



**Daniela Filipa Mendes Melo**

Licenciada em Ciências de Engenharia Química e Bioquímica

**Validação de um método analítico de HPLC – Quantificação  
das impurezas do Cloridrato de Tetraciclina**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Doutora Dália Maria Dias Barbosa, CIPAN

Co-orientador: Prof. Doutor Mário Eusébio, FCT-UNL



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Setembro, 2016**



**Daniela Filipa Mendes Melo**

Licenciada em Ciências de Engenharia Química e Bioquímica

**Validação de um método analítico de HPLC – Quantificação das impurezas de Cloridrato de Tetraciclina**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Doutora Dália Maria Dias Barbosa, CIPAN

Co-orientador: Prof. Doutor Mário Eusébio, FCT-UNL

**Setembro, 2016**



## **Validação de um Método Analítico de HPLC – Quantificação das Impurezas de Cloridrato de Tetraciclina**

Copyright © Daniela Filipa Mendes Melo, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



(Este documento está escrito sob regras do novo acordo ortográfico)



Dedico este trabalho aos meus pais  
e à minha avó com eterna saudade



## AGRADECIMENTOS

---

Ao dar como concluído este trabalho, não posso deixar de agradecer a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a sua realização, demonstrando preocupação e estando sempre presentes ao longo desta caminhada, a etapa final.

Quero agradecer à empresa Cipan pela oportunidade nestes seis meses, sobretudo agradecer a aprendizagem que obtive durante todo o estágio que irá contribuir muito para o meu enriquecimento enquanto pessoa e na minha vida profissional. Destacando sem dúvida a minha orientadora, Doutora Dália Barbosa por toda a orientação científica, aprendizagem, disponibilidade e preocupação que sempre demonstrou.

Ao meu coorientador, Prof. Doutor Mário Eusébio, por toda a sua disponibilidade e apoio nos momentos mais difíceis deste trabalho. Agradeço-lhe também por todos os conhecimentos científicos ao longo do percurso académico.

À Maria Vieira, analista do laboratório de desenvolvimento da Cipan, pela ajuda na integração e pela transmissão dos seus conhecimentos que tanto me auxiliaram na elaboração de todo este trabalho. Também ao João Manso por ser prestável e me ajudar quando tinha dúvidas no funcionamento do HPLC. Um muito obrigada.

Ao Engenheiro Carlos Santos, Tânia, Samuel, Ramiro, Frazão, Anabela, pelas horas de almoço e momentos de convívio que proporcionaram, tornando mais fácil a adaptação a esta empresa. Agradeço também à Marta Vale, companheira desta jornada, parceira de gabinete e com quem partilhei os momentos de mais nervosismo, sendo o apoio uma da outra. Muito obrigada.

As viagens de comboio não seriam as mesmas sem a companhia das minhas meninas. As manhãs chuvosas e frias eram esquecidas dando lugar à vossa boa disposição, tornando os dias bem mais animados. Vou levar-vos no coração e recordar esses dias com muita saudade. Obrigada Catarina, Joana, Catarina Vieira, Helena, Isabel, Sofia, Maria e Daniela.

Quero agradecer de forma especial a quem durante este percurso académico mais me marcou, especialmente ao grupo do Etilenoglicol. E se os tempos de Projeto I e II são recordados com saudade, a vocês o devo, sei que vos vou levar no coração para sempre. Muito obrigada Margarida Pedro, Inês Salvador e Catarina Vieira. Um agradecimento também especial para a Sara, Rita e Beatriz por partilharem comigo todas as aventuras da FCT, pelo companheirismo, pelas gargalhadas, pelos jantares. Com vocês tive a certeza que há amigos da faculdade que são para sempre.

Infinitos agradecimentos aos meus pais. Sem o vosso apoio e esforço sei que nada disto seria possível. Reconheço todos os sacrifícios que fizeram para me proporcionarem este sonho, não tenho palavras nem como agradecer todo esse gesto. Mesmo estando a quilómetros de distância de vocês nestes cinco anos e não vos ver com a frequência que gostaria, sei que estavam e estarão sempre presentes na minha vida. Agradeço toda a compreensão mesmo nos dias mais complicados. Todas as palavras e conselhos foram de extrema importância e serão lembrados sempre nas diversas situações da minha vida. Muito obrigada por todo o apoio incondicional e por serem um exemplo para mim.

Ao meu irmão agradeço por desde sempre me fazer acreditar que conseguia alcançar a meta. Obrigada por todas as palavras e por sempre teres tido orgulho da tua mana. Levarei e lembrarei sempre os teus ensinamentos porque sem dúvida és um exemplo enquanto pessoa para mim.

