área (Y ₁)	Y ₁ est	Y ₁ -Y ₁ est	(X ₁ -X ₁ med) ²	X ₁ ²
S1	0,2015	674822	668349,5099	6472,49006	0,285607112	0,04060225
S2	0,2008	675786	666007,6569	9778,34312	0,286355793	0,04032064
S3	0,1998	656131	662662,1525	-6531,15251	0,287427037	0,03992004
S1	0,403	1340630	1342468,64	-1838,64015	0,110837206	0,162409
S2	0,4015	1354859	1337450,384	17408,6164	0,111838223	0,16120225
S3	0,3996	1343035	1331093,925	11941,0747	0,113112637	0,15968016
S1	0,6045	1984066	2016587,77	-32521,7704	0,0172718	0,36542025
S2	0,6023	2040787	2009227,661	31559,3393	0,017854898	0,36276529
S3	0,5993	2005922	1999191,148	6730,85236	0,018665632	0,35916049
S1	0,806	2657687	2690706,901	-33019,9006	0,004910895	0,649636
S2	0,803	2690132	2680670,387	9461,61254	0,004499428	0,644809
S3	0,7991	2634730	2667622,92	-32892,9204	0,003991432	0,63856081
S1						
S2	1,0038	3336159	3352447,665	-16288,6646	0,071758504	1,00761444
S3	0,9989	3303292	3336054,693	-32762,6932	0,069157312	0,99780121
S1	1,209	4046746	4038945,161	7800,83902	0,223802584	1,461681
S2						
S3	1,1987	4044719	4004486,466	40232,534	0,214163272	1,43688169
S1	1,4105	4716914	4713064,291	3849,70881	0,455055178	1,98951025
S2	1,4053	4706288	4695667,668	10620,3315	0,448066609	1,97486809
S3						

Homocedasticidade das variâncias dos resíduos (Teste F Snedecor)	
S ² res Solv	478574887
S ² res Matriz	326247041,4
GL (n ₁ + n ₂) - 4	33
F _(1-α/2, GL)	2,32
Teste F	1,466909508

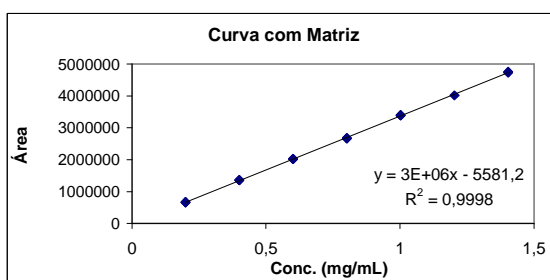
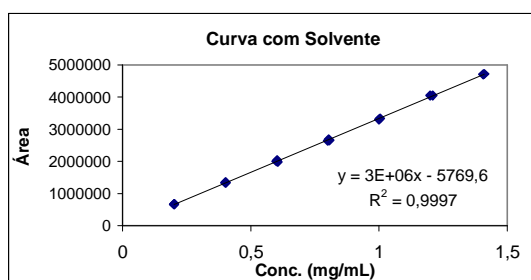
Estatísticas (Solvente)	
Inclinação	3345504,368
Interceção	-5769,62027
Sxx ₁	2,744375551
s ² res ₁	478574887
n ₁	18
ΣX ₁ ²	12,49284286
X ₁ med	0,735922222

Estatísticas (Matriz)	
Inclinação	3375449,994
Interceção	-5581,164373
Sxx ₂	3,025552797
s ² res ₂	326247041,4
n ₂	19
ΣX ₂ ²	13,99053082
X ₂ med	0,759673684

Curva com Matriz

Padrão	Conc. (mg/mL) (X ₂)	Área (Y ₂)	Y ₂ est	Y ₂ -Y ₂ est	(X ₂ -X ₂ med) ²	X ₂ ²
S1	0,2	672585	669508,8344	3076,16558	0,313234633	0,04
S2	0,2	666990	669508,8344	-2518,83442	0,313234633	0,04
S3	0,2	662388	669508,8344	-7120,83442	0,313234633	0,04
S1	0,4006	1358207	1346624,103	11582,8968	0,128933911	0,16048036
S2	0,4006	1363261	1346624,103	16636,8968	0,128933911	0,16048036
S3	0,4006	1360097	1346624,103	13472,8968	0,128933911	0,16048036
S1	0,6013	2028424	2024076,917	4347,08299	0,025082224	0,36156169
S2	0,6013	2020735	2024076,917	-3341,91701	0,025082224	0,36156169
S3	0,6013	2025003	2024076,917	926,082994	0,025082224	0,36156169
S1	0,8019	2675334	2701192,186	-25858,1858	0,001783062	0,64304361
S2	0,8019	2680920	2701192,186	-20272,1858	0,001783062	0,64304361
S3	0,8019	2668132	2701192,186	-33060,1858	0,001783062	0,64304361
S1	1,0026	3399517	3378645	20872,0004	0,059013195	1,00520676
S2	1,0026	3396858	3378645	18213,0004	0,059013195	1,00520676
S3	1,0026	3389058	3378645	10413,0004	0,059013195	1,00520676
S1						
S2	1,2032	4017532	4055760,268	-38228,2684	0,196715593	1,44769024
S3						
S1	1,4038	4728854	4732875,537	-4021,53717	0,414898711	1,97065444
S2	1,4038	4755227	4732875,537	22351,4628	0,414898711	1,97065444
S3	1,4038	4745406	4732875,537	12530,4628	0,414898711	1,97065444

Avaliação	
s ² _D	400102966,6
t _b	1,795917717
t _a	0,01337407
GL (n ₁ + n ₂) - 4	33
t _(1-α/2, GL)	2,03



APÊNDICE Q – EFEITO MATRIZ PRODUTO 4 - LEVOBUPIVACAÍNA

Efeito Matriz Produto 4 (sinal de Levobupivacaína)

Curva com Solvente

Padrão	Conc. (mg/mL) (X ₁)	Área (Y ₁)	Y ₁ est	Y ₁ -Y ₁ est	(X ₁ -X ₁ med) ²	X ₁ ²
S1	0,2015	674822	668349,5099	6472,49006	0,285607112	0,04060225
S2	0,2008	675786	666007,6569	9778,34312	0,286355793	0,04032064
S3	0,1998	656131	662662,1525	-6531,15251	0,287427037	0,03992004
S1	0,403	1340630	1342468,64	-1838,64015	0,110837206	0,162409
S2	0,4015	1354859	1337450,384	17408,6164	0,111838223	0,16120225
S3	0,3996	1343035	1331093,925	11941,0747	0,113112637	0,15968016
S1	0,6045	1984066	2016587,77	-32521,7704	0,0172718	0,36542025
S2	0,6023	2040787	2009227,661	31559,3393	0,017854898	0,36276529
S3	0,5993	2005922	1999191,148	6730,85236	0,018665632	0,35916049
S1	0,806	2657687	2690706,901	-33019,9006	0,004910895	0,649636
S2	0,803	2690132	2680670,387	9461,61254	0,004499428	0,644809
S3	0,7991	2634730	2667622,92	-32892,9204	0,003991432	0,63856081
S1						
S2	1,0038	3336159	3352447,665	-16288,6646	0,071758504	1,00761444
S3	0,9989	3303292	3336054,693	-32762,6932	0,069157312	0,99780121
S1	1,209	4046746	4038945,161	7800,83902	0,223802584	1,461681
S2						
S3	1,1987	4044719	4004486,466	40232,534	0,214163272	1,43688169
S1	1,4105	4716914	4713064,291	3849,70881	0,455055178	1,98951025
S2	1,4053	4706288	4695667,668	10620,3315	0,448066609	1,97486809
S3						

