



**Universidade de Aveiro** - Departamento de Química

**Ano 2011**

**Catarina Raquel Marques  
Domingos**

Validação de um método de HPLC para análise de  
conteúdo em comprimidos



**Universidade de Aveiro** - Departamento de Química

**Ano 2011**

**Catarina Raquel Marques  
Domingos**

Validação de um método de HPLC para análise de  
conteúdo em comprimidos

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Dra. Isabel Cristina Raposo Lapa do Laboratório de Investigação e Desenvolvimento da empresa Bluepharma, Indústria Farmacêutica, S.A. e da Professora Maria do Rosário Gonçalves dos Reis Marques Domingues, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

## **o júri**

presidente

Professor Bruno Miguel Rodrigues das Neves  
Professor auxiliar convidado do Departamento de Química da  
Universidade de Aveiro

Dra. Isabel Cristina Raposo Lapa  
Laboratório de Investigação e Desenvolvimento da Bluepharma

Professora Maria do Rosário Gonçalves dos Reis Marques  
Domingues  
Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de  
Aveiro

Professor Doutor Carlos Manuel Freire Cavaleiro  
Professor auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

## **Agradecimentos**

Ao terminar este trabalho, não posso deixar de agradecer a todas as pessoas que ajudaram à sua realização e que me apoiaram nesta fase crucial do meu curso.

Às, Dra. Isabel Lapa e Professora Rosário Domingues, minhas orientadoras, pela disponibilidade, pela orientação científica, pelos conselhos e ajuda prestada.

Á Bluepharma, em especial ao Professor Sérgio Simões, pelo modo como que me acolheu e por me ter possibilitado a realização deste estágio.

À Dra. Sonia Alfar pela experiência e conhecimentos transmitidos.

Ao Laboratório I&D (Investigação e Desenvolvimento) da Bluepharma pelo carinho com que me receberam, pela boa disposição e espírito de grupo, pela partilha de conhecimentos e experiências e sobretudo pela compreensão e paciência durante todo o meu estágio.

Aos colegas e amigos pelo imprescindível apoio, confiança e amizade.

Aos meus pais e irmãos pelo apoio incondicional e toda a paciência, não apenas durante este estágio mas ao longo de toda a minha formação académica.

Ao André pela felicidade e bons momentos que me proporcionou, por estar sempre presente e pela ajuda nos piores momentos.

A todos muito obrigada!

**Palavras-chave**

Cromatografia Líquida de Alta Pressão · Desenvolvimento analítico · Validação analítica · Análise de conteúdo

**Resumo**

O presente trabalho descreve o desenvolvimento e validação de um método analítico para análise de conteúdo de substância activa em comprimidos revestidos de Blue025 (formulação final a ser comercializada).

O método foi desenvolvido tomando como ponto de partida as condições definidas pelo fabricante da substância activa, sendo que a melhor separação de todos os componentes da amostra foi conseguida com uma coluna Zorbax SB-Phenyl, 3.5µm, 150 x 4.6mm e recorrendo a um programa de gradiente de duas fases móveis, com um fluxo constante e igual a 1.0 ml/min.

A validação do método foi realizada de acordo com as diretrizes ICH. Foram realizados testes de filtração, seletividade, linearidade, rigor, precisão, robustez e estabilidade. Após os testes de filtração verificou-se que para a preparação das amostras deve ser utilizada a centrifugação a 4000rpm durante 10min. Não foi observada interferência de qualquer constituinte da amostra na análise de Blue025, pelo que ficou demonstrado tratar-se de um método seletivo. O método apresenta uma resposta linear para uma gama de concentrações de 60% a 140% (100%  $\Leftrightarrow$  concentração de Blue025 de 0.2mg/ml), tanto para as soluções padrão como para as amostras de fórmula reconstituída. Os testes de rigor demonstraram que o método é rigoroso e através da avaliação da precisão do sistema verificou-se que o sistema cromatográfico usado para a análise é preciso na aplicação do método analítico. Tanto as soluções padrão como as amostras apresentaram uma estabilidade de pelo menos 48h nas

condições ambiente. O método demonstrou ser robusto para volumes de injeção de 5 $\mu$ L e 15 $\mu$ L, para fluxos de 0.8ml/min. e para temperaturas da coluna de 36°C e 44°C. Neste sentido, o método definido para avaliação do conteúdo de substância ativa em comprimidos revestidos de Blue025 está adequado para a finalidade a que foi proposto, e portanto é válido para a referida análise.

**Keywords**

High-performance liquid chromatography · Analytical Development · Analytical Validation · Assay analysis

**Abstract**

This work describes the development and validation of an analytical method defined to be used for the evaluation of assay of drug substance in Blue025 film-coated tablets (final formulation to be marketed).

The method was developed using the conditions set by drug substance manufacturer as a starting point, and the best separation of all components of the sample was achieved with a Zorbax SB-Phenyl, 3.5 $\mu$ m, 150 $\times$ 4.6mm column and using a program gradient of two mobile phases with a constant flow of 1.0ml/min.

The method validation was performed according to ICH guidelines. Filtration, selectivity, linearity, accuracy, precision, robustness and stability tests were performed. Filtration tests showed that centrifugation at 4000rpm for 10min. should be used for the samples preparation. There was no interference of any constituent of the sample in Blue025 analysis, demonstrating that the method is selective. The method shows a linear response for a range of concentrations from 60% to 140% (100%  $\Leftrightarrow$  concentration of Blue025 of 0.2mg/ml) for standard solutions and for reconstituted formula samples. The accuracy tests demonstrated that the method is rigorous and the evaluation of the system precision showed that the chromatographic system used is accurate applying the analytical method. Standard solutions and reconstituted formula samples are stable at least 48 hours at room conditions. The method proved to be robust for injection volumes of 5 $\mu$ L and 15 $\mu$ L, flow of 0.8mL/min. and for column temperatures of 36 $^{\circ}$ C and 44 $^{\circ}$ C.

In this sense, the method defined for the assay evaluation of the drug substance in Blue025 film-coated tablets complies with its purpose and therefore is valid for the referred analysis.



---

# Índice

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Índice de Figuras .....</b>                             | <b>12</b> |
| <b>Índice de Tabelas .....</b>                             | <b>15</b> |
| <b>Glossário .....</b>                                     | <b>18</b> |
| <br>   |           |
| <b>1. Introdução .....</b>                                 | <b>21</b> |
| 1.1. Desenvolvimento de um novo produto farmacêutico ..... | 22        |
| 1.1.1. Dossier Common Technical Document .....             | 23        |
| 1.2. Desenvolvimento de um método analítico por HPLC ..... | 26        |
| 1.2.1. Cromatografia líquida de alta pressão .....         | 27        |
| 1.2.1.1. Cromatografia de fase normal .....                | 28        |
| 1.2.1.2. Cromatografia de fase reversa .....               | 29        |
| 1.2.1.3. Equipamento de cromatografia líquida .....        | 29        |
| 1.2.1.3.1. Fase móvel .....                                | 30        |
| 1.2.1.3.2. Bomba .....                                     | 30        |
| 1.2.1.3.3. Sistema de eluição de gradiente .....           | 31        |
| 1.2.1.3.4. Injetor .....                                   | 31        |
| 1.2.1.3.5. Coluna cromatográfica .....                     | 31        |
| 1.2.1.3.6. Pré-coluna .....                                | 32        |
| 1.2.1.3.7. Forno da coluna .....                           | 32        |
| 1.2.1.3.8. Detetores .....                                 | 33        |
| 1.2.1.3.9. Reciclador .....                                | 33        |
| 1.2.1.3.10. Sistema de aquisição e controlo .....          | 34        |
| 1.2.2. Definição das condições cromatográficas .....       | 34        |
| 1.2.3. Degradação forçada .....                            | 35        |
| 1.3. Validação de um método analítico .....                | 37        |
| 1.3.1. Parâmetros analíticos de validação .....            | 38        |
| 1.3.1.1. Seletividade ou especificidade .....              | 38        |
| 1.3.1.2. Linearidade .....                                 | 38        |
| 1.3.1.3. Gama de trabalho .....                            | 39        |
| 1.3.1.4. Rigor .....                                       | 39        |
| 1.3.1.5. Precisão .....                                    | 40        |
| 1.3.1.5.1. Repetibilidade .....                            | 40        |

---

|  |           |
|--|-----------|
| 1.3.1.5.2. Precisão intermédia .....                 | 40        |
| 1.3.1.5.3. Reprodutibilidade .....                   | 41        |
| 1.3.1.6. Robustez.....                               | 41        |
| 1.3.1.6.1. Estabilidade das soluções .....           | 41        |
| 1.3.1.6.2. Filtração.....                            | 42        |
| 1.3.2. Testes de conformidade do sistema.....        | 42        |
| 1.3.2.1. Tempo de retenção .....                     | 43        |
| 1.3.2.2. Resolução .....                             | 43        |
| 1.3.2.3. Fator de simetria.....                      | 43        |
| 1.3.2.4. Número de pratos teóricos .....             | 44        |
| 1.3.2.5. Fator de capacidade.....                    | 46        |
| 1.3.2.6. Precisão/repetibilidade de injeção .....    | 46        |
| 1.4. Blue025 .....                                   | 46        |
| <b>2. Material e métodos .....</b>                   | <b>48</b> |
| 2.1. Reagentes e produtos .....                      | 48        |
| 2.2. Instrumentação analítica .....                  | 48        |
| 2.3. Material auxiliar.....                          | 49        |
| 2.4. Condições cromatográficas .....                 | 49        |
| 2.5. Procedimento analítico.....                     | 50        |
| 2.5.1. Preparação das soluções .....                 | 51        |
| 2.5.2. Conformidade do sistema.....                  | 53        |
| <b>3. Resultados e discussão.....</b>                | <b>55</b> |
| 3.1. Desenvolvimento do método analítico.....        | 55        |
| 3.1.1. Definição das condições cromatográficas ..... | 56        |
| 3.1.2. Definição da concentração de trabalho .....   | 70        |
| 3.2. Validação do método analítico.....              | 81        |
| 3.2.1. Filtração.....                                | 83        |
| 3.2.2. Seletividade/especificidade .....             | 91        |
| 3.2.3. Linearidade.....                              | 98        |
| 3.2.4. Rigor.....                                    | 101       |
| 3.2.5. Precisão .....                                | 102       |
| 3.2.5.1. Repetibilidade .....                        | 102       |
| 3.2.5.2. Precisão intermédia .....                   | 103       |

---

---

|   |            |
|---|------------|
| 3.2.5.3. Precisão do sistema .....            | 104        |
| 3.2.6. Estabilidade das soluções .....        | 106        |
| 3.2.7. Robustez.....                          | 107        |
| 3.2.8. Testes de conformidade do sistema..... | 113        |
| 3.2.9. Avaliação dos resultados.....          | 114        |
| <b>4. Conclusão .....</b>                     | <b>116</b> |
| <b>5. Bibliografia.....</b>                   | <b>118</b> |

## Índice de Figuras

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Diagrama representativo da organização de um CTD [12, 16].....  | 25 |
| <b>Figura 2.</b> Equipamento tipo de HPLC [33]. .....  | 30 |
| <b>Figura 3.</b> Bomba de HPLC. ....   | 30 |
| <b>Figura 4.</b> Injetor de HPLC. ....   | 31 |
| <b>Figura 5.</b> Colunas de HPLC. ....   | 32 |
| <b>Figura 6.</b> Cromatograma ilustrativo para o cálculo do fator de simetria [28]. ....   | 44 |
| <b>Figura 7.</b> Cromatograma ilustrativo para o cálculo do número de pratos teóricos [28].  | 45 |
| <b>Figura 8.</b> Influência de N na resposta da coluna cromatográfica [43]. ....   | 45 |
| <b>Figura 9.</b> Cromatograma da substância ativa a 100% (0.4mg/ml). ....  | 56 |
| <b>Figura 10.</b> Cromatograma da solução do branco (solvente). ....   | 57 |
| <b>Figura 11.</b> Cromatograma de amostra de substância ativa a 0.4mg/mL degradada com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% a 60°C, 2horas. ....  | 58 |
| <b>Figura 12.</b> Cromatograma de amostra de substância ativa a 0.4mg/mL degradada com HCl 10M a 60°C, 2horas. ....                            | 58 |
| <b>Figura 13.</b> Cromatograma de amostra de substância ativa a 0.4mg/mL degradada com NaOH 0.1M a 60°C, 24horas. ....                         | 58 |
| <b>Figura 14.</b> Cromatograma da solução do branco (solvente). ....   | 60 |
| <b>Figura 15.</b> Cromatograma da amostra de substância ativa a 0.4mg/mL degradada com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% a 60°C, 2horas. ....  | 60 |
| <b>Figura 16.</b> Cromatograma da amostra de substância activa a 0.4mg/mL degradada com HCl 10M a 60°C, 2horas. ....                           | 60 |
| <b>Figura 17.</b> Cromatograma da amostra de substância activa a 0.4mg/mL degradada com NaOH 0.1M a 60°C, 24horas. ....                        | 61 |
| <b>Figura 18.</b> Cromatograma da solução do branco (solvente). ....   | 62 |
| <b>Figura 19.</b> Cromatograma da amostra de substância ativa a 0.4mg/mL degradada com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% a 60°C, 2horas. ....  | 62 |
| <b>Figura 20.</b> Cromatograma da amostra de substância ativa a 0.4mg/mL degradada com HCl 10M a 60°C, 2horas. ....                            | 63 |
| <b>Figura 21.</b> Cromatograma da solução do branco (solvente). ....   | 64 |
| <b>Figura 22.</b> Cromatograma da amostra de substância activa a 0.4mg/mL degradada com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% a 60°C, 2horas. .... | 64 |

---

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 23.</b> Cromatograma da amostra de substância activa a 0.4mg/mL degradada com HCl 10M a 60°C, 2horas.....   | 65 |
| <b>Figura 24.</b> Cromatograma da amostra de substância activa a 0.4mg/mL degradada com NaOH 0.1M a 60°C, 24horas.....  | 65 |
| <b>Figura 25.</b> Cromatograma da solução do branco (solvente).....   | 66 |
| <b>Figura 26.</b> Cromatograma da amostra de substância activa a 0.4mg/mL degradada com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% a 60°C, 2horas.....                   | 66 |
| <b>Figura 27.</b> Cromatograma da amostra de substância activa a 0.4mg/mL degradada com HCl 10M a 60°C, 2horas.....   | 67 |
| <b>Figura 28.</b> Cromatograma da amostra de substância activa a 0.4mg/mL degradada com NaOH 0.1M a 60°C, 24horas.....  | 67 |
| <b>Figura 29.</b> Cromatograma da solução do branco (solvente).....   | 68 |
| <b>Figura 30.</b> Cromatograma da amostra de substância activa a 0.4mg/mL degradada com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% a 80°C, 20horas.....                  | 68 |
| <b>Figura 31.</b> Cromatograma da amostra de substância activa a 0.4mg/mL degradada com HCl 10M a 80°C, 20horas.....  | 69 |
| <b>Figura 32.</b> Cromatograma da amostra de substância activa a 0.4mg/mL degradada com NaOH 1M a 80°C, 26horas.....  | 69 |
| <b>Figura 33.</b> Cromatograma da solução de substância activa a 0.2% (8E-4 mg/ml). ....  | 69 |
| <b>Figura 34.</b> Cromatograma da solução de substância activa a 100% (0.4mg/ml). ....  | 70 |
| <b>Figura 35.</b> Resultados da linearidade para o nível de impurezas relativas à concentração de substância activa de 0.4mg/mL (100%). ....                    | 71 |
| <b>Figura 36.</b> Resultados da linearidade de conteúdo relativa à concentração de trabalho de 0.4mg/mL de Blue025 (100%); volume de injeção: 20µL. ....        | 72 |
| <b>Figura 37.</b> Resultados da linearidade para o nível de impurezas relativas a uma concentração de Blue025 de 0.4mg/mL (100%); volume de injeção: 10µL. .... | 73 |
| <b>Figura 38.</b> Resultados da linearidade de conteúdo relativa à concentração de trabalho de 0.4mg/mL de Blue025 (100%); volume de injeção: 10µL.....         | 74 |
| <b>Figura 39.</b> Resultados da linearidade de conteúdo relativa à concentração de trabalho de 0.4mg/mL de Blue025 (100%); volume de injeção: 5µL. ....         | 75 |
| <b>Figura 40.</b> Resultados da linearidade de conteúdo relativa à concentração de trabalho de 0.2mg/mL de Blue025 (100%); volume de injeção: 10µL. ....        | 77 |
| <b>Figura 41.</b> Cromatograma da solução de branco (solvente) não filtrado. ....   | 85 |
| <b>Figura 42.</b> Cromatograma da solução de branco (solvente) filtrado com PTFE VWR. ....  | 85 |

---

---

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura 43.</b> Cromatograma da solução de branco (solvente) filtrado com PP VWR.....  | 85  |
| <b>Figura 44.</b> Cromatograma da solução de branco (solvente) filtrado com PTFE Simplepure.....   | 86  |
| <b>Figura 45.</b> Cromatograma da solução de branco (solvente) centrifugado a 4000rpm durante 10min.....                                   | 86  |
| <b>Figura 46.</b> Cromatograma e avaliação da pureza do pico da solução padrão (0.2mg/mL) não filtrada/centrifugada.....                   | 87  |
| <b>Figura 47.</b> Cromatograma e avaliação da pureza do pico da solução padrão (0.2mg/mL) filtrada com PTFE VWR.....                       | 87  |
| <b>Figura 48.</b> Cromatograma e avaliação da pureza do pico da solução padrão (0.2mg/mL) filtrada com PP VWR.....                         | 88  |
| <b>Figura 49.</b> Cromatograma e avaliação da pureza do pico da solução padrão (0.2mg/mL) filtrada com PTFE Simplepure.....                | 89  |
| <b>Figura 50.</b> Cromatograma obtido e avaliação da pureza do pico da solução padrão (0.2mg/mL) centrifugada a 4000rpm durante 10min..... | 89  |
| <b>Figura 51.</b> Cromatograma da solução do branco (solvente).....  | 92  |
| <b>Figura 52.</b> Cromatograma da solução de SA a 100% (C = 0.2mg/mL de substância ativa).....   | 92  |
| <b>Figura 53.</b> Cromatograma da solução de fórmula reconstituída após centrifugação (C = 0.2mg/mL de substância ativa).....              | 93  |
| <b>Figura 54.</b> Cromatograma da solução de mistura de excipientes após centrifugação... ..   | 93  |
| <b>Figura 55.</b> Cromatograma da solução de mistura de impurezas ao nível da especificação, 0.2% (impureza RRT0.98 e Impureza A).....     | 94  |
| <b>Figura 56.</b> Cromatograma da solução de substância ativa a 100% com Impurezas RRT0.98 e A a 0.2%.....                                 | 94  |
| <b>Figura 57.</b> Cromatograma da solução teste (SA a 100% + Impureza RRT 0.98 a 0.2% + Impureza A a 0.2% + excipientes).....              | 95  |
| <b>Figura 58.</b> Cromatograma da solução de identificação/resolução.....  | 95  |
| <b>Figura 59.</b> Avaliação da pureza do pico de substância ativa na solução teste.....  | 96  |
| <b>Figura 60.</b> Representação gráfica/resultados da linearidade para as soluções padrão ..   | 99  |
| <b>Figura 61.</b> Representação gráfica/resultados da linearidade para as soluções de fórmula reconstituída.....                           | 100 |

---

## Índice de Tabelas

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1.</b> Tipos de ligantes das fases estacionárias [27]. .....  | 32 |
| <b>Tabela 2.</b> Parâmetros analisados para a validação de métodos de identificação, de conteúdo e testes de impurezas [20]. .....                | 37 |
| <b>Tabela 3.</b> Reagentes e produtos utilizados na execução do trabalho e respetiva origem. ....   | 48 |
| <b>Tabela 4.</b> Equipamentos e respetivos modelos, utilizados durante o trabalho. ....   | 48 |
| <b>Tabela 5.</b> Condições cromatográficas do método (utilizadas durante a validação).....  | 49 |
| <b>Tabela 6.</b> Condições analíticas de HPLC (método da substância ativa).....   | 55 |
| <b>Tabela 7.</b> Condições de HPLC testadas (com base no definido para análise da substância ativa). ....   | 57 |
| <b>Tabela 8.</b> Condições de HPLC testadas.....  | 59 |
| <b>Tabela 9.</b> Condições de HPLC testadas.....  | 61 |
| <b>Tabela 10.</b> Condições de HPLC testadas.....   | 63 |
| <b>Tabela 11.</b> Alteração no gradiente. ....  | 64 |
| <b>Tabela 12.</b> Nova alteração do gradiente. ....   | 66 |
| <b>Tabela 13.</b> Alterações no gradiente. ....   | 68 |
| <b>Tabela 14.</b> Resultados da linearidade para o nível de impurezas (100% de Blue025 = 0.4mg/mL).....   | 71 |
| <b>Tabela 15.</b> Avaliação dos resultados da linearidade para o nível das impurezas (100% de Blue025 = 0.4mg/mL; volume de injeção de 20µL)..... | 71 |
| <b>Tabela 16.</b> Resultados da linearidade para conteúdo (100% Blue025 = 0.4mg/mL; volume de injeção de 20µL). ....                              | 72 |
| <b>Tabela 17.</b> Avaliação dos resultados da linearidade para conteúdo (100% de Blue025 = 0.4mg/mL; volume de injeção de 20µL) .....             | 72 |
| <b>Tabela 18.</b> Resultados da linearidade para o nível de impurezas (100% de Blue025 = 0.4mg/mL; volume de injeção: 10µL). ....                 | 73 |
| <b>Tabela 19.</b> Avaliação dos resultados da linearidade ao nível das impurezas (100% de Blue025 = 0.4mg/mL; volume de injeção de 10µL). ....    | 73 |
| <b>Tabela 20.</b> Resultados da linearidade de conteúdo (100% de Blue025 = 0.4mg/mL) ..   | 74 |
| <b>Tabela 21.</b> Avaliação dos resultados da linearidade para conteúdo (100% de Blue025 = 0.4mg/mL; volume de injeção de 10µL). ....             | 74 |

---

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tabela 22.</b> Resultados da linearidade de conteúdo (100% de Blue025 = 0.4mg/mL) ..   | 75  |
| <b>Tabela 23.</b> Avaliação dos resultados da linearidade para conteúdo (100% de Blue025 = 0.4mg/mL; volume de injeção de 5µL). .....   | 75  |
| <b>Tabela 24.</b> Resultados da linearidade de conteúdo relativa a 100% Blue025 = 0.2mg/mL .....  | 76  |
| <b>Tabela 25.</b> Avaliação dos resultados da linearidade para conteúdo (100% de Blue025 = 0.2mg/mL; volume de injeção de 10µL). .....  | 77  |
| <b>Tabela 26.</b> Condições analíticas finais.....  | 78  |
| <b>Tabela 27.</b> Resultados dos testes de seletividade, linearidade, rigor, precisão, estabilidade e filtração realizados para avaliação da performance do método de análise de conteúdo de substância ativa em comprimidos revestidos de Blue025.....                             | 79  |
| <b>Tabela 28.</b> Resultados dos testes de seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, estabilidade e filtração realizados para avaliação da performance do método para análise de substâncias relacionadas em comprimidos revestidos de Blue025..... | 80  |
| <b>Tabela 29.</b> Critérios de aceitação dos ensaios de validação (com base no protocolo de validação analítica).....   | 82  |
| <b>Tabela 30.</b> Resultados das soluções não filtradas, filtradas com filtros PTFE VWR, PP VWR e PTFE Simplepure com 0.45µm e centrifugadas. ....  | 84  |
| <b>Tabela 31.</b> Parâmetros de performance cromatográfica avaliados para o pico de substância ativa.....   | 96  |
| <b>Tabela 32.</b> Resultados da interferência dos excipientes no pico da substância ativa na solução de fórmula reconstituída.....  | 97  |
| <b>Tabela 33.</b> Resultado da interferência dos excipientes e das impurezas no pico da substância ativa na solução teste. ....   | 97  |
| <b>Tabela 34.</b> Avaliação dos resultados obtidos para avaliação da seletividade.....  | 98  |
| <b>Tabela 35.</b> Resultados relativos à linearidade.....   | 99  |
| <b>Tabela 36.</b> Avaliação dos resultados obtidos na linearidade. ....   | 100 |
| <b>Tabela 37.</b> Resultados obtidos na avaliação do rigor. ....  | 101 |
| <b>Tabela 38.</b> Avaliação dos resultados obtidos nos testes de rigor.....   | 102 |
| <b>Tabela 39.</b> Resultados de precisão de sistema obtidos para as soluções padrão (concentração teórica de Blue025 de 0.2mg/mL).....  | 104 |
| <b>Tabela 40.</b> Resultados de precisão de sistema obtidos para as amostras de fórmula reconstituída (concentração teórica de Blue025 de 0.2mg/mL).....  | 105 |

---



---

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabela 41.</b> Avaliação dos resultados obtidos nos testes de precisão do sistema. ....   | 105 |
| <b>Tabela 42.</b> Resultados de estabilidade das soluções padrão analisadas aos tempos 0h, 24h e 48h .....   | 106 |
| <b>Tabela 43.</b> Resultados de estabilidade das amostras de fórmula reconstituída analisadas aos tempos 0h, 24h e 48h. ....   | 107 |
| <b>Tabela 44.</b> Avaliação dos resultados obtidos nos testes de estabilidade. ....  | 107 |
| <b>Tabela 45.</b> Parâmetros cromatográficos avaliados durante os testes de robustez.....  | 108 |
| <b>Tabela 46.</b> Resolução obtida para a solução de identificação/resolução em cada condição testada.....   | 108 |
| <b>Tabela 47.</b> Resultados dos testes realizados no estudo da robustez. Avaliação do tempo de retenção, simetria, $K'$ , N e RF para o pico de Blue025 nas soluções padrão. .... | 109 |
| <b>Tabela 48.</b> Resultados da recuperação das soluções teste, para cada condição avaliada. ....  | 112 |
| <b>Tabela 49.</b> Avaliação dos resultados obtidos nos testes de robustez.....   | 113 |
| <b>Tabela 50.</b> Resultados dos testes de conformidade do sistema. Avaliação de N, S, R e da repetibilidade da resposta.....  | 114 |
| <b>Tabela 51.</b> Avaliação dos resultados obtidos na validação do método analítico.....   | 114 |

---

## Glossário

### ***Abreviaturas***

- AIM – Autorização de Introdução no Mercado
- CQ – Controlo de Qualidade
- CTD – Documento Técnico Comum (do inglês, *Common Technical Document*)
- DCI – Denominação comum internacional
- EMA - Agencia Europeia do Medicamento (do inglês *European Medicines Agency*)
- EUA – Estados Unidos da América
- FDA – Autoridade Americana que regulamenta os produtos Farmacêuticos e Alimentares (do inglês *Food and Drug Administration*)
- GC – Cromatografia gasosa (do inglês *Gas Chromatography*)
- GMP – Boas Práticas de Fabrico (do inglês *Good manufacturing practices*)
- HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Pressão (do inglês, *High performance liquid chromatography*)
- HR – Humidade relativa
- ICH – Conferência Internacional de Harmonização (do inglês, *International Conference on Harmonization*)
- ID – Investigação e desenvolvimento
- INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.
- LD – limite de deteção
- LQ – limite de quantificação
- MG – Medicamento Genérico
- MS – Espectroscopia de Massa (do inglês *Mass Spectrometry*)
- PDA – detetor de fotodiodos (do inglês *Photo Diode Array detector*)
- PDG – Grupo de discussão farmacopeia (do inglês *Pharmacopoeial Discussion Group*)
- Ph. Eur. - Farmacopeia Europeia (do inglês, *European Pharmacopoeia*)
- RP – fase reversa (do inglês, *reversed phase*)
- RSD – Desvio padrão relativo (do inglês, *Relative Standard Deviation*)
- S.A. – Sociedade anónima
- SA – Substância ativa
- SOP – procedimento padrão (do inglês, *Standard Operating Procedure*)
- USP – Farmacopeia dos Estados Unidos (do inglês *United States Pharmacopoeia*)
-

**Notação geral**

$\mu\text{L}$  - microlitros

$\mu\text{m}$  – micrómetros

A – Área do pico

$A_{\text{RF}}$  - Área do pico da substância ativa na fórmula reconstituída

$A_{\text{st}}$  - Área do pico da substância ativa na solução padrão

C – Concentração (mg/mL)

$C_{\text{RF}}$  - Concentração da substância ativa na fórmula reconstituída (mg/mL)

$C_{\text{st}}$  - Concentração da substância ativa na solução padrão (mg/mL)

H – Altura do pico

h – horas

IC – Intervalo de confiança

$K'$  – Fator de capacidade

m - declive

M - molaridade

mg - miligramas

min. – minutos

mL – mililitros

mm – milímetros

MRF – média dos fatores de resposta

$m_{\text{RF}}$  – declive obtido na linearidade das amostras de fórmula reconstituída

$m_{\text{st}}$  - declive obtido na linearidade das solução padrão

nm - nanômetros

N – Número de pratos teóricos

R – Resolução

RF – Fator de resposta (do inglês, *Response Factor*)

rpm – rotações por minuto

RT – tempo de retenção (do inglês, *retention time*)

S - simetria

S/R – razão sinal ruído

UV – Ultravioleta

Vis – Vísivel

$W_h$  – Largura do pico a meia altura

$W_{0.05}$  – Largura do pico a uma altura de 5%

## 1. Introdução

Como consequência do impacto na saúde pública, a actividade da indústria farmacêutica encontra-se altamente regulamentada, tendo de cumprir normas, diretrizes e legislação impostas por entidades reguladoras, como a EMA (do inglês *European Medicines Agency*) e a FDA (do inglês *Food and Drug Administration*).

De forma a proteger e não colocar em risco os consumidores, quer pela adulteração do produto, pela falta ou excesso de substância ativa ou mesmo por uma má rotulagem, a FDA, em 1962, desenvolveu as Boas Práticas de Fabrico, as GMP (do inglês *Good Manufacturing Practice*). Estas consistem num conjunto de normas, diretrizes e recomendações, que a Indústria Farmacêutica tem de cumprir durante todo o processo de desenvolvimento, fabrico e controlo de medicamentos, para garantir um elevado grau de qualidade e segurança [1-5].

Actualmente, os medicamentos são desenvolvidos para mercados globais e nesse sentido as GMPs são normas reconhecidas internacionalmente e são exigidas por vários países para a importação e comercialização de medicamentos, tendo no entanto cada país, autoridades reguladoras próprias. Assim, em 1990 foi fundada a PDG (do inglês *Pharmacopoeial Discussion Group*). A PDG é composta por farmacêuticos e autoridades reguladoras da Europa, Estados Unidos e Japão, e no sentido de harmonizar os procedimentos, os critérios de aceitação e a interpretação e aplicação de normas e legislações nestas regiões, desenvolveu um conjunto de recomendações que são divulgadas pela Conferência Internacional de Harmonização (ICH). A ICH tem assim a missão de, com uma maior harmonização, assegurar o desenvolvimento de medicamentos de alta qualidade, seguros e eficazes e reduzir os custos inerentes à indústria farmacêutica, podendo, no entanto, haver ocasiões em que não existe um único texto correspondente às três regiões da PDG [1-3, 5-9].

Devido ao constante desenvolvimento tecnológico e científico, todas estas directrizes e normas se encontram em constante actualização.

As necessidades mundiais no que diz respeito à saúde das populações têm vindo a impulsionar a actividade da indústria farmacêutica no que diz respeito à investigação e

produção de novos medicamentos, nomeadamente ao desenvolvimento de medicamentos genéricos.

Os medicamentos genéricos apresentam igualmente elevada qualidade e segurança, sendo comercializados, a preços mais baixos do que os medicamentos de referência.

Neste contexto, a Bluepharma, Indústria Farmacêutica, S.A. sediada em Coimbra, apostou na produção e desenvolvimento de medicamentos genéricos, desenvolvendo novos genéricos quer para distribuição nacional quer internacional.

### 1.1. Desenvolvimento de um novo produto farmacêutico

Um medicamento é toda a substância ou composição apresentada como possuindo propriedades curativas ou preventivas das doenças e dos seus sintomas, do homem ou do animal, com vista a estabelecer um diagnóstico médico ou a restaurar, corrigir ou modificar as suas funções orgânicas. O processo de introdução no mercado de um novo medicamento é muito longo e bastante complexo, tendo de passar por várias fases.

A introdução de um medicamento genérico no mercado é, no entanto, um processo mais simples, rápido e barato (desenvolvimento galénico, desenvolvimento analítico, estudos de bioequivalência, estudos de estabilidade, ...) uma vez que não inclui a investigação e descoberta de um novo princípio ativo.

Um medicamento genérico é um medicamento com a mesma substância activa, forma farmacêutica e dosagem, e com a mesma indicação terapêutica que o medicamento original, de marca, que serviu de referência. São identificados pela Denominação Comum Internacional (DCI) das substâncias ativas, seguida do nome do titular da Autorização de Introdução no Mercado (AIM) ou de um nome de fantasia, da dosagem, da forma farmacêutica e da sigla «MG», inserida na embalagem exterior do medicamento [1, 10].

O desenvolvimento de um produto genérico envolve vários passos:

- Desenvolvimento da formulação
- Desenvolvimento e validação de métodos analíticos
- Produção de lotes piloto
- Validação do processo de fabrico

- Estudos de estabilidade
- Estudos de bioequivalência

Toda esta informação terá depois de ser compilada e irá fazer parte do módulo 3 de um dossier correspondente ao Documento Técnico Comum (CTD – do inglês *Common Technical Document*), que posteriormente será submetido às autoridades reguladoras para aprovação desse medicamento [11-14].

### 1.1.1. Dossier *Common Technical Document*

Depois de desenvolvido o novo medicamento, é necessário proceder à elaboração de um dossier, que será posteriormente submetido às autoridades reguladoras de cada País (INFARMED, em Portugal) para o pedido de autorização de comercialização. Cada região (Europa, EUA e Japão) tem as suas próprias exigências para a organização e apresentação dos seus relatórios e resultados no dossier. Assim, a fim de evitar a necessidade de compilar diferentes dossiers, reduzir o tempo e os recursos necessários, houve uma harmonização considerável entre as três regiões no que diz respeito aos requisitos técnicos para o registo de produtos farmacêuticos, desenvolvendo-se o Documento Técnico Comum (CTD – do inglês *Common Technical Document*).