Ao meu afilhado Salvador que foi mais uma força para a minha luta e que, mesmo sem ele perceber me ajudou muito. Às suas palavras carinhosas, “tenho saudades tuas madrinha”, a melhor coisa que se pode ter, uma alegria imensa capaz de alegrar o pior dia da faculdade.

Avó, sei que já não estás fisicamente presente para te poder dizer que esta etapa está a terminar, mas recordo-te com eterna saudade e agradeço-te por tudo o que fizeste por mim, por todo o apoio, pelas palavras sábias que me dizias e pelas últimas palavras que me disseste “boa viagem netinha”, viagem para a vida acredito. Um muito obrigada desta tua neta.

Finalmente, ao Jorge, meu namorado, companheiro, confiante por estar sempre presente e acima de tudo pela pessoa que é e pela pessoa especial que me faz sentir. Sempre foi um dos meus pilares nesta caminhada, a pessoa que sempre teve muita paciência comigo, principalmente nos momentos mais difíceis. Obrigada por estares sempre presente na minha vida.

Muito obrigada a todos!

## RESUMO

---

Um procedimento analítico é desenvolvido com o intuito de se testar uma característica definida para uma determinada substância de um fármaco relativamente aos critérios de aceitação estabelecidos para esse parâmetro estudado. Este trabalho consistiu em validar um método cromatográfico destinado à quantificação das impurezas do Cloridrato de Tetraciclina (4-Epitetraciclina, 4-Epianidrotetraciclina e Anidrotetraciclina), seguindo a metodologia descrita no ICH Q2 (R1). Foram realizados testes de estabilidade, especificidade/seletividade, linearidade, limite de deteção, limite de quantificação, exatidão e precisão (repetibilidade e precisão intermédia), que permitiram constatar que o método analítico usado reproduz resultados precisos e fiáveis. A avaliação de todos os parâmetros permitirão em análises futuras, no Controlo de Qualidade identificar e quantificar as impurezas do Cloridrato de Tetraciclina.

Relativamente à estabilidade das soluções usadas na validação do método, foi obtida uma estabilidade de 12 horas para as soluções das impurezas 4-Epitetraciclina e 4-Epianidrotetraciclina e de 8 horas para as soluções da impureza Anidrotetraciclina.

Os resultados obtidos para a validação do método analítico permitem concluir que a resposta é linear entre o limite de quantificação de cada impureza e 120% do limite de especificação correspondente. Para analistas e dias diferentes conclui-se que o método é preciso com RSD  $\leq 10$ . O método é exato com valores de recuperação entre 90% - 110%. Para a impureza 4-Epitetraciclina os limites de deteção (LD), quantificação (LQ) e especificação (LE) são 0,001mg/mL, 0,003mg/mL e 0,03mg/mL, respetivamente. Para a impureza 4-Epianidrotetraciclina são 0,0006mg/mL, 0,001mg/mL e 0,005mg/mL, respetivamente. Para a impureza Anidrotetraciclina são 0,001mg/mL, 0,0024mg/mL e 0,005mg/mL, respetivamente.

O estudo da robustez do método analítico permitiu concluir que o tempo de retenção relativo de cada impureza não é significativamente afetado pelas alterações efetuadas à fase móvel nem à temperatura da coluna cromatográfica.

Neste sentido, as impurezas do Cloridrato de Tetraciclina são quantificados de forma exata, precisa, linear e seletiva.

**Palavras-Chave:** Impurezas; validação de um método analítico, cromatografia líquida de alta eficiência



## ABSTRACT

---

An analytical procedure is developed in order to test a feature set for a specific substance of a drug relative to the acceptance criteria established for this parameter studied. This work consisted in the validation a chromatographic method to quantify the impurities of Tetracycline Hydrochloride (4-Epitetracycline, 4-Epianhydrotetracycline and Anhydrotetracycline), following the methodology described in ICH Q2 (R1) Were performed tests of stability, specificity/selectivity, linearity, detection limit, quantification limit, accuracy and precision (repeatability and intermediate precision), which showed evidence that the analytical method will provide accurate and reliable results. The evaluation of all parameters will, in future analysis of Quality Control, identify and quantify the impurities of Tetracycline Hydrochloride.

Regarding the stability of solutions used in method validation was obtained a stability of 12 hours for the impurities 4-Epitetracycline and 4-Epianhydrotetracycline and only 8 hours for the impurity Anhydrotetracycline.