Homocedasticidade das variâncias dos resíduos (Teste F Snedecor)	
S ² res Solv	478574887
S ² res Matriz	54899044,43
GL (n ₁ +n ₂)-4	32
F _(1-α/2;GL)	2,33
Teste F	8,717362789

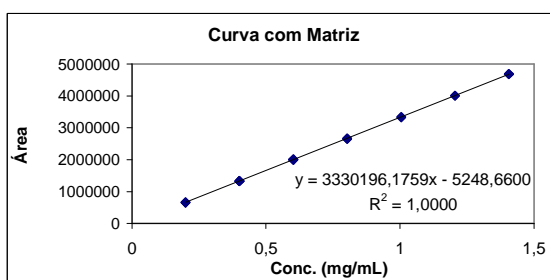
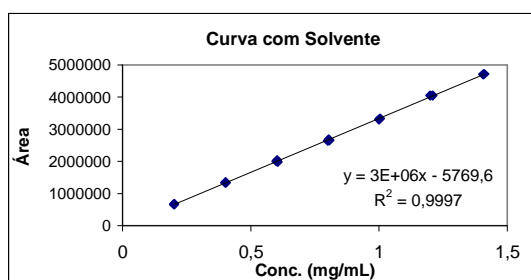
Estatísticas (Solvente)	
Inclinação	3345504,368
Interceção	-5769,62027
Sxx ₁	2,744375551
s ² res ₁	478574887
n ₁	18
ΣX ₁ ²	12,49284286
X ₁ med	0,735922222

Estatísticas (Matriz)	
Inclinação	3330196,176
Interceção	-5248,660023
Sxx ₂	2,75000228
s ² res ₂	54899044,43
n ₂	18
ΣX ₂ ²	12,50759716
X ₂ med	0,736266667

Curva com Matriz

Padrão	Conc. (mg/mL) (X ₂)	Área (Y ₂)	Y ₂ est	Y ₂ -Y ₂ est	(X ₂ -X ₂ med) ²	X ₂ ²
S1	0,2	658027	660790,5752	-2763,57516	0,287581938	0,04
S2	0,2	662029	660790,5752	1238,42484	0,287581938	0,04
S3	0,2	660673	660790,5752	-117,575163	0,287581938	0,04
S1	0,4011	1332104	1330493,026	1610,97386	0,112336694	0,16088121
S2	0,4011	1334195	1330493,026	3701,97386	0,112336694	0,16088121
S3	0,4011	1336187	1330493,026	5693,97386	0,112336694	0,16088121
S1	0,6022	2013355	2000195,477	13159,5229	0,017973871	0,36264484
S2	0,6022	2005890	2000195,477	5694,52288	0,017973871	0,36264484
S3	0,6022	1994948	2000195,477	-5247,47712	0,017973871	0,36264484
S1	0,8033	2656631	2669897,928	-13266,9281	0,004493468	0,64529089
S2	0,8033	2670776	2669897,928	878,071895	0,004493468	0,64529089
S3	0,8033	2655955	2669897,928	-13942,9281	0,004493468	0,64529089
S1						
S2	1,0044	3342563	3339600,379	2962,62092	0,071895484	1,00881936
S3	1,0044	3327397	3339600,379	-12203,3791	0,071895484	1,00881936
S1						
S2	1,2055	4007400	4009302,83	-1902,83007	0,220179921	1,45323025
S3	1,2055	4009078	4009302,83	-224,830065	0,220179921	1,45323025
S1						
S2	1,4066	4685594	4679005,281	6588,71895	0,449346778	1,97852356
S3	1,4066	4687146	4679005,281	8140,71895	0,449346778	1,97852356

Avaliação	
s ² _D	266736965,7
t _b	1,098082088
t _a	0,044853336
GL (n ₁ +n ₂)-4	19,62315707
t _(1-α/2;GL)	2,09



APÊNDICE R – EFEITO MATRIZ PRODUTO 5 - LEVOBUPIVACAÍNA

Efeito Matriz Produto 5 (sinal de Levobupivacaína)**Curva com Solvente**

Padrão	Conc. (mg/mL) (X ₁)	Área (Y ₁)	Y ₁ est	Y ₁ -Y ₁ est	(X ₁ -X ₁ med) ²	X ₁ ²
S1	0,2015	674822	668349,5099	6472,49006	0,285607112	0,04060225
S2	0,2008	675786	666007,6569	9778,34312	0,286355793	0,04032064
S3	0,1998	656131	662662,1525	-6531,15251	0,287427037	0,03992004
S1	0,403	1340630	1342468,64	-1838,64015	0,110837206	0,162409
S2	0,4015	1354859	1337450,384	17408,6164	0,111838223	0,16120225
S3	0,3996	1343035	1331093,925	11941,0747	0,113112637	0,15968016
S1	0,6045	1984066	2016587,77	-32521,7704	0,0172718	0,36542025
S2	0,6023	2040787	2009227,661	31559,3393	0,017854898	0,36276529
S3	0,5993	2005922	1999191,148	6730,85236	0,018665632	0,35916049
S1	0,806	2657687	2690706,901	-33019,9006	0,004910895	0,649636
S2	0,803	2690132	2680670,387	9461,61254	0,004499428	0,644809
S3	0,7991	2634730	2667622,92	-32892,9204	0,003991432	0,63856081
S1						
S2	1,0038	3336159	3352447,665	-16288,6646	0,071758504	1,00761444
S3	0,9989	3303292	3336054,693	-32762,6932	0,069157312	0,99780121
S1	1,209	4046746	4038945,161	7800,83902	0,223802584	1,461681
S2						
S3	1,1987	4044719	4004486,466	40232,534	0,214163272	1,43688169
S1	1,4105	4716914	4713064,291	3849,70881	0,455055178	1,98951025
S2	1,4053	4706288	4695667,668	10620,3315	0,448066609	1,97486809
S3						

Homocedasticidade das variâncias dos resíduos (Teste F Snedecor)	
S ² res Solv	478574887
S ² res Matriz	66024897,31
GL (n ₁ +n ₂)-4	33
F _(1-α/2, GL)	2,32
Teste F	7,248400324