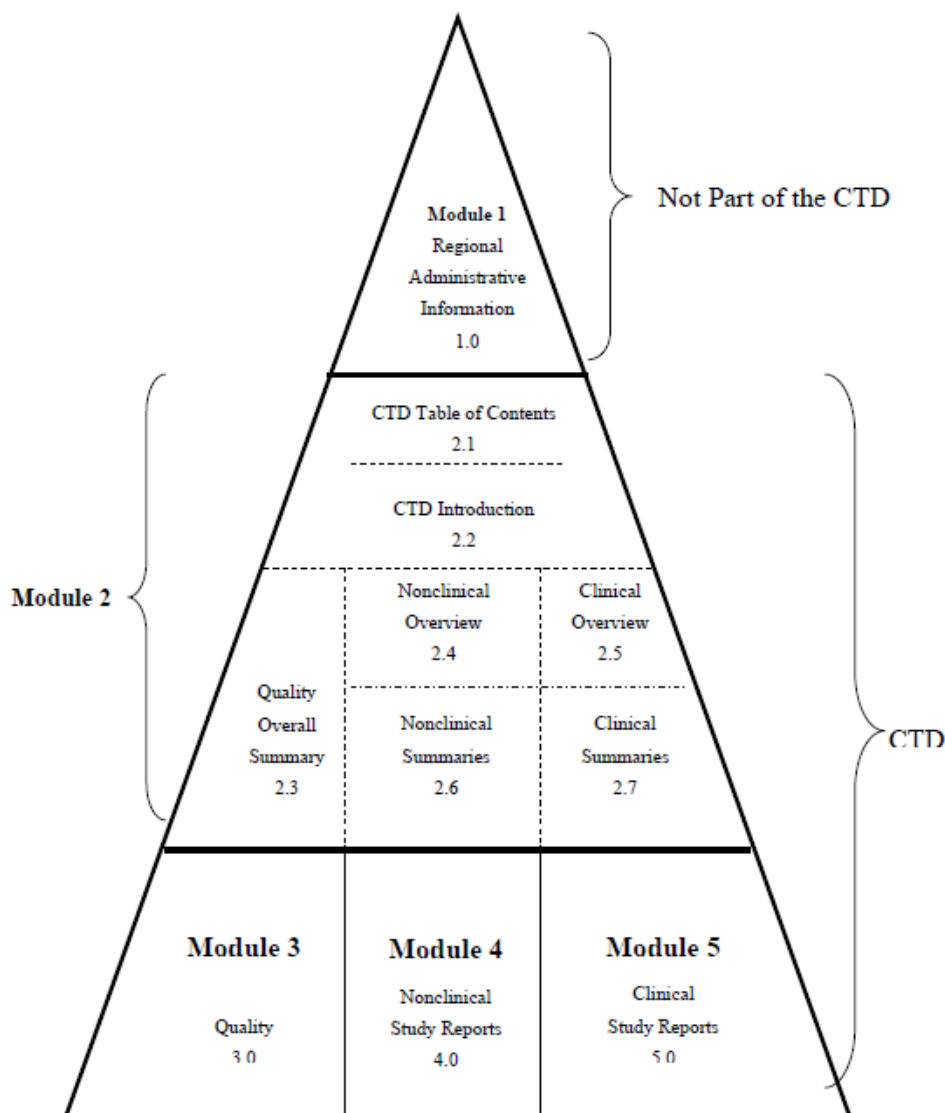
O CTD é um formato internacionalmente acordado para a preparação do dossier a ser submetido às autoridades reguladoras nas três regiões. Indica um formato apropriado para apresentação dos dados necessários a uma submissão, não dando contudo informação sobre o conteúdo de um dossier nem dos estudos e dados necessários para uma aprovação. As necessidades regionais podem exigir diferentes conteúdos no dossier apresentado, o que significa que o dossier submetido pode não ser igual em todas as regiões.

O CTD está organizado em cinco módulos, dos quais o módulo 1 é específico da região e os módulos 2, 3, 4 e 5 são comuns às três regiões:

- Módulo 1 – Informação administrativa e informação de prescrição – deverá conter os documentos específicos para cada região, formulário da candidatura, características do produto, rotulagem e folheto informativo, etc.

- Módulo 2 – Resumo do CTD – este módulo deve começar com uma introdução geral ao produto, incluindo classe farmacológica, modo de ação e uso clínico, sendo que esta não deve exceder uma página. Deve conter sete secções na seguinte ordem:
  - Índice do CTD
  - Introdução
  - Resumo geral da qualidade
  - Visão geral não clínica
  - Visão geral clínica
  - Resumo não clínico
  - Resumo clínico
- Módulo 3 – Qualidade – contém toda a documentação química, farmacêutica e biológica; dá informações sobre a qualidade do medicamento
- Módulo 4 – Relatórios de estudos não clínicos – deve incluir a informação relacionada com os testes farmacológicos e toxicológicos realizados
- Módulo 5 – Relatórios de estudos clínicos – deve conter a documentação dos ensaios clínicos realizados com o medicamento [11-18].





**Figura 1.** Diagrama representativo da organização de um CTD [12, 16].

Para o processo de desenvolvimento de um novo medicamento genérico, no sentido de demonstrar a sua qualidade, há necessidade de desenvolver métodos analíticos para avaliação da pureza, conteúdo da substância ativa e para a sua identificação, entre outros.

O trabalho proposto para o estágio no âmbito do Mestrado em Bioquímica diz respeito ao desenvolvimento e validação do método analítico para a análise de conteúdo de substância ativa em comprimidos revestidos de Blue025<sup>1</sup> (formulação final a ser comercializada), o qual será posteriormente incluído no módulo 3 do dossier CTD deste

<sup>1</sup> O Projecto será assim denominado por questões de protecção de informação

medicamento que será submetido às autoridades para aprovação da sua introdução no mercado.

## 1.2. Desenvolvimento de métodos analíticos por HPLC

Qualquer novo produto farmacêutico tem de ser submetido a uma rigorosa avaliação da sua actividade farmacológica, eficácia e segurança, que reflete a sua qualidade, e apenas podem ser comercializados aqueles cuja relação risco-benefício (efeitos secundários / efeito terapêutico) justifique a sua aplicação médica. A qualidade é definida como a adequabilidade de um produto farmacêutico para o fim pretendido, e apesar de ainda ser um paradigma, é aferida com base em três atributos: identidade, dosagem e pureza. Os testes de identificação, conteúdo e pureza (quantificação de impurezas) permitem reunir as informações necessárias para demonstrar a qualidade de um medicamento [6, 19].

Os testes de identificação destinam-se a garantir a identidade de um analito numa amostra. Isto é normalmente conseguido através da comparação de uma propriedade da amostra à do padrão de referência.

As análises de impurezas avaliam com precisão as características de pureza da amostra.

Os procedimentos de conteúdo pretendem quantificar o analito presente na amostra em estudo. No contexto deste trabalho, a análise de conteúdo representa uma determinação quantitativa do principal componente de uma amostra – substância ativa [20].

Nos últimos anos, os métodos cromatográficos adquiriram uma importância significativa e têm sido muito utilizados na Indústria Farmacêutica, na análise qualitativa e quantitativa de medicamentos [21]. O termo cromatografia é baseado na palavra grega “croma” que significa cor e “grafia” referente a escrita e foi usado a primeira vez por Tswett quando separou bandas coloridas de pigmentos de plantas numa coluna cromatográfica fazendo passar um solvente líquido, fase móvel, por um pó absorvente [22]. A cromatografia é uma técnica que permite a separação física dos componentes de uma amostra que percorrem um meio adequado com o qual interatuam fisicamente, fase estacionária, arrastados por um fluido, fase móvel. A separação desses

componentes é possível devido à diferença das velocidades no percurso dos componentes arrastados pelo solvente, que dependem das interações de cada um dos componentes com a fase estacionária, os quais são dependentes da carga, tamanho molecular, polaridade, afinidade específica ou solubilidade dos diferentes compostos.

Hoje em dia existem vários tipos de cromatografia, que se podem classificar de acordo com vários critérios, por exemplo com base no tipo de fase móvel, como a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida. [22-25].

Devido à seletividade, sensibilidade e versatilidade dos seus detetores, a indústria farmacêutica recorre principalmente à Cromatografia Gasosa (GC – do inglês *Gas Chromathography*) e à Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC – do inglês *High performance liquid chromatography*) [26].

Na avaliação qualitativa e quantitativa de medicamentos genéricos utiliza-se com muita frequência a cromatografia líquida. No âmbito do estágio, foi desenvolvido e validado um método de HPLC para análise de conteúdo de substância activa em comprimidos, pelo que será apresentada de seguida uma breve descrição desta técnica analítica.

### 1.2.1. Cromatografia Líquida de Alta Pressão

A Cromatografia Líquida de Alta Pressão é um tipo de cromatografia em que a fase móvel é líquida e é realizada numa coluna contendo uma fase estacionária sólida. Difere da cromatografia líquida em coluna tradicional no facto do movimento da fase líquida ocorrer sob altas pressões [22, 27, 28].

O HPLC surgiu no final dos anos 60, início dos anos 70, e desde então o seu desenvolvimento tem sido enorme. Na década de 1970 foi desenvolvida a cromatografia de fase reversa e na década de 1980 o desenvolvimento de computadores e automação facilitou em muito o uso do HPLC. Com o desenvolvimento de micro-colunas, colunas especializadas e detetores estáveis na década de 1990, em conjunto com a aquisição de dados integrada, armazenamento e a capacidade de recuperação, aumentou muito a velocidade e eficiência do HPLC. A sua importância cresceu tão rapidamente que entre 1995 e 2001, 53% dos métodos analíticos diziam respeito a métodos por HPLC [22, 29-31].

De acordo com o tipo de separação, a cromatografia líquida pode ser classificada em:

- Cromatografia de adsorção – onde a separação dos componentes de uma amostra é baseada nas diferenças de afinidade destes pela fase estacionária;
- Cromatografia de troca iónica – baseada nas diferentes trocas de compostos ionizados ou iónicos com os iões da matriz da fase estacionária. Designa-se cromatografia de troca catiónica, quando se separam compostos de carga positiva e, cromatografia aniónica quando os compostos a separar são de carga negativa;
- Cromatografia de exclusão ou em gel – a separação é baseada no tamanho e forma das moléculas. As moléculas pequenas que penetram nos poros da fase estacionária ficam retidas e eluem mais tarde, enquanto as moléculas maiores não entram nos poros da matriz eluindo primeiro;
- Cromatografia quiral – é utilizada para separação de enantiómeros numa fase estacionária quiral. A separação é conseguida por ação de agentes derivatizantes formando-se diastereómeros;
- Cromatografia de partição – baseia-se na diferente solubilidade dos componentes da mistura em relação a duas fases líquidas não miscíveis

Na indústria farmacêutica a técnica de cromatografia líquida mais usada é a de partição, em que, dependendo da polaridade da fase estacionária e da fase móvel, pode ser de fase normal ou de fase reversa [21, 22].

#### 1.2.1.1. Cromatografia de fase normal

Este tipo de cromatografia baseia-se nas interações das moléculas dos solutos presentes na fase móvel (líquida) com um sólido adsorvente, normalmente sílica ou alumina, presente na coluna (fase estacionária). É caracterizada por uma fase estacionária com carácter polar e fase móvel com carácter apolar, como tetrahidrofurano ou hexano.

Neste tipo de cromatografia, os compostos polares são fortemente atraídos para a superfície da fase estacionária, ou seja, quanto maior a polaridade desses compostos maior a força de adsorção o que leva a um maior tempo de retenção. Este tipo de cromatografia é, assim, utilizado para separar compostos apolares [21, 22].

### 1.2.1.2. Cromatografia de fase reversa (RP)

Este tipo de cromatografia utiliza uma fase estacionária apolar e uma fase móvel moderadamente apolar, uma mistura de solventes orgânicos, como metanol e acetonitrilo, e uma solução aquosa. O carácter apolar da fase estacionária é conseguido pela ligação de grupos alquil C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>8</sub> e C<sub>18</sub>, podendo também ser utilizados grupos amino, ciano e fenilo. Neste tipo de cromatografia as moléculas apolares ficam retidas na coluna sendo que as moléculas polares eluem primeiro.

A cromatografia de fase reversa é rápida, versátil e bastante reprodutível. Por essa razão e uma vez que a maioria dos compostos de interesse farmacêutico têm características polares, a cromatografia de fase reversa é maioritariamente usada na Indústria Farmacêutica [21, 22].

### 1.2.1.3. Equipamento de cromatografia líquida

Um sistema de HPLC é composto por um reservatório contendo a fase móvel, uma bomba que força a passagem dessa fase móvel numa coluna cromatográfica, originando um fluxo de alta pressão, um injetor (que pode estar associado a uma câmara de amostras refrigeradas), um forno de coluna onde esta é mantida a temperatura constante, um detector localizado à saída da coluna que permite visualizar a separação dos compostos eluídos da coluna, e um sistema de recolha de dados, habitualmente um computador com *software* específico, que trata esses dados por algoritmos de integração específicos que fornecem parâmetros quantitativos aquando da realização de uma análise [21, 22, 27, 32].



**Figura 2.** Equipamento tipo de HPLC [33].

#### 1.2.1.3.1. Fase móvel

Como já referido anteriormente, em HPLC a fase móvel é um líquido, que está continuamente a ser bombeado para a coluna, atuando como transportador da amostra e é a sua composição que influencia a separação dos compostos da amostra, devido à interação química da fase móvel e da amostra com a fase estacionária [22, 27, 34].

#### 1.2.1.3.2. Bomba

A bomba é uma entidade que permite o fornecimento da fase móvel, a partir dos reservatórios, à coluna, a um determinado fluxo constante, originando uma determinada pressão, podendo ser isocrática ou de gradiente. O facto de serem compostas por êmbolos com válvulas de regulação permite-lhes uma maior precisão no controlo do fluxo [22, 27, 34].



**Figura 3.** Bomba de HPLC.

#### 1.2.1.3.3. Sistema de eluição em gradiente

A variação da composição da fase móvel pode ser realizada por bombeamento e compressão dos solventes individualmente seguida de uma mistura a altas pressões ou misturando os solventes à pressão atmosférica, seguida de bombeamento e compressão da solução final para a coluna [22, 27, 34].

#### 1.2.1.3.4. Injector

Após solubilização no solvente, os compostos a serem analisados são injectados na fase móvel, entrando posteriormente na coluna. A injeção pode ser feita manualmente com uma seringa, por pressão de gás, para um *loop* com uma capacidade definida, ou recorrendo a injetores automáticos (*autosamplers*) por ação de um pistão de uma válvula injetora [22, 27, 34].



**Figura 4.** Injetor de HPLC.

#### 1.2.1.3.5. Coluna Cromatográfica

As colunas cromatográficas contêm um enchimento de partículas (fase estacionária) com determinadas características que vão permitir a partilha dos solutos com a fase móvel. Os principais parâmetros da fase estacionária são: o tamanho da partícula, o tamanho do poro, a área, tipo e quantidade de ligantes. A polaridade da coluna depende da polaridade dos grupos funcionais ligados que variam de relativamente apolar ( $C_8$ ,  $C_{18}$  ou fenil) a grupos muito polares (ciano, amina ou diol).

**Tabela 1.** Tipos de ligantes das fases estacionárias [27].

|             |  |                        |
|-------------|--|------------------------|
| Octil       | $=\text{Si}-[\text{CH}_2]_7-\text{CH}_3$   | $\text{C}_8$           |
| Octadecil   | $=\text{Si}-[\text{CH}_2]_{17}-\text{CH}_3$                                      | $\text{C}_{18}$        |
| Fenil       | $=\text{Si}-[\text{CH}_2]_n-\text{C}_6\text{H}_5$                                | $\text{C}_6\text{H}_5$ |
| Cianopropil | $=\text{Si}-[\text{CH}_2]_3-\text{CN}$   | CN                     |
| Aminopropil | $=\text{Si}-[\text{CH}_2]_3-\text{NH}_2$   | $\text{NH}_2$          |
| Diol        | $=\text{Si}-[\text{CH}_2]_3-\text{O}-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{OH}$ | $(\text{OH})_2$        |

**Figura 5.** Colunas de HPLC.

#### 1.2.1.3.6. Pré-coluna

A pré-coluna, como o nome indica, encontra-se localizada imediatamente antes da coluna de cromatografia, funciona como saturador do eluente, impedindo o seu arrastamento na coluna, servindo também como filtro a contaminantes e partículas. A pré-coluna tem um enchimento com a mesma fase estacionária da coluna e é colocada antes da mesma. Não altera os resultados cromatográficos e permite proporcionar um aumento de vida da coluna [22, 27, 34].

#### 1.2.1.3.7. Forno da coluna

Para uma separação cromatográfica estável e reprodutível que conduza a quantificações fiáveis e rigorosas, a coluna cromatográfica deverá ser mantida a temperatura constante. Tal é conseguido colocando a coluna dentro de um forno isolado e adequadamente controlado e para o qual se selecciona uma temperatura, de acordo com as definições do procedimento analítico [22, 27, 34].

A temperatura da coluna pode ser definida para obter separações mais eficientes mas raramente são utilizadas temperaturas superiores a  $60^\circ\text{C}$  devido à potencial degradação da fase estacionária ou às fases móveis voláteis [22, 27, 34].



#### 1.2.1.3.8. Detetores

Os detetores usados em cromatografia líquida são sensores que estão associados a um dispositivo electrónico, que detetam um sinal e o enviam a um processador. Os detetores de HPLC devem apresentar uma elevada relação sinal/ruído, permitindo assim detetar baixas concentrações de soluto, e uma resposta linear em função da concentração de soluto dentro de uma determinada gama de concentrações.

A técnica de HPLC exige a utilização de detetores próprios consoante a descrição do método analítico. Existem vários tipos de detetores entre os quais os detetores UV/Vis, os detetores espectrofotométricos de fotodiodos (PDA, do inglês *Photo Diode Array Detectors*), os detetores de fluorescência e os detetores electroquímicos são os mais seletivos [22, 27, 34].

Entre 1995 e 2001, 94% dos métodos analíticos por HPLC publicados usavam a deteção por UV. Os detetores UV/Vis permitem a absorção de luz na região do UV (190-400nm), onde se utilizam lâmpadas de deutério ou xénon a alta pressão, e na região do visível (400-750nm), utilizando lâmpadas de um tungsténio.

A utilização de outros tipos de deteção como por espectrometria de massa, tem vindo a aumentar e em 2005 já representava 1/3 dos artigos científicos publicados. No entanto, com a descoberta de detetores espectrofotométricos de fotodiodos (PDA) houve uma generalização da utilização do HPLC-UV, em detrimento do HPLC-MS [29-31].

Os detetores PDA permitem análises em comprimentos de onda variáveis, obtendo um espectro entre os 190 e 800nm. Comparando o espectro de uma solução de referência com o espectro de uma amostra, é possível identificar e verificar a pureza desta. Permitem ainda avaliar diferentes picos em vários comprimentos de onda numa única análise cromatográfica e obter gráficos 3D dos diferentes picos [22, 27, 34].

#### 1.2.1.3.9. Reciclador

O dispositivo ELU-SAVE é uma válvula controlada por um microprocessador que permite a reciclagem de eluentes limpos durante a análise cromatográfica, ao controlar constantemente o sinal gerado pelo sistema de deteção. Possui em memória um valor limite que determina a que desvio da linha de base a válvula muda de função, rejeitando

o solvente que está a sair da coluna. Quando é detectado um sinal, correspondente a um pico de um componente, o sinal do detector é superior a esse limite e a válvula muda da posição “Recycle” para “Waste”. No final do pico, o sinal do detector diminui e atinge um valor inferior ao limite, a válvula liga então novamente a função “Recycle”. Assim, quando não são detectados picos o eluente que sai da coluna é conduzido a um recipiente sendo reciclado. Nem todos os sistemas de HPLC possuem reciclador [22, 27, 34].

#### 1.2.1.3.10. Sistema de aquisição e controlo

Consistem em sistemas computadorizados que controlam todos os parâmetros do HPLC (composição da fase móvel, fluxo, comprimento de onda do detector, temperatura da coluna, etc.) e que adquirem o sinal do detector, convertendo-o em dados que por sua vez são transformados num perfil cromatográfico [22, 27, 34].

Para a definição de um método de HPLC para a análise de substância ativa em medicamentos é necessário determinar as condições cromatográficas que permitam quantificar de forma adequada os compostos em causa.

#### 1.2.2. Definição das condições cromatográficas

No desenvolvimento de um método analítico por HPLC para análise de conteúdo de substância ativa em comprimidos é necessário definir as melhores condições cromatográficas para a quantificação do referido composto. É necessário conhecer o tipo de molécula, estudando a sua polaridade, solubilidade, comprimento de onda a que absorve preferencialmente, etc., para se poder seleccionar o tipo de detector, o tipo de coluna e fase móvel adequados e o comprimento de onda a que se vai fazer a deteção.

A actualização de farmacopeias com métodos analíticos, com a caracterização de moléculas com actividade terapêutica e das suas impurezas, a publicação de documentos com directrizes e discussão científica facilitam este tipo de pesquisa.

Na fase de desenvolvimento de um método analítico e tendo em atenção as características acima referidas bem como informação disponível do produto, são

realizados diferentes testes. Com base nas análises realizadas determina-se a melhor concentração de trabalho, volume de injeção, fluxo, tempo de corrida e programa de gradiente (caso seja necessário) para que o método quantifique todos os compostos presentes na amostra com uma adequada resolução entre picos.

Geralmente, para que os métodos sejam capazes de quantificar e separar corretamente todos os possíveis produtos de degradação, o desenvolvimento do método é realizado com amostras degradadas obtidas, em muitos casos, por um processo de degradação forçada [22, 23, 31].

### 1.2.3. Degradação forçada

A degradação forçada consiste em submeter as substâncias activas (SA) e/ou produtos farmacêuticos a condições de *stress* para induzir a formação de produtos de degradação [36]. Assim, utilizando amostras degradadas no desenvolvimento, é possível desenvolver métodos analíticos capazes de avaliar todos os possíveis produtos de degradação formados durante os estudos de estabilidade acelerada e de estabilidade a longo termo.

O principal objectivo de um estudo completo de degradação forçada é verificar/confirmar que os métodos analíticos (para análise de conteúdo de substância ativa e substâncias relacionadas) são indicativos da estabilidade do produto, o que é demonstrado através de um aceitável balanço de massas no final destes ensaios. Ou seja, verificar que os métodos quantificam correctamente a substância ativa bem como todos os possíveis produtos da sua degradação. Não existem instruções específicas para conduzir um estudo de degradação forçada, como a selecção das condições de stress, tempo de exposição a essas condições, etc. No entanto, os estudos de degradação forçada são conduzidos em condições mais severas do que os testes de estabilidade acelerada – 40°C/ 75% HR (humidade relativa) – e consistentes com o conhecimento pré-existente sobre a estabilidade/decomposição do produto em condições normais de produção, embalagem e uso. De um modo geral, as condições de degradação forçada devem incluir:

- degradação térmica: calor seco/ calor húmido – que consiste em submeter a amostra em pó ou em solução aquosa, respetivamente, a altas temperaturas;
- hidrólise ácida / hidrólise alcalina – baseia-se na adição de um ácido ou uma base à amostra em análise;
- oxidação – onde se sujeita o produto a uma reação com um agente oxidante, geralmente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Para a realização destes testes tem de ser definido o tempo de degradação, a temperatura ou a concentração do agente degradante, considerando que o objectivo será atingir 10 a 20% de degradação da substância activa – SA. Isto porque, com uma degradação abaixo dos 10% esta não produzirá níveis suficientes de produtos de degradação. Já acima dos 20% de degradação serão produzidos produtos secundários provavelmente não encontrados durante o ciclo de vida do produto.

No desenvolvimento de um método analítico são normalmente utilizadas amostras degradadas que foram sujeitas ao calor, a hidrólise, degradação ácida e alcalina e a oxidação, garantindo o desenvolvimento de um método que, em rotina, consiga avaliar todos os produtos de degradação que se possam formar durante a vida do medicamento [35-38].

A qualidade analítica é um fator essencial nos diferentes processos de desenvolvimento, produção e controlo de qualidade de medicamentos. Dados analíticos duvidosos podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. É portanto necessário que todos os métodos analíticos sejam correctamente desenvolvidos e posteriormente validados [26].

Após conclusão do desenvolvimento do método para a análise de conteúdo de substância ativa em comprimidos foi realizada a validação do referido método.

### 1.3. Validação de um método analítico

A validação de um método analítico consiste na realização de um conjunto de testes para demonstrar que esse método é adequado para a finalidade a que foi proposto, tendo, esses testes, de cumprir determinados requisitos e apresentar resultados que estejam dentro dos critérios de aceitação definidos.

Os parâmetros avaliados numa validação são a precisão, rigor, selectividade, limites de detecção e quantificação (para análise de substâncias relacionadas), linearidade e gama de trabalho. No entanto, para cada tipo de método analítico podem ser exigidos diferentes testes. O objetivo do procedimento analítico deve ser claramente entendido uma vez que este irá determinar os testes a realizar durante a validação. Na tabela 2 são apresentados os parâmetros mais importantes e que devem ser analisados e avaliados no processo de validação dos diferentes tipos de métodos analíticos, ou num processo de revalidação em caso de alteração nos processos de produção ou em mudança de procedimento analítico [20].

**Tabela 2.** Parâmetros analisados para a validação de métodos de identificação, de conteúdo e testes de impurezas [20].

| Procedimento analítico        | Identificação | Teste de impurezas |        | Conteúdo         |
|-------------------------------|---------------|--------------------|--------|------------------|
|                               |               | Quantitativo       | Limite |                  |
| Rigor                         | -             | +                  | -      | +                |
| Precisão:                     |               |                    |        |                  |
| Repetibilidade                | -             | +                  | -      | +                |
| Precisão intermédia           | -             | + <sup>(1)</sup>   | -      | + <sup>(1)</sup> |
| Especificidade <sup>(2)</sup> | +             | +                  | +      | +                |
| Limite de detecção            | -             | - <sup>(3)</sup>   | +      | -                |
| Limite de quantificação       | -             | +                  | -      | -                |
| Linearidade                   | -             | +                  | -      | +                |
| Gama de trabalho              | -             | +                  | -      | +                |

- significa que esta característica não é normalmente avaliada

+ significa que esta característica é normalmente avaliada

<sup>(1)</sup> nos casos em que a reprodutibilidade é realizada, a precisão intermédia não é necessária

<sup>(2)</sup> a falta de especificidade de um procedimento analítico poderia ser compensada através de um outro procedimento analítico de apoio

<sup>(3)</sup> pode ser necessária em alguns casos

A robustez, apesar de não estar integrada na tabela, deve ser avaliada, em alguns casos, durante o desenvolvimento do método analítico. Esta lista deverá ser considerada típica para os procedimentos analíticos citados, no entanto poderá ser alterada [20].

O processo de validação não compreende apenas o método analítico desenvolvido é também necessário ter em conta o uso de equipamento e sistemas adequados, qualificados e validados.

Como referido anteriormente, o método analítico foi desenvolvido para avaliar o conteúdo de substância ativa em comprimidos. Assim, para proceder à sua validação foram realizados testes de especificidade, linearidade, rigor, precisão e robustez.

### 1.3.1. Parâmetros analíticos de validação

A validação de métodos analíticos deve ser orientada pelo definido na ICH Q2(R1) – *Validation of Analytical Procedures: text and methodology*.

#### 1.3.1.1. Seletividade ou especificidade

O objetivo deste teste consiste verificar a capacidade do método analítico avaliar inequivocamente a substância ativa na presença de excipientes e possíveis impurezas/ produtos de degradação. A seletividade é avaliada através da comparação da resposta obtida numa solução contendo apenas o analito com a resposta obtida em soluções contendo o analito e outros componentes, como placebo e impurezas, através do cálculo da percentagem de interferência.

Devem ser utilizados os cromatogramas representativos para demonstrar a especificidade bem como espectros da avaliação de pureza do pico [5, 20-22, 26, 39-41].

#### 1.3.1.2. Linearidade

A linearidade de um método permite demonstrar a capacidade de obter resultados que sejam directamente proporcionais à concentração da substância ativa em análise na

gama de trabalho do procedimento analítico, verificando assim se existe uma relação linear entre os valores da área e a concentração das amostras analisadas.

A gama de concentrações em que a linearidade é avaliada depende do objectivo do método. Num método de conteúdo normalmente a gama de concentrações a testar será de 60 a 140%. A linearidade é então avaliada através do traçado de curvas de calibração com um mínimo de cinco pontos (entre 60-140% de concentração da substância ativa). Devem ser avaliados o declive, a intercepção da reta no eixo dos yy, e o coeficiente de correlação (r) que deverá ser próximo de 1 [5, 20-22, 26, 39-41].

#### 1.3.1.3. Gama de trabalho

A gama de trabalho é normalmente derivada de estudos de linearidade e depende da aplicação pretendida do procedimento. Numa análise de conteúdo a gama de trabalho é normalmente 80 a 120% de concentração da substância ativa. Este é o intervalo entre as concentrações mínimas e máximas do analito que se podem quantificar com linearidade, exactidão e precisão [5, 20-22, 26, 39-41].

#### 1.3.1.4. Rigor

O rigor expressa a concordância entre o valor obtido pelo método analítico e o valor considerado como real (valor teórico). O objetivo deste teste é demonstrar a capacidade de recuperação do método em amostras de fórmula reconstituída. É determinado pela adição de quantidades conhecidas do analito numa matriz, o placebo, que contém todos os ingredientes da formulação menos o princípio activo [5, 20-22, 26, 39-41].

Segundo as diretrizes da ICH Q2(R1), a análise do rigor deve consistir na realização, no mínimo, de três determinações em cada uma de três diferentes concentrações, abrangendo toda a gama de trabalho. Para métodos de conteúdo normalmente as concentrações avaliadas são 60%, 100% e 140%. Esta deve ser apresentada como a percentagem de recuperação:

$$\text{Recuperação}_{\%} = \frac{\text{Valor obtido}}{\text{Valor teórico}} \times 100$$

Deve ser também apresentado o RSD (desvio padrão relativo) e os intervalos de confiança (gama de valores no qual existe uma determinada probabilidade de se encontrar um certo valor de uma variável).

#### 1.3.1.5. Precisão

O objetivo dos testes de precisão é avaliar o grau de concordância entre uma série de resultados obtidos por aplicação do mesmo método e sob as mesmas condições. Esta deve ser avaliada através do cálculo do desvio padrão absoluto e do RSD e devem ser apresentados os valores dos intervalos de confiança [5, 20-22, 26, 39-41]. A ICH Q2(R1) define que a precisão deve ser considerada em três níveis: repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade.

##### 1.3.1.5.1. Repetibilidade

A repetibilidade expressa a precisão de um método sob as mesmas condições operacionais ao longo de um curto intervalo de tempo [5, 20-22, 26, 39-41].

Segundo a ICH Q2(R1) a repetibilidade deve ser avaliada usando no mínimo nove determinações que abranjam a gama de trabalho ou no mínimo seis determinações de uma concentração a 100%.

##### 1.3.1.5.2. Precisão intermédia

A precisão intermédia expressa a precisão do método considerando variações no laboratório, avaliando se o método origina os mesmos resultados apesar de alterações como diferentes equipamentos, diferentes analistas e diferentes dias de análise, não sendo contudo necessário avaliar estes efeitos individualmente [5, 20-22, 26, 39-41].

De acordo com a ICH Q2(R1), a precisão intermédia deve ser avaliada segundo o procedimento da repetibilidade.



#### 1.3.1.5.3. Reprodutibilidade

Este teste demonstra a precisão de um método avaliada pela relação de resultados obtidos entre diferentes laboratórios. É realizada, por exemplo, no caso de padronização de um procedimento analítico para ser incluído em farmacopeias. Estes dados não fazem parte do dossier de autorização de introdução no mercado [5, 20-22, 26, 39-41].

#### 1.3.1.6. Robustez

A robustez indica a capacidade de um procedimento analítico permanecer inalterado face a pequenas mas deliberadas alterações nos parâmetros do método.

A avaliação da robustez deve ser considerada durante a fase de desenvolvimento e depende do tipo de procedimento em estudo, havendo vários parâmetros que a podem afetar. Em HPLC podem ser avaliados parâmetros como a filtração, a estabilidade das soluções, o fluxo, a temperatura e lotes da coluna, o volume de injeção, o pH e a composição da fase móvel. As análises a efectuar devem ser cuidadosamente seleccionadas de acordo com o método analítico proposto, as suas características e o produto em análise. As análises em condições diferentes devem ser devidamente controladas pelo que uma consequência da avaliação da robustez é que uma série de testes de conformidade do sistema sejam estabelecidos para assegurar a validade do método analítico sempre que usado [5, 20-22, 26, 39-41].

##### 1.3.1.6.1. Estabilidade das soluções

O objetivo deste teste é avaliar a estabilidade das soluções padrão e das soluções teste durante um tempo definido.

Os estudos de estabilidade permitem estabelecer um período de tempo e de condições de armazenamento que garantem que as soluções utilizadas não tenham sofrido alterações ou degradações nas suas características originais devido a pequenas alterações das condições laboratoriais como temperatura, humidade e luz. Para isso são analisadas soluções imediatamente após a preparação e com vários tempos de armazenamento.

A estabilidade das soluções é avaliada pelo cálculo do desvio dos fatores de resposta (RF, do inglês *Response Factor*) de cada solução.

#### 1.3.1.6.2. Filtração

Com os testes de filtração pretende avaliar-se a interferência que a filtração poderá ter na quantificação da amostra e seleccionar o(s) filtro(s) mais adequado(s) à sua preparação. Este teste é necessário apenas nos casos em que, no procedimento analítico, as amostras sofrem um processo de filtração durante a preparação.

O teste pode ser realizado através da análise de uma solução padrão contendo substância ativa com uma concentração de 100% da concentração teórica antes e depois de filtrada, normalmente com três tipos de filtros diferentes, utilizando nos ensaios seis filtros de cada tipo.

Os sistemas de filtração utilizados não devem alterar a solução analisada, não deverá haver retenção de substância ativa pelo filtro, nem aparecimento de picos na zona correspondente a cada substância em avaliação.

A influência da filtração é avaliada pelo cálculo do desvio dos fatores de resposta (RF) de cada solução. É ainda comparado o fator de resposta entre as soluções filtradas e não filtradas através do teste *t-Student* e avaliado o *p-value*, para um intervalo de confiança de 95%.

É avaliado o RSD de cada condição e a pureza do pico nos cromatogramas das soluções filtradas [5, 20-22, 26, 39-41].

#### 1.3.2. Testes de conformidade do sistema

A análise da conformidade do sistema (“*system suitability*”) garante que a *performance* do sistema cromatográfico é adequada para a análise a realizar. Assim, podem ser avaliados parâmetros como o tempo de retenção, a resolução, fator de simetria, número de pratos teóricos, factor de capacidade e precisão/repetibilidade de injeção [20-22, 26, 28, 42].

### 1.3.2.1. Tempo de Retenção

O tempo de retenção é a forma mais simples e imediata da avaliação da aceitabilidade de um ensaio por HPLC. Consiste numa qualificação visual comparando os tempos de retenção obtidos com os definidos no protocolo analítico específico, devendo estar dentro da janela especificada no procedimento. No caso de esta não estar especificada não devem divergir, segundo a Farmacopeia Europeia, por mais que  $\pm 20\%$  do tempo de retenção indicado no cromatograma de referência.

O tempo de retenção é dependente da coluna utilizada, da composição da fase móvel e do fluxo, entre outros parâmetros cromatográficos [20-22, 26, 28, 42].