The validation results obtained revealed that the method is linear between quantification limit of each impurity and 120% of the limit of specification corresponding. The method is precise for different analysts and days with  $RSD \leq 10\%$ . The method is accurate with recovery values between 90% - 110%. The limit of detection (LD), quantification (LQ) and specification (LE) for the impurity 4-Epitetracycline are 0,001mg/mL, 0,003mg/mL and 0,03mg/mL, respectively. For the impurity 4-Epianhydrotetracycline are 0,0006mg/mL, 0,001mg/mL and 0,005mg/mL, respectively. For the impurity Anhydrotetracycline are 0,001 mg/mL, 0,0024mg/mL and 0,005mg/mL, respectively.

The study of the robustness of the analytical method concluded that the relative retention time of each impurity was not significantly affected by the change made on the mobile phase and on the temperature of the chromatographic column.

In the sense, the impurities of Tetracycline Hydrochloride are quantified accurately, linearity and selectivity.

**Keywords:** Impurities; Validation of an analytical method; high performance liquid chromatography.



# ÍNDICE

---

1	INTRODUÇÃO .....	1
1.1.	ENQUADRAMENTO E MOTIVAÇÃO .....	1
1.2.	GRUPO ATRALCIPAN.....	2
1.2.1.	Laboratórios Cipan.....	3
1.3.	TETRACICLINAS.....	3
1.4.	CLASSIFICAÇÃO DE IMPUREZAS .....	5
1.5.	QUALIFICAÇÃO DE IMPUREZAS .....	7
1.6.	DOCUMENTAÇÃO .....	10
1.7.	CROMATOGRAFIA.....	11
1.7.1.	Mecanismos de Separação.....	11
1.8.	MÉTODOS ANALÍTICOS E SUA VALIDAÇÃO .....	21
1.8.1.	Especificidade/Seletividade.....	22
1.8.2.	Linearidade.....	23
1.8.3.	Limite de Quantificação (LQ) e Limite de Detecção (LD) .....	23
1.8.4.	Exatidão.....	25
1.8.5.	Precisão .....	25
1.8.5.1.	Repetibilidade.....	26
1.8.5.2.	Precisão Intermédia .....	26
1.8.5.3.	Reprodutibilidade.....	27
1.8.6.	Robustez.....	27
1.8.7.	CrITÉrios de Aceitação .....	28
1.9.	FATOR DE RESPOSTA RELATIVO .....	29
1.10.	TRATAMENTO ESTATÍSTICO DE DADOS.....	30
2	MATERIAIS E MÉTODOS .....	35
2.1.	DETERMINAÇÃO DA EATC/ATC/ETC E TC POR CROMATOGRAFIA.....	35

2.2.	PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE REAGENTES .....	36
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	39
3.1	Pré-Validação do Método Cromatográfico .....	39
3.2	Validação do Método Cromatográfico .....	42
3.2.1	Especificidade .....	42
3.2.2	Linearidade.....	46
3.2.3	Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....	51
3.2.4	Sensibilidade .....	55
3.2.5	Exatidão.....	56
3.2.6	Precisão .....	60
3.2.7	Intervalo de Linearidade.....	66
3.2.8	Estabilidade das Soluções .....	66
3.2.9	Robustez.....	72
4	CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	75
5	TRABALHOS FUTUROS.....	79
6	BIBLIOGRAFIA.....	81
7	ANEXOS.....	85
I.	Linearidade do método analítico.....	85
II.	Cálculo do Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	89
III.	Resultados da ANOVA para o estudo da Precisão.....	91