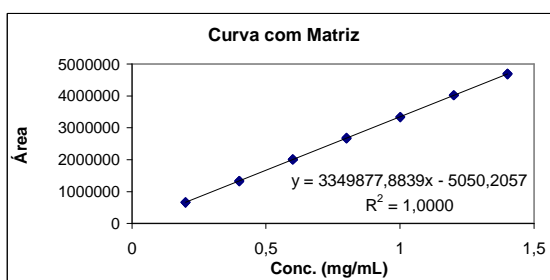
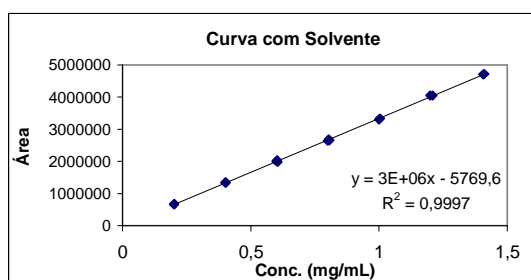
Estatísticas (Solvente)	
Inclinação	3345504,368
Interceção	-5769,62027
Sxx ₁	2,744375551
s ² res ₁	478574887
n ₁	18
ΣX ₁ ²	12,49284286
X ₁ med	0,735922222

Estatísticas (Matriz)	
Inclinação	3349877,884
Interceção	-5050,205681
Sxx ₂	3,146674104
s ² res ₂	66024897,31
n ₂	19
ΣX ₂ ²	14,38068758
X ₂ med	0,768936842

Curva com Matriz

Padrão	Conc. (mg/mL) (X ₂)	Área (Y ₂)	Y ₂ est	Y ₂ -Y ₂ est	(X ₂ -X ₂ med) ²	X ₂ ²
S1	0,2	664739	664925,3711	-186,371095	0,32368913	0,04
S2	0,2	665658	664925,3711	732,628905	0,32368913	0,04
S3	0,2	665203	664925,3711	277,628905	0,32368913	0,04
S1	0,4002	1338819	1335570,923	3248,07655	0,135966859	0,16016004
S2	0,4002	1340903	1335570,923	5332,07655	0,135966859	0,16016004
S3	0,4002	1324187	1335570,923	-11383,9234	0,135966859	0,16016004
S1	0,6004	2010250	2006216,476	4033,5242	0,028404667	0,36048016
S2	0,6004	2003862	2006216,476	-2354,4758	0,028404667	0,36048016
S3	0,6004	2013994	2006216,476	7777,5242	0,028404667	0,36048016
S1	0,8005	2671220	2676527,04	-5307,04037	0,000996233	0,64080025
S2	0,8005	2689900	2676527,04	13372,9596	0,000996233	0,64080025
S3	0,8005	2668850	2676527,04	-7677,04037	0,000996233	0,64080025
S1	1,0007	3346030	3347172,593	-1142,59272	0,053714161	1,00140049
S2	1,0007	3328944	3347172,593	-18228,5927	0,053714161	1,00140049
S3						
S1	1,2009	4018447	4017818,145	628,854927	0,18659217	1,44216081
S2						
S3	1,2009	4026018	4017818,145	8199,85493	0,18659217	1,44216081
S1	1,4011	4694370	4688463,697	5906,30257	0,399630258	1,96308121
S2	1,4011	4697565	4688463,697	9101,30257	0,399630258	1,96308121
S3	1,4011	4676133	4688463,697	-12330,6974	0,399630258	1,96308121

Avaliação	
s ² _D	266049134,7
t _b	0,312900186
t _a	0,061483545
GL (n ₁ +n ₂)-4	20,13205472
t _(1-α/2, GL)	2,09



APÊNDICE S – EFEITO MATRIZ PRODUTO 1 - DEXTROBUPIVACAÍNA

Efeito Matriz Produto 1 (sinal de Dextrobupivacaína)

Curva com Solvente

Padrão	Conc. (mg/mL) (X ₁)	Área (Y ₁)	Y _{1,est}	Y ₁ -Y _{1,est}	(X ₁ -X _{1,med}) ²	X ₁ ²
S1	0,2008	677611	674755,4782	2855,52185	0,325146047	0,04032064
S2	0,2004	663167	673422,5543	-10255,5543	0,325602379	0,04016016
S3	0,2009	653553	675088,7091	-21535,7091	0,325032013	0,04036081
S1	0,4016	1369299	1343883,255	25415,7453	0,136468026	0,16128256
S2	0,4008	1335825	1341217,407	-5392,40697	0,137059731	0,16064064
S3	0,4018	1350380	1344549,717	5830,28338	0,136320299	0,16144324
S1	0,6024	2002371	2013011,031	-10640,0312	0,028431284	0,36288576
S2	0,6011	1978632	2008679,029	-30047,0287	0,028871376	0,36132121
S3	0,6028	2022524	2014343,955	8180,04492	0,028296552	0,36336784
S1	0,8032	2682764	2682138,808	625,192244	0,001035823	0,64513024
S2	0,8015	2695929	2676473,881	19455,1186	0,000929287	0,64240225
S3	0,8037	2709898	2683804,963	26093,0374	0,001068258	0,64593369
S1						
S2	1,0019	3351344	3344268,734	7075,26596	0,053307519	1,00380361
S3	1,0046	3353080	3353265,97	-185,970077	0,054561583	1,00922116
S1	1,2048	4028021	4020394,361	7626,63918	0,188168741	1,45154304
S2	1,2023	4026646	4012063,587	14582,4133	0,18600607	1,44552529
S3						
S1	1,4056	4666496	4689522,137	-23026,1374	0,40269712	1,97571136
S2	1,4027	4663161	4679858,439	-16697,4394	0,399024942	1,96756729
S3	1,4064	4692229	4692187,985	41,0149256	0,403713095	1,97796096

Homocedasticidade das variâncias dos resíduos (Teste F Snedecor)	
S ² res Solv	253263862
S ² res Matriz	298833341,4
GL (n ₁ +n ₂)-4	35
F _(1-α/2;GL)	2,26
Teste F	1,179928866

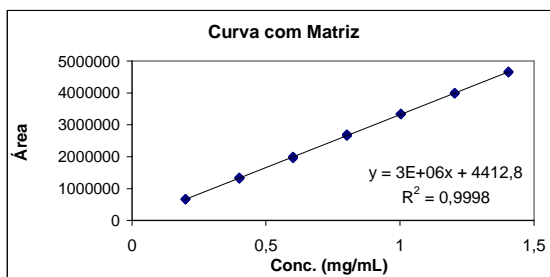
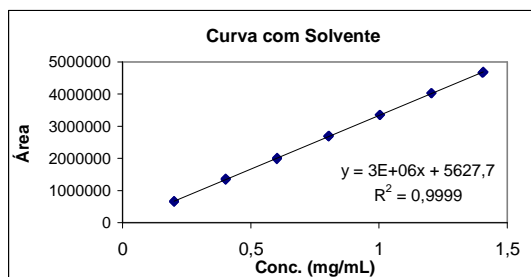
Estatísticas (Solvente)	
Inclinação	3332309,644
Interceção	5627,701619
Sxx ₁	3,161740145
s ² res ₁	253263862
n ₁	19
ΣX ₁ ²	14,45658175
X _{1,med}	0,771015789