### 1.3.2.2. Resolução

A resolução (R) determina a capacidade do sistema cromatográfico para separar picos, numa situação de eluição próxima de dois ou mais solutos. São relacionadas as larguras dos picos a meia altura ( $W_1$  e  $W_2$ ) e os respectivos tempos de retenção ( $RT_1$  e  $RT_2$ ), segundo a equação seguinte:

$$R = 1.18 \frac{(RT_2 - RT_1)}{(W_2 + W_1)}$$

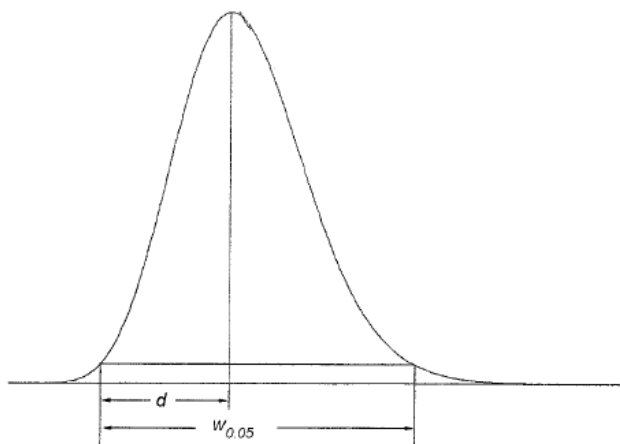
Salvo outra indicação do procedimento analítico a resolução deverá ser igual ou superior a 1.5, sendo que está poderá variar com o tipo de coluna utilizada, com a composição da fase móvel, com o gradiente e com o fluxo [20-22, 26, 28, 42].

### 1.3.2.3. Fator de simetria

O fator de simetria (S) mede a simetria de um pico em relação ao seu eixo. De acordo com a Farmacopeia Europeia este é calculado segundo a seguinte equação:

$$S = \frac{W_{0,05}}{2d}$$

onde  $W_{0,05}$  é a largura do pico a uma altura de 5% e d a distância do início do pico à linha central, como se pode ver na seguinte figura:



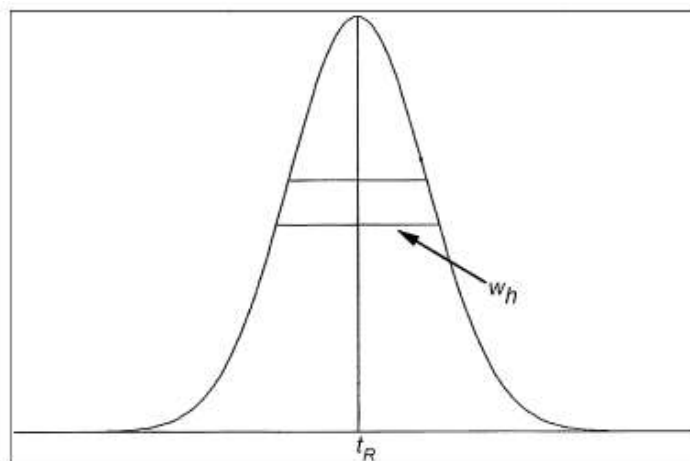
**Figura 6.** Cromatograma ilustrativo para o cálculo do fator de simetria [28].

Para picos perfeitamente simétricos  $S = 1$ . Quando  $S < 1$  o pico apresenta uma cauda (“tailing”) e quando  $S > 1$  o pico apresenta um arrastamento inicial (“fronting”). Segundo a Farmacopeia Europeia é recomendado um valor de  $S$  inferior a 2. À medida que a assimetria do pico aumenta a integração é dificultada por haver uma maior dificuldade em determinar o início ou o fim do pico, o que leva a que a reprodutibilidade de integração seja comprometida e portanto a uma diminuição do desempenho do método [20-22, 26, 28, 42].

#### 1.3.2.4. Número de pratos teóricos

O número de pratos teóricos ( $N$ ), resultante do inverso do afilamento do pico, avalia a eficiência aparente da coluna cromatográfica. O número de pratos teóricos é calculado segundo a equação seguinte e como se pode observar na figura 5:

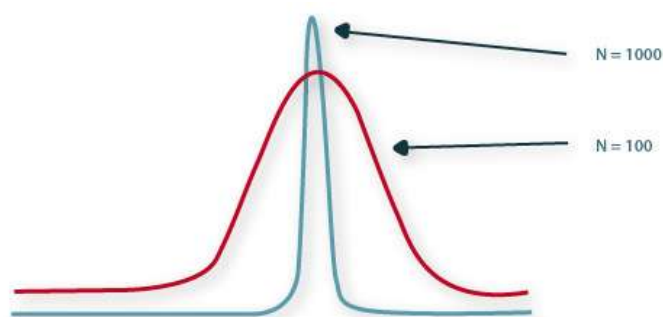
$$N = 5.54 \left( \frac{RT}{W_R} \right)^2$$



**Figura 7.** Cromatograma ilustrativo para o cálculo do número de pratos teóricos [28].

onde  $t_R$  é o tempo de retenção do pico e  $W_h$  é a largura do pico a meia altura.

Quanto maior for a distribuição dos analitos na coluna menos eficiente será a resposta, isto é observado por um menor número de pratos teóricos e conseqüentemente uma maior largura do pico observado, como mostra a figura:



**Figura 8.** Influência de  $N$  na resposta da coluna cromatográfica [43].

Salvo casos específicos que apresentem outro limite utilizado para a avaliação da conformidade do sistema, o número mínimo de pratos teóricos recomendados pela Farmacopeia Europeia é de 2000. Este pode ser afetado pelo tamanho da partícula da coluna, pela temperatura a que a coluna se encontra, fluxo, viscosidade da fase móvel e pelo peso molecular do composto em análise [20-22, 26, 28, 42].

### 1.3.2.5. Fator de capacidade

O factor de capacidade ( $K'$ ) mede o tempo em que um analito é retido pelas partículas da coluna em relação ao tempo percorrido na fase estacionária, segundo a equação:

$$K' = \frac{(RT - t_M)}{t_M}$$

onde  $RT$  é o tempo de retenção e  $t_M$  o “tempo morto” (tempo percorrido desde a injeção até à eluição do primeiro pico correspondente a um composto não retido).

Este valor é dependente da natureza da coluna, da temperatura a que esta é mantida, da fase móvel e do fluxo. Quanto maior for este valor melhor a retenção do soluto. Segundo a Farmacopeia Europeia o factor de capacidade deve ser superior a 2. Quando  $K'$  é inferior a 2 pode não haver uma total separação entre os picos e a frente de solvente, estando mais sensíveis a pequenas variações na composição da fase móvel [20-22, 26, 28, 42].

### 1.3.2.6. Precisão/repetibilidade da injeção

Como referido anteriormente a precisão avalia o desempenho cromatográfico de uma análise de HPLC, feita a partir de uma série de análises consecutivas do mesmo padrão, calculando o desvio padrão relativo (RSD) das áreas obtidas.

Um mau funcionamento da bomba, problemas na coluna ou injetor ou até variações das condições ambientais podem levar a uma grande variação entre as áreas dos picos relativos a cada análise, obtendo-se valores de RSD elevados [20-22, 26, 28, 42].

## 1.4. Blue025

Blue025 é um fármaco aprovado para o uso clínico – trata-se de um pó branco, solúvel em acetonitrilo e metanol, entre outros solventes orgânicos.

O objectivo do presente trabalho consistiu no desenvolvimento e validação de metodologia analítica de HPLC-UV para a análise de conteúdo da substância ativa em comprimidos revestidos de Blue025.

## 2. Material e métodos

### 2.1. Reagentes e produtos

**Tabela 3.** Reagentes e produtos utilizados na execução do trabalho e respetiva origem.

| <b>Reagentes/ produtos</b>  | <b>Origem</b>               |
|---|-----------------------------|
| Água ultra-pura   | Interno                     |
| di-hidrogeno fosfato de potássio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) | Merck                       |
| ácido orto-fosfórico 85% (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )          | Merck                       |
| acetoneitrilo gradiente   | Prolabo                     |
| Substância ativa Blue025  | Fabricante substância ativa |
| Impureza RRT0.98  | Fabricante substância ativa |
| Impureza A  | Fabricante substância ativa |
| Placebo (mistura de excipientes)                                    | Interno                     |

### 2.2. Instrumentação analítica

**Tabela 4.** Equipamentos e respetivos modelos, utilizados durante o trabalho.

| <b>Equipamento</b>   | <b>Modelo</b>                   |
|--|---------------------------------|
| Sistema de HPLC, com sistema automático de injeção, forno de coluna e detetor espectralométrico de fotodiodos (PDA) na gama UV-Vis (Waters, modelo 2996) | Waters Alliance, modelo 2695    |
| Eléctrodo de pH  | Metrohm 686 titroprocessador    |
| Eléctrodo de pH  | WTW Inolab level 2              |
| balança analítica, resolução 0.1mg   | Mettler Toledo XS205 dual range |
| banho de ultra-sons  | Bandelin Sonorex                |
| centrífuga   | himac CT 6E                     |



## 2.3. Material auxiliar

- Material de pesagem – espátulas e “barcos de pesagem”
- Balões volumétricos de 20 e 100mL
- Micropipetas Eppendorf de volume 20-200 $\mu$ L e 100-1000 $\mu$ L
- Vials para HPLC (~1.5 mL)
- Filtros com membrana de 0.45 $\mu$ m (PTFE VWR, PP VWR e PTFE Simplepure)
- Óculos de proteção
- Luvas
- Máscara de pó
- Máscara de líquidos

## 2.4. Condições cromatográficas

Após desenvolvimento, o método foi definido da seguinte forma:

**Tabela 5.** Condições cromatográficas do método (utilizadas durante a validação).

| <b>Condições HPLC</b>          |   |
|--------------------------------|---|
| Coluna analítica:              | Zorbax SB-Phenyl, 3.5 $\mu$ m, 150 x 4.6mm (Agilent ou equivalente) |
| Fase móvel A:                  | Tampão fosfato 0.013M: Acetonitrilo (75:25) (pH2.5)                 |
| Fase móvel B:                  | Tampão fosfato 0.033M: Acetonitrilo (30:70) (pH2.5)                 |
| Fluxo:                         | 1.0 ml/min  |
| Temperatura do forno da coluna | 40°C  |
| Temperatura das amostras       | 20°C  |
| Detecção:                      | UV 220nm  |
| Tempo de análise:              | 34 minutos  |
| Volume de injeção:             | 10 $\mu$ L  |
| Solvente:                      | Fase móvel B  |

| <b>Gradiente:</b>  |                         |                         |
|--------------------|-------------------------|-------------------------|
| <b>Tempo (min)</b> | <b>Fase móvel A (%)</b> | <b>Fase móvel B (%)</b> |
| 0                  | 100                     | 0                       |
| 25                 | 20                      | 80                      |
| 27                 | 0                       | 100                     |
| 29                 | 0                       | 100                     |
| 31                 | 100                     | 0                       |
| 34                 | 100                     | 0                       |

**Fase móvel A:** Tampão fosfato 0.013M ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ): Acetonitrilo (75:25); ajustar o pH a 2.5 com ácido orto-fosfórico 85% ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ).

**Tampão fosfato 0.013M** – Dissolver 1.77g de di-hidrogenofosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) em 1000mL de água ultra-pura.

**Fase móvel B:** Tampão fosfato 0.033M ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ): Acetonitrilo (30:70); ajustar o pH a 2.5 com ácido orto-fosfórico 85% ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ).

**Tampão fosfato 0.033M** – Dissolver 4.49g de di-hidrogenofosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) em 1000ml de água ultra-pura.

## 2.5. Procedimento analítico

O valor do conteúdo de substância activa em comprimidos é obtido a partir da comparação com padrões de substância activa (incluídos na análise como “calibração”) – padrões de trabalho. A calibração relaciona a medição do sinal instrumental com a concentração do analito de interesse, num determinado número de amostras em que a concentração do analito é conhecida (padrão adequado para a análise).

Os padrões de trabalho são padrões caracterizados, no laboratório, segundo um procedimento específico para atribuição do seu teor, em relação ao respetivo padrão de referência. Os padrões de referência são amostras altamente avaliadas e caracterizadas, como são exemplo os padrões de referência certificados pela Farmacopeia Europeia ou pela USP, com teor determinado.

Para além dos padrões, em todas as análises devem ser analisados brancos que permitem, no início da análise, estabilizar a coluna/sistema cromatográfico, o que pode ser verificado através da avaliação da linha de base, do ruído existente e da identificação dos sinais provenientes do solvente.

Pelo facto da substância ativa apresentar uma impureza (imp. RRT 0.98) que elui muito próximo do pico da substância ativa foi necessário, neste caso, definir uma solução de avaliação de conformidade do sistema, solução de identificação/resolução. A avaliação da resolução (definida como superior a 1.5) entre a impureza RRT0.98 e o pico da substância activa permite verificar que o sistema está apto para a análise. Uma vez comprovada a conformidade da calibração e do sistema cromatográfico, a análise pode ser realizada.

De forma a controlar a conformidade do sistema ao longo da análise é injectada uma solução padrão que funciona como controlo, a cada seis injeções de amostras consecutivas.

Neste trabalho, a calibração baseou-se na avaliação com duas soluções padrão, cada uma injectada 3 vezes consecutivas. A sequência de análise definida no método tem a seguinte estrutura:

- Branco (solvente): 10µl (3 injeções ou até obtenção de uma linha de base estável)
- Solução de identificação/resolução: 10 µl (injeção única)
- Padrão 1: 10µl (3 injeções consecutivas)
- Padrão 2: 10µl (3 injeções consecutivas)
- Amostra (máximo de 6 injeções): 10µl (injeção única)
- Padrão 1 ou 2 (solução controlo): 10µl (injeção única)

### 2.5.1. Preparação de soluções

De seguida é apresentada a preparação das diferentes soluções necessárias para a realização da análise:

**Solução de Identificação/Resolução:** Pesar 2mg da impureza RRT0.98, 2mg da impureza A e 400mg da substância ativa para um balão volumétrico de 20ml. Adicionar

15ml de solvente, sonicar durante 5 min. para dissolver e perfazer o volume com solvente (solução a)).

Diluir 1ml da solução a) num balão volumétrico de 100ml e perfazer com solvente para obter a concentração final: concentração de SA de 0.2mg/ml e concentração das impurezas de 0.001mg/ml.

**Solução padrão:** Pesar ~20.0mg de substância ativa para um balão volumétrico de 100ml. Adicionar cerca de 80ml de solvente e sonicar 15min para dissolver. Perfazer de seguida o volume com solvente (C= 0.2mg/mL). A concentração das soluções padrão é dada pela seguinte equação:

$$C_s = \frac{W_s \times P}{Volume\ inicial \times 100}$$

onde  $C_s$  é a concentração da solução padrão (mg/mL),  $W_s$  é o peso do padrão (mg), P é o conteúdo do padrão de trabalho (%) e o volume inicial é o volume usado para preparar a solução padrão.

**Mistura de excipientes:** Pesar 8.4mg de placebo para um balão volumétrico de 100ml e adicionar 80ml de solvente. Sonicar durante 15min. e perfazer o volume com solvente. Centrifugar a 4000rpm durante 10min e analisar o sobrenadante.

**Fórmula reconstituída (substância activa + mistura de excipientes):** Pesar ~20.0mg de substância activa e 8.4mg de placebo (mistura de excipientes) para um balão volumétrico de 100ml. Adicionar cerca de 80ml de solvente e dissolver por ação dos ultra-sons durante 15min. Perfazer o volume com solvente, centrifugar a 4000rpm durante 10min e analisar o sobrenadante.

**Solução teste:**

Pesar 20 comprimidos e determinar o peso médio. Pulverizar os comprimidos e pesar uma quantidade equivalente a 20mg de substância activa para um balão volumétrico de 100ml. Adicionar cerca de 80ml de solvente e sonicar durante 15min. Perfazer o volume com solvente (c  $\cong$  0.2mg/ml). Centrifugar durante 10min a 4000rpm e analisar o sobrenadante.

### 2.5.2. Conformidade do sistema

Para avaliar a conformidade do sistema analítico é necessário calcular o fator de resposta (RF, do inglês *Response Factor*) a partir das injeções das soluções padrão, segundo a seguinte equação:

$$RF = \frac{A}{C_s}$$

onde A é a área do pico da substância ativa obtido no cromatograma e  $C_s$  é a concentração de substância ativa na solução padrão.

Na avaliação da conformidade de sistema é também calculado o desvio padrão relativo (RSD) dos 6 fatores de resposta através da equação apresentada abaixo. O valor do RSD deve ser inferior ao limite estabelecido, ou seja, em análises de conteúdo, com base no conceito definido na Farmacopeia Europeia, o RSD deve ser  $\leq 2.0\%$ .

$$RSD (\%) = \frac{\text{desvio padrão dos RF's}}{\text{média dos RF's}} \times 100$$

É ainda necessário que o “desvio” dos RF's (R) das duas soluções padrão (em percentagem) esteja de acordo com limites estabelecidos. Com base no conceito definido na Farmacopeia Europeia, para análises de conteúdo, R deverá estar entre 98.0% e 102.0%, sendo calculado através da seguinte equação:

$$R (\%) = \frac{RF1}{RF2} \times 100$$

onde RF1 é a média dos fatores de resposta das 3 injeções do padrão 1 e RF2 é a média dos fatores de resposta das 3 injeções do padrão 2.

Como referido anteriormente, a performance do sistema cromatográfico é controlada ao longo da análise através da injeção de solução padrão após cada seis amostras consecutivas analisadas. Com base nas injeções de “controle” é calculada a recuperação, segundo a equação:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{RF_{\text{controle}}}{MRF} \times 100$$

onde  $RF_{\text{controle}}$  é o fator de resposta da injeção da solução “controle” e MRF é a média dos fatores de resposta obtidos com as injeções dos padrões na calibração, calculada segundo a equação:

$$\text{MRF} = \frac{RF_{\text{padrão 1}} + RF_{\text{padrão 2}}}{2}$$

Para a análise de conteúdo, a recuperação deverá estar entre 97.0% e 103.0%.

O cálculo do conteúdo de substância ativa nas amostras é realizado segundo a seguinte equação:

$$\text{Conteúdo (\%)} = \frac{A}{\text{MRF}} \times \frac{V}{W} \times \frac{AW}{L} \times 100$$

onde A é a área do pico da substância ativa na amostra, MRF a média dos fatores de resposta das soluções padrão, V o volume (mL) de preparação da amostra, W o peso (mg) da amostra, AW é o peso médio dos comprimidos (mg) e L é a dosagem (mg de substância ativa/comprimido) dos comprimidos.

O conteúdo da substância ativa nas amostras deverá estar entre 95.0% e 105.0% para a Europa e entre 90.0% e 110.0% para os EUA.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Desenvolvimento do método analítico

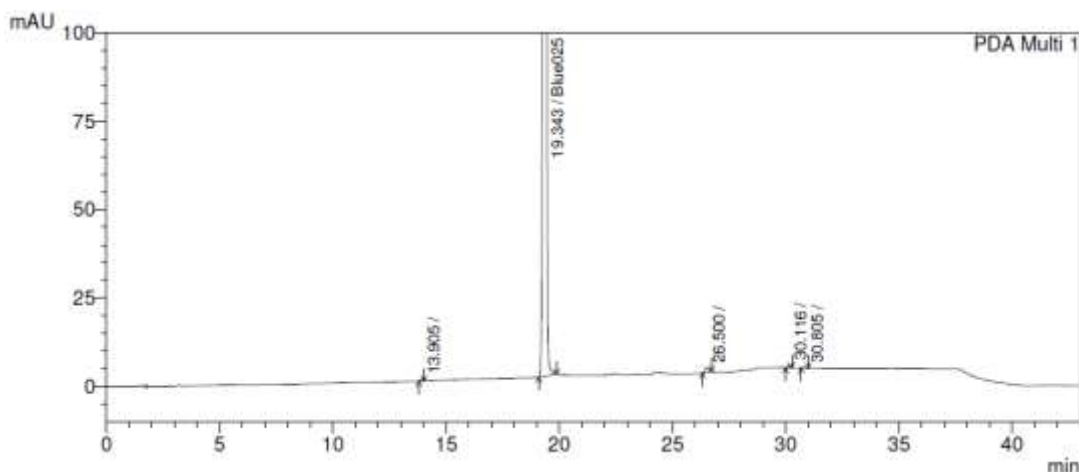
O desenvolvimento dos métodos de conteúdo e substâncias relacionadas foi iniciado tomando como ponto de partida as condições definidas pelo fabricante da substância ativa, que são resumidas de seguida:

**Tabela 6.** Condições analíticas de HPLC (método da substância ativa).

| <b>HPLC (Ph. Eur. 2.2.29)</b> |   |
|-------------------------------|---|
| Coluna analítica:             | Zorbax SB-Phenyl, 3.5 µm, 150 x 4.6mm               |
| Fase móvel A:                 | Tampão fosfato 0.013M: Acetonitrilo (75:25) (pH2.5) |
| Fase móvel B:                 | Tampão fosfato 0.033M: Acetonitrilo (30:70) (pH2.5) |
| Fluxo:                        | 1.0 mL/min  |
| Temperatura da coluna         | 40°C  |
| Temperatura das amostras      | 25°C  |
| Deteção:                      | UV 220nm  |
| Tempo de corrida:             | 43minutos (38minutos + 5minutos de equilíbrio)      |
| Volume de injeção:            | 5 µL  |
| Solvente:                     | Fase móvel B  |

| <b>Gradiente:</b>  |                         |                         |
|--------------------|-------------------------|-------------------------|
| <b>Tempo (min)</b> | <b>Fase móvel A (%)</b> | <b>Fase móvel B (%)</b> |
| 0                  | 100                     | 0                       |
| 25                 | 20                      | 80                      |
| 27                 | 0                       | 100                     |
| 35                 | 0                       | 100                     |
| 38                 | 100                     | 0                       |

Tempo de equilíbrio: 5min.



**Figura 9.** Cromatograma da substância ativa a 100% (0.4mg/ml).

O desenvolvimento do método foi realizado em duas etapas principais:

- 1) Definição das condições cromatográficas de forma a obter um método selectivo para avaliar o conteúdo e impurezas em comprimidos revestidos de Blue025 de modo a ter a melhor separação possível entre picos de Blue025, impurezas/produtos de degradação provenientes da degradação das amostras.
- 2) Realização de alguns testes na substância ativa e fórmula reconstituída (mistura de substância ativa e excipientes na proporção em que se encontram no comprimido); pré-validação necessária para se considerar que o método é aceitável para o fim pretendido.

Os testes incluíram:

- Selectividade
- Linearidade (substância ativa)
- Precisão do sistema (substância ativa e amostras de fórmula reconstituída)
- Recuperação em amostras de fórmula reconstituída de Blue025
- Filtração/centrifugação
- Estabilidade

### 3.1.1. Definição das condições cromatográficas

Na tentativa de obter um tempo de análise menor, foi usada uma coluna semelhante à descrita para análise de substância activa mas mais rápida, tendo-se também alterado o gradiente da fase móvel.

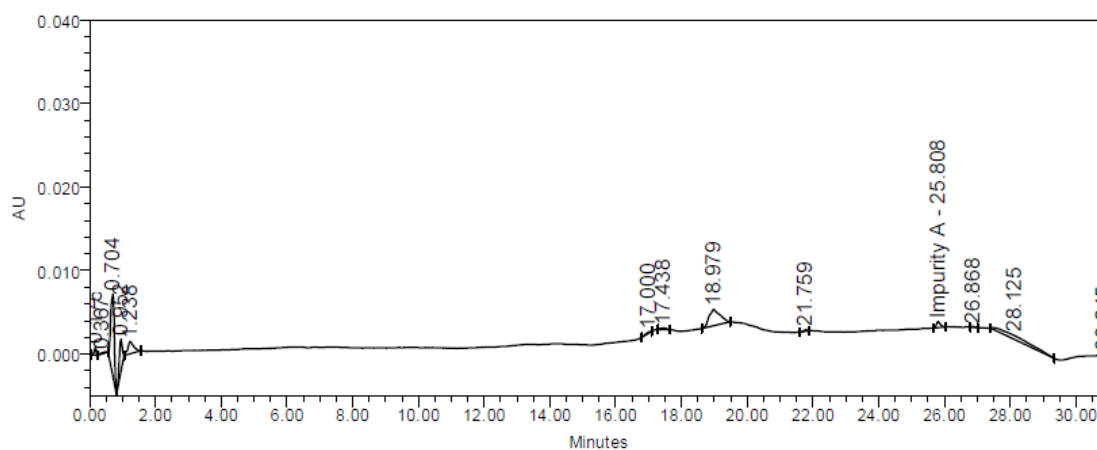


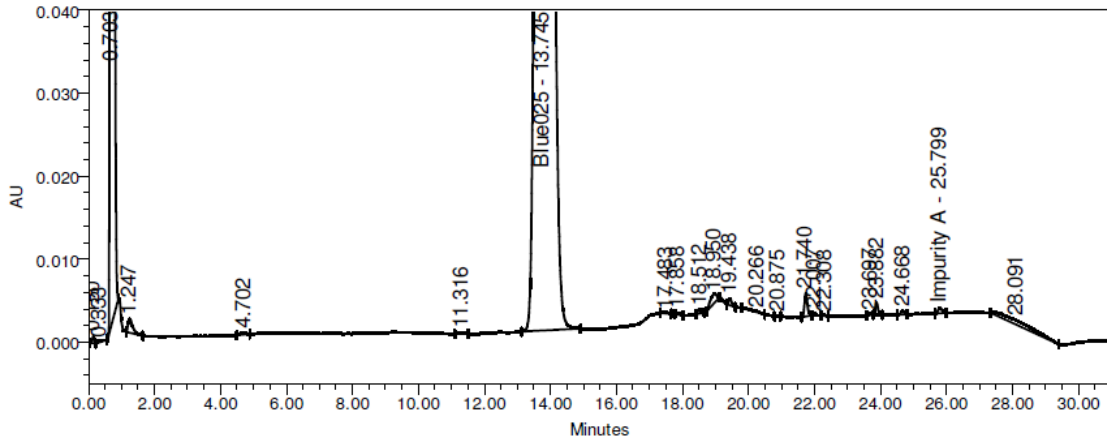
**Tabela 7.** Condições de HPLC testadas (com base no definido para análise da substância ativa).

| Condições HPLC           |  |
|--------------------------|--|
| Coluna analítica:        | Zorbax SB-Phenyl, 3.5µm, 150 x <b>3.0mm</b>        |
| Fase móvel A:            | Tampão fosfato 0.013M (pH2.5):Acetonitrilo (75:25) |
| Fase móvel B:            | Tampão fosfato 0.033M (pH2.5):Acetonitrilo (30:70) |
| Fluxo:                   | 1.0 mL/min   |
| Temperatura da coluna    | 40°C   |
| Temperatura das amostras | 25°C   |
| Deteção:                 | UV 220nm   |
| Tempo de corrida:        | <b>31 minutos</b>                                  |
| Volume de injeção:       | <b>20µL</b>  |
| Solvente:                | Fase móvel B                                       |

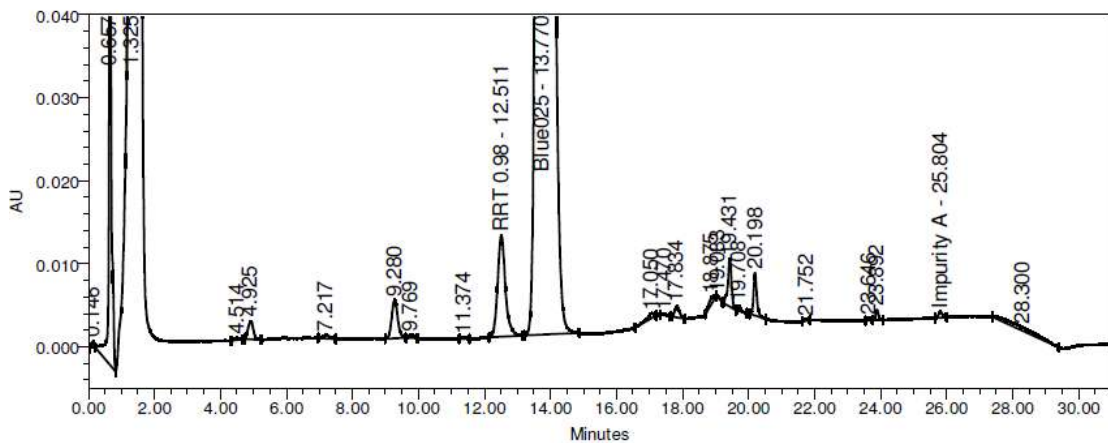
| Gradiente:  |                  |                  |
|-------------|------------------|------------------|
| Tempo (min) | Fase móvel A (%) | Fase móvel B (%) |
| 0           | 90               | 10               |
| 5           | 75               | 25               |
| 10          | 75               | 25               |
| 14          | 70               | 30               |
| 24          | 0                | 100              |
| 26          | 0                | 100              |
| 28          | 90               | 10               |
| 31          | 90               | 10               |

Foram analisadas amostras de substância ativa a 0.4mg/mL degradadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HCl e NaOH:

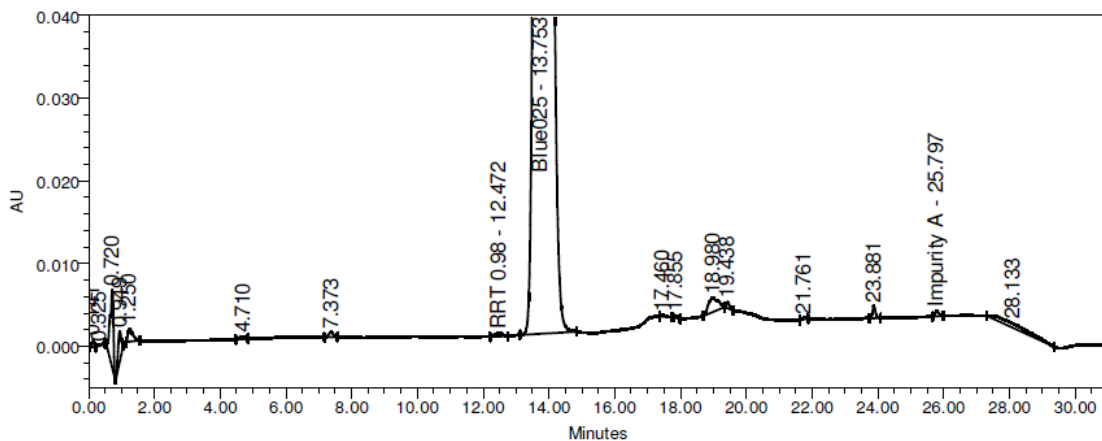
**Figura 10.** Cromatograma da solução do branco (solvente).



**Figura 11.** Cromatograma de amostra de substância ativa a 0.4mg/mL degradada com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% a 60°C, 2horas.



**Figura 12.** Cromatograma de amostra de substância ativa a 0.4mg/mL degradada com HCl 10M a 60°C, 2horas.



**Figura 13.** Cromatograma de amostra de substância ativa a 0.4mg/mL degradada com NaOH 0.1M a 60°C, 24horas.

Apesar de se ter obtido uma boa separação dos picos provenientes da degradação forçada, verificaram-se flutuações na linha de base que dificultam a integração/detecção dos picos.

Assim, as amostras foram de seguida analisadas com a mesma coluna (mais rápida) mas agora com o mesmo tempo de análise e o mesmo gradiente propostos para os métodos da substância ativa.

**Tabela 8.** Condições de HPLC testadas.

| <b>Condições HPLC</b>    |  |
|--------------------------|--|
| Coluna analítica:        | Zorbax SB-Phenyl, 3.5µm, 150 x <b>3.0mm</b>        |
| Fase móvel A:            | Tampão fosfato 0.013M (pH2.5):Acetonitrilo (75:25) |
| Fase móvel B:            | Tampão fosfato 0.033M (pH2.5):Acetonitrilo (30:70) |
| Fluxo:                   | 1.0 mL/min   |
| Temperatura da coluna    | 40°C   |
| Temperatura das amostras | 25°C   |
| Detecção:                | UV 220nm   |
| Tempo de corrida:        | 43 minutos (38 minutos + 5 minutos de equilíbrio)  |
| Volume de injeção:       | <b>20µL</b>  |
| Solvente:                | Fase móvel B                                       |

| <b>Gradiente:</b>  |                         |                         |
|--------------------|-------------------------|-------------------------|
| <b>Tempo (min)</b> | <b>Fase móvel A (%)</b> | <b>Fase móvel B (%)</b> |
| 0                  | 100                     | 0                       |
| 25                 | 20                      | 80                      |
| 27                 | 0                       | 100                     |
| 35                 | 0                       | 100                     |
| 38                 | 100                     | 0                       |

Tempo de equilíbrio: 5min.

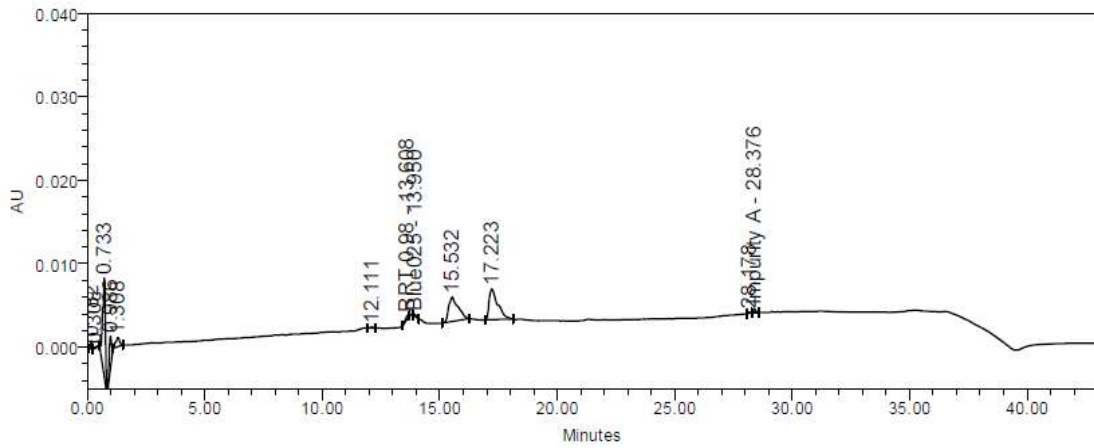


Figura 14. Cromatograma da solução do branco (solvente).

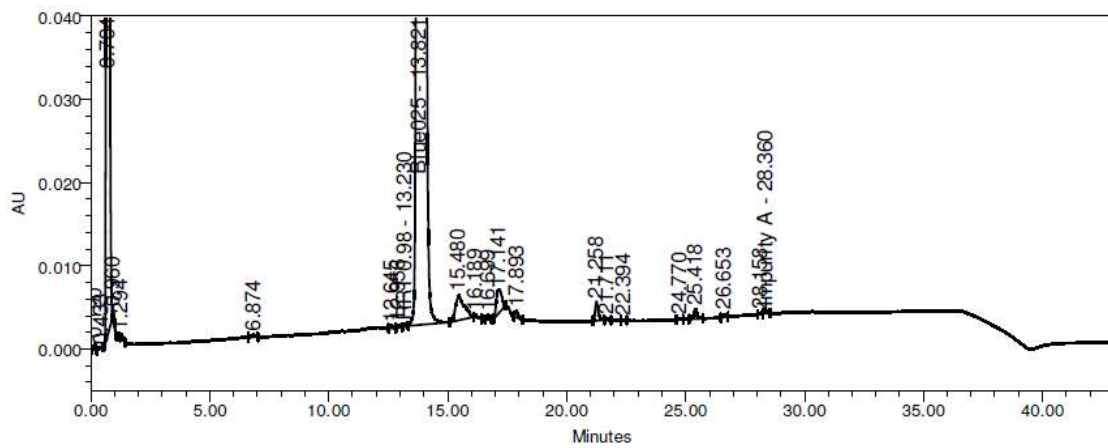


Figura 15. Cromatograma da amostra de substância ativa a 0.4mg/mL degradada com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% a 60°C, 2horas.