# ÍNDICE DE FIGURAS

---

Figura 1.1 – Organização do grupo AtralCipan .....	2
Figura 1.2- Estrutura da Tetraciclina (TC) [7]. .....	5
Figura 1.3 – Limites associados às impurezas .....	8
Figura 1.4 - Árvore de decisão e qualificação de impurezas, (adaptado [10]). .....	9
Figura 1.5 – Botânico Mikhail Semenovich Tsvet [12]. .....	11
Figura 1.6 - Esquema das diferentes trocas iônicas da cromatografia por troca iônica .....	14
Figura 1.7 – Etapas da Cromatografia Líquida Clássica (adaptado [25]). .....	16
Figura 1.8 – Etapas da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (adaptado [25]). .....	16
Figura 1.9 - Diagrama detalhado de um HPLC [27]. .....	17
Figura 1.10 – Ilustração representativa da diferença entre precisão e exatidão. ....	27
Figura 1.11 – Fator de Resposta Relativo (RRF), (adaptado [40]). .....	30
Figura 1.12 – Distribuição Normal [39]. .....	31
Figura 1.13 – Teste Unilateral (à direita) [39]. .....	33
Figura 1.14 – Teste Bilateral (simétrico) [39]. .....	33
Figura 3.1 – Cromatograma da solução de padrão de Cloridrato de Tetraciclina sem fortificação (0min-15min). .....	44
Figura 3.2 – Cromatograma da solução de padrão de Cloridrato de Tetraciclina sem fortificação (15min-65min). .....	44
Figura 3.3 – Cromatograma da solução de padrão de Cloridrato de Tetraciclina fortificada com quantidades conhecidas das impurezas 4-ETC, 4-EATC e ATC (0min-15min). .....	44
Figura 3.4 – Cromatograma da solução de padrão de Cloridrato de Tetraciclina fortificada com quantidades conhecidas das impurezas 4-ETC, 4-EATC e ATC (15min-65min). .....	45
Figura 3.5 – Esquema ilustrativo do procedimento de cálculo da resolução entre os picos da impureza 4-Epianidrotetraciclina (RT=28,067) e da impureza Anidrotetraciclina (RT=60,135). .....	45
Figura 3.6 – Representação gráfica das áreas dos picos em função da concentração da impureza ETC. ....	48

Figura 3.7 – Representação gráfica das áreas dos picos em função da concentração da impureza EATC. ....	48
Figura 3.8 – Representação gráfica das áreas dos picos em função da concentração da impureza ATC.....	48
Figura 3.9 – Gráfico dos resíduos da concentração para a reta de calibração da impureza 4-Epitetraciclina. ....	49
Figura 3.10 – Gráfico dos resíduos da concentração para a reta de calibração da impureza 4-Epianidrotetraciclina. ....	49
Figura 3.11 – Gráfico dos resíduos da concentração para a reta de calibração da impureza Anidrotetraciclina.....	50
Figura 3.12 - Cromatograma correspondente ao Limite de Detecção da impureza 4-Epitetraciclina.....	52
Figura 3.13 – Cromatograma correspondente ao Limite de Quantificação da impureza 4-Epitetraciclina. ....	52
Figura 3.14 – Cromatograma correspondente ao Limite de Detecção da impureza 4-Epianidrotetraciclina. ....	53
Figura 3.15 – Cromatograma correspondente ao Limite de Quantificação da impureza 4-Epianidrotetraciclina. ....	53
Figura 3.16 – Cromatograma correspondente ao Limite de Detecção da impureza 4-Epianidrotetraciclina. ....	54
Figura 3.17 – Cromatograma correspondente ao Limite de Quantificação da impureza 4-Epianidrotetraciclina. ....	54
Figura 3.18 – Cromatograma da solução padrão de Cloridrato de Tetraciclina para o estudo da exatidão da impureza 4-ETC.....	58
Figura 3.19 – Cromatograma da solução padrão de Cloridrato de Tetraciclina depois de sofrer fortificação para o estudo da exatidão da impureza 4-ETC. ....	58
Figura 3.20 – Cromatograma da solução padrão de Cloridrato de Tetraciclina para o estudo da exatidão da impureza 4-EATC.....	58
Figura 3.21 – Cromatograma da solução padrão de Cloridrato de Tetraciclina depois de sofrer fortificação para o estudo da exatidão da impureza 4-EATC.....	58