Estatísticas (Matriz)	
Inclinação	3315787,92
Interceção	4412,773193
Sxx ₂	3,38693376
s ² res ₂	298833341,4
n ₂	20
ΣX ₂ ²	16,26384896
X _{2,med}	0,8024

Curva com Matriz

Padrão	Conc. (mg/mL) (X ₂)	Área (Y ₂)	Y _{2,est}	Y ₂ -Y _{2,est}	(X ₂ -X _{2,med}) ²	X ₂ ²
S1	0,2	662568	667570,3571	-5002,35714	0,36288576	0,04
S2	0,2	673067	667570,3571	5496,64286	0,36288576	0,04
S3	0,2	674074	667570,3571	6503,64286	0,36288576	0,04
S1	0,4008	1339054	1333380,571	5673,42857	0,16128256	0,16064064
S2	0,4008	1315048	1333380,571	-18332,5714	0,16128256	0,16064064
S3	0,4008	1345608	1333380,571	12227,4286	0,16128256	0,16064064
S1	0,6016	1999934	1999190,786	743,214286	0,04032064	0,36192256
S2	0,6016	2004171	1999190,786	4980,21429	0,04032064	0,36192256
S3	0,6016	1953480	1999190,786	-45710,7857	0,04032064	0,36192256
S1	0,8024	2654563	2665001	-10438	0,0	0,64384576
S2	0,8024	2701594	2665001	36593	0,0	0,64384576
S3						
S1	1,0032	3350407	3330811,214	19595,7857	0,04032064	1,00641024
S2	1,0032	3329035	3330811,214	-1776,21429	0,04032064	1,00641024
S3	1,0032	3338752	3330811,214	7940,78571	0,04032064	1,00641024
S1	1,204	3990226	3996621,429	-6395,42857	0,16128256	1,449616
S2	1,204	3982165	3996621,429	-14456,4286	0,16128256	1,449616
S3	1,204	4007608	3996621,429	10986,5714	0,16128256	1,449616
S1	1,4048	4638782	4662431,643	-23649,6429	0,36288576	1,97346304
S2	1,4048	4668102	4662431,643	5670,35714	0,36288576	1,97346304
S3	1,4048	4671782	4662431,643	9350,35714	0,36288576	1,97346304

Avaliação	
s ² _D	276699594,2
t _β	1,270108629
t _α	0,105338753
GL (n ₁ +n ₂)-4	35
t _(1-α/2;GL)	2,03



APÊNDICE T – EFEITO MATRIZ PRODUTO 2 - DEXTROBUPIVACAÍNA

Efeito Matriz Produto 2 (sinal de Dextrobutipivacaína)

Curva com Solvente

Padrão	Conc. (mg/mL) (X ₁)	Área (Y ₁)	Y ₁ est	Y ₁ -Y ₁ est	(X ₁ -X ₁ ,med) ²	X ₁ ²
S1	0,2008	677611	674755,4782	2855,52185	0,325146047	0,04032064
S2	0,2004	663167	673422,5543	-10255,5543	0,325602379	0,04016016
S3	0,2009	653553	675088,7091	-21535,7091	0,325032013	0,04036081
S1	0,4016	1369299	1343883,255	25415,7453	0,136468026	0,16128256
S2	0,4008	1335825	1341217,407	-5392,40697	0,137059731	0,16064064
S3	0,4018	1350380	1344549,717	5830,28338	0,136320299	0,16144324
S1	0,6024	2002371	2013011,031	-10640,0312	0,028431284	0,36288576
S2	0,6011	1978632	2008679,029	-30047,0287	0,028871376	0,36132121
S3	0,6028	2022524	2014343,955	8180,04492	0,028296552	0,36336784
S1	0,8032	2682764	2682138,808	625,192244	0,001035823	0,64513024
S2	0,8015	2695929	2676473,881	19455,1186	0,000929287	0,64240225
S3	0,8037	2709898	2683804,963	26093,0374	0,001068258	0,64593369
S1						
S2	1,0019	3351344	3344268,734	7075,26596	0,053307519	1,00380361
S3	1,0046	3353080	3353265,97	-185,970077	0,054561583	1,00922116
S1	1,2048	4028021	4020394,361	7626,63918	0,188168741	1,45154304
S2	1,2023	4026646	4012063,587	14582,4133	0,18600607	1,44552529
S3						
S1	1,4056	4666496	4689522,137	-23026,1374	0,40269712	1,97571136
S2	1,4027	4663161	4679858,439	-16697,4394	0,399024942	1,96756729
S3	1,4064	4692229	4692187,985	41,0149256	0,403713095	1,97796096

Homocedasticidade das variâncias dos resíduos (Teste F Snedecor)	
S ² res Solv	253263862
S ² res Matriz	138153391,6
GL (n ₁ +n ₂)-4	33
F _(1-α/2;GL)	2,32
Teste F	1,833207705

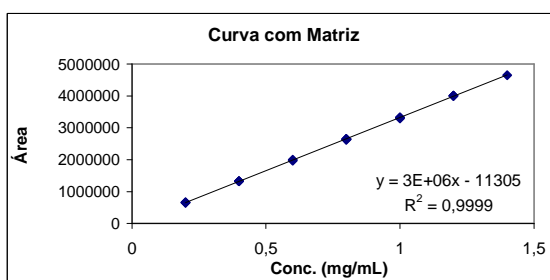
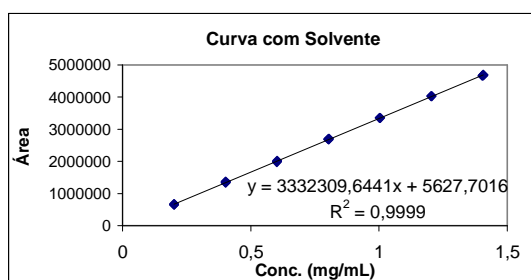
Estatísticas (Solvente)	
Inclinação	3332309,644
Interceção	5627,701619
Sxx ₁	3,161740145
s ² res ₁	253263862
n ₁	19
ΣX ₁ ²	14,45154304
X ₁ med	0,771015789

Estatísticas (Matriz)	
Inclinação	3335233,376
Interceção	-11305,12402
Sxx ₂	2,544444444
s ² res ₂	138153391,6
n ₂	18
ΣX ₂ ²	12,52
X ₂ med	0,744444444