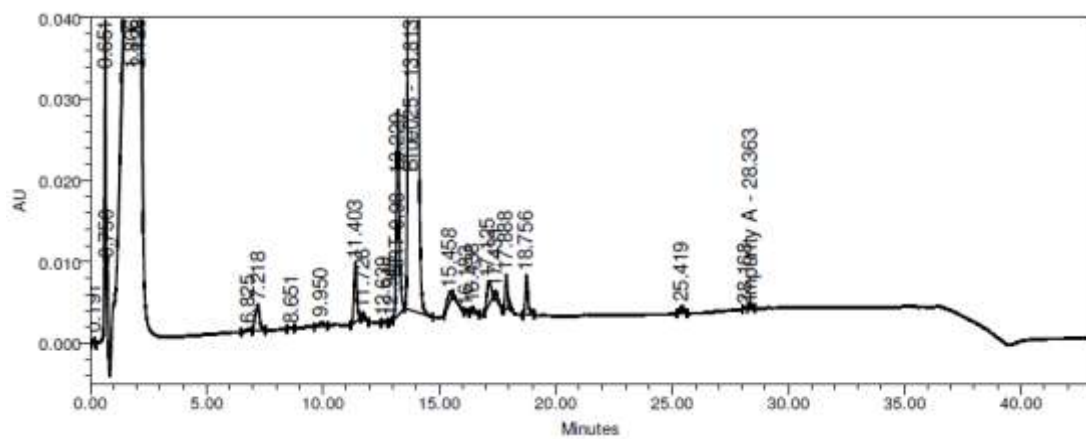
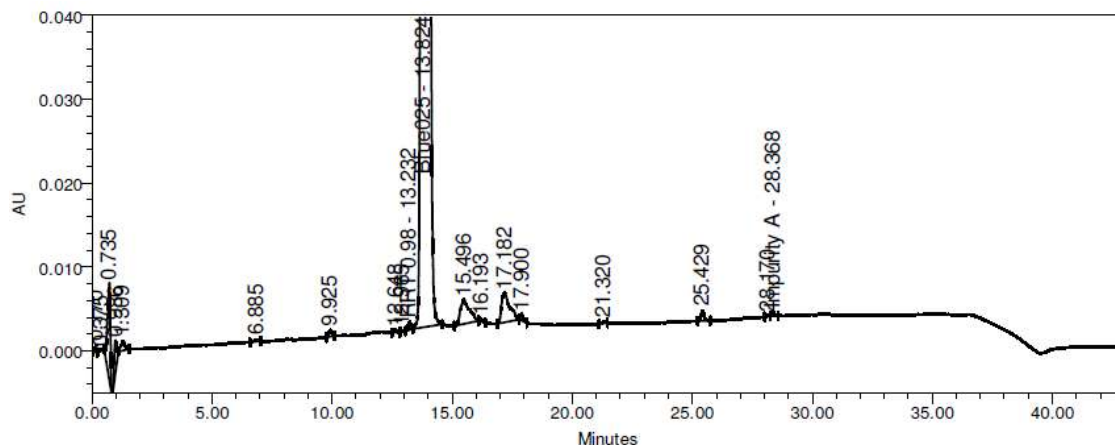


Figura 16. Cromatograma da amostra de substância ativa a 0.4mg/mL degradada com HCl 10M a 60°C, 2horas.



**Figura 17.** Cromatograma da amostra de substância activa a 0.4mg/mL degradada com NaOH 0.1M a 60°C, 24horas.

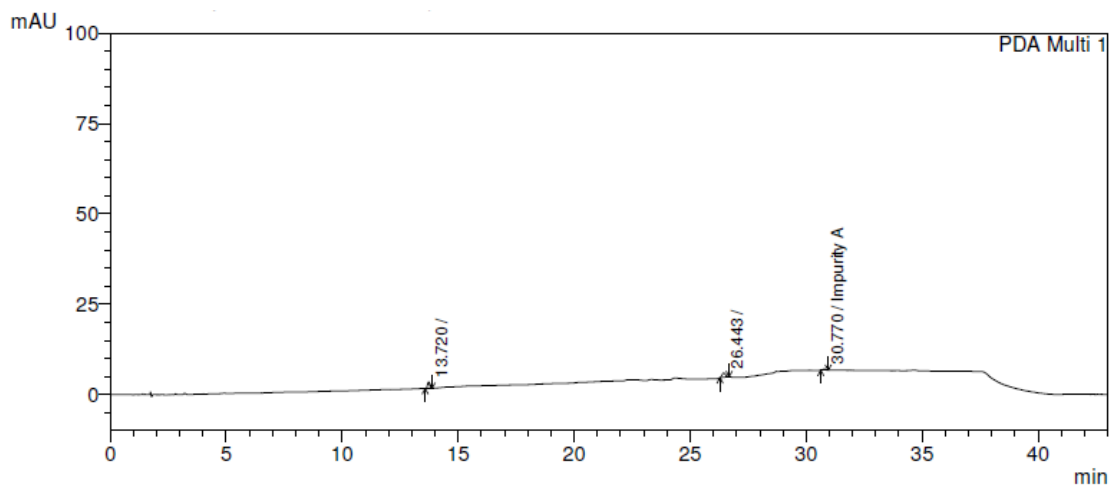
A partir dos cromatogramas acima apresentados, concluiu-se não ser possível obter uma adequada separação dos picos com uma coluna de menor diâmetro (150x3.0mm). Além disso, observam-se picos resultantes do gradiente da fase móvel que podem interferir com a correcta quantificação das substâncias relacionadas; alguns destes picos “interferentes” eluem com o mesmo tempo de retenção da substância activa. Por estes motivos, a coluna de HPLC e o gradiente descrito para a substância activa foram testados, no solvente e amostras degradadas da substância activa a 0.4mg/ml com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e HCl. Os novos testes foram realizados com um maior volume de injeção.

**Tabela 9.** Condições de HPLC testadas.

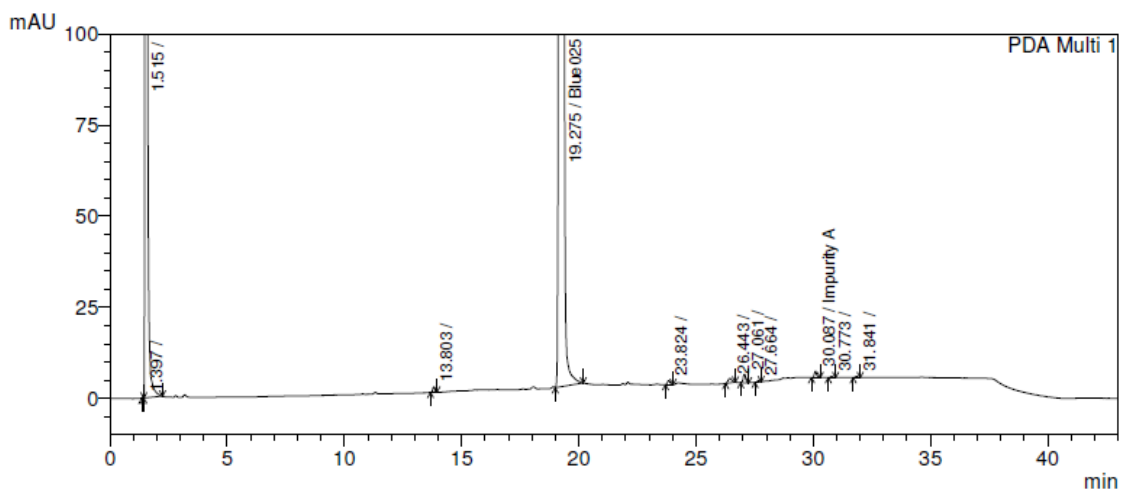
| <b>Condições HPLC</b>    |  |
|--------------------------|--|
| Coluna analítica:        | Zorbax SB-Phenyl, 3.5µm, 150 x 4.6mm               |
| Fase móvel A:            | Tampão fosfato 0.013M (pH2.5):Acetonitrilo (75:25) |
| Fase móvel B:            | Tampão fosfato 0.033M (pH2.5):Acetonitrilo (30:70) |
| Fluxo:                   | 1.0 mL/min   |
| Temperatura da coluna    | 40°C   |
| Temperatura das amostras | 25°C   |
| Deteção:                 | UV 220nm   |
| Tempo de corrida:        | 43 minutos (38 minutos + 5 minutos de equilíbrio)  |
| Volume de injeção:       | <u>20µL</u>  |
| Solvente:                | Fase móvel B                                       |

| Gradiente:  |                  |                  |
|-------------|------------------|------------------|
| Tempo (min) | Fase móvel A (%) | Fase móvel B (%) |
| 0           | 100              | 0                |
| 25          | 20               | 80               |
| 27          | 0                | 100              |
| 35          | 0                | 100              |
| 38          | 100              | 0                |

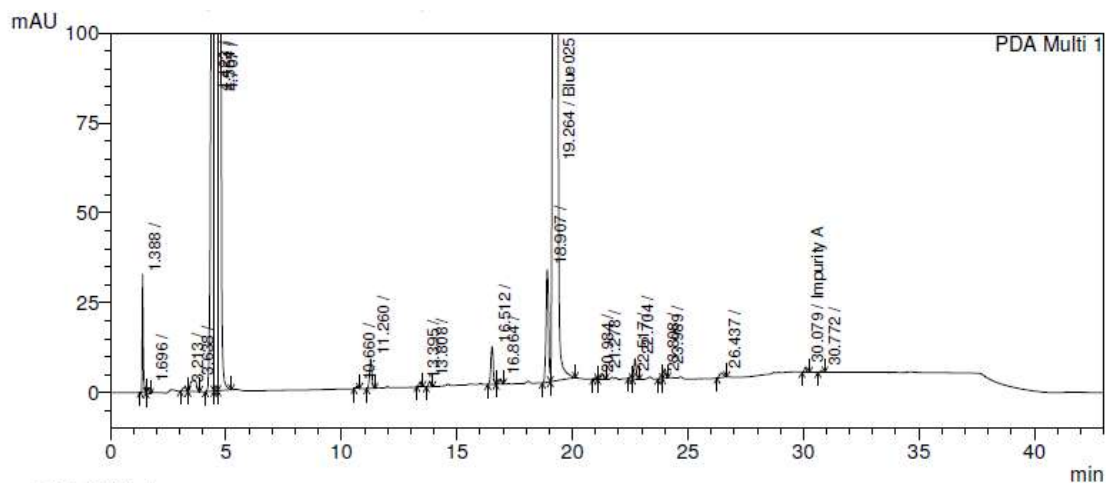
Tempo de equilíbrio: 5min.



**Figura 18.** Cromatograma da solução do branco (solvente).



**Figura 19.** Cromatograma da amostra de substância ativa a 0.4mg/mL degradada com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% a 60°C, 2horas.



1 PDA Multi 1/220nm 4nm

**Figura 20.** Cromatograma da amostra de substância ativa a 0.4mg/mL degradada com HCl 10M a 60°C, 2horas.

Com base nos cromatogramas acima apresentados é possível observar que foram obtidos melhores resultados com a coluna de dimensões 150x4.6mm. O método proposto tem capacidade para separar impurezas conhecidas / desconhecidas e substância ativa.

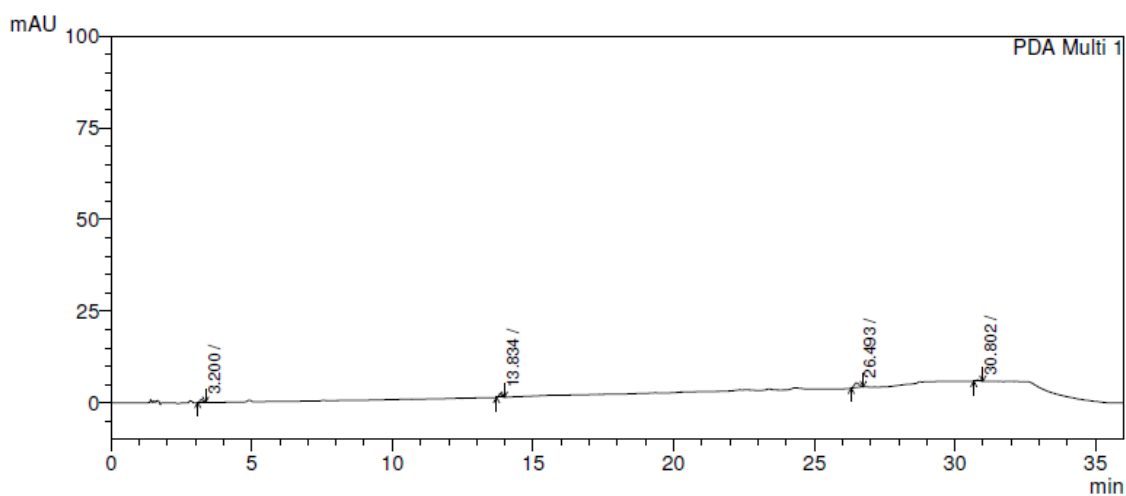
A última impureza a eluir apresenta um tempo de retenção de 31.8 minutos não havendo a eluição de mais nenhuma impureza até ao final da análise (com base nos ensaios de degradação forçada realizados). De forma a diminuir o tempo de análise procedeu-se a uma pequena modificação no gradiente de análise.

**Tabela 10.** Condições de HPLC testadas.

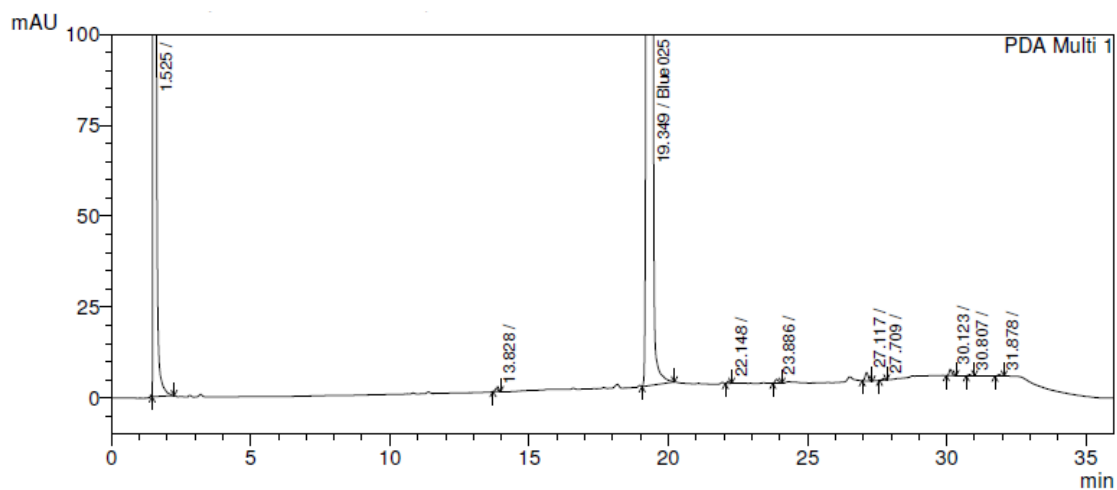
| Condições HPLC           |  |
|--------------------------|--|
| Coluna analítica:        | Zorbax SB-Phenyl, 3.5µm, 150 x 4.6mm               |
| Fase móvel A:            | Tampão fosfato 0.013M (pH2.5):Acetonitrilo (75:25) |
| Fase móvel B:            | Tampão fosfato 0.033M (pH2.5):Acetonitrilo (30:70) |
| Fluxo:                   | 1.0 mL/min   |
| Temperatura do forno     | 40°C   |
| Temperatura das amostras | 25°C   |
| Deteção:                 | UV 220nm   |
| Tempo de corrida:        | <b><u>36 minutos</u></b>                           |
| Volume de injeção:       | 20µL   |
| Solvente:                | Fase móvel B                                       |

**Tabela 11.** Alteração no gradiente.

| <b>Gradiente (alteração 1):</b> |                         |                         |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <b>Tempo (min)</b>              | <b>Fase móvel A (%)</b> | <b>Fase móvel B (%)</b> |
| 0                               | 100                     | 0                       |
| 25                              | 20                      | 80                      |
| 27                              | 0                       | 100                     |
| 30                              | 0                       | 100                     |
| 33                              | 100                     | 0                       |
| 36                              | 100                     | 0                       |



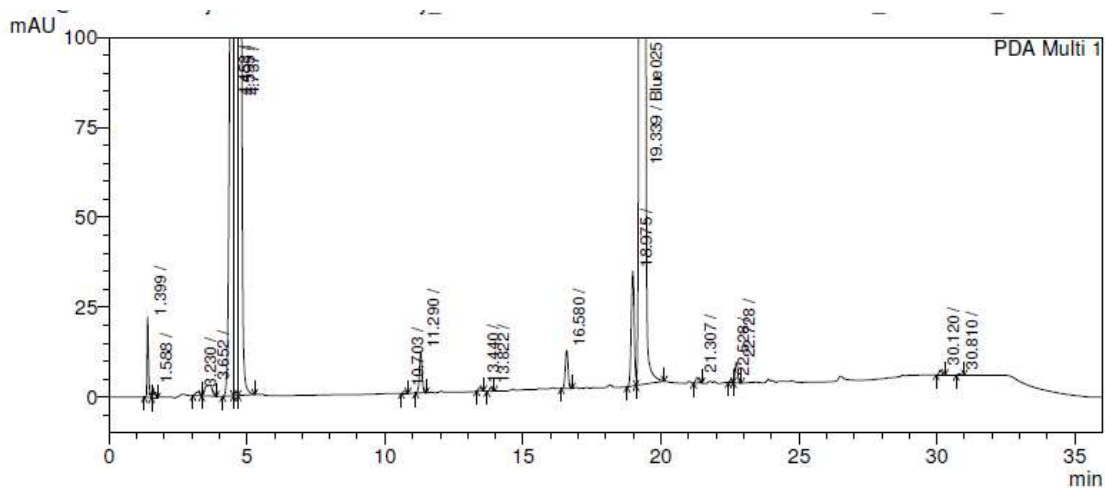
1 PDA Multi 1/220nm 4nm

**Figura 21.** Cromatograma da solução do branco (solvente).

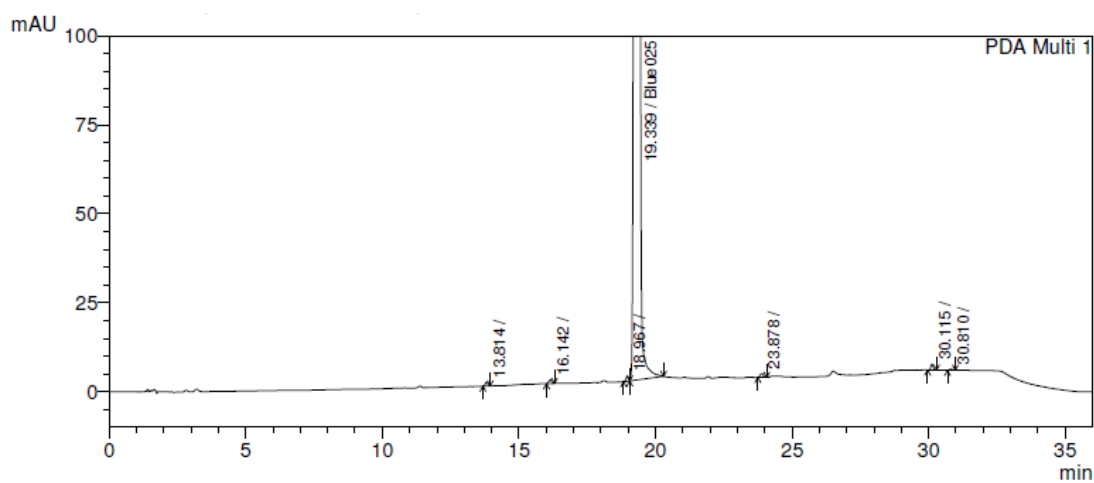
1 PDA Multi 1/220nm 4nm

**Figura 22.** Cromatograma da amostra de substância activa a 0.4mg/mL degradada com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% a 60°C, 2horas.





**Figura 23.** Cromatograma da amostra de substância activa a 0.4mg/mL degradada com HCl 10M a 60°C, 2horas.



**Figura 24.** Cromatograma da amostra de substância activa a 0.4mg/mL degradada com NaOH 0.1M a 60°C, 24horas.

A partir dos cromatogramas acima apresentados, concluiu-se que, com esta pequena alteração do gradiente foi possível diminuir o tempo de análise sem afectar a separação dos picos.

Na tentativa de obter uma melhor separação dos picos provenientes da hidrólise ácida, alterou-se novamente o gradiente.

Tabela 12. Nova alteração do gradiente.

| Gradiente (Alteração 2): |                  |                  |
|--------------------------|------------------|------------------|
| Tempo (min)              | Fase móvel A (%) | Fase móvel B (%) |
| 0                        | 100              | 0                |
| 7                        | 78               | 22               |
| 12                       | 70               | 30               |
| 25                       | 20               | 80               |
| 27                       | 0                | 100              |
| 30                       | 0                | 100              |
| 33                       | 100              | 0                |
| 36                       | 100              | 0                |

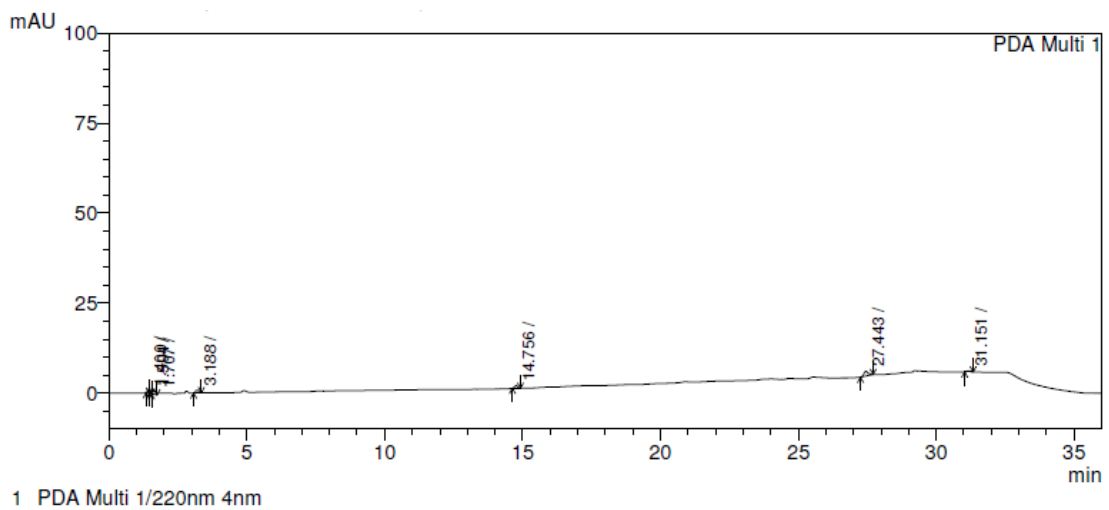
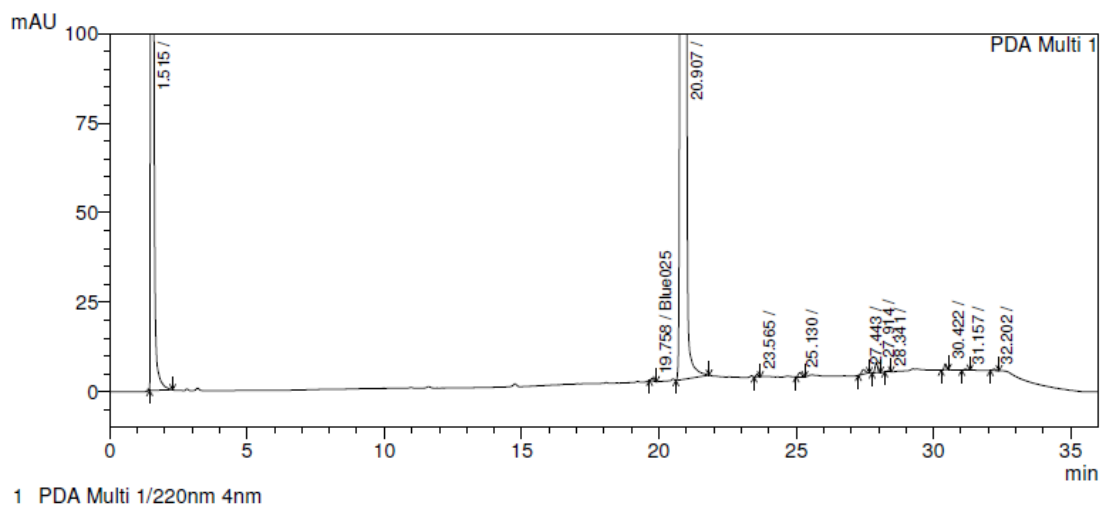
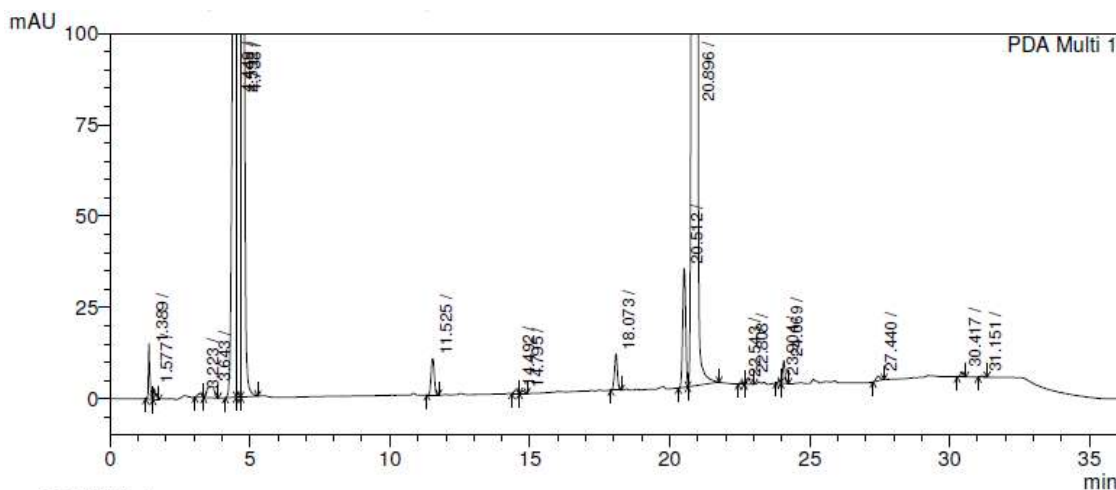


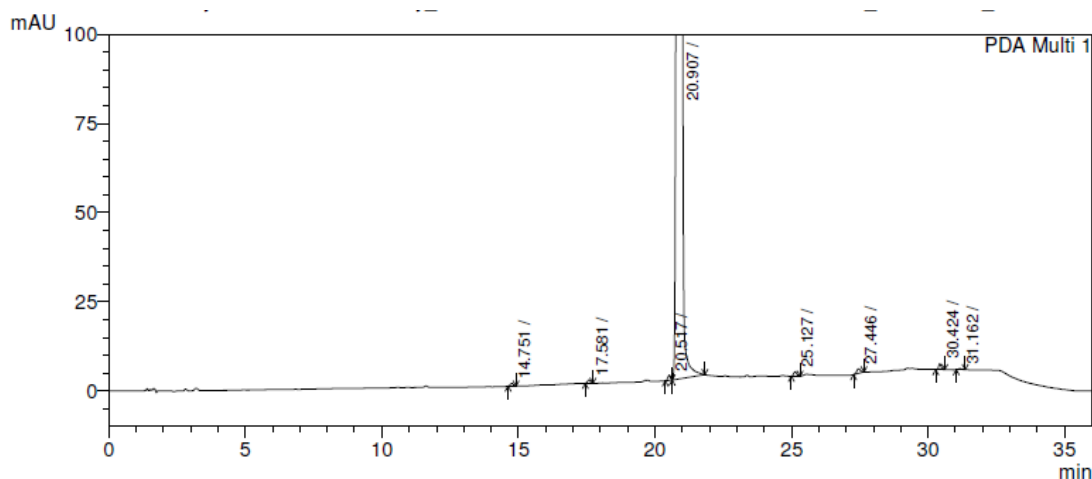
Figura 25. Cromatograma da solução do branco (solvente).

Figura 26. Cromatograma da amostra de substância activa a 0.4mg/mL degradada com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% a 60°C, 2horas.



1 PDA Multi 1/220nm 4nm

**Figura 27.** Cromatograma da amostra de substância ativa a 0.4mg/mL degradada com HCl 10M a 60°C, 2horas.



1 PDA Multi 1/220nm 4nm

**Figura 28.** Cromatograma da amostra de substância ativa a 0.4mg/mL degradada com NaOH 0.1M a 60°C, 24horas.

A partir dos resultados apresentados, pode concluir-se que o novo gradiente testado também tem capacidade para separar os picos de impurezas provenientes da degradação da substância ativa. No entanto, não se verificou melhoria na separação das impurezas com tempo de retenção ~ 4-5 minutos produzidas na degradação ácida. Além disso o tempo de retenção da substância ativa aumentou cerca de 1 minuto.

Assim, de acordo com os resultados acima descritos, decidiu-se voltar ao gradiente anterior (alteração 1), fazendo-se no entanto uma nova alteração no tempo de corrida.

Tabela 13. Alterações no gradiente.

| Gradiente (Alteração 3): |                  |                  |
|--------------------------|------------------|------------------|
| Tempo (min)              | Fase móvel A (%) | Fase móvel B (%) |
| 0                        | 100              | 0                |
| 25                       | 20               | 80               |
| 27                       | 0                | 100              |
| 29                       | 0                | 100              |
| 31                       | 100              | 0                |
| 34                       | 100              | 0                |

Nota: os cromatogramas de amostras degradadas apresentados de seguida foram obtidos durante o estudo de degradação forçada cujas condições de degradação são diferentes das testadas ao longo do desenvolvimento do método.

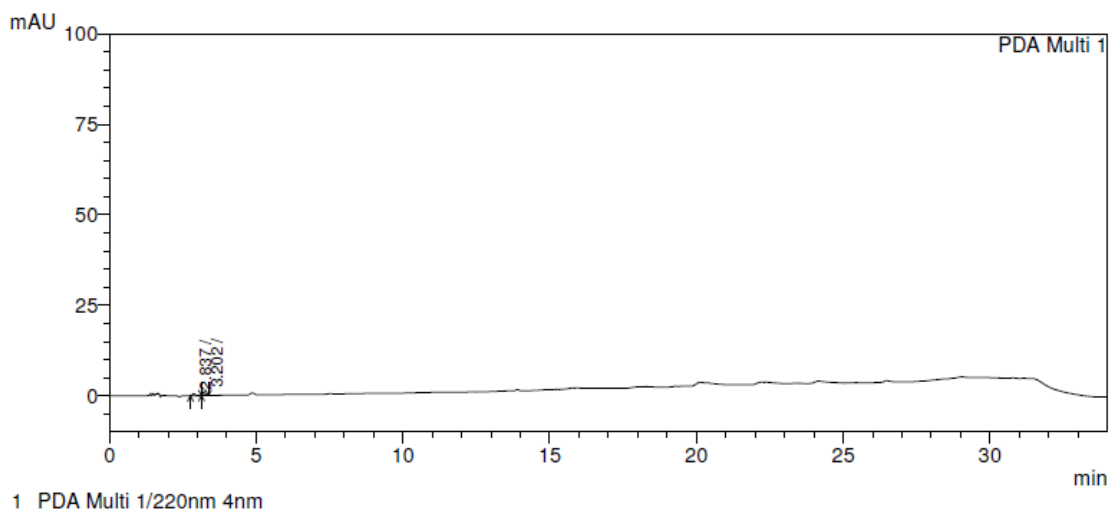
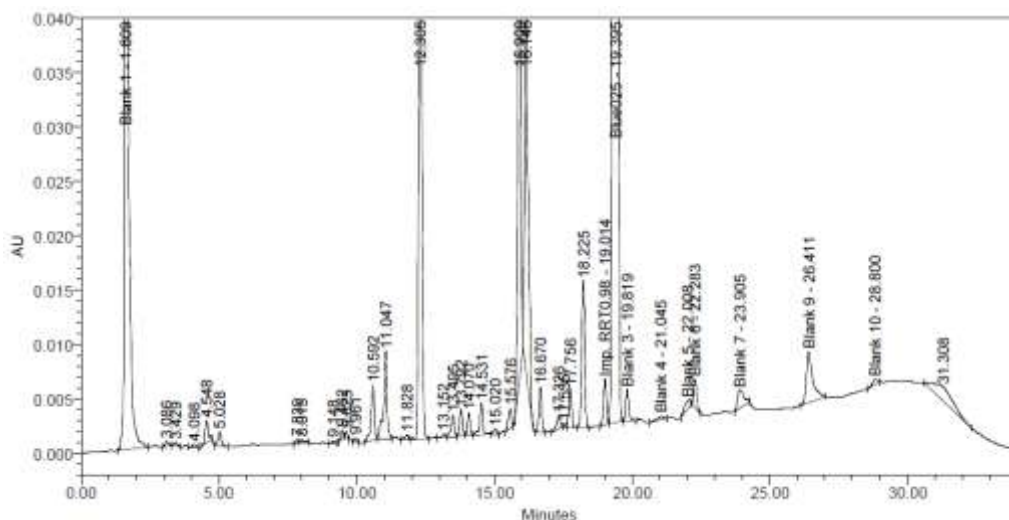
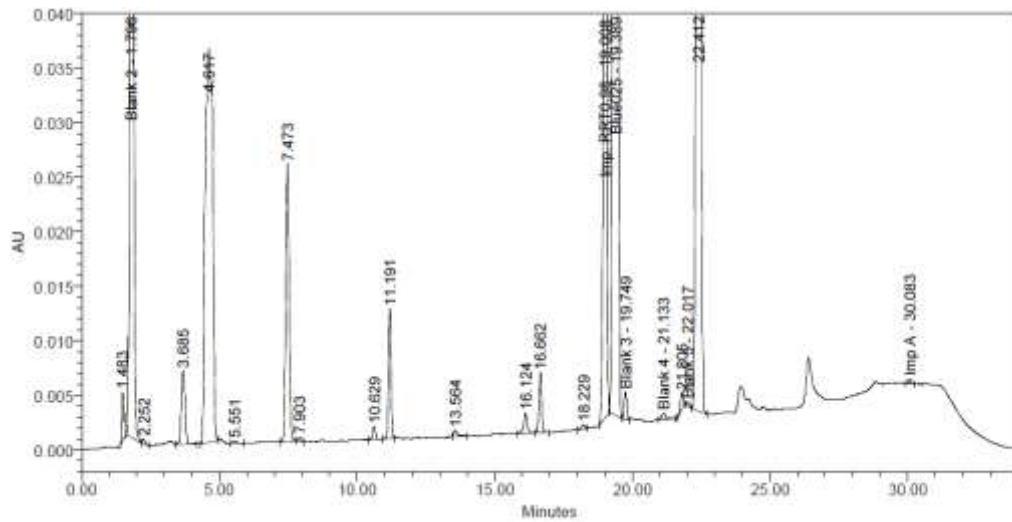
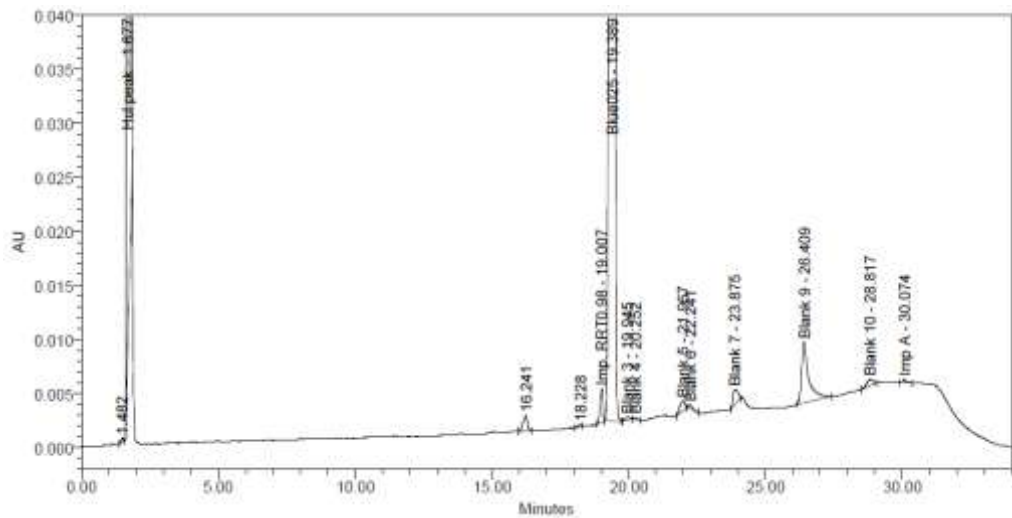


Figura 29. Cromatograma da solução do branco (solvente).