Figura 3.22 – Cromatograma da solução padrão de Cloridrato de Tetraciclina para o estudo da exatidão da impureza ATC.....	59
Figura 3.23 – Cromatograma da solução padrão de Cloridrato de Tetraciclina depois de sofrer fortificação para o estudo da exatidão da impureza ATC. ....	59
Figura 3.24 – Cromatograma para o estudo da precisão da impureza 4-EATC referente ao nível mais baixo de concentração adicionada à solução padrão de Cloridrato de Tetraciclina (preparada pelo analista 1). ....	62
Figura 3.25 – Cromatograma para o estudo da precisão da impureza 4-EATC referente ao nível mais baixo de concentração adicionada à solução padrão de Cloridrato de Tetraciclina (preparada pelo analista 2). ....	62
Figura 3.26 – Cromatograma para o estudo da precisão da impureza 4-EATC referente ao nível intermédio de concentração adicionada à solução padrão de Cloridrato de Tetraciclina (preparada pelo analista 1). ....	63
Figura 3.27 – Cromatograma para o estudo da precisão da impureza 4-EATC referente ao nível intermédio de concentração adicionada à solução padrão de Cloridrato de Tetraciclina (preparada pelo analista 2). ....	63
Figura 3.28 – Cromatograma para o estudo da precisão da impureza 4-EATC referente ao nível mais elevado de concentração adicionada à solução padrão de Cloridrato de Tetraciclina (preparada pelo analista 1). ....	63
Figura 3.29 – Cromatograma para o estudo da precisão da impureza 4-EATC referente ao nível mais elevado de concentração adicionada à solução padrão de Cloridrato de Tetraciclina (preparada pelo analista 2). ....	63
Figura 3.30 – Cromatograma da solução padrão de Cloridrato de Tetraciclina para o estudo da estabilidade das soluções (instante $t_0$ ). ....	68
Figura 3.31 – Cromatograma da solução padrão de Cloridrato de Tetraciclina para o estudo da estabilidade das soluções (instante $t=12h$ ). ....	68
Figura 3.32 – Cromatograma da solução correspondente à concentração equivalente ao LQ da impureza 4-ETC para o estudo da estabilidade das soluções (instante $t_0$ ).....	69
Figura 3.33 – Cromatograma da solução corresponde à concentração equivalente ao LQ da impureza 4-ETC para o estudo da estabilidade das soluções (instante $t=12h$ ).....	69
Figura 3.34 – Cromatograma da solução correspondente à concentração equivalente ao LE da impureza 4-ETC para o estudo da estabilidade das soluções (instante $t_0$ ).....	69

Figura 3.35 - Cromatograma da solução corresponde à concentração equivalente ao LE da impureza 4-ETC para o estudo da estabilidade das soluções (instante t=12h).....	69
Figura 3.36 - Cromatograma da solução correspondente à concentração equivalente ao LQ da impureza 4-EATC para o estudo da estabilidade das soluções (instante t <sub>0</sub> ).....	70
Figura 3.37 - Cromatograma da solução corresponde à concentração equivalente ao LQ da impureza 4-EATC para o estudo da estabilidade das soluções (instante t=12h).....	70
Figura 3.38 - Cromatograma da solução correspondente à concentração equivalente ao LE da impureza 4-EATC para o estudo da estabilidade das soluções (instante t <sub>0</sub> ).....	70
Figura 3.39 - Cromatograma da solução corresponde à concentração equivalente ao LE da impureza 4-EATC para o estudo da estabilidade das soluções (instante t=12h).....	70
Figura 3.40 - Cromatograma da solução correspondente à concentração equivalente ao LQ da impureza ATC para o estudo da estabilidade das soluções (instante t <sub>0</sub> ). ....	71
Figura 3.41 - Cromatograma da solução corresponde à concentração equivalente ao LQ da impureza ATC para o estudo da estabilidade das soluções (instante t=8h). ....	71
Figura 3.42 - Cromatograma da solução correspondente à concentração equivalente ao LE da impureza ATC para o estudo da estabilidade das soluções (instante t <sub>0</sub> ). ....	71
Figura 3.43 - Cromatograma da solução corresponde à concentração equivalente ao LE da impureza ATC para o estudo da estabilidade das soluções (instante t=8h). ....	71

# ÍNDICE DE TABELAS

---

Tabela 1.1 - Comparação dos diferentes tipos de detetores usados em HPLC [30].....	19
Tabela 1.2 – Caraterísticas necessárias para validar os diferentes tipos de procedimento analítico, ICH 2005, (adaptado [34]). .....	22
Tabela 1.3 – Critérios de aceitação de cada parâmetro da validação do método analítico .....	28
Tabela 2.1 – Parâmetros do método analítico em HPLC .....	35
Tabela 3.1 – Limite de Especificação das Impurezas do Cloridrato de Tetraciclina .....	39
Tabela 3.2 – Limite de Quantificação e Limite de Detecção da Impureza 4-Epitetraciclina, calculados pelo método S/N para período de tempo equivalente a 5 vezes a largura a meia altura .....	41
Tabela 3.3 – Limite de Quantificação e Limite de Detecção da Impureza 4-Epianidrotetraciclina, calculados pelo método S/N para período de tempo equivalente a 5 vezes a largura a meia altura. ....	41
Tabela 3.4 – Limite de Quantificação e Limite de Detecção da Impureza Anidrotetraciclina, calculados pelo método S/N para período de tempo equivalente a 5 vezes a largura a meia altura. ....	41
Tabela 3.5 – Resultados da Especificação do método a partir do teste de recuperação. ....	43
Tabela 3.6 – Resultados da Resolução para as impurezas 4-ETC, 4-EATC e ATC. ....	46
Tabela 3.7 – Intervalo de Trabalho das impurezas 4-ETC, 4-EATC e ATC .....	47
Tabela 3.8 – Áreas da curva de calibração das impurezas ETC, EATC e ATC.....	47
Tabela 3.9 – Média do Quadrado (MQ) da regressão e dos resíduos a partir dos resultados da ANOVA. ....	51
Tabela 3.10 – Resultados dos limites LD e LQ da impureza 4-Epitetraciclina.....	52
Tabela 3.11 – Resultados dos limites LD e LQ da impureza 4-Epianidrotetraciclina. ....	53
Tabela 3.12 – Resultados dos limites LD e LQ da impureza Anidrotetraciclina. ....	54
Tabela 3.13 – Resultados da sensibilidade das impurezas ETC, EATC, ATC .....	55
Tabela 3.14 – Resultados da Recuperação para as impurezas 4-ETC, 4-EATC e ATC .....	59