Curva com Matriz

Padrão	Conc. (mg/mL) (X ₂)	Área (Y ₂)	Y ₂ est	Y ₂ -Y ₂ est	(X ₂ -X ₂ ,med) ²	X ₂ ²
S1	0,2	657756	655741,5511	2014,44891	0,296419753	0,04
S2	0,2	665955	655741,5511	10213,4489	0,296419753	0,04
S3	0,2	657357	655741,5511	1615,44891	0,296419753	0,04
S1	0,4	1324442	1322788,226	1653,7738	0,118641975	0,16
S2	0,4	1328831	1322788,226	6042,7738	0,118641975	0,16
S3	0,4	1325092	1322788,226	2303,7738	0,118641975	0,16
S1	0,6	1996631	1989834,901	6796,09869	0,020864198	0,36
S2						
S3	0,6	1973779	1989834,901	-16055,9013	0,020864198	0,36
S1	0,8	2630458	2656881,576	-26423,5764	0,00308642	0,64
S2	0,8	2650011	2656881,576	-6870,57642	0,00308642	0,64
S3	0,8	2657586	2656881,576	704,423581	0,00308642	0,64
S1	1	3327706	3323928,252	3777,74847	0,065308642	1
S2	1	3323335	3323928,252	-593,251528	0,065308642	1
S3	1	3301180	3323928,252	-22748,2515	0,065308642	1
S1	1,2	3999936	3990974,927	8961,07336	0,207530864	1,44
S2	1,2	4004626	3990974,927	13651,0734	0,207530864	1,44
S3	1,2	4009237	3990974,927	18262,0734	0,207530864	1,44
S1						
S2	1,4	4654717	4658021,602	-3304,60175	0,429753086	1,96
S3						

Avaliação	
s ² _p	197452724,8
t _β	0,247054392
t _α	1,680780725
GL (n ₁ +n ₂)-4	33
t _(1-α/2;GL)	2,03



APÊNDICE U – EFEITO MATRIZ PRODUTO 3 - DEXTROBUPIVACAÍNA

Efeito Matriz Produto 3 (sinal de Dextrobupivacaína)

Curva com Solvente

Padrão	Conc. (mg/mL) (X ₁)	Área (Y ₁)	Y _{1,est}	Y ₁ -Y _{1,est}	(X ₁ -X _{1,med}) ²	X ₁ ²
S1	0,2008	677611	674755,4782	2855,52185	0,325146047	0,04032064
S2	0,2004	663167	673422,5543	-10255,5543	0,325602379	0,04016016
S3	0,2009	653553	675088,7091	-21535,7091	0,325032013	0,04036081
S1	0,4016	1369299	1343883,255	25415,7453	0,136468026	0,16128256
S2	0,4008	1335825	1341217,407	-5392,40697	0,137059731	0,16064064
S3	0,4018	1350380	1344549,717	5830,28338	0,136320299	0,16144324
S1	0,6024	2002371	2013011,031	-10640,0312	0,028431284	0,36288576
S2	0,6011	1978632	2008679,029	-30047,0287	0,028871376	0,36132121
S3	0,6028	2022524	2014343,955	8180,04492	0,028296552	0,36336784
S1	0,8032	2682764	2682138,808	625,192244	0,001035823	0,64513024
S2	0,8015	2695929	2676473,881	19455,1186	0,000929287	0,64240225
S3	0,8037	2709898	2683804,963	26093,0374	0,001068258	0,64593369
S1						
S2	1,0019	3351344	3344268,734	7075,26596	0,053307519	1,00380361
S3	1,0046	3353080	3353265,97	-185,970077	0,054561583	1,00922116
S1	1,2048	4028021	4020394,361	7626,63918	0,188168741	1,45154304
S2	1,2023	4026646	4012063,587	14582,4133	0,18600607	1,44552529
S3						
S1	1,4056	4666496	4689522,137	-23026,1374	0,40269712	1,97571136
S2	1,4027	4663161	4679858,439	-16697,4394	0,399024942	1,96756729
S3	1,4064	4692229	4692187,985	41,0149256	0,403713095	1,97796096

Homocedasticidade das variâncias dos resíduos (Teste F Snedecor)	
S ² res Solv	253263862
S ² res Matriz	307156029
GL (n ₁ +n ₂)-4	32
F _(1-α/2, GL)	2,37
Teste F	1,212790592

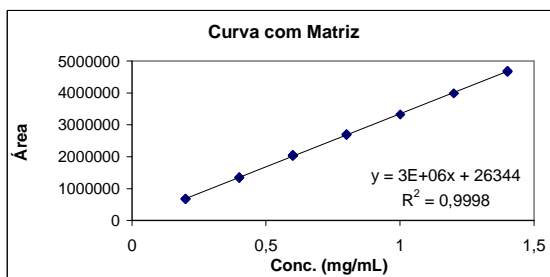
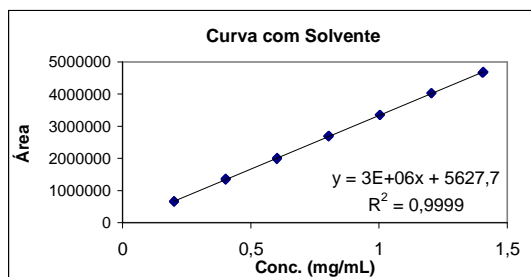
Estatísticas (Solvente)	
Inclinação	3332309,644
Interceção	5627,701619
Sxx ₁	3,161740145
s ² res ₁	253263862
n ₁	19
ΣX ₁ ²	14,45154304
X _{1,med}	0,771015789

Estatísticas (Matriz)	
Inclinação	3318391,498
Interceção	26343,99122
Sxx ₂	2,883332681
s ² res ₂	307156029
n ₂	17
ΣX ₂ ²	11,94657511
X _{2,med}	0,730158824

Curva com Matriz

Padrão	Conc. (mg/mL) (X ₂)	Área (Y ₂)	Y _{2,est}	Y ₂ -Y _{2,est}	(X ₂ -X _{2,med}) ²	X ₂ ²
S1	0,2	678921	690022,2909	-11101,2909	0,281068378	0,04
S2	0,2	678235	690022,2909	-11787,2909	0,281068378	0,04
S3	0,2	680417	690022,2909	-9605,29086	0,281068378	0,04
S1	0,4003	1348015	1354696,108	-6681,10794	0,108806843	0,16024009
S2	0,4003	1353375	1354696,108	-1321,10794	0,108806843	0,16024009
S3	0,4003	1344171	1354696,108	-10525,1079	0,108806843	0,16024009
S1	0,6006	2056345	2019369,925	36975,075	0,016785489	0,36072036
S2	0,6006	2033676	2019369,925	14306,075	0,016785489	0,36072036
S3	0,6006	2029008	2019369,925	9638,07498	0,016785489	0,36072036
S1	0,8008	2687161	2683711,903	3449,09705	0,0	0,64128064
S2	0,8008	2698749	2683711,903	15037,0971	0,0	0,64128064
S3	0,8008	2705465	2683711,903	21753,0971	0,0	0,64128064
S1	1,0011	3322008	3348385,72	-26377,72	0,073409121	1,00220121
S2						
S3						
S1	1,2014	3989025	4013059,537	-24034,5371	0,222068246	1,44336196
S2						
S3						
S1	1,4017	4655697	4677733,354	-22036,3542	0,450967552	1,96476289
S2	1,4017	4691974	4677733,354	14240,6458	0,450967552	1,96476289
S3	1,4017	4685804	4677733,354	8070,64581	0,450967552	1,96476289