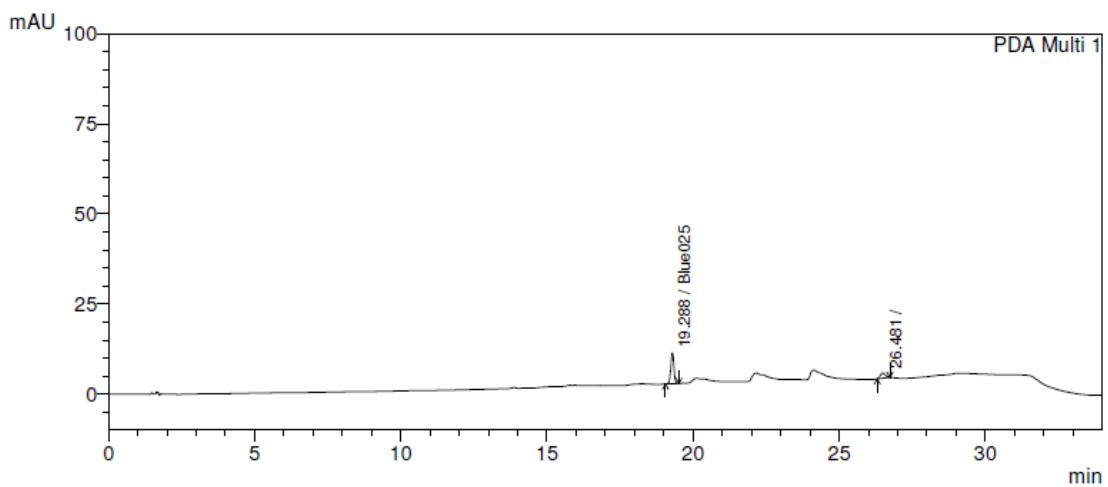
Figura 30. Cromatograma da amostra de substância ativa a 0.4mg/mL degradada com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% a 80°C, 20horas.



**Figura 31.** Cromatograma da amostra de substância ativa a 0.4mg/mL degradada com HCl 10M a 80°C, 20horas.

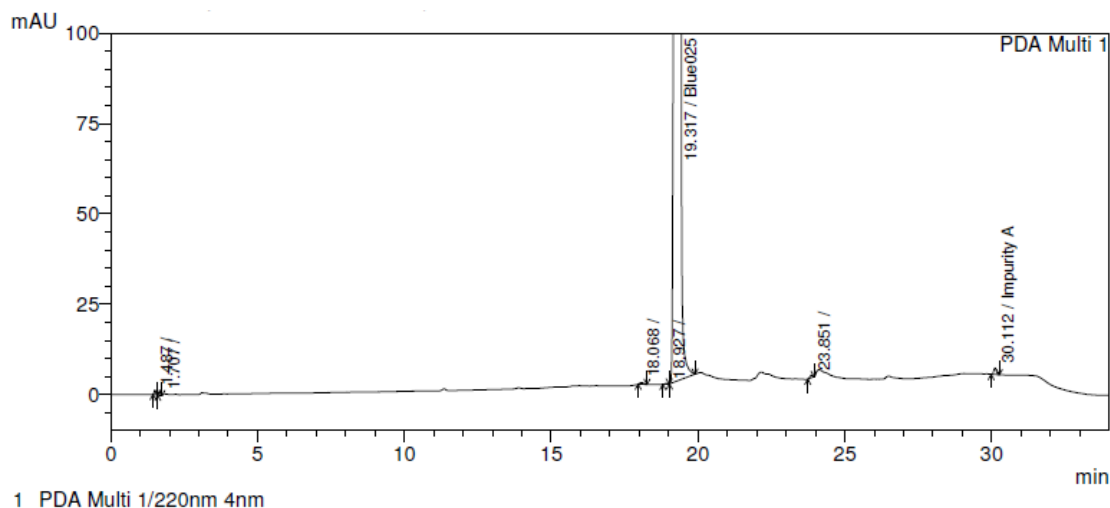


**Figura 32.** Cromatograma da amostra de substância ativa a 0.4mg/mL degradada com NaOH 1M a 80°C, 26horas.



1 PDA Multi 1/220nm 4nm

**Figura 33.** Cromatograma da solução de substância ativa a 0.2% (8E-4 mg/ml).



**Figura 34.** Cromatograma da solução de substância ativa a 100% (0.4mg/ml).

A partir dos resultados apresentados acima pode concluir-se que o gradiente descrito na tabela 13 tem capacidade para separar o pico da substância ativa dos picos de impurezas, tanto conhecidas como desconhecidas, nas amostras degradadas testadas.

O desenvolvimento do método continuou de forma a definir a concentração de trabalho.

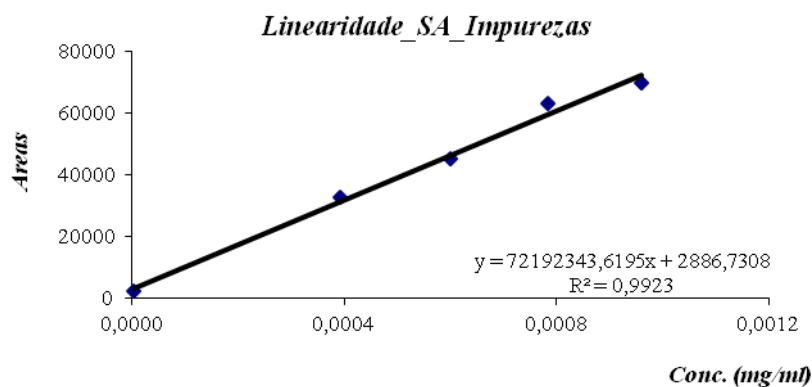
### 3.1.2. Definição da concentração de trabalho

Os métodos analíticos descritos para a substância ativa propõem 0.4mg/mL de substância ativa como concentração de trabalho para análise de conteúdo e 5mg/mL para a análise de impurezas, com 5 $\mu$ L de volume de injeção. Na tentativa de ter o mesmo método para quantificar conteúdo e substâncias relacionadas foram feitas algumas modificações. Dois ensaios de linearidade, uma linearidade para o método de conteúdo (amostras com um nível de concentração de 60% a 140%) e uma linearidade ao nível das impurezas (níveis de concentração desde LQ a 0.24%), foram realizados considerando a concentração de substância ativa de 0.4mg/mL (100%) para os dois métodos, com um volume de injeção de 20 $\mu$ L.

O ensaio de linearidade realizado para o nível de impurezas está de acordo com os critérios de aceitação definidos (resultados apresentados na Tabela 14 e Figura 35); o mesmo não se verificou para a linearidade realizada para o método de conteúdo (resultados apresentados na Tabela 16 e Figura 36).

**Resultados****Tabela 14.** Resultados da linearidade para o nível de impurezas (100% de Blue025 = 0.4mg/mL)

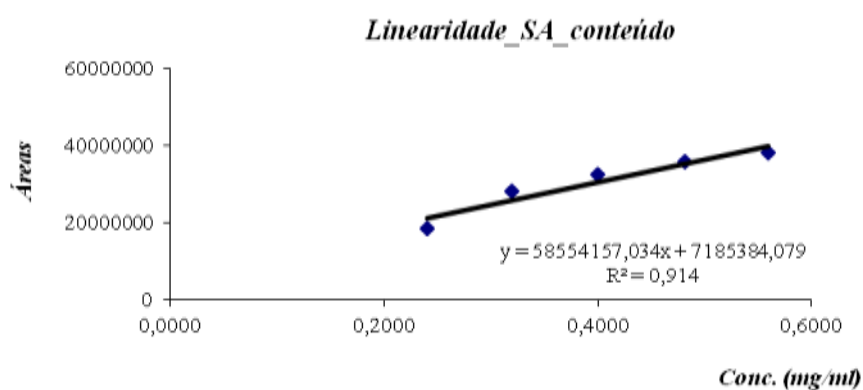
| Conc. (%)          | Conc. (mg/ml) | Área  | RF        |
|--------------------|---------------|-------|-----------|
| <b>(LQ) 0.001%</b> | 0.000004      | 2154  | 5.382E+08 |
| <b>0.1%</b>        | 0.0004        | 32521 | 8.300E+07 |
| <b>0.15%</b>       | 0.0006        | 45164 | 7.524E+07 |
| <b>0.2%</b>        | 0.0008        | 62812 | 8.015E+07 |
| <b>0.24%</b>       | 0.0010        | 69607 | 7.247E+07 |

**Figura 35.** Resultados da linearidade para o nível de impurezas relativas à concentração de substância ativa de 0.4mg/mL (100%).**Tabela 15.** Avaliação dos resultados da linearidade para o nível das impurezas (100% de Blue025 = 0.4mg/mL; volume de injeção de 20µL)

|  | Limites         | SA            |           |
|--|-----------------|---------------|-----------|
|  |                 | Resultado     | Avaliação |
| Intercepção eixo dos yy' (relativa à conc. 0.2%) | $\leq \pm 10\%$ | <b>4.60%</b>  | CUMPRE    |
| Coeficiente de correlação                        | $\geq 0.99$     | <b>0.9961</b> | CUMPRE    |

**Tabela 16.** Resultados da linearidade para conteúdo (100% Blue025 = 0.4mg/mL; volume de injeção de 20µL).

| Conc. (%) | Conc. (mg/ml) | Área     | RF        |
|-----------|---------------|----------|-----------|
| 60%       | 0.2401        | 18413779 | 7.669E+07 |
| 80%       | 0.3191        | 28259215 | 8.857E+07 |
| 100%      | 0.4002        | 32484024 | 8.117E+07 |
| 120%      | 0.4814        | 35776787 | 7.432E+07 |
| 140%      | 0.5598        | 38131050 | 6.812E+07 |

**Figura 36.** Resultados da linearidade de conteúdo relativa à concentração de trabalho de 0.4mg/mL de Blue025 (100%); volume de injeção: 20µL.**Tabela 17.** Avaliação dos resultados da linearidade para conteúdo (100% de Blue025 = 0.4mg/mL; volume de injeção de 20µL)

|  | Limites        | SA            |            |
|--|----------------|---------------|------------|
|  |                | Resultado     | Avaliação  |
| Intercepção eixo dos yy'<br>(relativa à conc.100%) | $\leq \pm 3\%$ | <b>22.12%</b> | NÃO CUMPRE |
| Coefficiente de correlação                         | $\geq 0.997$   | <b>0.9560</b> | NÃO CUMPRE |

|                        |   |
|------------------------|---|
| <b>AVALIAÇÃO FINAL</b> | LINEARIDADE AO NÍVEL DAS IMPUREZAS - CUMPRE |
| <b>AVALIAÇÃO FINAL</b> | LINEARIDADE DO CONTEÚDO - NÃO CUMPRE        |

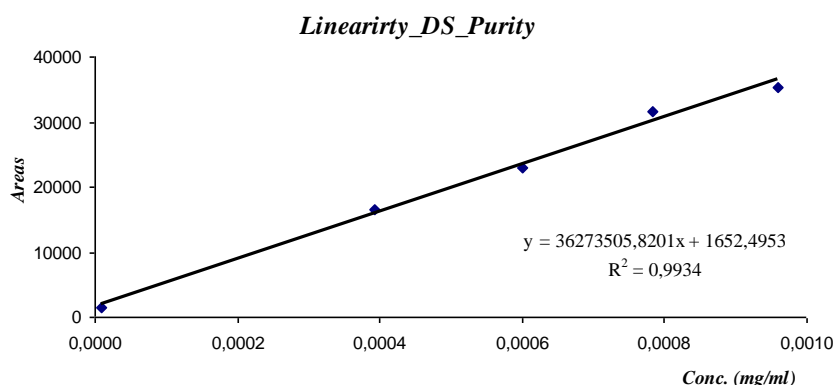


Na concentração testada anteriormente e com 20 $\mu$ L de volume de injeção obteve-se um valor de intercepção no eixo dos yy' elevado. Assim, de seguida, foi testado um volume de injeção mais baixo, 10 $\mu$ L, mantendo a concentração de substância ativa anterior (100% = 0.4 mg/mL).

## **Resultados**

**Tabela 18.** Resultados da linearidade para o nível de impurezas (100% de Blue025 = 0.4mg/mL; volume de injeção: 10 $\mu$ L).

| Conc. (%)     | Conc. (mg/ml) | Área  | RF        |
|---------------|---------------|-------|-----------|
| <b>0.002%</b> | 0.000008      | 1450  | 1.812E+08 |
| <b>0.1%</b>   | 0.00039       | 16494 | 4.209E+07 |
| <b>0.15%</b>  | 0.00060       | 22977 | 3.828E+07 |
| <b>0.2%</b>   | 0.00078       | 31630 | 4.036E+07 |
| <b>0.24%</b>  | 0.00096       | 35255 | 3.671E+07 |



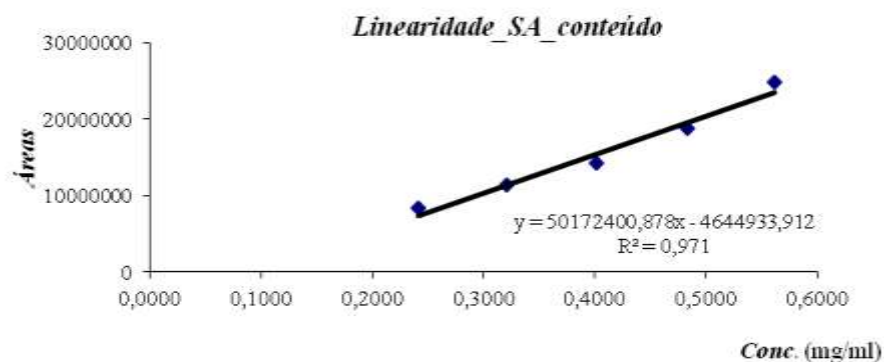
**Figura 37.** Resultados da linearidade para o nível de impurezas relativas a uma concentração de Blue025 de 0.4mg/mL (100%); volume de injeção: 10 $\mu$ L.

**Tabela 19.** Avaliação dos resultados da linearidade ao nível das impurezas (100% de Blue025 = 0.4mg/mL; volume de injeção de 10 $\mu$ L).

|  | Limites         | SA            |           |
|--|-----------------|---------------|-----------|
|  |                 | Resultados    | Avaliação |
| Intercepção eixo dos yy' (relativa à conc. 0.2%) | $\leq \pm 10\%$ | <b>5.22%</b>  | CUMPRE    |
| Coeficiente de correlação                        | $\geq 0.99$     | <b>0.9967</b> | CUMPRE    |

**Tabela 20.** Resultados da linearidade de conteúdo (100% de Blue025 = 0.4mg/mL) (volume de injeção: 10µL).

| Conc. (%) | Conc. (mg/ml) | Área     | RF        |
|-----------|---------------|----------|-----------|
| 60%       | 0.2411        | 8353427  | 3.465E+07 |
| 80%       | 0.3203        | 11336804 | 3.539E+07 |
| 100%      | 0.4018        | 14260849 | 3.549E+07 |
| 120%      | 0.4833        | 18752209 | 3.880E+07 |
| 140%      | 0.5620        | 24845317 | 4.421E+07 |



**Figura 38.** Resultados da linearidade de conteúdo relativa à concentração de trabalho de 0.4mg/mL de Blue025 (100%); volume de injeção: 10µL.

**Tabela 21.** Avaliação dos resultados da linearidade para conteúdo (100% de Blue025 = 0.4mg/mL; volume de injeção de 10µL).

|   | Limites        | SA             |            |
|---|----------------|----------------|------------|
|   |                | Resultados     | Avaliação  |
| Intercepção eixo dos yy'<br>(relativa à conc. 100%) | $\leq \pm 3\%$ | <b>-32.57%</b> | NÃO CUMPRE |
| Coefficiente de correlação                          | $\geq 0.997$   | <b>0.9854</b>  | NÃO CUMPRE |

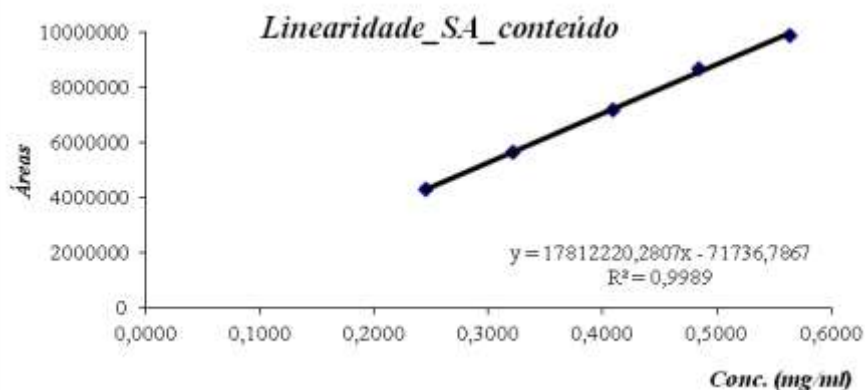
|                        |   |
|------------------------|---|
| <b>AVALIAÇÃO FINAL</b> | LINEARIDADE AO NÍVEL DAS IMPUREZAS - CUMPRE |
| <b>AVALIAÇÃO FINAL</b> | LINEARIDADE DO CONTEÚDO - NÃO CUMPRE        |

Com a concentração de trabalho referida e 10 $\mu$ L de volume de injeção também se obteve um valor de intercepção no eixo dos yy' elevado para a linearidade de conteúdo. Assim, e mantendo a mesma concentração de trabalho, testou-se o volume de injeção inicial de 5 $\mu$ L (definido para a substância ativa), com os mesmos cinco pontos de linearidade com concentrações de 60% a 140%.

## **Resultados**

**Tabela 22.** Resultados da linearidade de conteúdo (100% de Blue025 = 0.4mg/mL) (volume de injeção: 5 $\mu$ L).

| Conc. (%)   | Conc. (mg/ml) | Área    | RF        |
|-------------|---------------|---------|-----------|
| <b>60%</b>  | 0.2456        | 4292435 | 1.747E+07 |
| <b>80%</b>  | 0.3213        | 5637964 | 1.755E+07 |
| <b>100%</b> | 0.4094        | 7198643 | 1.758E+07 |
| <b>120%</b> | 0.4847        | 8688309 | 1.793E+07 |
| <b>140%</b> | 0.5636        | 9886374 | 1.754E+07 |



**Figura 39.** Resultados da linearidade de conteúdo relativa à concentração de trabalho de 0.4mg/mL de Blue025 (100%); volume de injeção: 5 $\mu$ L.

**Tabela 23.** Avaliação dos resultados da linearidade para conteúdo (100% de Blue025 = 0.4mg/mL; volume de injeção de 5 $\mu$ L).

|  | Limites        | SA            |           |
|--|----------------|---------------|-----------|
|  |                | Resultados    | Avaliação |
| Intercepção eixo dos yy' (relativa à conc. 100%) | $\leq \pm 3\%$ | <b>-1.00%</b> | CUMPRE    |
| Coeficiente de correlação                        | $\geq 0.997$   | <b>0.9994</b> | CUMPRE    |

**AVALIAÇÃO FINAL****LINEARIDADE DO CONTEÚDO - CUMPRE**

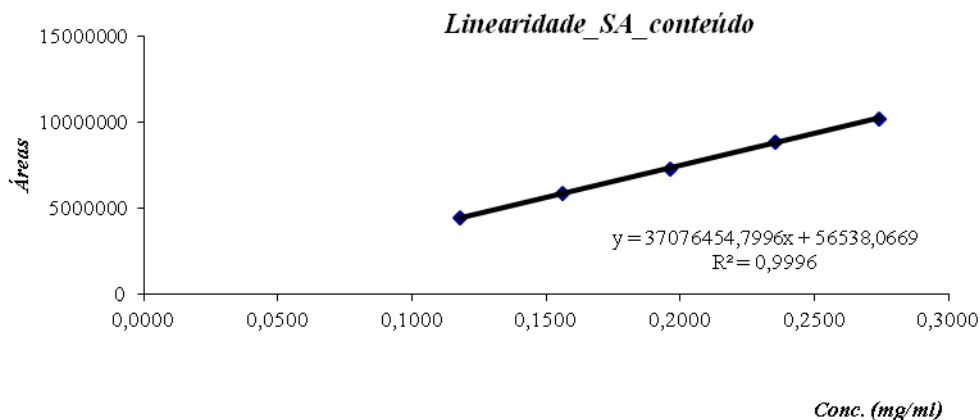
Com base nos resultados obtidos para a linearidade, é possível definir uma concentração de trabalho de 0.4mg/mL com um volume de injeção de 5 $\mu$ L. No entanto, e de forma a avaliar a possibilidade de utilizar 0.2mg/mL como concentração de trabalho para a análise de conteúdo em comprimidos de Blue025, prepararam-se as seguintes amostras e analisaram-se com um volume de injeção de 10 $\mu$ L:

- solução padrão a 60% (0.12mg/ml)
- solução padrão a 80% (0.16mg/ml)
- solução padrão a 100% (0.2mg/ml)
- solução padrão a 120% (0.24mg/ml)
- solução padrão a 140% (0.28mg/ml)

**Resultados**

**Tabela 24.** Resultados da linearidade de conteúdo relativa a 100% Blue025 = 0.2mg/mL  
(volume de injeção: 10 $\mu$ L).

| <b>Conc. (%)</b> | <b>Conc. (mg/ml)</b> | <b>Área</b> | <b>RF</b> |
|------------------|----------------------|-------------|-----------|
| <b>60%</b>       | 0.1178               | 4432946     | 3.764E+07 |
| <b>80%</b>       | 0.1562               | 5842688     | 3.741E+07 |
| <b>100%</b>      | 0.1963               | 7282426     | 3.711E+07 |
| <b>120%</b>      | 0.2356               | 8866054     | 3.763E+07 |
| <b>140%</b>      | 0.2740               | 10186239    | 3.718E+07 |



**Figura 40.** Resultados da linearidade de conteúdo relativa à concentração de trabalho de 0.2mg/mL de Blue025 (100%); volume de injeção: 10 $\mu$ L.

**Tabela 25.** Avaliação dos resultados da linearidade para conteúdo (100% de Blue025 = 0.2mg/mL; volume de injeção de 10 $\mu$ L).

|   | Limites        | SA            |           |
|---|----------------|---------------|-----------|
|   |                | Resultados    | Avaliação |
| Intercepção eixo dos yy'<br>(relativa à conc. 100%) | $\leq \pm 3\%$ | <b>0.78%</b>  | CUMPRE    |
| Coefficiente de correlação                          | $\geq 0.997$   | <b>0.9998</b> | CUMPRE    |

|                        |   |
|------------------------|---|
| <b>AVALIAÇÃO FINAL</b> | <b>LINEARIDADE DE CONTEÚDO - CUMPRE</b> |
|------------------------|---|

Como a linearidade para a concentração de substância ativa 0.2mg/mL (100%) cumpre os critérios de aceitação definidos, esta foi definida como concentração de trabalho para os métodos de conteúdo e substâncias relacionadas.

Após desenvolvimento dos métodos de conteúdo e impurezas, as condições analíticas finais definidas estão resumidas abaixo:

**Tabela 26.** Condições analíticas finais.

| <b>Condições HPLC</b>    |   |
|--------------------------|---|
| Coluna analítica:        | Zorbax SB-Phenyl, 3.5 µm, 150 x 4.6mm               |
| Fase móvel A:            | Tampão fosfato 0.013M: Acetonitrilo (75:25) (pH2.5) |
| Fase móvel B:            | Tampão fosfato 0.033M: Acetonitrilo (30:70) (pH2.5) |
| Fluxo:                   | 1.0 ml/min  |
| Temperatura da coluna    | 40°C  |
| Temperatura das amostras | 25°C  |
| Deteção:                 | UV 220nm  |
| Tempo de corrida:        | <b><u>34 minutos</u></b>                            |
| Volume de injeção:       | <b><u>10 µL</u></b>                                 |
| Solvente:                | Fase móvel B  |

| <b>Gradiente:</b>  |                         |                         |
|--------------------|-------------------------|-------------------------|
| <b>Tempo (min)</b> | <b>Fase móvel A (%)</b> | <b>Fase móvel B (%)</b> |
| 0                  | 100                     | 0                       |
| 25                 | 20                      | 80                      |
| 27                 | 0                       | 100                     |
| 29                 | 0                       | 100                     |
| 31                 | 100                     | 0                       |
| 34                 | 100                     | 0                       |

Para confirmar que o método definido era adequado tanto para análise de conteúdo como de substâncias relacionadas foram realizados vários testes, cujos resultados estão resumidamente apresentados nas tabelas seguintes:

## Método de conteúdo

**Tabela 27.** Resultados dos testes de seletividade, linearidade, rigor, precisão, estabilidade e filtração realizados para avaliação da performance do método de análise de conteúdo de substância ativa em comprimidos revestidos de Blue025.

| PARÂMETRO           | CRITÉRIO DE ACEITAÇÃO   | RESULTADO   |   |         |              |
|---------------------|---|---|---|---------|--------------|
| SELETIVIDADE        | Não interfere   | CUMPRE  |   |         |              |
| LINEARIDADE         | Intercepção eixo dos $yy'$<br>$\leq 3\%$<br>$r \geq 0.997$                                    | Padrão  | Intercepção eixo dos $yy' = 0.78\%$<br>$r = 1.0000$                 |         |              |
| RIGOR               | Recuperação: 97 - 103%<br>RSD (n=3) $\leq 3\%$  | Conc.   | Recuperação (%)   | RSD (%) | CI 95%       |
|                     |   | 60%   | 99.9  | 0.41    | 99.6%-100.4% |
|                     |   | 100%  | 99.1  | 0.29    | 98.8%-99.4%  |
|                     |   | 120%  | 100.5   | 0.54    | 99.9%-100.9% |
| PRECISÃO DO SISTEMA | RSD do RF (1dia)<br>$\leq 2\%$ (SA a 100%)  | SA a 0.2mg/ml<br>(100%)   |   |         | RSD (%)      |
|                     |   |   | Padrão  |         | 0.46%        |
|                     |   |   | Fórmula reconstituída   |         | 0.92%        |
| ESTABILIDADE        | - desvio RF $\leq 2\%$ ;<br>p-value $\geq 0.05$ (intervalo de confiança=95%, teste-t Student) | Estável   | Soluções padrão são estáveis pelo menos 4 dias (condições ambiente) |         |              |
| FILTRAÇÃO           | Desvio RF $\leq \pm 2\%$  | As soluções não podem ser filtradas usando filtros GHP Pall, PVDF Pall e Nylon VWR (as amostras usadas na análise de conteúdo são as mesmas das usadas na análise de impurezas e a filtração induz o aparecimento de novos picos nos cromatogramas)<br>Pode ser usada centrifugação 4000rpm durante 10 minutos. |   |         |              |

## Método de Impurezas

**Tabela 28.** Resultados dos testes de seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, estabilidade e filtração realizados para avaliação da performance do método para análise de substâncias relacionadas em comprimidos revestidos de Blue025.

| PARÂMETRO                           | CRITÉRIO DE ACEITAÇÃO   | RESULTADO  |  |         |              |  |
|-------------------------------------|---|--|--|---------|--------------|--|
| <b>SELETIVIDADE</b>                 | <i>Aceitável – impurezas conhecidas e desconhecidas não apresentam interferência do pico da substância activa nem de nenhum pico do solvente ou excipientes</i> |  |  |         |              |  |
| <b>LINEARIDADE</b>                  | Intercepção eixo dos yy'<br>≤10%<br>r ≥ 0.99  | Padrão   | Intercepção eixo dos yy' = -0.58%<br>r = 0.9956  |         |              |  |
| <b>LIMITE DE DETECÇÃO (DL)</b>      | S/N de acordo com Farm. Eur.<br>DL= Conc. (S/N ≥ 3)   | Limite de detecção (DL)  | SA   |         | 0.005%       |  |
|                                     |   |  | Impureza A   |         | 0.003%       |  |
| <b>LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (QL)</b> | S/N de acordo com Farm. Eur<br>QL= Conc. (S/N ≥ 10)<br>QL ≤ 0.1%<br>Recuperação: 90 - 110%<br>RSD recuperação QL ≤ 10%  | Limite de quantificação (QL)   | SA   |         | 0.03%        |  |
|                                     |   |  | Impureza A   |         | 0.01%        |  |
|                                     |   | Concentração (SA):   | Recuperação (%)  | RSD (%) | CI 95%       |  |
|                                     |   | 0.03%  | 103.0%   | 3.58%   | 93.8%-112.2% |  |
| <b>PRECISÃO DO SISTEMA</b>          | RSD (1dia)<br>≤ 5% para SA a 0.2%<br>RSD (1dia)<br>≤ 5% para Impureza A a 0.2%  |  |  |         | RSD (%)      |  |
|                                     |   | Padrão   | SA a 0.2%  |         | 1.59%        |  |
|                                     |   | Fórmula reconstituída+Imp A a 0.2%   | Impureza A a 0.2%  |         | 0.75%        |  |
| <b>ESTABILIDADE</b>                 | - desvio RF ≤5%;<br><i>p-value</i> ≥0.05 (intervalo de confiança 95%, <i>teste-t Student</i> )  | Estável  | Padrão a 0.2% - estável pelo menos 48 horas nas condições ambiente<br>Amostra - estável pelo menos 4 dias nas condições ambiente |         |              |  |
| <b>FILTRAÇÃO</b>                    | Desvio RF ≤±5%  | Soluções não podem ser filtradas usando filtros GHP Pall, PVDF Pall e Nylon VWR pois induzem o aparecimento de picos no cromatograma.<br>Pode ser usada centrifugação 4000rpm durante 10 minutos |  |         |              |  |

Com base nos testes realizados e resultados obtidos, concluiu-se que o método analítico desenvolvido é adequado para a análise de conteúdo de substância ativa e para a quantificação de substâncias relacionadas em comprimidos revestidos de Blue025 de uma forma precisa, devendo ser validado de forma a poder ser utilizado para estes fins.



Após o desenvolvimento do método foi então realizada a sua validação, nomeadamente a validação do método para análise de conteúdo de substância ativa em comprimidos revestidos de Blue025.

### 3.2. Validação do método analítico

Para demonstrar que o método desenvolvido é adequado para a análise de conteúdo de substância ativa em comprimidos de Blue025 foi realizada a sua validação, tendo sido para isso avaliada a seletividade, linearidade, precisão, rigor e a robustez do método. Foram ainda realizados testes de filtração e estudada a estabilidade das soluções preparadas.

Os parâmetros de validação foram avaliados respeitando o protocolo experimental acima apresentado (capítulo 2.) e os critérios de aceitação, estabelecidos de acordo com o definido no protocolo de validação analítica específico para esta validação e preparado com base em Norma interna de validação analítica (elaborada de acordo com o definido na *Guideline* de validação: *Validation of analytical procedures: text and methodology (Q2 (R1))*, encontram-se sumariados na tabela seguinte:

**Tabela 29.** Critérios de aceitação dos ensaios de validação (com base no protocolo de validação analítica)

| Parâmetro                          |                     | Critérios de aceitação   |
|------------------------------------|---------------------|--|
| Especificidade                     |                     | A presença de excipientes e impurezas não deve interferir com o pico da substância ativa.<br>$\% \text{ interferência} \leq 2.0\%$ |
|                                    |                     | Devem ser obtidos picos não impuros  |
| Linearidade                        |                     | Intercepção eixo dos $yy' \leq 3\%$  |
|                                    |                     | $r \geq 0.997$   |
|                                    |                     | $\% \text{ desvio do declive (substância activa vs fórmula reconstituída)} \leq 3\%$   |
| Rigor                              |                     | Recuperação (%): 97 - 103%   |
|                                    |                     | $RSD \leq 3\%$   |
| Precisão                           | Repetibilidade      | $RSD \text{ (intra-dia)} \leq 3\%$   |
|                                    | Precisão intermédia | $\% \text{ desvio (intra-lab.)} \leq 3\%$  |
|                                    |                     | $\% \text{ desvio (inter-lab.)} \leq 3\%$  |
|                                    |                     | $p\text{-value} \geq 0.05$   |
|                                    | Precisão do sistema | $RSD \text{ (intra-dia)} \leq 2.0\%$   |
| $RSD \text{ (inter-dia)} \leq 2\%$ |                     |  |
| Estabilidade                       |                     | $\% \text{ desvio} \leq 2\%$   |
|                                    |                     | $p\text{-value} \geq 0.05$   |
| Filtração                          |                     | $\% \text{ desvio} \leq 2\%$   |
|                                    |                     | $p\text{-value} \geq 0.05$   |
|                                    |                     | Devem ser obtido picos não impuros   |
| Robustez                           |                     | $R \geq 1.5$   |
|                                    |                     | desvio recuperação em relação a SOP (%) $\leq 2\%$   |
|                                    |                     | $p\text{-value} \geq 0.05$   |

### 3.2.1. Filtração

Numa análise por HPLC, a preparação das amostras é um passo muito importante. A filtração permite remover partículas existentes na solução da amostra, não devendo, contudo, reter o composto a analisar.

Existem no mercado vários tipos de filtros com várias dimensões de poros e vários tipos de membranas. A escolha destes filtros baseia-se na aplicação pretendida e nos solventes utilizados.

Neste trabalho, o teste de filtração consistiu em avaliar diferentes tipos de membranas com 0.45 $\mu$ m de diferentes fornecedores de forma a verificar se eram adequados para a análise de conteúdo em causa. Avaliou-se ainda a possibilidade de centrifugação das amostras. Neste sentido foram avaliados três filtros diferentes, PTFE VWR, PP VWR e PTFE Simplepure, e a centrifugação das amostras a 4000rpm durante 10 minutos, que permitiram seleccionar o melhor sistema de preparação das amostras ao longo da validação e posteriormente na análise de rotina.

Assim, a filtração/centrifugação foi avaliada através da análise de uma solução padrão, contendo a substância ativa a 100% da concentração teórica (0.2mg/mL), antes e depois de filtrada/centrifugada. Antes de filtrada/centrifugada a solução padrão foi injetada 6 vezes de 6 “vials” diferentes (injeção simples). A solução padrão foi depois filtrada 6 vezes usando 6 filtros independentes para cada tipo de filtro e cada solução filtrada foi injetada uma vez. A solução centrifugada foi injetada 6 vezes a partir de 6 “vials” diferentes (injeção simples de cada vial).

O solvente foi também analisado, tendo sido realizada a análise de forma similar. O solvente foi analisado antes e depois de filtrado/centrifugado, sendo no entanto avaliado 2 vezes em vez de 6.

As respostas obtidas para o padrão não filtrado foram comparadas com as respostas obtidas para o padrão filtrado/centrifugado. Os resultados são apresentados na tabela seguinte:

**Tabela 30.** Resultados das soluções não filtradas, filtradas com filtros PTFE VWR, PP VWR e PTFE Simplepure com 0.45µm e centrifugadas.

| Amostra | Sem filtração |           | Filtração      |               |                |               |                 |               | Centrifugação  |               |
|---------|---------------|-----------|----------------|---------------|----------------|---------------|-----------------|---------------|----------------|---------------|
|         |               |           | PTFE VWR       |               | PP VWR         |               | PTFE Simplepure |               |                |               |
|         | Área          | RF        | Área           | RF            | Área           | RF            | Área            | RF            | Área           | RF            |
| #1      | 7505445       | 3.721E+07 | 7452964        | 3.695E+07     | 7236233        | 3.587E+07     | 7348462         | 3.643E+07     | 7289383        | 3.614E+07     |
| #2      | 7506597       | 3.721E+07 | 7328876        | 3.633E+07     | 7161153        | 3.550E+07     | 7154703         | 3.547E+07     | 7315097        | 3.626E+07     |
| #3      | 7378533       | 3.658E+07 | 7283462        | 3.611E+07     | 7269420        | 3.604E+07     | 7287165         | 3.613E+07     | 7328579        | 3.633E+07     |
| #4      | 7326520       | 3.632E+07 | 7200112        | 3.569E+07     | 7336846        | 3.637E+07     | 7174014         | 3.557E+07     | 7318096        | 3.628E+07     |
| #5      | 7218404       | 3.579E+07 | 7185706        | 3.562E+07     | 7308948        | 3.623E+07     | 7235755         | 3.587E+07     | 7326333        | 3.632E+07     |
| #6      | 7329012       | 3.633E+07 | 7152383        | 3.546E+07     | 7387016        | 3.662E+07     | 7297754         | 3.618E+07     | 7329173        | 3.633E+07     |
|         | <b>Média</b>  | 3.657E+07 | <b>Média</b>   | 3.603E+07     | <b>Média</b>   | 3.611E+07     | <b>Média</b>    | 3.594E+07     | <b>Média</b>   | 3.628E+07     |
|         |               |           | <b>Desvio</b>  | <b>-1.50%</b> | <b>Desvio</b>  | <b>-1.28%</b> | <b>Desvio</b>   | <b>-1.75%</b> | <b>Desvio</b>  | <b>-0.81%</b> |
|         |               |           | <i>p-value</i> | 0.120         | <i>p-value</i> | 0.125         | <i>p-value</i>  | 0.043         | <i>p-value</i> | 0.254         |

A diferença entre a solução padrão antes e depois da filtração/centrifugação foi determinada em termos de percentagem de alteração do fator de resposta (RF), através da equação:

$$\%_{\text{desvio}} = \frac{RF_{\text{antes filtração}} - RF_{\text{depois filtração}}}{\left(\frac{RF_{\text{antes filtração}} + RF_{\text{depois filtração}}}{2}\right)} \times 100$$

onde  $RF_{\text{antes filtração}}$  é a média dos fatores de resposta obtidos na análise das amostras não filtradas/não centrifugadas e  $RF_{\text{depois filtração}}$  é a média dos fatores de resposta obtidos na análise das amostras filtradas/centrifugadas.

Foi realizado um teste *t de Student* e avaliado o valor de *p-value* entre a solução não filtrada e cada uma das soluções filtradas/centrifugadas. Os resultados obtidos são estatisticamente semelhantes para um nível de confiança de 95% se  $p\text{-value} \geq 0.05$ .

O limite definido, para o desvio de RF entre a solução não filtrada e a filtrada/centrifugada, é de 2%.

Foram ainda comparados os cromatogramas das soluções analisadas (solvente e padrão, filtradas/centrifugadas e não filtradas/não centrifugadas) e avaliada a pureza do pico da substância ativa, como apresentado de seguida:

## Resultados da filtração/centrifugação do solvente

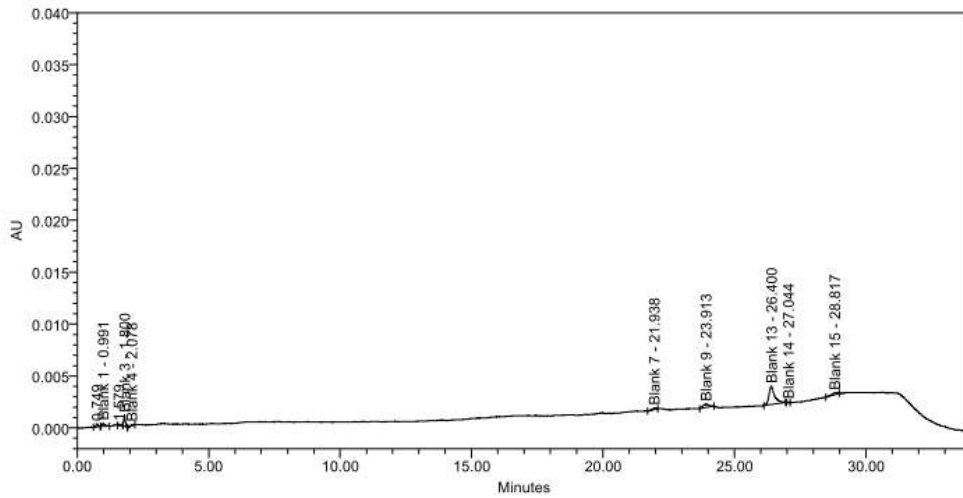


Figura 41. Cromatograma da solução de branco (solvente) não filtrado.

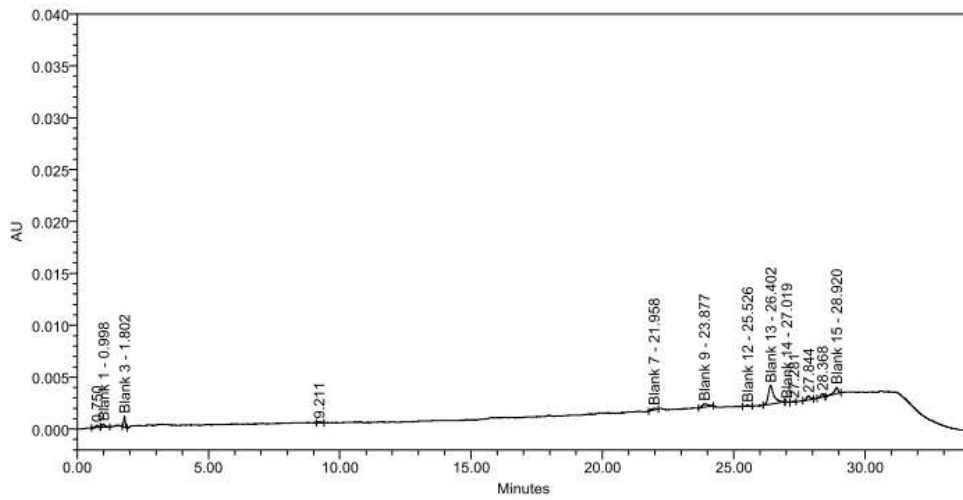


Figura 42. Cromatograma da solução de branco (solvente) filtrado com PTFE VWR.

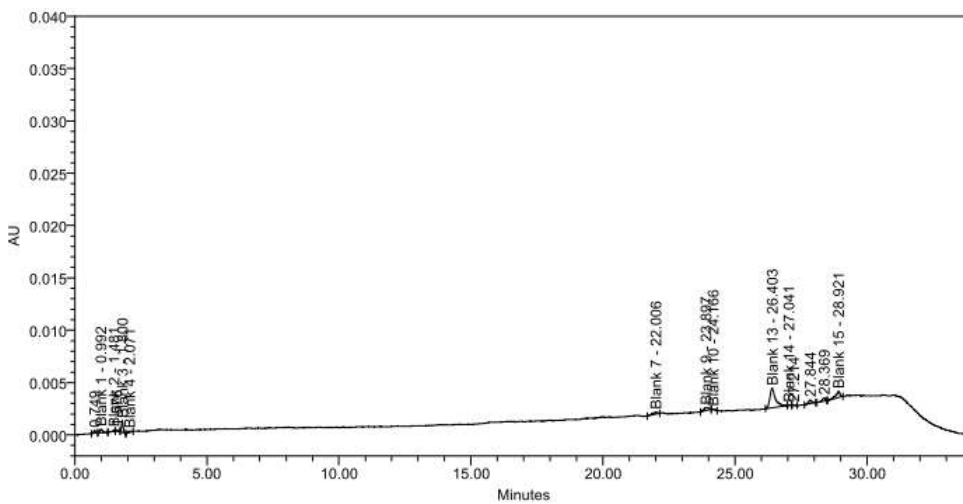


Figura 43. Cromatograma da solução de branco (solvente) filtrado com PP VWR.

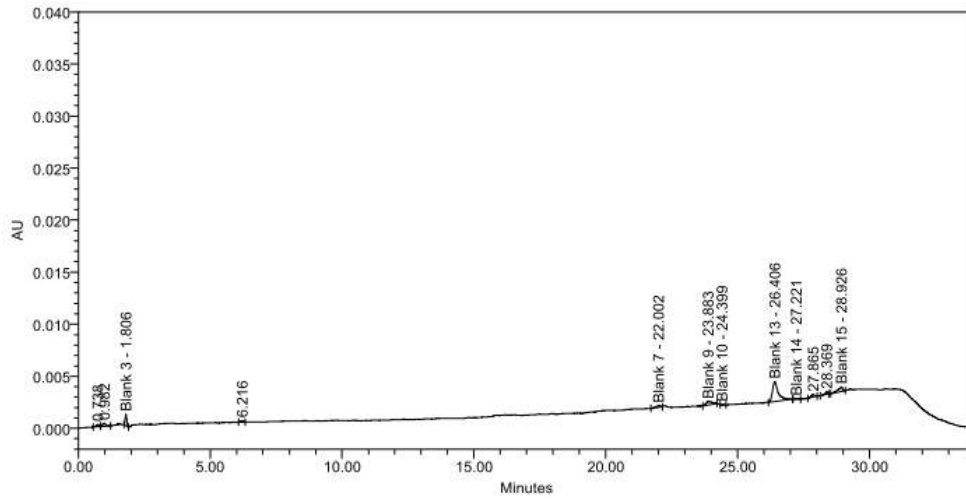


Figura 44. Cromatograma da solução de branco (solvente) filtrado com PTFE Simplepure.

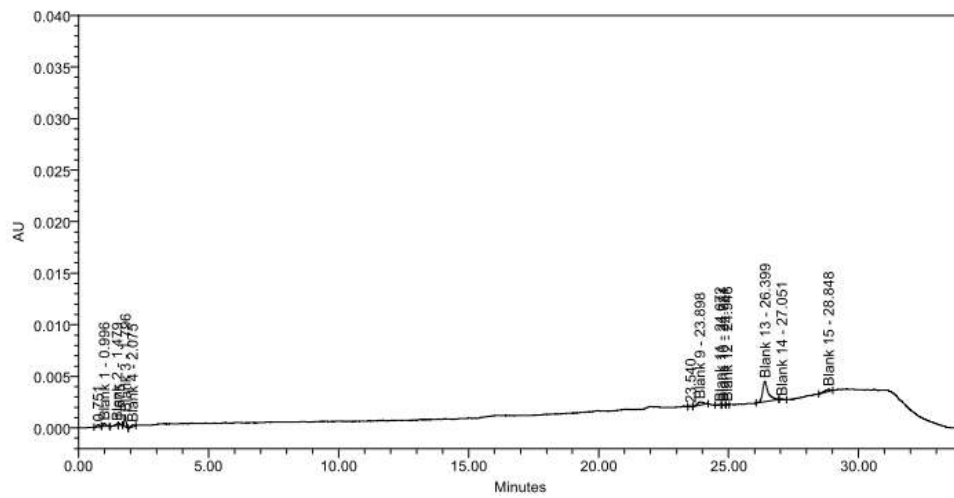
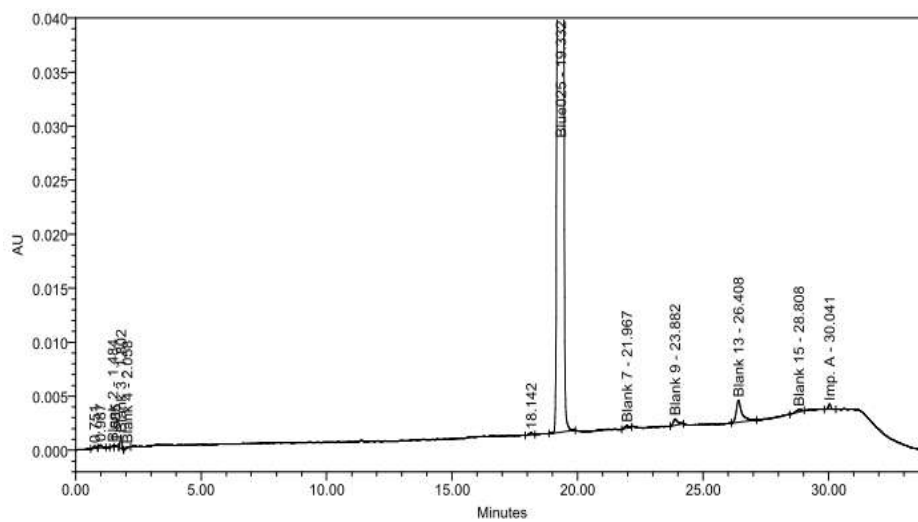
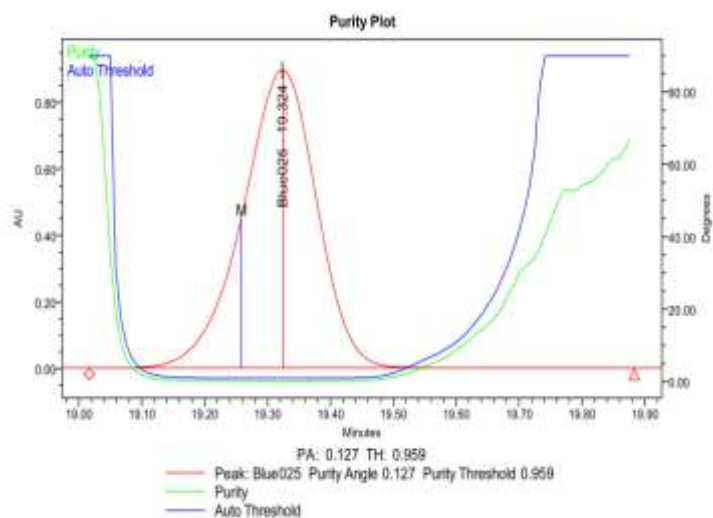


Figura 45. Cromatograma da solução de branco (solvente) centrifugado a 4000rpm durante 10min.

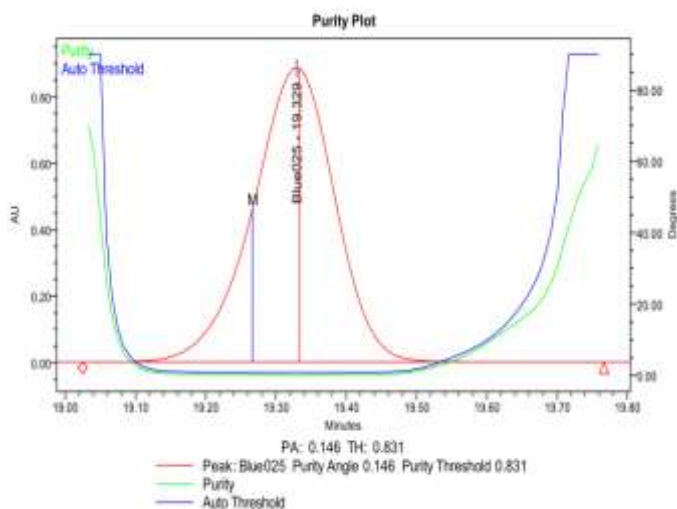
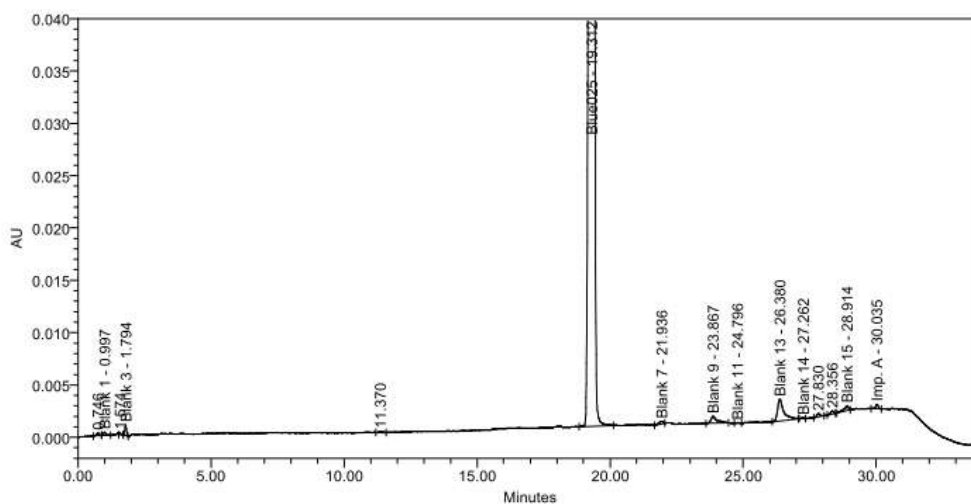
**Resultados da filtração/centrifugação da solução padrão**





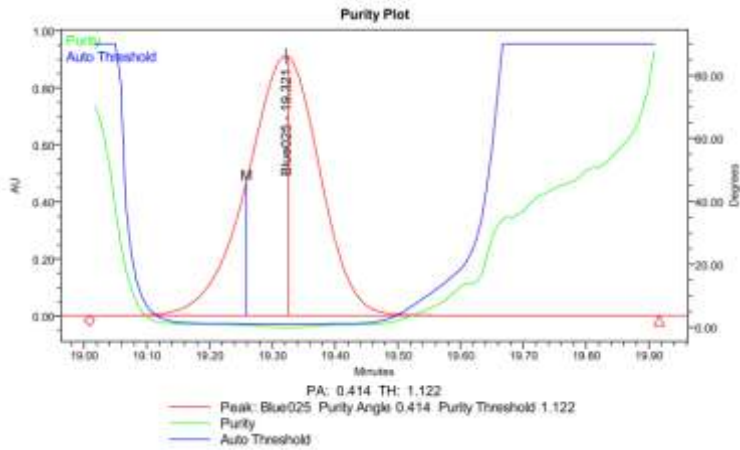
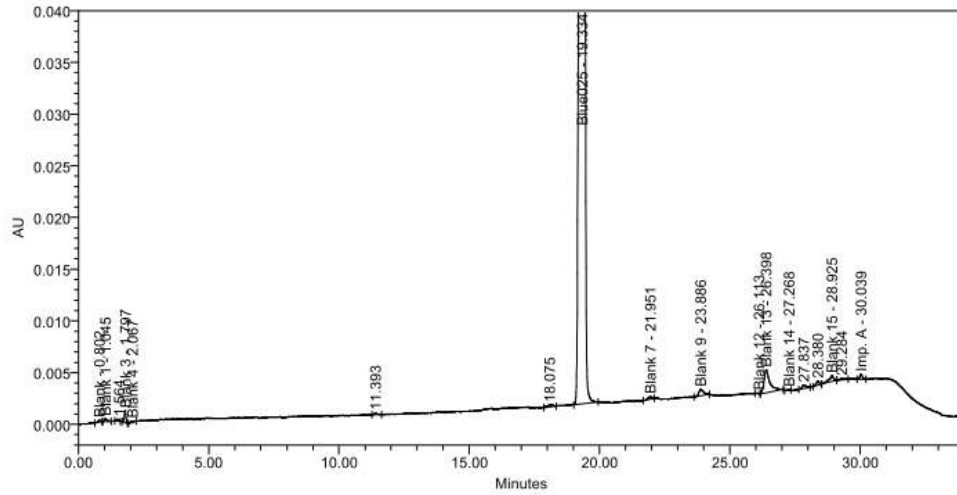
Pico: Blue025\_DS  
 Ângulo de pureza: 0.127  
 Limiar de pureza: 0.959

**Figura 46.** Cromatograma e avaliação da pureza do pico da solução padrão (0.2mg/mL) não filtrada/centrifugada.



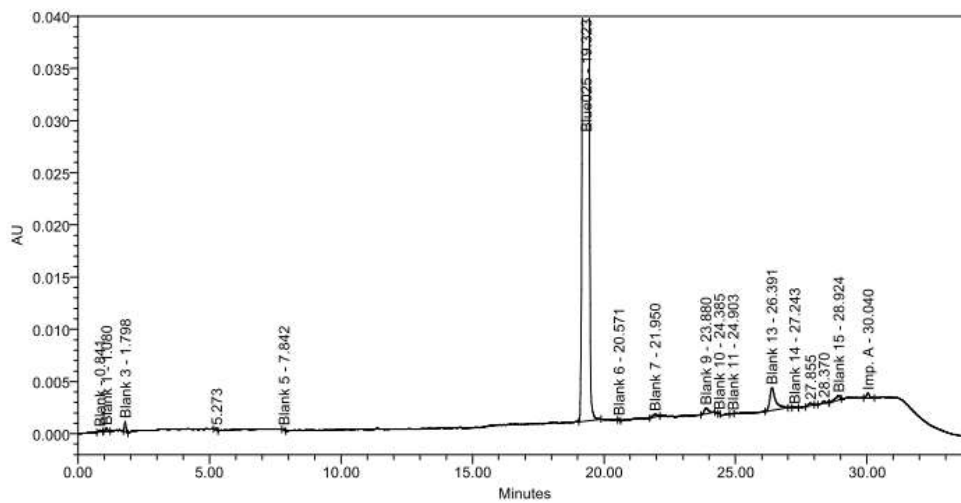
Pico: Blue025\_DS  
 Ângulo de pureza: 0.146  
 Limiar de pureza: 0.831

**Figura 47.** Cromatograma e avaliação da pureza do pico da solução padrão (0.2mg/mL) filtrada com PTFE VWR.

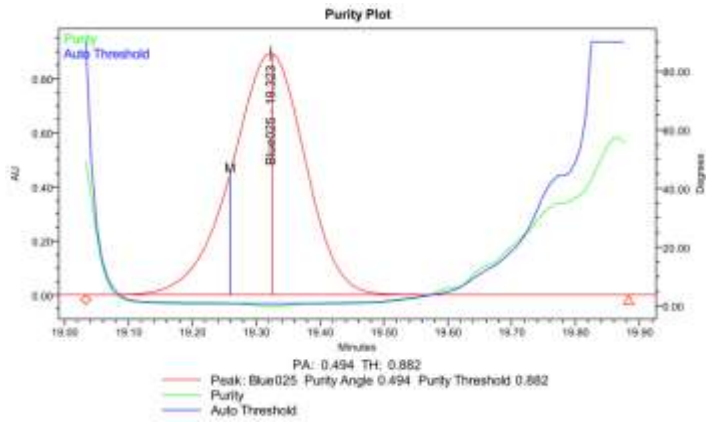


Pico: Blue025\_DS  
 Ângulo de pureza: 0.414  
 Limiar de pureza: 1.122

Figura 48. Cromatograma e avaliação da pureza do pico da solução padrão (0.2mg/mL) filtrada com PP VWR.

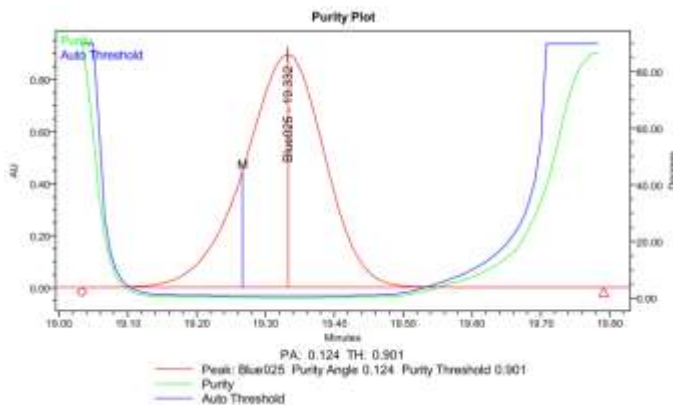
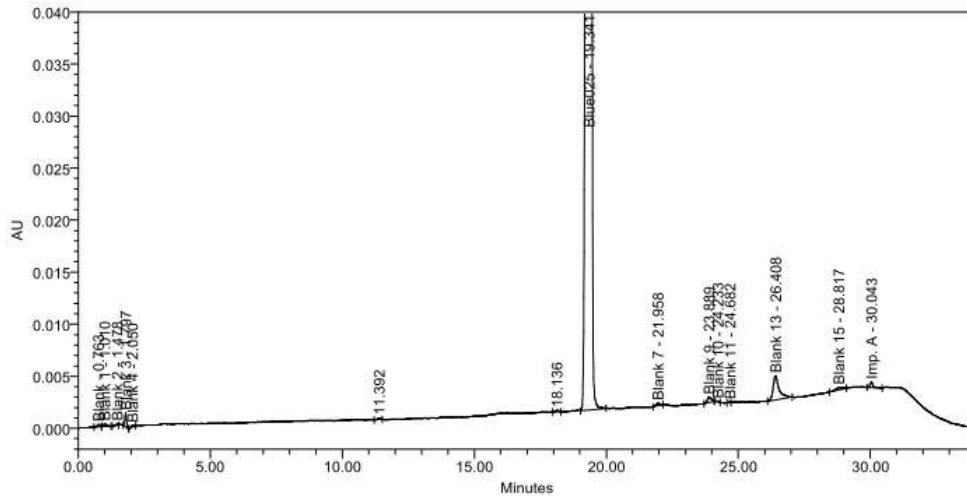






Pico: Blue025\_DS  
 Ângulo de pureza: 0.494  
 Limiar de pureza: 0.882

**Figura 49.** Cromatograma e avaliação da pureza do pico da solução padrão (0.2mg/mL) filtrada com PTFE Simplepure.



Pico: Blue025\_DS  
 Ângulo de pureza: 0.124  
 Limiar de pureza: 0.901

**Figura 50.** Cromatograma obtido e avaliação da pureza do pico da solução padrão (0.2mg/mL) centrifugada a 4000rpm durante 10min.

Analisando os resultados da Tabela 30, pode concluir-se que todos os sistemas de filtração testados (PTFE VWR, PP VWR e PTFE Simplepure, 0.45 $\mu$ m) e a centrifugação não alteraram as soluções analisadas considerando a análise de conteúdo da substância ativa, uma vez que não houve retenção da substância ativa ou influência do filtro na análise da solução de substância ativa (desvio entre RFs  $\leq 2\%$ ).

No entanto, como se pode verificar nos cromatogramas obtidos, houve uma diferença no perfil cromatográfico entre as soluções filtradas e não filtradas, o que não acontece com a centrifugação a 4000rpm durante 10 minutos. Qualquer um dos filtros testados promove o aparecimento de novos picos no tempo de retenção 27.8 minutos e 28.3 minutos. Pelo contrário, os cromatogramas obtidos para as amostras não filtradas/ não centrifugadas e centrifugadas são semelhantes, mostrando que não há influência da centrifugação no perfil cromatográfico.

A partir dos gráficos de pureza do pico da substância ativa e dos resultados de PDA apresentados acima para as soluções filtradas/centrifugadas pode concluir-se que, para todos os filtros testados e para a centrifugação, o pico de Blue025 apresenta resultados aceitáveis de pureza de pico, com um ângulo de pureza abaixo do limiar de pureza, indicativo de um pico não impuro.

Os valores de *p-value* obtidos no teste *t-Student* são  $\geq 0.05$ , exceto para os filtros PTFE Simplepure; como o valor do desvio entre as soluções não filtradas e filtradas com estes filtros (-1.75%) está próximo do limite definido (2%), este sistema de filtração não foi considerado adequado para a análise de conteúdo. Em relação aos outros sistemas de filtração (PTFE VWR e PP VWR) e centrifugação testados, demonstrou-se serem apropriados para a análise de conteúdo em comprimidos revestidos de Blue025.

Considerando que as mesmas amostras serão utilizadas para a análise de conteúdo da substância ativa mas também para a análise de substâncias relacionadas, e pelo facto da filtração induzir o aparecimento de novos picos nos cromatogramas, considerou-se que a filtração não é adequada para a preparação das amostras. Assim, ao longo da validação, e posteriormente nas análises de rotina, será utilizada a centrifugação para a preparação das amostras.

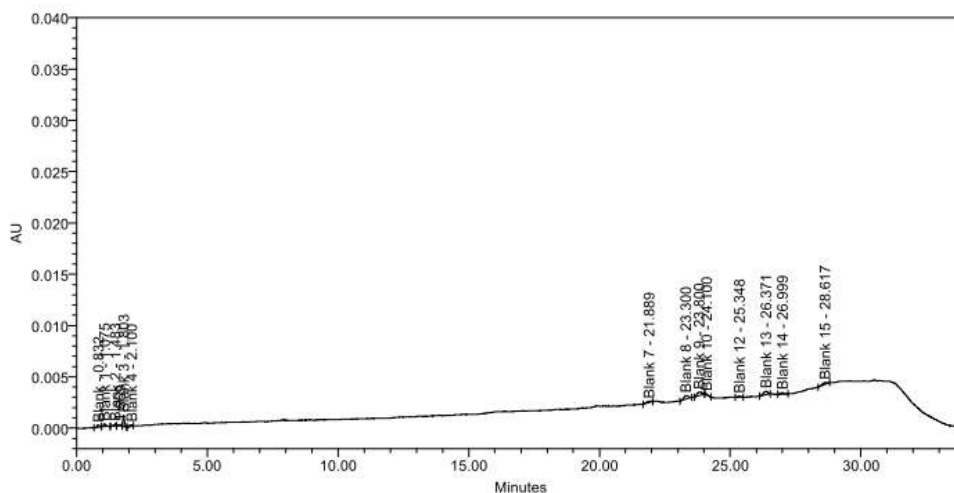
### 3.2.2. Seletividade/especificidade

Depois de definir o modo de preparar a amostra em termos de filtração/centrifugação, avaliou-se a selectividade de forma a garantir que o método analítico consegue avaliar de forma inequívoca a substância ativa na presença de excipientes e possíveis impurezas e produtos de degradação. Assim, foram preparadas e analisadas as seguintes soluções de acordo com o método analítico e com dupla injeção:

- branco (solvente)
- SA – 100% (C = 0.2mg/mL de substância ativa)
- Formula reconstituída (SA + excipientes) após centrifugação (C = 0.2mg/mL de substância ativa)
- Mistura de excipientes (após centrifugação)
- Solução de impurezas ao nível da especificação, 0.2% (Impureza RRT 0.98 e Impureza A)
- SA 100% + Impurezas 0.2%
- SA 100% + Impurezas 0.2% + excipientes (solução teste), após centrifugação
- Solução de Identificação/resolução

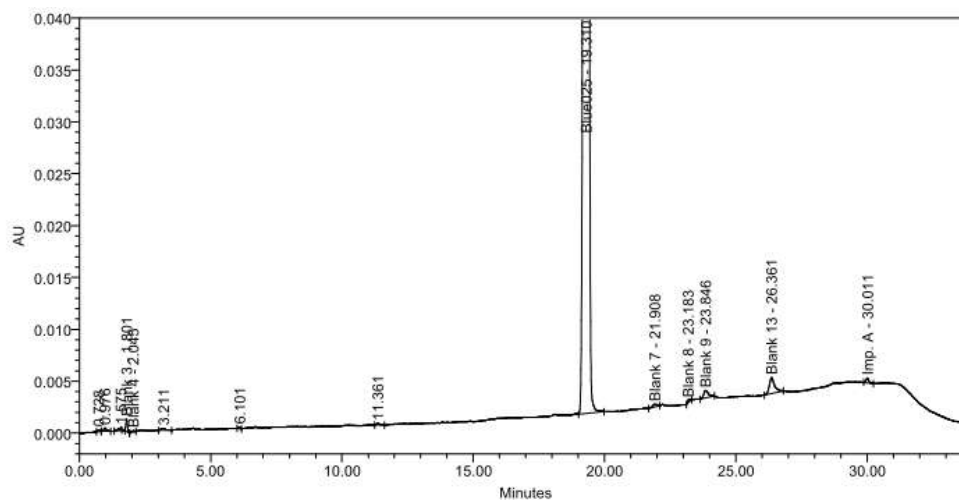
Foram comparados os vários cromatogramas (apresentados de seguida) referentes a cada uma das soluções acima referidas de forma a verificar se existiria alguma interferência entre os picos da substância ativa, do branco, dos excipientes e das impurezas (RRT0.98 e A).

A Figura 51 representa o cromatograma da solução do branco (solvente) que permitiu verificar que não existem picos provenientes do solvente a interferir com o pico da substância ativa.