Avaliação	
s ² _D	278525815,3
t _α	1,024137702
t _β	1,783563095
GL (n ₁ +n ₂)-4	32
t _(1-α/2, GL)	2,04



APÊNDICE V – EFEITO MATRIZ PRODUTO 4 - DEXTROBUPIVACAÍNA

Efeito Matriz Produto 4 (sinal de Dextrobutivacaína)**Curva com Solvente**

Padrão	Conc. (mg/mL) (X ₁)	Área (Y ₁)	Y ₁ est	Y ₁ -Y ₁ est	(X ₁ -X ₁ med) ²	X ₁ ²
S1	0,2008	677611	674755,4782	2855,52185	0,325146047	0,04032064
S2	0,2004	663167	673422,5543	-10255,5543	0,325602379	0,04016016
S3	0,2009	653553	675088,7091	-21535,7091	0,325032013	0,04036081
S1	0,4016	1369299	1343883,255	25415,7453	0,136468026	0,16128256
S2	0,4008	1335825	1341217,407	-5392,40697	0,137059731	0,16064064
S3	0,4018	1350380	1344549,717	5830,28338	0,136320299	0,16144324
S1	0,6024	2002371	2013011,031	-10640,0312	0,028431284	0,36288576
S2	0,6011	1978632	2008679,029	-30047,0287	0,028871376	0,36132121
S3	0,6028	2022524	2014343,955	8180,04492	0,028296552	0,36336784
S1	0,8032	2682764	2682138,808	625,192244	0,001035823	0,64513024
S2	0,8015	2695929	2676473,881	19455,1186	0,000929287	0,64240225
S3	0,8037	2709898	2683804,963	26093,0374	0,001068258	0,64593369
S1						
S2	1,0019	3351344	3344268,734	7075,26596	0,053307519	1,00380361
S3	1,0046	3353080	3353265,97	-185,970077	0,054561583	1,00922116
S1	1,2048	4028021	4020394,361	7626,63918	0,188168741	1,45154304
S2	1,2023	4026646	4012063,587	14582,4133	0,18600607	1,44552529
S3						
S1	1,4056	4666496	4689522,137	-23026,1374	0,40269712	1,97571136
S2	1,4027	4663161	4679858,439	-16697,4394	0,399024942	1,96756729
S3	1,4064	4692229	4692187,985	41,0149256	0,403713095	1,97796096

Homocedasticidade das variâncias dos resíduos (Teste F Snedecor)	
S ² res Solv	253263862
S ² res Matriz	497375047,8
GL (n ₁ +n ₂)-4	36
F _(1-α/2, GL)	2,24
Teste F	1,963861105

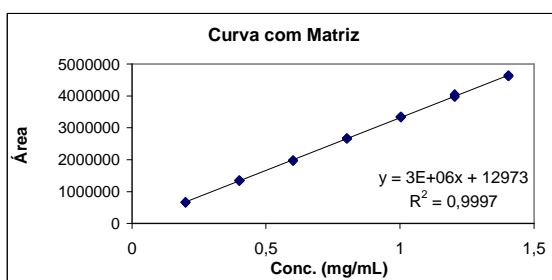
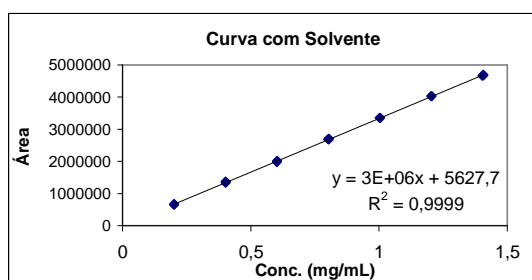
Estatísticas (Solvente)	
Inclinação	3332309,644
Interceção	5627,701619
Sxx ₁	3,161740145
s ² res ₁	253263862
n ₁	19
ΣX ₁ ²	14,45658175
X ₁ med	0,771015789

Estatísticas (Matriz)	
Inclinação	3303138,28
Interceção	12973,12967
Sxx ₂	3,38693376
s ² res ₂	497375047,8
n ₂	21
ΣX ₂ ²	16,90769472
X ₂ med	0,8024

Curva com Matriz

Padrão	Conc. (mg/mL) (X ₂)	Área (Y ₂)	Y ₂ est	Y ₂ -Y ₂ est	(X ₂ -X ₂ med) ²	X ₂ ²
S1	0,2	665180	673600,7857	-8420,78571	0,36288576	0,04
S2	0,2	672670	673600,7857	-930,785714	0,36288576	0,04
S3	0,2	665316	673600,7857	-8284,78571	0,36288576	0,04
S1	0,4008	1347275	1336870,952	10404,0476	0,16128256	0,16064064
S2	0,4008	1348405	1336870,952	11534,0476	0,16128256	0,16064064
S3	0,4008	1353246	1336870,952	16375,0476	0,16128256	0,16064064
S1	0,6016	1974717	2000141,119	-25424,119	0,04032064	0,36192256
S2	0,6016	1977145	2000141,119	-22996,119	0,04032064	0,36192256
S3	0,6016	1981254	2000141,119	-18887,119	0,04032064	0,36192256
S1	0,8024	2660438	2663411,286	-2973,28571	0,0	0,64384576
S2	0,8024	2670625	2663411,286	7213,71429	0,0	0,64384576
S3	0,8024	2672532	2663411,286	9120,71429	0,0	0,64384576
S1	1,0032	3350126	3326681,452	23444,5476	0,04032064	1,00641024
S2	1,0032	3328839	3326681,452	2157,54762	0,04032064	1,00641024
S3	1,0032	3345661	3326681,452	18979,5476	0,04032064	1,00641024
S1	1,204	3968196	3989951,619	-21755,619	0,16128256	1,449616
S2	1,204	4053393	3989951,619	63441,381	0,16128256	1,449616
S3	1,204	4002501	3989951,619	12549,381	0,16128256	1,449616
S1	1,4048	4620252	4653221,786	-32969,7857	0,36288576	1,97346304
S2	1,4048	4651662	4653221,786	-1559,78571	0,36288576	1,97346304
S3	1,4048	4622204	4653221,786	-31017,7857	0,36288576	1,97346304

Avaliação	
s ² _D	382100321,2
t _α	1,908348945
t _β	0,543310709
GL (n ₁ +n ₂)-4	36
t _(1-α/2, GL)	2,03



APÊNDICE W – EFEITO MATRIZ PRODUTO 5 - DEXTROBUPIVACAÍNA

Efeito Matriz Produto 5 (sinal de Dextrobutivacaína)