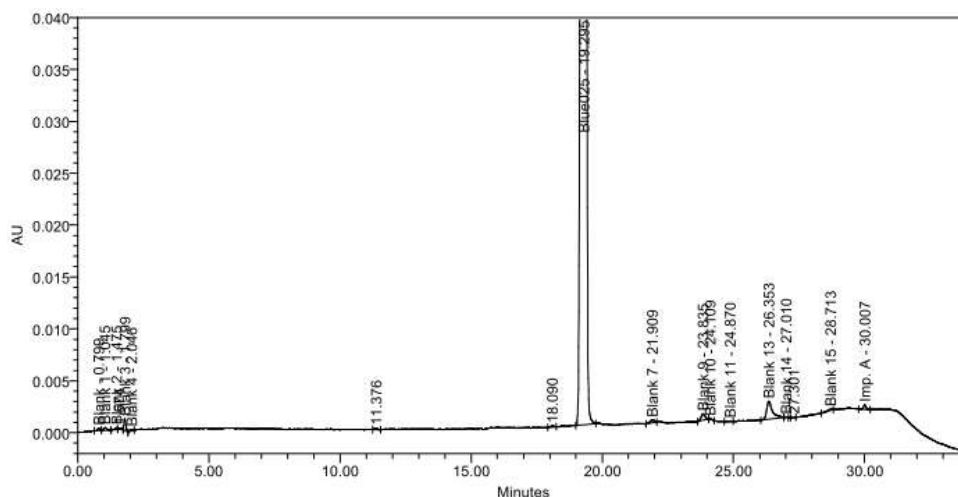
**Figura 51.** Cromatograma da solução do branco (solvente).

Na Figura 52 está representado o pico da substância ativa que eluiu aos 19.310min., sendo, contudo, possível verificar também a existência de impureza A aos 30.011 (devido ao facto da substância ativa conter esta impureza).



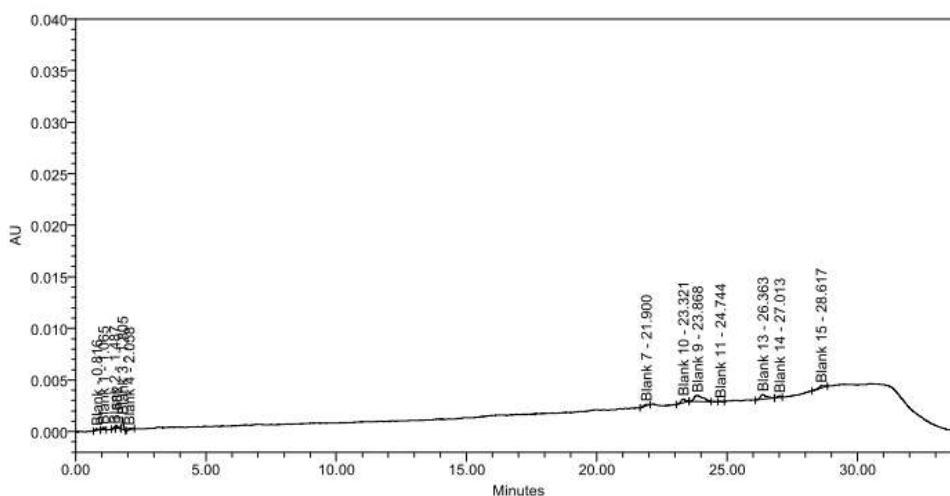
**Figura 52.** Cromatograma da solução de SA a 100% (C = 0.2mg/mL de substância ativa).

Para verificar que a substância ativa se comporta de igual forma na presença de excipientes foi também analisada uma solução de fórmula reconstituída, contendo a substância ativa a 100% e todos os excipientes utilizados na formulação dos comprimidos, estando o cromatograma obtido representado na Figura 53:



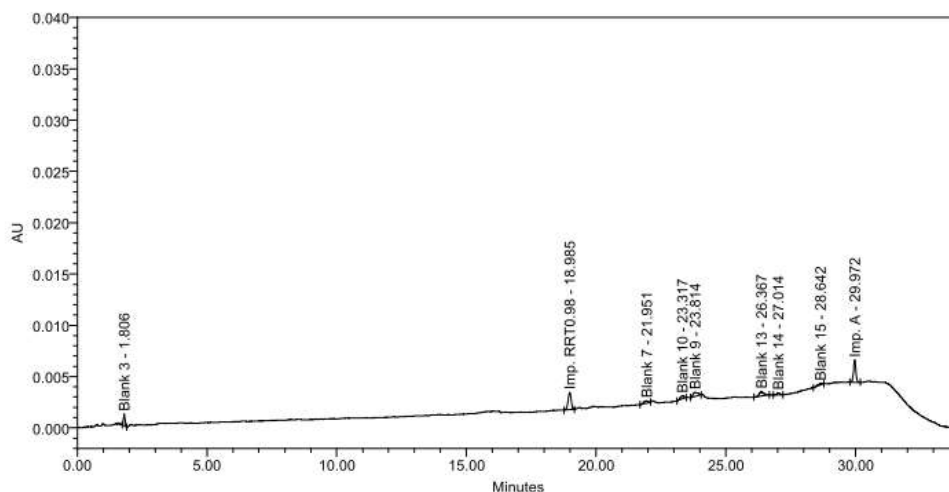
**Figura 53.** Cromatograma da solução de fórmula reconstituída após centrifugação (C = 0.2mg/mL de substância ativa).

Foi também analisada uma solução de mistura de excipientes, representada na Figura 54, que contém todos os componentes presentes na formulação final com exceção do composto activo, permitindo verificar quais os picos provenientes da mistura de excipientes.



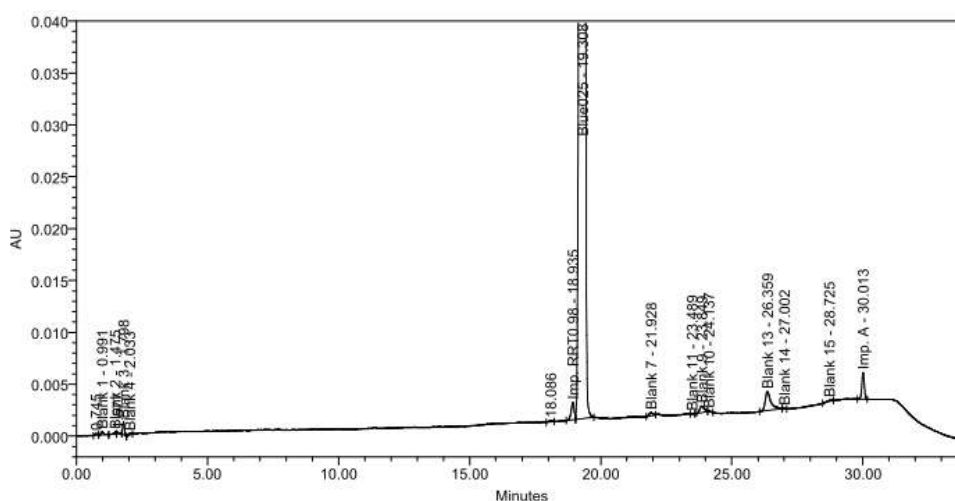
**Figura 54.** Cromatograma da solução de mistura de excipientes após centrifugação.

A Figura 55 representa o cromatograma da solução de impurezas (Impureza RRT0.98 e Impureza A) onde se pode verificar que a Impureza RRT0.98 elui ~19.0min. e a Impureza A ~ 30.0 min.



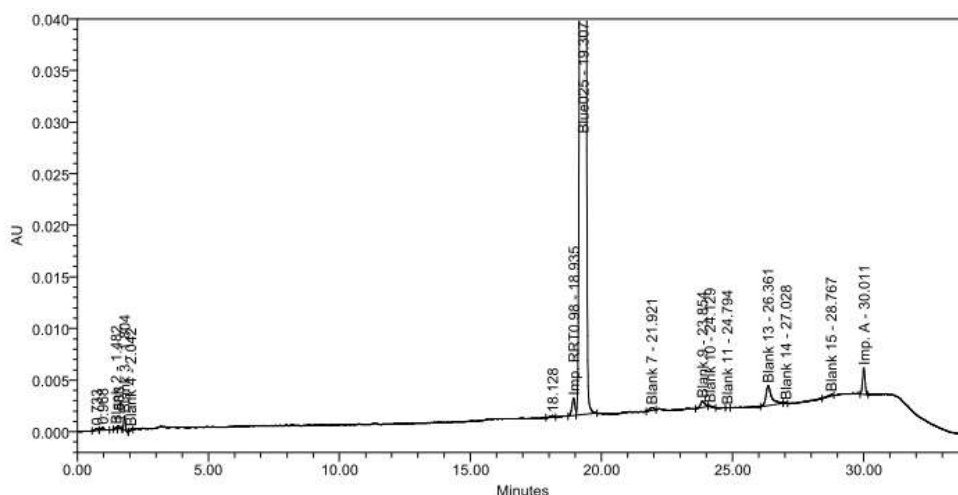
**Figura 55.** Cromatograma da solução de mistura de impurezas ao nível da especificação, 0.2% (impureza RRT0.98 e Impureza A).

Para avaliar o comportamento da substância ativa na presença das impurezas RRT0.98 e A foi analisada uma solução de substância ativa a 100% ( $C = 0.2\text{mg/mL}$ ) com as impurezas no nível da especificação, 0.2% - cromatograma representado na figura seguinte:



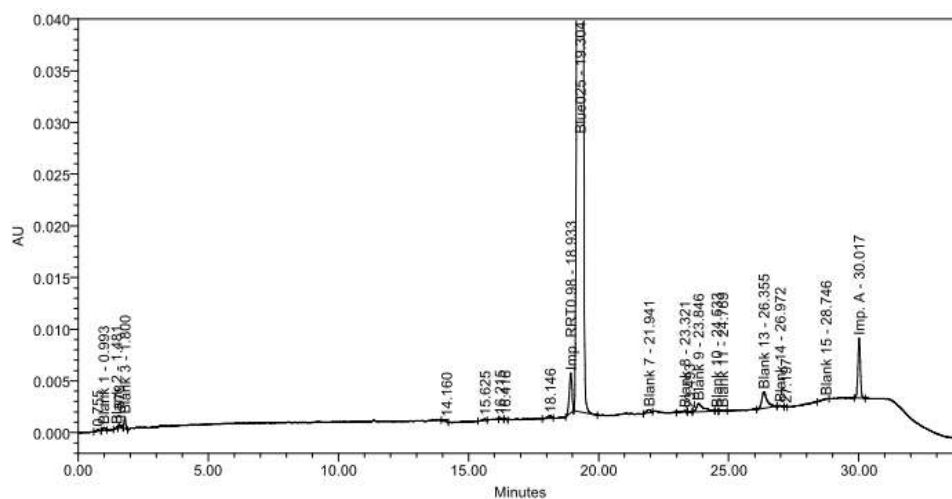
**Figura 56.** Cromatograma da solução de substância ativa a 100% com Impurezas RRT0.98 e A a 0.2%.

O cromatograma seguinte, Figura 57, representa a solução teste, ou seja, contém todos os excipientes utilizados na formulação, a substância ativa a 100% e as impurezas conhecidas presentes. De uma maneira geral, esta solução teste tenta representar o cromatograma que seria esperado, se fosse analisada uma amostra para avaliação de conteúdo em comprimidos.



**Figura 57.** Cromatograma da solução teste (SA a 100% + Impureza RRT 0.98 a 0.2% + Impureza A a 0.2% + excipientes).

Pelo facto da Impureza RRT0.98 eluir muito próximo do pico correspondente à substância ativa é ainda necessário verificar se o sistema cromatográfico consegue separar os dois compostos com uma determinada resolução (devendo, neste caso, ser superior a 1.5). Para isso foi ainda analisada uma solução de identificação/resolução contendo substância ativa e as duas impurezas (RRT0.98 e A) - cromatograma representado na figura seguinte:

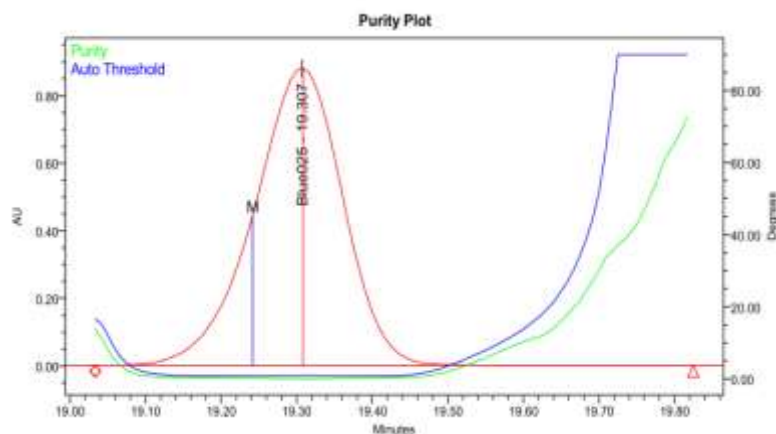


**Figura 58.** Cromatograma da solução de identificação/resolução.

Na solução teste (acima referida) foram ainda avaliados os parâmetros de performance cromatográfica (Tabela 31), factores que permitem caracterizar o sistema cromatográfico e a separação conseguida, e avaliar a pureza do pico da substância ativa (Figura 59).

**Tabela 31.** Parâmetros de performance cromatográfica avaliados para o pico de substância ativa.

| Parâmetros    | Resolução (R) entre os picos da substância ativa e imp. RRT0.98 | Simetria (S) | Número de pratos teóricos (N) | Fator de capacidade (K') |
|---------------|---|--------------|-------------------------------|--------------------------|
| Solução teste | 1.72  | 0.90         | 131337                        | 23.13                    |



Pico: Blue025\_DS  
 Ângulo de pureza: 0.165  
 Limiar de pureza: 0.842

**Figura 59.** Avaliação da pureza do pico de substância ativa na solução teste.

A partir dos resultados acima apresentados pode concluir-se que não há interferência de impurezas nem de excipientes no pico da substância ativa; todos os picos de impurezas estão suficientemente separados entre si e do pico da substância ativa.

A partir do cromatograma obtido com a solução teste pode verificar-se que o pico da substância ativa apresenta parâmetros de performance cromatográfica aceitáveis.

A avaliação da pureza do pico na solução teste, realizada em PDA, permite referir que o pico da substância ativa se apresenta como um pico não impuro, pois apresenta um ângulo de pureza inferior ao limiar de pureza.

A avaliação quantitativa foi feita através das percentagens de interferência dos componentes presentes nas amostras. A equação seguinte permitiu verificar se existiria alguma interferência dos excipientes em relação à substância ativa, avaliada na solução de fórmula reconstituída. Resultados apresentados na Tabela 32.

$$\% \text{ interferência} = \left[ \left( \frac{C_{st}}{A_{st}} \times \frac{A_{RF}}{C_{RF}} \right) - 1 \right] \times 100$$

onde  $C_{st}$  é a concentração do padrão de substância ativa (mg/mL),  $A_{st}$  é a área do pico da substância ativa na solução padrão,  $A_{RF}$  é a área do pico da substância ativa na



solução de fórmula reconstituída e  $C_{RF}$  é a concentração da substância ativa na solução de fórmula reconstituída.

**Tabela 32.** Resultados da interferência dos excipientes no pico da substância ativa na solução de fórmula reconstituída.

|                       | Blue025<br>RT (min) | Área do pico           |       |
|-----------------------|---------------------|------------------------|-------|
|                       |                     | média (n=2)            |       |
| Padrão SA 100%        | 19.301              | 7204411                |       |
| Fórmula reconstituída | 19.303              | 7188531                |       |
|                       |                     | <b>% Interferência</b> | 0.22% |

Foi ainda avaliada a interferência dos excipientes e das impurezas no pico da substância ativa na solução teste através da seguinte equação - resultados apresentados na Tabela 33:

$$\% \text{ interferência} = \left[ \left( \frac{C_{st}}{A_{st}} \times \frac{A_{teste}}{C_{teste}} \right) - 1 \right] \times 100$$

onde  $C_{st}$  é a concentração do padrão de substância ativa (mg/mL),  $A_{st}$  é a área do pico da substância ativa na solução padrão,  $A_{teste}$  é a área do pico da substância ativa na solução teste e  $C_{teste}$  é a concentração da substância ativa na solução teste.

**Tabela 33.** Resultado da interferência dos excipientes e das impurezas no pico da substância ativa na solução teste.

|                | Blue025<br>RT (min) | Área do pico           |       |
|----------------|---------------------|------------------------|-------|
|                |                     | média (n=2)            |       |
| Padrão SA 100% | 19.301              | 7204411                |       |
| Solução teste  | 19.305              | 7209118                |       |
|                |                     | <b>% Interferência</b> | 0.07% |

**Avaliação dos resultados obtidos****Tabela 34.** Avaliação dos resultados obtidos para avaliação da seletividade.

|   | <b>Limites</b>                      | <b>Resultados</b> | <b>Avaliação</b> |
|---|-------------------------------------|-------------------|------------------|
| <b>Interferência dos excipientes (solução de fórmula reconstituída)</b> | < 2.0%                              | 0.22%             | CUMPRE           |
| <b>Interferência dos excipientes e das impurezas (solução teste)</b>    | < 2.0%                              | 0.07%             | CUMPRE           |
| <b>Resolução (entre os picos da substância ativa e imp. RRT 0.98)</b>   | $\geq 1.5$                          | 1.72              | CUMPRE           |
| <b>Pureza do pico da SA</b>   | ângulo de pureza < limiar de pureza | pico não impuro   | CUMPRE           |

Pode então concluir-se que o método é selectivo para a análise da substância ativa em comprimidos revestidos de Blue025.

**3.2.3. Linearidade**

A linearidade caracteriza-se pela capacidade do método analítico gerar resultados diretamente proporcionais à concentração de Blue025 no solvente. Para isso foram preparadas e analisadas 5 soluções padrão e 5 soluções de fórmula reconstituída de diferentes concentrações de Blue025 a 60%, 80%, 100%, 120% e 140% da concentração teórica de substância ativa (100% Blue025 = 0.2mg/mL). Para a linearidade das soluções padrão o conjunto de soluções foi preparado a partir de 2 soluções-mãe independentes, no entanto a linearidade da fórmula reconstituída foi preparada a partir de 5 soluções independentes.

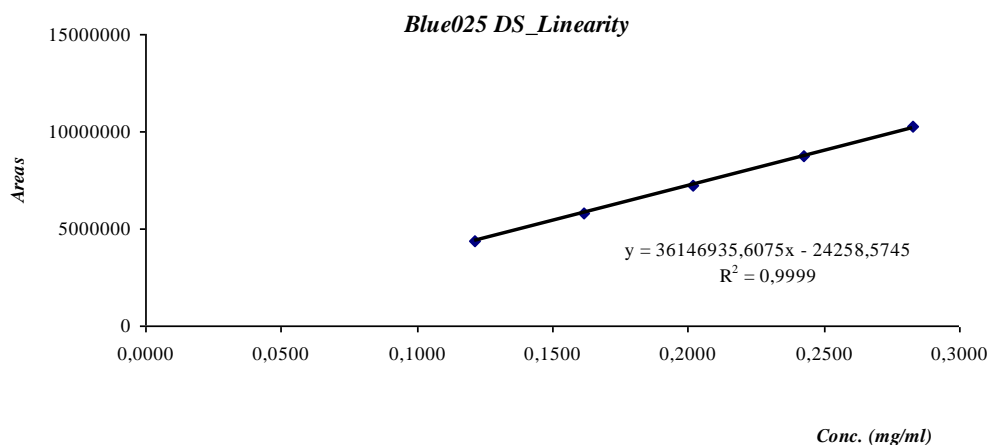
As soluções foram injectadas em duplicado e analisadas de acordo com o método analítico, no mesmo dia - resultados apresentados na Tabela 35.

Tabela 35. Resultados relativos à linearidade

| Nível de concentração | Solução padrão               |                  | Fórmula reconstituída        |                  |
|-----------------------|------------------------------|------------------|------------------------------|------------------|
|                       | Concentração Blue025 (mg/mL) | Área média (n=2) | Concentração Blue025 (mg/mL) | Área média (n=2) |
| 60%                   | 0.1212                       | 4367200          | 0.12156                      | 4360172          |
| 80%                   | 0.1616                       | 5828881          | 0.16178                      | 5817428          |
| 100%                  | 0.2020                       | 7244983          | 0.20172                      | 7322766          |
| 120%                  | 0.2426                       | 8734852          | 0.24194                      | 8789441          |
| 140%                  | 0.2830                       | 10227246         | 0.28285                      | 10269740         |

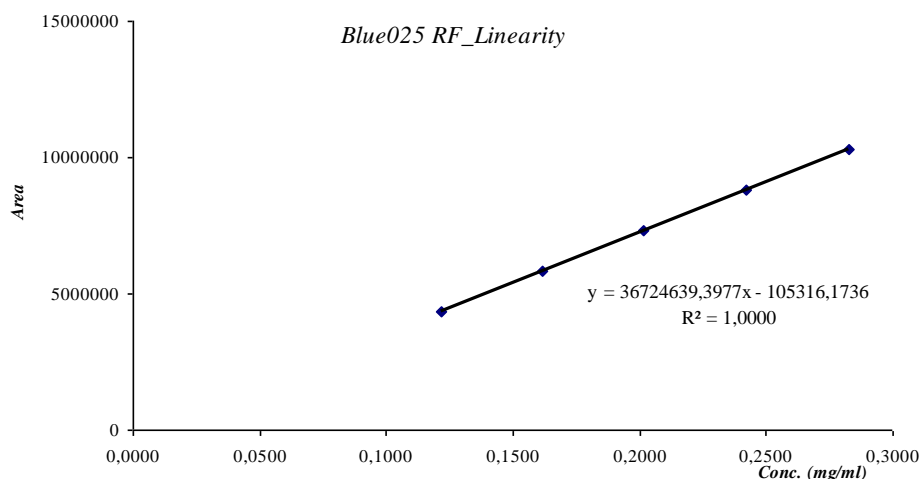
A área apresentada em cada nível de concentração corresponde à média das áreas das duas injeções consecutivas da mesma amostra. A concentração em cada nível corresponde à concentração teórica de Blue025, calculada tendo em conta a massa de Blue025 usada na preparação das soluções stock, as diluições realizadas na preparação das diferentes soluções e o seu teor.

A linearidade do método foi avaliada por regressão linear, o que incluiu a avaliação da intercepção no eixo dos yy', do declive da recta de regressão, do coeficiente de correlação (r) e da soma do quadrado dos resíduos, estando os resultados apresentados nas figuras seguintes:



|  | Resultados regressão |
|--|----------------------|
| intercepção no eixo dos yy'<br>(% rel. 100%) | -0.33%               |
| Coeficiente de correlação, r                 | 0.9999               |
| declive                                      | 36146936             |
| Soma do quadrado dos resíduos                | 1.794E+09            |

Figura 60. Representação gráfica/resultados da linearidade para as soluções padrão



|  | Resultados regressão |
|--|----------------------|
| intercepção no eixo dos yy'<br>(% rel. 100%) | -1.44%               |
| Coefficiente de correlação, r                | 1.0000               |
| declive                                      | 36724639             |
| Soma do quadrado dos resíduos                | 1.002E+09            |

Figura 61. Representação gráfica/resultados da linearidade para as soluções de fórmula reconstituída.

Foi ainda avaliado o desvio (em percentagem) entre os declives obtidos em cada uma das linearidades, através da seguinte equação:

$$\%\_desvio = \frac{m_{RF} - m_{st}}{\left(\frac{m_{RF} + m_{st}}{2}\right)} \times 100$$

onde  $m_{st}$  é o declive obtido na linearidade das soluções padrão e  $m_{RF}$  é o declive obtido na linearidade das formulas reconstituídas.

**Avaliação dos resultados**

Tabela 36. Avaliação dos resultados obtidos na linearidade.

|                             |                | Limites | Resultados | Avaliação |
|-----------------------------|----------------|---------|------------|-----------|
| intercepção no eixo dos yy' | SA             | ≤±3%    | -0.33%     | CUMPRE    |
|                             | Form. Rec.     |         | -1.44%     | CUMPRE    |
| Coefficiente de correlação  | SA             | ≥0.997  | 0.9999     | CUMPRE    |
|                             | Form. Rec.     |         | 1.0000     | CUMPRE    |
| Desvio dos declives         | Form. Rec./ SA | ≤±3%    | 1.59%      | CUMPRE    |

Observando os resultados obtidos, pode concluir-se que o método analítico é capaz de gerar resultados directamente proporcionais à concentração de Blue025 no solvente no intervalo da gama de trabalho testada (60% a 140% da concentração de 0.2mg/ml).

### 3.2.4. Rigor

A análise do rigor permite expressar o grau de concordância entre o valor de referência aceite (valor teórico) e o valor encontrado com o método analítico. É expresso como percentagem de recuperação da quantidade teórica de substância ativa.

Nesse sentido foram preparadas três soluções independentes de fórmula reconstituída com concentrações de 70%, 100% e 130% da concentração teórica de substância ativa (0.2mg/mL) e analisadas de acordo com o procedimento analítico. Cada nível de concentração consistiu em três preparações independentes tendo sido feitas injecções simples de cada solução.

Na análise do rigor é necessária a verificação de uma calibração para verificar se o equipamento se encontra em conformidade para a análise, realizada como descrito no capítulo 2. Provada a conformidade do sistema considerou-se então o sistema apto para a continuação da análise.

Foram calculadas as concentrações reais de Blue025 em cada amostra e avaliados a percentagem de recuperação, o RSD entre os valores de recuperação (em cada nível) e os intervalos de confiança de 95% dos resultados médios, estando os resultados apresentados na tabela seguinte:

**Tabela 37.** Resultados obtidos na avaliação do rigor.

| Nível de concentração (%) | Amostra | Conc. (mg/mL) |        | Recuperação (%) | média (%)     | RSD (%)      | 95% Intervalo de confiança |
|---------------------------|---------|---------------|--------|-----------------|---------------|--------------|----------------------------|
|                           |         | Teórica       | Real   |                 |               |              | Min. - Max.                |
| 70%                       | # 1     | 0.1414        | 0.1424 | 100.7%          | <b>100.3%</b> | <b>0.45%</b> | 99.2% - 101.4%             |
|                           | # 2     | 0.1410        | 0.1417 | 100.5%          |               |              |                            |
|                           | # 3     | 0.1416        | 0.1414 | 99.8%           |               |              |                            |
| 100%                      | # 1     | 0.2024        | 0.2038 | 100.7%          | <b>100.6%</b> | <b>0.18%</b> | 100.2% - 101.1%            |
|                           | # 2     | 0.2021        | 0.2036 | 100.7%          |               |              |                            |
|                           | # 3     | 0.2023        | 0.2031 | 100.4%          |               |              |                            |
| 130%                      | # 1     | 0.2627        | 0.2639 | 100.4%          | <b>100.6%</b> | <b>0.13%</b> | 100.3% - 100.9%            |
|                           | # 2     | 0.2629        | 0.2644 | 100.6%          |               |              |                            |
|                           | # 3     | 0.2623        | 0.2642 | 100.7%          |               |              |                            |

A recuperação (em percentagem) foi calculada através da seguinte equação:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Concentração real}}{\text{Concentração teórica}}$$

em que a concentração real de cada amostra foi obtida pela equação seguinte:

$$\text{Concentração real (mg/mL)} = \frac{\text{Área}}{\text{MRF}}$$

### **Avaliação dos resultados**

**Tabela 38.** Avaliação dos resultados obtidos nos testes de rigor.

| Nível conc. | Média das recuperações |            |           | RSD      |            |           |
|-------------|------------------------|------------|-----------|----------|------------|-----------|
|             | Limites                | Resultados | Avaliação | Limites  | Resultados | Avaliação |
| 70%         | 97% < R < 103%         | 100.3%     | CUMPRE    | RSD ≤ 3% | 0.45%      | CUMPRE    |
| 100%        |                        | 100.6%     | CUMPRE    |          | 0.18%      | CUMPRE    |
| 130%        |                        | 100.6%     | CUMPRE    |          | 0.13%      | CUMPRE    |

Pode concluir-se que o método analítico permite quantificar, de forma rigorosa, a concentração de Blue025 nas amostras, na gama de concentrações avaliadas e nas condições analisadas.

### 3.2.5. Precisão

A precisão de um procedimento analítico expressa o grau de concordância entre uma série de valores obtidos por análise de múltiplas amostragens de uma amostra homogénea segundo as condições definidas no método.

Na validação do método analítico a análise da precisão consistiu na avaliação da repetibilidade, precisão intermédia e precisão do sistema.

#### 3.2.5.1. Repetibilidade

De forma a avaliar a precisão do método sob as mesmas condições operacionais, ao longo de um curto intervalo de tempo é analisada a repetibilidade do método. Para efeitos da validação deste método analítico, este teste não foi ainda realizado, pois não

foram ainda produzidos comprimidos revestidos de Blue025 com os quais realizar esta análise.

No entanto, aquando da sua realização, a avaliação da repetibilidade do método irá consistir na análise de seis soluções teste independentes, com uma concentração de 100%, preparadas, a partir de comprimidos revestidos de Blue025, pelo mesmo analista, utilizando o mesmo equipamento e no mesmo dia. As amostras deverão ser preparadas com comprimidos revestidos de Blue025 do mesmo lote e injetadas um única vez.

A repetibilidade será determinada com base no valor de RSD do conteúdo de Blue025 obtido nas seis amostras, que deverá ser inferior a 3% (tabela 29), e dos intervalos de confiança para a um nível de confiança de 95%.

#### 3.2.5.2. Precisão intermédia

A precisão intermédia, tal como a repetibilidade, não foi ainda avaliada, pelo facto de não terem sido produzidos comprimidos revestidos de Blue025 com a formulação final definida. No entanto esta será avaliada de forma a demonstrar a precisão do método tendo em conta variações laboratoriais: análise realizada em dois dias diferentes, por dois analistas diferentes, em dois laboratórios diferentes (laboratório de ID e CQ).

A precisão intermédia deverá ser demonstrada pela análise de seis soluções teste independentes de comprimidos revestidos de Blue025, injetadas uma única vez. Essa análise será repetida num outro dia, por um analista diferente no mesmo laboratório (laboratório ID). Serão ainda realizados mais dois testes adicionais por dois analistas diferentes, em dois dias diferentes, no laboratório de Controlo de Qualidade. Tal como para a repetibilidade as amostras deverão ser preparadas com comprimidos revestidos de Blue025 do mesmo lote e injetadas uma única vez.

A precisão intermédia é determinada pela comparação das médias dos resultados obtidos para cada teste realizado (analista1 (ID) – analista2 (ID), analista1 (CQ) – analista2 (CQ), média dos 2analistas ID – média dos 2analistas CQ), devendo a diferença ser inferior a 3% (tabela 29).

### 3.2.5.3. Precisão do sistema

A avaliação da precisão do sistema permite avaliar a precisão do equipamento (sistema cromatográfico).

A precisão do sistema avalia a variabilidade entre várias injeções de uma mesma solução. Neste caso, a precisão do sistema foi demonstrada pela análise de 6 injeções de uma solução padrão e de uma amostra de fórmula reconstituída com uma concentração teórica de Blue025 de 100% (0.2mg/mL), preparadas como descrito no capítulo 2. O teste foi realizado em três dias diferentes, com três soluções padrão e três amostras de fórmula reconstituída diferentes, preparadas em cada dia.

Foram calculados os fatores de resposta e avaliados os RSD intra e inter-dia entre as médias das 6 injeções, estando os resultados obtidos, para as soluções padrão e para as amostras de fórmula reconstituída, apresentados nas tabelas 39 e 40, respectivamente:

**Tabela 39.** Resultados de precisão de sistema obtidos para as soluções padrão (concentração teórica de Blue025 de 0.2mg/mL).

| Injeção                          | RF           |              |              |
|----------------------------------|--------------|--------------|--------------|
|                                  | dia 1        | dia 2        | dia 3        |
| # 1                              | 3.581E+07    | 3.591E+07    | 3.554E+07    |
| # 2                              | 3.592E+07    | 3.608E+07    | 3.557E+07    |
| # 3                              | 3.604E+07    | 3.615E+07    | 3.603E+07    |
| # 4                              | 3.588E+07    | 3.610E+07    | 3.602E+07    |
| # 5                              | 3.574E+07    | 3.612E+07    | 3.608E+07    |
| # 6                              | 3.580E+07    | 3.623E+07    | 3.602E+07    |
| <b>Média</b>                     | 3.587E+07    | 3.610E+07    | 3.588E+07    |
| <b>Desvio padrão</b>             | 104156       | 107453       | 249091       |
| <b>RSD (intra-dia)</b>           | <b>0.29%</b> | <b>0.30%</b> | <b>0.69%</b> |
| <b>Média (inter-dia)</b>         | 3.595E+07    |              |              |
| <b>Desvio padrão (inter-dia)</b> | 129640       |              |              |
| <b>RSD (inter-dia)</b>           | <b>0.36%</b> |              |              |



**Tabela 40.** Resultados de precisão de sistema obtidos para as amostras de fórmula reconstituída (concentração teórica de Blue025 de 0.2mg/mL)

| Injeção                          | RF           |              |              |
|----------------------------------|--------------|--------------|--------------|
|                                  | dia 1        | dia 2        | dia 3        |
| # 1                              | 3.620E+07    | 3.602E+07    | 3.602E+07    |
| # 2                              | 3.640E+07    | 3.603E+07    | 3.592E+07    |
| # 3                              | 3.627E+07    | 3.602E+07    | 3.601E+07    |
| # 4                              | 3.630E+07    | 3.606E+07    | 3.592E+07    |
| # 5                              | 3.639E+07    | 3.605E+07    | 3.589E+07    |
| # 6                              | 3.633E+07    | 3.604E+07    | 3.590E+07    |
| <b>Média</b>                     | 3.632E+07    | 3.604E+07    | 3.594E+07    |
| <b>Desvio padrão</b>             | 73805        | 16137        | 57906        |
| <b>RSD (intra-dia)</b>           | <b>0.20%</b> | <b>0.04%</b> | <b>0.16%</b> |
| <b>Média (inter-dia)</b>         | 3.610E+07    |              |              |
| <b>Desvio padrão (inter-dia)</b> | 194498       |              |              |
| <b>RSD (inter-dia)</b>           | <b>0.54%</b> |              |              |

### Avaliação dos resultados

**Tabela 41.** Avaliação dos resultados obtidos nos testes de precisão do sistema.

|               |       | Resultados       |              | Limites | Avaliação |
|---------------|-------|------------------|--------------|---------|-----------|
|               |       | Substância ativa | Fórmula Rec. |         |           |
| RSD intra-dia | Dia 1 | 0.29%            | 0.20%        | ≤ 2.0%  | CUMPRE    |
|               | Dia 2 | 0.30%            | 0.04%        |         | CUMPRE    |
|               | Dia 3 | 0.69%            | 0.16%        |         | CUMPRE    |
| RSD inter-dia |       | <b>0.36%</b>     | <b>0.54%</b> | ≤ 2%    | CUMPRE    |

Pode assim concluir-se que o sistema cromatográfico usado para a análise é preciso na aplicação do método analítico.

### 3.2.6. Estabilidade das soluções

A avaliação da estabilidade das soluções é bastante importante permitindo estabelecer o período para o qual as diferentes soluções apresentam o conteúdo de substância ativa praticamente inalterado.

De forma a avaliar a estabilidade foram preparadas três soluções padrão e três amostras de fórmula reconstituída com uma concentração teórica de Blue025 de 100% (0.2mg/mL) a partir de três pesagens independentes e mantidas nas condições ambiente. Todas as soluções foram analisadas nos tempos t=0h, t=24h e t=48h, de acordo com o protocolo analítico (injeção única).