Curva com Solvente

Padrão	Conc. (mg/mL) (X ₁)	Área (Y ₁)	Y ₁ est	Y ₁ -Y ₁ est	(X ₁ -X ₁ med) ²	X ₁ ²
S1	0,2008	677611	674755,4782	2855,52185	0,325146047	0,04032064
S2	0,2004	663167	673422,5543	-10255,5543	0,325602379	0,04016016
S3	0,2009	653553	675088,7091	-21535,7091	0,325032013	0,04036081
S1	0,4016	1369299	1343883,255	25415,7453	0,136468026	0,16128256
S2	0,4008	1335825	1341217,407	-5392,40697	0,137059731	0,16064064
S3	0,4018	1350380	1344549,717	5830,28338	0,136320299	0,16144324
S1	0,6024	2002371	2013011,031	-10640,0312	0,028431284	0,36288576
S2	0,6011	1978632	2008679,029	-30047,0287	0,028871376	0,36132121
S3	0,6028	2022524	2014343,955	8180,04492	0,028296552	0,36336784
S1	0,8032	2682764	2682138,808	625,192244	0,001035823	0,64513024
S2	0,8015	2695929	2676473,881	19455,1186	0,000929287	0,64240225
S3	0,8037	2709898	2683804,963	26093,0374	0,001068258	0,64593369
S1						
S2	1,0019	3351344	3344268,734	7075,26596	0,053307519	1,00380361
S3	1,0046	3353080	3353265,97	-185,970077	0,054561583	1,00922116
S1	1,2048	4028021	4020394,361	7626,63918	0,188168741	1,45154304
S2	1,2023	4026646	4012063,587	14582,4133	0,18600607	1,44552529
S3						
S1	1,4056	4666496	4689522,137	-23026,1374	0,40269712	1,97571136
S2	1,4027	4663161	4679858,439	-16697,4394	0,399024942	1,96756729
S3	1,4064	4692229	4692187,985	41,0149256	0,403713095	1,97796096

Homocedasticidade das variâncias dos resíduos (Teste F Snedecor)	
S ² res Solv	253263862
S ² res Matriz	822679773,8
GL (n ₁ +n ₂)-4	36
F _(1-α/2, GL)	2,24
Teste F	3,248310941

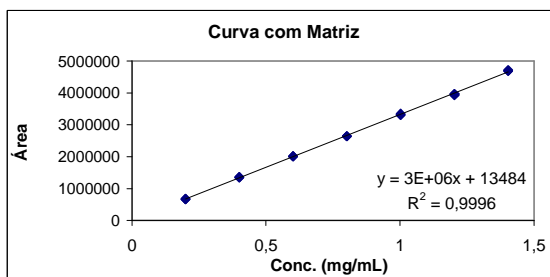
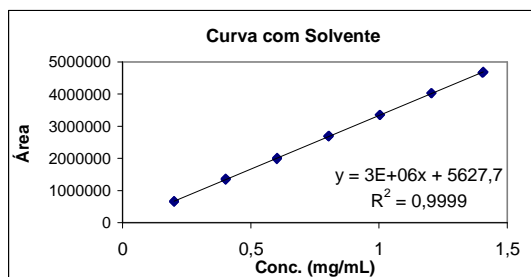
Estatísticas (Solvente)	
Inclinação	3332309,644
Interceção	5627,701619
Sxx ₁	3,161740145
s ² res ₁	253263862
n ₁	19
ΣX ₁ ²	14,45154304
X ₁ med	0,771015789

Estatísticas (Matriz)	
Inclinação	3309296,345
Interceção	13484,3736
Sxx ₂	3,380912451
s ² res ₂	822679773,8
n ₂	21
ΣX ₂ ²	16,88338488
X ₂ med	0,801857143

Curva com Matriz

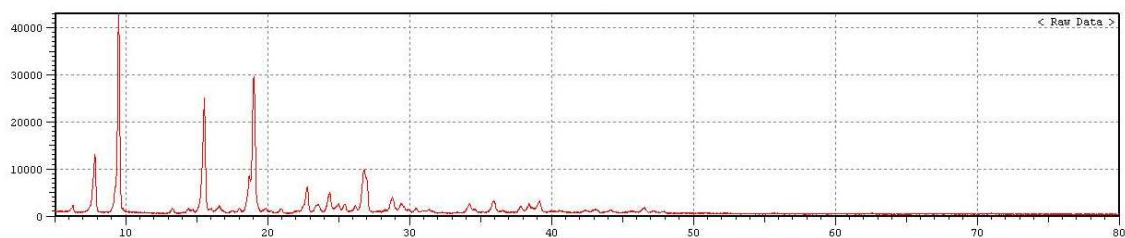
Padrão	Conc. (mg/mL) (X ₂)	Área (Y ₂)	Y ₂ est	Y ₂ -Y ₂ est	(X ₂ -X ₂ med) ²	X ₂ ²
S1	0,2	672860	675343,6426	-2483,64261	0,36223202	0,04
S2	0,2	679577	675343,6426	4233,35739	0,36223202	0,04
S3	0,2	669435	675343,6426	-5908,64261	0,36223202	0,04
S1	0,4006	1369039	1339188,489	29850,5106	0,161007295	0,16048036
S2	0,4006	1352941	1339188,489	13752,5106	0,161007295	0,16048036
S3	0,4006	1351275	1339188,489	12086,5106	0,161007295	0,16048036
S1	0,6012	2015195	2003033,336	12161,6638	0,040263289	0,36144144
S2	0,6012	2017258	2003033,336	14224,6638	0,040263289	0,36144144
S3	0,6012	2007631	2003033,336	4597,66375	0,040263289	0,36144144
S1	0,8019	2639986	2667209,113	-27223,1127	0,0	0,64304361
S2	0,8019	2641744	2667209,113	-25465,1127	0,0	0,64304361
S3	0,8019	2645229	2667209,113	-21980,1127	0,0	0,64304361
S1	1,0025	3302881	3331053,96	-28172,9595	0,040257556	1,00500625
S2	1,0025	3350396	3331053,96	19342,0405	0,040257556	1,00500625
S3	1,0025	3321700	3331053,96	-9353,95952	0,040257556	1,00500625
S1	1,2031	3971136	3994898,806	-23762,8063	0,16099583	1,44744961
S2	1,2031	3966093	3994898,806	-28805,8063	0,16099583	1,44744961
S3	1,2031	3930371	3994898,806	-64527,8063	0,16099583	1,44744961
S1	1,4037	4722671	4658743,653	63927,3468	0,362214825	1,97037369
S2	1,4037	4688585	4658743,653	29841,3468	0,362214825	1,97037369
S3	1,4037	4692410	4658743,653	33666,3468	0,362214825	1,97037369

Avaliação	
s ² _D	553788926,6
t _b	1,279636044
t _a	0,490487931
GL (n ₁ +n ₂)-4	30,21927523
t _(1-α/2, GL)	2,04