A estabilidade das soluções foi avaliada pela diferença entre cada tempo de análise, determinado pela percentagem de alteração no fator de resposta, através da seguinte equação:

$$\text{Variação}_{\%} = \left( \frac{\text{RF}_{t=x}}{\text{RF}_{t=0}} \times 100 \right) - 100$$

onde  $\text{RF}_{t=x}$  corresponde ao fator de resposta em cada tempo (24h ou 48h) e  $\text{RF}_{t=0}$  é o fator de resposta do tempo inicial t=0 (imediatamente após a preparação).

Os resultados obtidos tanto para as soluções padrão como para as amostras de fórmula reconstituída estão apresentados nas tabelas 41 e 42.

**Tabela 42.** Resultados de estabilidade das soluções padrão analisadas aos tempos 0h, 24h e 48h

| Solução nº | t=0h       |           | t=24h                  |              | t=48h      |              |
|------------|------------|-----------|------------------------|--------------|------------|--------------|
|            | Área (n=2) | RF        | Área (n=2)             | RF           | Área (n=2) | RF           |
| #1         | 7210721    | 3.568E+07 | 7331995                | 3.628E+07    | 7340615    | 3.632E+07    |
| #2         | 7282496    | 3.607E+07 | 7313354                | 3.622E+07    | 7283368    | 3.607E+07    |
| #3         | 7181316    | 3.548E+07 | 7282452                | 3.598E+07    | 7325241    | 3.619E+07    |
|            | Média      | 3.574E+07 | -                      | 3.616E+07    | -          | 3.620E+07    |
|            |            |           | Desvio da média dos RF | <b>1.17%</b> | -          | <b>1.27%</b> |
|            |            |           | <i>p-value</i>         | <b>0.112</b> | -          | <b>0.119</b> |

**Tabela 43.** Resultados de estabilidade das amostras de fórmula reconstituída analisadas aos tempos 0h, 24h e 48h.

| Solução n° | t=0h       |           | t=24h                  |              | t=48h      |               |
|------------|------------|-----------|------------------------|--------------|------------|---------------|
|            | Área (n=2) | RF        | Área (n=2)             | RF           | Área (n=2) | RF            |
| #1         | 7382949    | 3.648E+07 | 7332872                | 3.623E+07    | 7256367    | 3.585E+07     |
| #2         | 7387162    | 3.650E+07 | 7365750                | 3.639E+07    | 7253093    | 3.584E+07     |
| #3         | 7211329    | 3.570E+07 | 7315558                | 3.621E+07    | 7234695    | 3.581E+07     |
|            | Média      | 3.622E+07 | -                      | 3.628E+07    | -          | 3.583E+07     |
|            |            |           | Desvio da média dos RF | <b>0.15%</b> | -          | <b>-1.08%</b> |
|            |            |           | <i>p-value</i>         | <b>0.785</b> | -          | <b>0.228</b>  |

### Avaliação dos resultados

**Tabela 44.** Avaliação dos resultados obtidos nos testes de estabilidade.

|   | Soluções preparadas ao | Tempo de análise | Limites         |                | Resultados      |                | Avaliação |
|---|------------------------|------------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------|
|   |                        |                  | % Devio do t=0h | <i>p-value</i> | % Devio do t=0h | <i>p-value</i> |           |
| Desvio dos RF e do <i>p-value</i> para as soluções padrão                   | t=0h                   | 24h              | ≤ 2%            | ≥ 0.05         | 1.17%           | 0.112          | CUMPRE    |
|   |                        | 48h              |                 |                | 1.27%           | 0.119          | CUMPRE    |
| Desvio dos RF e do <i>p-value</i> para as amostras de fórmula reconstituída | t=0h                   | 24h              | ≤ 2%            | ≥ 0.05         | 0.15%           | 0.785          | CUMPRE    |
|   |                        | 48h              |                 |                | -1.08%          | 0.228          | CUMPRE    |

Conclui-se então que, tanto as soluções padrão como as amostras de fórmula reconstituída, são estáveis durante pelo menos 48 horas nas condições ambiente.

### 3.2.7. Robustez

De forma a avaliar o impacto de pequenas variações das condições cromatográficas na performance do método foram feitos testes de robustez, fornecendo assim uma indicação da sua fiabilidade durante o seu uso.

A robustez do método foi avaliada por pequenas variações deliberadas nos parâmetros do método, nomeadamente variação do fluxo, do volume de injeção e da temperatura da

coluna (tabela 43). Os parâmetros avaliados refletem variações normais decorrentes da aplicação do método em diferentes laboratórios e têm em conta o objetivo do método. Para avaliar a robustez analisaram-se duas soluções padrão e três amostras de fórmula reconstituída de Blue025 a 100% (0.2mg/mL). A avaliação da robustez respeitou a seguinte sequência de análise: injeção consecutiva de brancos (2 injeções ou até obter um cromatograma estável), solução de identificação/resolução (injeção simples), duas soluções padrão (3 injeções de cada) e 3 soluções teste (injeção simples). A sequência de análise foi repetida para cada parâmetro testado (tabela 43).

**Tabela 45.** Parâmetros cromatográficos avaliados durante os testes de robustez.

| Parâmetros              | Condições |                           |                                |
|-------------------------|-----------|---------------------------|--------------------------------|
|                         | 1.Fluxo   | 0.8ml/min                 | <b>1.0ml/min<sup>(a)</sup></b> |
| 2.Temperatura da coluna | 36°C      | <b>40°C<sup>(a)</sup></b> | 44°C                           |
| 3.Volume de injeção     | 5µL       | <b>10µL<sup>(a)</sup></b> | 15µL                           |

<sup>(a)</sup>Condições SOP

Para cada parâmetro testado foi analisada uma solução de identificação/resolução (tabela 44) permitindo assim verificar se a resolução entre os picos da impureza RRT0.98 e da substância ativa Blue025 cumpre o limite definido ( $R \geq 1.5$ ).

**Tabela 46.** Resolução obtida para a solução de identificação/resolução em cada condição testada.

| Avaliação     | SOP* |      |      | Volume de injeção |      | Fluxo      |            | Temperatura da coluna |      |
|---------------|------|------|------|-------------------|------|------------|------------|-----------------------|------|
|               |      |      |      | 5µL               | 15µL | 0.8mL/min. | 1.2mL/min. | 36°C                  | 44°C |
| Resolução (R) | 1.76 | 1.81 | 1.67 | 1.71              | 1.80 | 1.54       | 1.84       | 1.79                  | 1.72 |

\*as análises SOP foram realizadas em três dias diferentes para os diferentes testes de robustez

Foi avaliada a influência da variação de cada condição no tempo de retenção (RT), fator de simetria (S), relação de massa de distribuição ( $k'$ ) e no número de pratos teóricos (N) para a substância ativa Blue025 em cada solução padrão, determinada como a diferença

entre as condições normais de análise (SOP), definidas no método, e a condição testada, através da seguinte equação,

$$\%_{\text{desvio}} = \left[ \frac{P_x - P_{SOP}}{\left( \frac{P_x + P_{SOP}}{2} \right)} \right] \times 100$$

onde  $P_x$  corresponde ao valor do parâmetro avaliado na nova condição testada e  $P_{SOP}$  corresponde ao valor do parâmetro avaliado nas condições originais do método. Considera-se existir influência na performance do método para diferenças superiores a 2% (Tabela 29). Para cada parâmetro avaliado, foi feito um teste *t de Student* entre as condições SOP e cada condição testada e calculado o *p-value*, para um nível de confiança de 95%, verificando se estes são estatisticamente idênticos (*p-value*  $\geq 0.05\%$ ). Deverão ser obtidos valores de S próximos de 1,  $K' \geq 2$ , e valores de N tão elevados quanto possível, devendo sempre superiores a 2000.

Os resultados estão apresentados na tabela 45.

**Tabela 47.** Resultados dos testes realizados no estudo da robustez. Avaliação do tempo de retenção, simetria,  $K'$ , N e RF para o pico de Blue025 nas soluções padrão.

| Parâmetros cromatográficos |            | Parâmetro avaliado |        |                |      |        |                |       |         |                |        |         |                |           |         |                |
|----------------------------|------------|--------------------|--------|----------------|------|--------|----------------|-------|---------|----------------|--------|---------|----------------|-----------|---------|----------------|
|                            |            | RT (min)           |        |                | S    |        |                | K'    |         |                | N      |         |                | RF        |         |                |
|                            |            |                    | Desvio | <i>p-value</i> |      | Desvio | <i>p-value</i> |       | Desvio  | <i>p-value</i> |        | Desvio  | <i>p-value</i> |           | Desvio  | <i>p-value</i> |
| Condições SOP              |            | 19.296             | -      | -              | 0.91 | -      | -              | 23.12 | -       | -              | 132803 | -       | -              | 3.616E+07 | -       | -              |
| Fluxo                      | 0.8mL/min  | 21.065             | 8.76%  | 3.177E-23      | 0.94 | 3.79%  | 1.935E-05      | 18.15 | -24.09% | 3.250E-28      | 150829 | 12.71%  | 1.034E-06      | 4.560E+07 | 23.10%  | 1.369E-10      |
|                            | 1.2mL/min  | 18.004             | -6.93% | 7.958E-21      | 0.87 | -3.75% | 3.033E-07      | 29.01 | 22.58%  | 2.208E-26      | 115749 | -13.72% | 2.699E-09      | 3.030E+07 | -17.61% | 2.981E-08      |
| Volume de injeção          | 15 $\mu$ L | 19.296             | 0.00%  | 1.000          | 0.91 | 0.37%  | 0.485          | 23.12 | -0.01%  | 0.787          | 133323 | 0.39%   | 0.724          | 5.421E+07 | 39.96%  | 4.689E-15      |

| Parâmetros cromatográficos |      | Parâmetro avaliado |        |                |      |        |                |       |        |                |        |        |                |           |         |                |
|----------------------------|------|--------------------|--------|----------------|------|--------|----------------|-------|--------|----------------|--------|--------|----------------|-----------|---------|----------------|
|                            |      | RT (min)           |        |                | S    |        |                | K'    |        |                | N      |        |                | RF        |         |                |
|                            |      |                    | Desvio | <i>p-value</i> |      | Desvio | <i>p-value</i> |       | Desvio | <i>p-value</i> |        | Desvio | <i>p-value</i> |           | Desvio  | <i>p-value</i> |
| Condições SOP              |      | 19.306             | -      | -              | 0.90 | -      | -              | 23.13 | -      | -              | 132905 | -      | -              | 3.593E+07 | -       | -              |
| Temperatura da coluna      | 44°C | 19.095             | -1.10% | 2.494E-13      | 0.88 | -2.62% | 1.100E-05      | 22.87 | -1.14% | 4.222E-10      | 122840 | -7.87% | 3.128E-06      | 3.613E+07 | 0.54%   | 0.642          |
| Volume de injeção          | 5µL  | 19.312             | 0.03%  | 0.173          | 0.89 | -1.49% | a)             | 23.14 | 0.04%  | 0.183          | 129671 | -2.46% | 0.005          | 1.771E+07 | -67.91% | 1.143E-12      |

a) Não pode ser calculado porque os valores são todos iguais

| Parâmetros cromatográficos |      | Parâmetro avaliado |        |                |      |        |                |       |        |                |        |        |                |           |        |                |
|----------------------------|------|--------------------|--------|----------------|------|--------|----------------|-------|--------|----------------|--------|--------|----------------|-----------|--------|----------------|
|                            |      | RT (min)           |        |                | S    |        |                | K'    |        |                | N      |        |                | RF        |        |                |
|                            |      |                    | Desvio | <i>p-value</i> |      | Desvio | <i>p-value</i> |       | Desvio | <i>p-value</i> |        | Desvio | <i>p-value</i> |           | Desvio | <i>p-value</i> |
| Condições SOP              |      | 19.338             | -      | -              | 0.90 | -      | -              | 23.17 | -      | -              | 114917 | -      | -              | 3.615E+07 | -      | -              |
| Temperatura da coluna      | 36°C | 19.550             | 1.09%  | 2.130E-10      | 0.93 | 3.64%  | 1.709E-04      | 23.44 | 1.14%  | 3.115E-09      | 142386 | 21.35% | 0.159          | 3.603E+07 | -0.32% | 0.531          |

Os resultados obtidos na análise da solução de identificação/resolução em cada condição de robustez estudada, demonstram que, independentemente das mudanças efetuadas, a resolução obtida está acima do limite definido. Para todas as condições, a resolução obtida foi superior a 1.5.

A avaliação dos resultados do desempenho cromatográfico demonstra que as variações em relação às condições SOP promoveram algumas alterações nos resultados, como era esperado uma vez que os parâmetros foram modificados. Contudo, apenas se verificaram variações esperadas para cada parâmetro do método.

A variação do fluxo influenciou significativamente todos os parâmetros avaliados. Tanto para um fluxo inferior (0.8mL/min.) como para um fluxo maior (1.2mL/min.) os valores do desvio, em relação às condições SOP, para RT, S, K', N e RF foram superiores a 2%. No entanto, para os diferentes fluxos testados, todos os parâmetros finais de desempenho cromatográfico, estão dentro valores definidos.

Quanto à variação do volume de injeção, esta afetou significativamente apenas alguns parâmetros. Foram obtidos desvios superiores a 2% para os RF quando o volume de injeção aumentou e diminuiu e para o número de pratos teóricos (N) quando o volume de injeção diminuiu para 5µL. As variações no volume de injeção não afetaram o tempo de retenção, a simetria, nem o K'. Também para o volume de injeção, apesar das alterações do método promoverem alterações nos parâmetros cromatográficos superiores a 2%, todos os parâmetros cumprem os critérios de aceitação definidos.

A mudança na temperatura da coluna induziu maior influência em alguns parâmetros de desempenho. Os desvios dos parâmetros obtidos, em relação às condições SOP, foram superiores a 2% para S e N, tanto na análise com a coluna a uma temperatura de 36°C como a uma temperatura de 44°C. O tempo de retenção, K' e RF não foram afetados pela mudança da temperatura da coluna. Todos os parâmetros de desempenho cromatográfico cumpriram os critérios de aceitação, para qualquer uma das temperaturas de coluna testadas.

Embora para a maioria dos casos os valores de *p-value* obtidos sejam inferiores a 0.05%, demonstrando que os resultados são estatisticamente diferentes dos resultados obtidos nas condições SOP, todos os parâmetros estão dentro dos critérios de aceitação definidos.

Para a avaliação da robustez, como dito anteriormente, foram também analisadas três soluções teste. Para cada condição testada, foi calculada a percentagem de recuperação e avaliado o desvio desta em relação às condições SOP. Os resultados relativos à recuperação para as soluções teste e os respectivos valores de desvio estão apresentados na tabela 46.

**Tabela 48.** Resultados da recuperação das soluções teste, para cada condição avaliada.

| Fórmula reconstituída  | Recuperação (%) |           |           |                   |
|------------------------|-----------------|-----------|-----------|-------------------|
|                        | SOP             | Fluxo     |           | Volume de injeção |
|                        |                 | 0.8ml/min | 1.2ml/min | 15µl              |
| #1                     | 99.44%          | 100.18%   | 98.32%    | 99.02%            |
| #2                     | 100.55%         | 100.50%   | 98.29%    | 100.72%           |
| #3                     | 102.72%         | 100.34%   | 97.78%    | 100.26%           |
| <b>Média</b>           | 100.90%         | 100.34%   | 98.13%    | 100.00%           |
| <b>Desvio da média</b> |                 | -0.56%    | -2.79%    | -0.90             |

| Fórmula reconstituída  | Recuperação (%) |                   |                       |
|------------------------|-----------------|-------------------|-----------------------|
|                        | SOP             | Volume de injeção | Temperatura da coluna |
|                        |                 | 5µl               | 44°C                  |
| #1                     | 99.63%          | 98.69%            | 98.94%                |
| #2                     | 97.66%          | 97.79%            | 99.35%                |
| #3                     | 98.87%          | 98.14%            | 99.96%                |
| <b>Média</b>           | 98.72%          | 98.21%            | 99.41%                |
| <b>Desvio da média</b> |                 | -0.52%            | 0.70%                 |

| Fórmula reconstituída  | Recuperação (%) |                       |
|------------------------|-----------------|-----------------------|
|                        | SOP             | Temperatura da coluna |
|                        |                 | 36°C                  |
| #1                     | 99.36%          | 97.14%                |
| #2                     | 99.45%          | 97.64%                |
| #3                     | 100.22%         | 100.52%               |
| <b>Média</b>           | 99.68%          | 98.43%                |
| <b>Desvio da média</b> |                 | -1.25%                |

Os resultados obtidos demonstram que, para todos os parâmetros testados, excepto para um fluxo de 1.2mL/min, os valores de recuperação são aceitáveis, pois apresentam um desvio, em relação às condições SOP, inferior ao limite especificado ( $\leq 2\%$ ).



**Avaliação dos resultados****Tabela 49.** Avaliação dos resultados obtidos nos testes de robustez.

| <b>Robustez</b>              | <b>Influencia</b> | <b>Gama adequada</b>  |
|------------------------------|-------------------|-----------------------|
| <b>Fluxo</b>                 | <b>Alta</b>       | 0.8ml/min – 1.0mL/min |
| <b>Volume de injeção</b>     | <b>Baixa</b>      | 5µL - 15µL            |
| <b>Temperatura da coluna</b> | <b>Baixa</b>      | 36°C – 44°C           |

Através dos resultados obtidos nos testes de robustez realizados para a validação do método, pode concluir-se que o método é robusto para os parâmetros testados (fluxo de 0.8mL/min, temperatura de coluna de 36°C e 44°C e volume de injeção de 5µl e 15µl) excepto para um fluxo de 1.2mL/min.

**3.2.8. Testes de conformidade do sistema**

Os testes de conformidade do sistema, para a validação deste método, basearam-se na avaliação da simetria do pico, do número de pratos teóricos, da resolução e da reprodutibilidade do sistema cromatográfico, verificando assim se este é adequado para a análise de conteúdo em comprimidos revestidos de Blue025.

Nesse sentido serão avaliados os resultados obtidos nos cromatogramas das soluções padrão dos testes de rigor, repetibilidade e precisão intermédia, a fim de verificar se estes estão de acordo com os critérios de aceitação apresentados na tabela a baixo.

**Tabela 50.** Resultados dos testes de conformidade do sistema. Avaliação de N, S, R e da repetibilidade da resposta.

| Parâmetros avaliados<br>(de acordo com Ph. Eur. and USP)   | Critérios de<br>aceitação | Resultados    |  |
|--|---------------------------|---------------|--|
|  |                           | Rigor         | Repetibilidade/<br>precisão<br>intermédia* |
| Número de pratos teóricos (N)  | NLT 2000                  | 133970-138839 | ---  |
| Fator de simetria (S)  | $\leq 2$                  | 0.91-0.92     | ---  |
| Resolução (R) entre os picos da<br>substância ativa e imp. RRT 0.98 –<br>obtido na solução de<br>identificação/resolução | $\geq 1.5$                | 1.73          | ---  |
| Repetibilidade da resposta, RSD<br>(%), n=6  | $\leq 2.0\%$              | 0.91%         | ---  |

\*testes ainda não realizados

Pelos resultados obtidos pode observar-se que todos os parâmetros de conformidade do sistema avaliados apresentam resultados dentro dos critérios de aceitação definidos. Pode assim concluir-se que o método pode ser controlado pelos testes de conformidade do sistema definidos anteriormente e de acordo com os critérios de aceitação previamente definidos para uma análise de conteúdo rigorosa e reprodutível em comprimidos revestidos de Blue025.

### 3.2.9. Avaliação dos resultados

**Tabela 51.** Avaliação dos resultados obtidos na validação do método analítico.

| Parâmetros          | Critérios de<br>aceitação  | Resultados   |   |                       |   |
|---------------------|--|--|---|-----------------------|---|
| <b>Seletividade</b> | A presença dos excipientes e das impurezas não deverá interferir com o pico de Blue025.<br>Interferência $\leq 2.0\%$<br>A avaliação deverá permitir confirmar a pureza do pico. | Cumprido: -0.22% (interferência dos excipientes)<br>Cumprido: 0.07% (interferência dos excipientes e das impurezas)<br>Pico de Blue025 é não impuro. |   |                       |   |
| <b>Linearidade</b>  | Interceção no eixo dos yy' $\leq 3\%$<br>$r \geq 0.997$<br>Desvio dos declives $\leq 3\%$  | Solução padrão   | Interceção no eixo dos yy' = -0.33%<br>$r = 0.9999$ | Fórmula reconstituída | Interceção no eixo dos yy' = -1.44%<br>$r = 1.0000$ |
|                     |  | Desvio dos declives<br>(Solução padrão/formula reconstituída)  |   |                       | 1.59%   |

|                              |   |  |  |                   |                             |
|------------------------------|---|--|--|-------------------|-----------------------------|
| <b>Rigor</b>                 | Recuperação = 97.0%-103.0%<br>RSD ≤ 3%  | Nível de concentração                          | Recuperação (%)  | RSD (%)           | CI 95%                      |
|                              |   | 70%  | 100.3%   | 0.45%             | 99.2%-104.4%                |
|                              |   | 100%   | 100.6%   | 0.18%             | 100.2%-101.1%               |
|                              |   | 130%   | 100.6%   | 0.13%             | 100.3%-100.9%               |
| <b>Precisão do sistema</b>   | RSD (intra-dia) ≤ 2.0%<br>RSD (inter-dia) ≤ 2%  | Solução padrão                                 | Intra-dia  | Dia               | RSD                         |
|                              |   |  |  | Dia 1             | 0.29%                       |
|                              |   |  |  | Dia 2             | 0.30%                       |
|                              |   |  |  | Dia 3             | 0.69%                       |
|                              |   | Inter-dia                                      |  | 0.36%             |                             |
|                              |   | Fórmula reconstituída                          | Intra-dia  | Dia 1             | 0.20%                       |
|                              |   |  |  | Dia 2             | 0.04%                       |
|                              |   |  |  | Dia 3             | 0.16%                       |
| Inter-dia                    |   |  |  | 0.54%             |                             |
| <b>Robustez</b>              | A influência da variação dos parâmetros de robustez deve ser mínima   | <i>Influência</i>                              |  |                   |                             |
| <b>Estabilidade</b>          | - desvio dos RF em relação às condições padrão ≤ ±2%;   | <b>Estável</b>                                 | As soluções padrão e as amostras de fórmula reconstituída são estáveis pelo menos 48 horas às condições ambiente   |                   |                             |
| <b>Filtração</b>             | $p\text{-value} \geq 0.05$ (Intervalo de confiança=95% na avaliação do teste <i>t-student</i> )<br>A avaliação deverá permitir confirmar a pureza do pico (PDA) | <b>Alta</b>                                    | As soluções não devem ser filtradas com os filtros PTFE VWR, PP VWR e PTFE Simplepure 0.45µm (a filtração induz o aparecimento de novos picos no cromatograma).<br>Para a avaliação apenas do conteúdo, podem ser usados os filtros PTFE VWR e PP VWR 0.45µm.<br>Pode ser usada a centrifugação a 4000rpm durante 10 minutos.<br>Após a filtração com todos os filtros e após a centrifugação, avaliação da pureza do pico confirmou que o pico de Blue025 é não impuro. |                   |                             |
|                              |   | <b>Desvio da recuperação em relação às SOP</b> | <b>Desvio da recuperação em relação às SOP</b>   | <b>Influência</b> | <b>Condições aceitáveis</b> |
| <b>Fluxo</b>                 | Desvio da recuperação ≤ ±2%   | 0.8mL/min: -0.56%                              | 1.2mL/min: -2.79%  | <b>HIGH</b>       | 0.8mL/min - 1.0mL/min.      |
| <b>Temperatura da coluna</b> |   | 36°C: -1.25%                                   | 44°C: 0.70%  | <b>LOW</b>        | 36°C – 44°C                 |
| <b>Volume de injeção</b>     |   | 5µL: -0.52%                                    | 15µL: -0.90%   | <b>LOW</b>        | 5µL – 15µL                  |

Com base nos testes realizados e resultados obtidos pode-se concluir que este método analítico cumpre com a sua finalidade e, portanto, é válido para a avaliação do conteúdo de Blue025 em comprimidos revestidos.

## 4. Conclusão

A Indústria Farmacêutica está altamente regulamentada por entidades reguladoras e tem de cumprir com as Boas Práticas de Fabrico. Para a introdução de um novo medicamento no mercado é necessário submeter um dossier CTD, às autoridades reguladoras, que contenha toda a informação necessária para garantir a qualidade do produto.

Para demonstrar a qualidade de um produto é necessário desenvolver métodos para o analisar. O desenvolvimento de métodos de conteúdo permite quantificar a substância ativa presente nos comprimidos ou outras formas farmacêuticas, garantindo assim que este não apresenta falta ou excesso de princípio ativo podendo causar efeitos adversos ou um tratamento ineficaz.

De forma a evitar dados analíticos duvidosos que podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis é necessário que todos os métodos desenvolvidos sejam validados, demonstrando assim que o método desenvolvido está adequado para a finalidade a que foi proposto. A validação de um método é realizada de forma a assegurar que as metodologias analíticas são seletivas, lineares, rigorosas e precisas numa gama de valores nos quais o analito será analisado.

Actualmente é possível a aplicação de uma grande variedade de técnicas, no entanto a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), devido à sua seletividade, sensibilidade e versatilidade dos detetores, apresenta-se como uma técnica predominante utilizada nos laboratórios farmacêuticos, nomeadamente RP-HPLC com detetores PDA.

O presente trabalho teve como principal objetivo a validação de um novo método analítico desenvolvido para análise do conteúdo de Blue025 em comprimidos, explorando o HPLC-UV.

Pela avaliação dos testes de filtração concluiu-se que nas análises de rotina as soluções teste deverão ser centrifugadas, pois todos os filtros testados induzem o aparecimento de novos picos no cromatograma, uma vez que as mesmas amostras serão utilizadas para a análise de conteúdo da substância ativa e para a análise de substâncias relacionadas.

Em relação à especificidade pode concluir-se que o método é seletivo para a análise de Blue025 numa mistura de excipientes e impurezas, na formulação testada, pois não existe interferência significativa entre os excipientes e as impurezas na substância ativa.

O método demonstrou ser linear, tendo sido obtidos resultados diretamente proporcionais à concentração de Blue025 nas amostras tanto para as soluções padrão como para as soluções de fórmula reconstituída. Foi obtida a equação da reta  $y=36146935.6075x-24258.5745$ , com um coeficiente de correlação de 0.9999 para a linearidade das soluções padrão e a equação da reta  $y=36724639.3977x-105316.1736$ , com um coeficiente de correlação de 1.0000 para as soluções de fórmula reconstituída.

Os resultados obtidos para a recuperação nos testes de rigor foram, para cada nível de concentração (70%, 100% e 130%) respetivamente, 100.3%, 100.6% e 100.6%, demonstrando que o método é rigoroso.

O sistema cromatográfico usado para a análise é preciso na aplicação do método analítico, tanto na análise de injeções consecutivas num só dia, como na análise de soluções com concentrações semelhantes em dias diferentes, pois foram obtidos valores de RSD intra e inter-dia inferiores aos limites de especificação,  $\leq 2.0\%$  e  $\leq 2\%$  respetivamente.

Conclui-se que, tanto as soluções padrão como as amostras de fórmula reconstituída, são estáveis durante pelo menos 48 horas às condições ambiente.

A avaliação da robustez permitiu concluir que o método é robusto para um fluxo de 0.8mL/min., um volume de injeção de 5 $\mu$ L e 15 $\mu$ L e em análises com a coluna a temperaturas de 36°C ou 44°C.

A análise da conformidade do sistema garantiu que o sistema cromatográfico é adequado para a análise.

A validação forneceu provas experimentais de que o sistema e o método são adequados para o fim pretendido, demonstrando a adequabilidade das condições definidas e das técnicas seleccionadas. Dos resultados apresentados pode concluir-se que o método validado é seletivo, linear, rigoroso e preciso, na gama de concentração de trabalho.

Todo o processo de desenvolvimento e validação do método analítico de conteúdo da substância ativa, apresentado neste trabalho, é essencial para garantir a qualidade do novo medicamento genérico Blue025 desenvolvido pela Bluepharma. A qualidade do medicamento tem de estar demonstrada no módulo 3 do dossier CTD que irá ser submetido às autoridades para o pedido de introdução no mercado do medicamento genérico Blue025.

## 5. Bibliografia

1. <http://www.fda.gov> consultado em 07-09-2011
2. Arayne M. Saeed; Sultana Najma; Zaman M. Kamran (2008), “*Historical incidents leading to the evolution of good manufacturing practice*”, Accreditation and quality assurance, vol.13, 431-432
3. Tomic Sinisa; Sucic Anita Filipovic; Martinac Adrijana Ilic (2010), “*Good manufacturing practice: The role of local manufactures and competent authorities*”, Arh Hig Rada Toksikol, vol. 61, 425-436
4. Jornal Oficial da União Europeia, Diretiva 2003/94/CE (2003)
5. Causon, R. (1997), “*Validation of chromatographic methods in biomedical analysis Viewpoint and discussion*”, Journal of Chromatography B, 689, 175-180
6. <http://www.ich.org> consultado em 08-09-2011
7. ICH, “*Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances*” Q6A, 1999
8. <http://www.edqm.eu> consultado em 08-09-2011
9. <http://www.usp.org> consultado em 08-09-2011
10. <http://www.infarmed.pt> consultado em 09-09-2011
11. The Rules Governing Medicinal Products in the European Union, “*EU Guidelines to Good Manufacturing Practice Medicinal Products for Human and Veterinary Use*”, vol. 4, Part I, Chapter 6 - Quality Control ([http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4/index_en.htm))
12. [http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-2/b/update\\_200805/ctd\\_05-2008\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-2/b/update_200805/ctd_05-2008_en.pdf)
13. ICH, “*The Common Technical Document for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Quality – M4Q(R1)*”, 2002
14. Perez-Escobedo J. L., Azzaro-Pantel C., Pibouleau L (2011), “*New Product Development with Discrete Event Simulation: Application to Portfolio Management for the Pharmaceutical Industry*”, Industrial & Engineering Chemistry Research, vol. 50, 10615-10629
15. ICH, “*The Common Technical Document for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Safety – M4S(R2)*”, 2002

16. ICH, “*The Common Technical Document for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Efficacy – M4E(R1)*”, 2002
17. ICH, “*Organisation of the Common Technical Document for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use*”, M4, 2004
18. CPMP/ICH, Note for Guidance on Specifications: “*Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products*” Q6B, 1999
19. ICH, “*Pharmaceutical Development*”, Q8(R2), 2009
20. ICH, “*Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*”, Q2 (R1), 2005
21. Linda L. Ng, Ph.D, Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods (November 1994)
22. Raghavan. R, Joseph J. C. (2007), “*Chromatographic Methods of Analysis: High Performance Liquid Chromatography*”, Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, 526-537
23. Causon, R. (1997), “*Validation of chromatographic methods in biomedical analysis Viewpoint and discussion*”, Journal of Chromatography B, 689, 175-180
24. Joel K. Swadesh (2001), HPLC Practical an industrial applications, second edition, CRC Press LLC
25. Forgães, E. and T. Cserhádi (1997), Molecular Basis of Chromatographic Separation, New York , CRC Press, Boca Raton
26. Ribani, M. (2004), “*Validação em métodos cromatográficos e electroforéticos*”, Química Nova, vol. 27, 771-780
27. *European Pharmacopoeia*, 5.0, 2.2.29 Liquid chromatography
28. *European Pharmacopoeia*, 5.0, 2.2.46 Chromatographic separation techniques
29. Rao RN e Nagaraju V. (2003) “*An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs*”, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, vol. 33, 335-377
30. Gorog S. (2007) “*The changing face of pharmaceutical analysis*”, Trends in Analytical Chemistry, vol. 26, 12-17
31. Rao RN e Nagaraju V. (2003) “*An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs*”, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, vol. 33, 335-377

- 
32. Forgães, E. and T. Cserhádi (1997), Molecular Basis of Chromatographic Separation, New York , CRC Press, Boca Raton
33. [http://www.forumsci.co.il/HPLC/Waters\\_systems.html](http://www.forumsci.co.il/HPLC/Waters_systems.html) consultado em 10-09-2011
34. Pombeiro, A. J. L. O. – Técnicas e Operações Unitárias em Química Laboratorial. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1998
35. Garg Anuradha, Solas Dennis W., Takahashi Lori H., Cassella James V. (2010), “*Forced degradation of fentanyl: Identification and analysis of impurities and degradants*”, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, vol. 53, 325-334
36. Sehrawat Renu; Maithani Mukesh; Singh Ranjit (2010), “*Regulatory Aspects in Development of Stability-Indicating Methods: A Review*”, Chromatographia, vol. 72, 1-6
37. Alsante Karen M., Ando Akemi, Brown Roland, Ensing Janice, Hatajik Todd D., Kong Wei, Tsuda Yoshiko (2007), “*The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products*”, Advanced Drug Delivery Reviews, vol. 59, 29-37
38. Modhave Dattatray T., Handa Tarun, Shah Ravi P., Singh Saranjit (2011), “*Stress degradation studies on lornoxicam using LC, LC–MS/TOF and LC–MS<sup>n</sup>*”, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, vol. 56, 538-545
39. Andrade Nogueira Fernando Henrique, Lana Goulart Letícia de Paula, César Isabela da Costa, Moreira de Campos Lígia Maria, Pianetti Gérson Antônio (2011) “*Development and Validation of an HPLC Method for Mefloquine Hydrochloride Determination in Tablet Dosage Form*”, Journal of AOAC International, vol. 94, 1089-1093
40. dos Santos Karen C., da Silva Maria Fatima G. F., Fernandes João B., Vieira Paulo C., Polikarpov Igor, ZucolottoValtencir, Forim Moacir R. (2011), “*Development and validation of a fast RP-HPLC method to determine the analogue of the thyroid hormone, 3,5,3'-triiodothyroacetic acid (TRIAC), in polymeric nanoparticles*”, Analytical Methods, vol. 3, 1936-1942
41. Rodríguez-Ramos Fernando, Sánchez-Estrada Víctor H., Alfaro-Romero Alejandro, Tapia-Álvarez Gabriela Rubí, Navarrete Andrés (2011) “*Development and Validation of a Column High-Performance Liquid Chromatography Method for Quantification of Ganaphaliin A and B in*
-



- Inflorescences of Gnaphalium liebmannii Sch. Bp ex Klatt*”, Journal of AOAC International, vol. 94, 1076-1081
42. Guidance for Industry, Analytical Procedures and Method, U. S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Evaluation and Research (CDER) Center for Biologics Evaluation and Research (CBER)
43. [http://labvirtual.eq.uc.pt/siteJoomla/index.php?option=com\\_content&task=view&id=103&Itemid=451](http://labvirtual.eq.uc.pt/siteJoomla/index.php?option=com_content&task=view&id=103&Itemid=451) consultado em 11-09-2011<sup>i</sup>

---

<sup>i</sup> Este trabalho está escrito de acordo com o novo acordo ortográfico.