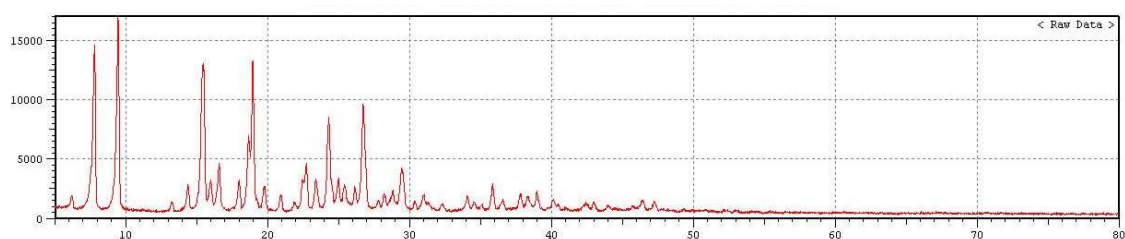


APÊNDICE X – DIFRATOGRAMAS DA SUBSTÂNCIA CLORIDRATO DE BUIVACAÍNA (MISTURA RACÊMICA)

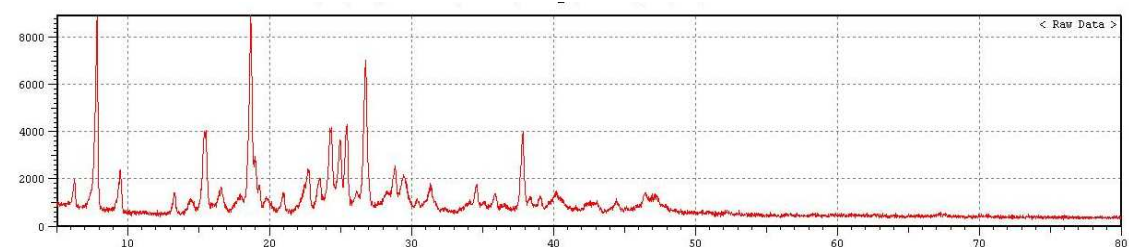
Padrão cloridrato de bupivacaína USP



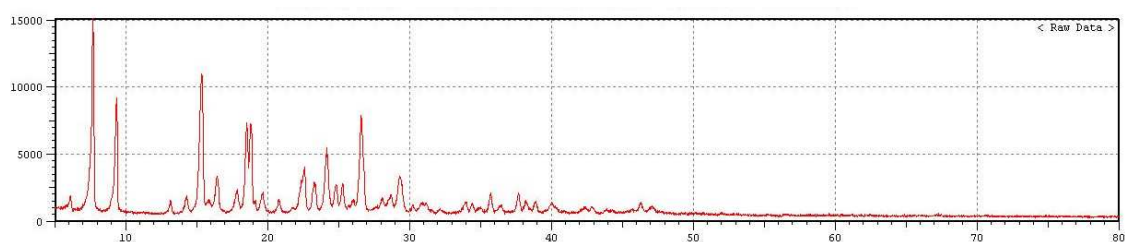
Padrão cloridrato de bupivacaína WHO



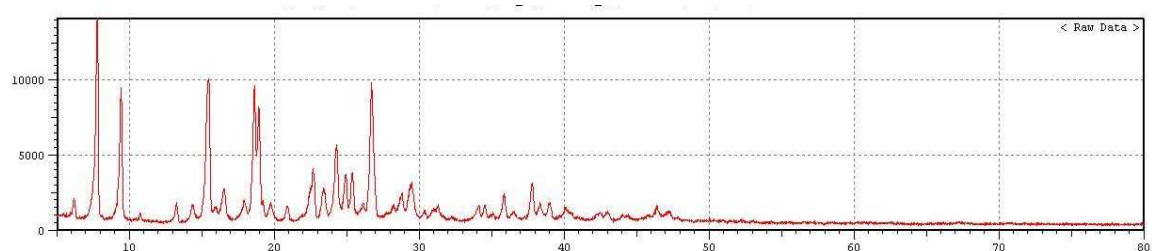
SQR-FB cloridrato de bupivacaína



MP cloridrato de bupivacaína fornecedor 1

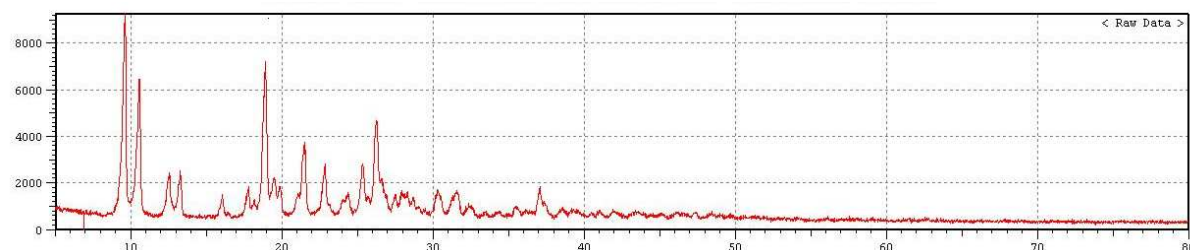


MP cloridrato de bupivacaína fornecedor 2

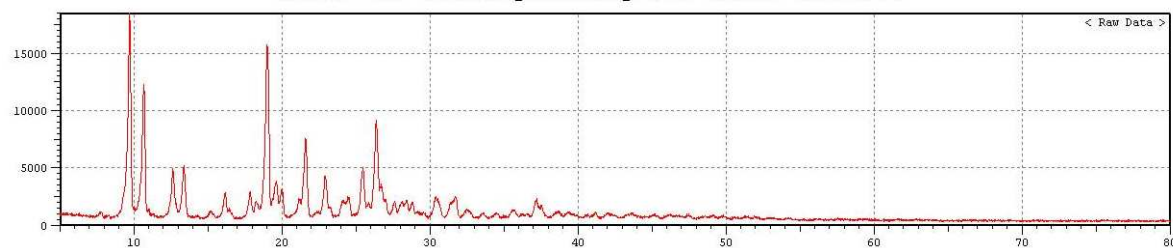


PÊNDICE Y – DIFRATOGRAMAS DAS SUBSTÂNCIAS CLORIDRATO DE LEVOBUPIVACAÍNA E CLORIDRATO DE DEXTROBUPIVACAÍNA

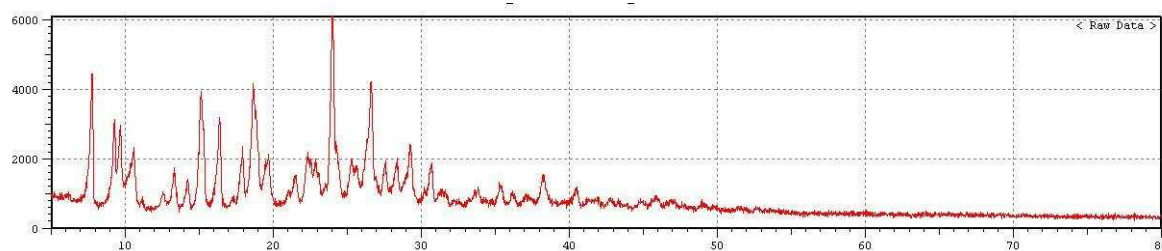
Padrão cloridrato de levobupivacaína



MP cloridrato de levobupivacaína



Padrão cloridrato de dextrobupivacaína



MP cloridrato de dextrobupivacaína