Tabela 3.15 – Resultados para a análise do parâmetro da repetibilidade da impureza 4-Epitetraciclina. ....	64
Tabela 3.16 – Resultados para a análise do parâmetro da precisão da impureza Anidrotetraciclina. ....	64
Tabela 3.17 – Resultados para a análise do parâmetro da precisão da impureza 4-Epianidotetraciclina.....	65
Tabela 3.18 – Resultados do teste da ANOVA para o estudo da precisão intermédia das impurezas 4-ETC e ATC. ....	66
Tabela 3.19 – Resultados do parâmetro da estabilidade das soluções para um tempo total de 12 horas. ....	67
Tabela 3.20 – Tempos relativos de retenção obtidos para o parâmetro da robustez (alteração da fase móvel). ....	73
Tabela 3.21 – Tempos relativos de retenção obtidos para o parâmetro da robustez (alteração da temperatura da coluna cromatográfica). ....	73
Tabela 4.1 – Resultados dos parâmetros de validação do método analítico de HPLC para as impurezas do Cloridrato de Tetraciclina. ....	76

# GLOSSÁRIO

---

4-EATC	4-Epianidrotetraciclina
4-ETC	4-Epitetraciclina
API	Active Pharmaceutical Ingredients (Ingrediente Ativo Farmacêutico)
ATC	Anidrotetraciclina
FDA	U.S. Food & Drug Administration
EP	European Pharmacopoeia
GC	Cromatografia Gasosa
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
ICH	International Conference on Harmonisation (Conferência Internacional de Harmonização)
K	Coeficiente de partição do soluto
k'	Fator de retenção (Equação)
LC	Cromatografia Líquida
LD	Limite de Detecção (Equação 1.7, mg/mL)
LE	Limite de Especificação
LQ	Limite de Quantificação (Equação 1.6, mg/mL)
m	Declive da curva de calibração
RELACRE	Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal
RF	Fator de resposta (Equação 1.9, adimensional)
RRF	Fator de resposta relativa (Equação 1.10, adimensional)
R <sub>s</sub>	Resolução (Equação 1.5)
RSD	Relative Standard Deviation (Desvio Padrão Residual, %)
S/N	Sinal/Ruído (Equação 3.1, adimensional)
t <sub>r</sub>	Tempo de Retenção (min)
t <sub>0</sub>	Tempo de retenção de um composto que não é retido

USP	United States Pharmacopoeia
UV	Detetor de Ultravioleta
W	Largura da base do pico (cm)
$V_m$	Volume de fase móvel (Equação 1.3, mL)
$V_r$	Volume de retenção (Equação 1.3, mL)
$V_s$	Volume da fase estacionária (Equação 1.3, mL)
$V_0$	Volume de um composto que não é retido (Equação 1.2, mL)

### *Símbolos gregos*

$\alpha$	Seletividade (Equação 1.1)
$\lambda$	Comprimento de onda (nm)
$\sigma$	Desvio padrão

# 1 INTRODUÇÃO

---

## 1.1. ENQUADRAMENTO E MOTIVAÇÃO

Um procedimento analítico é desenvolvido com o intuito de se testar uma característica definida para uma determinada substância de um fármaco relativamente aos critérios de aceitação estabelecidos para esse parâmetro estudado. No decorrer do desenvolvimento de um novo método analítico, torna-se essencial uma escolha rigorosa da instrumentação analítica e da metodologia, tendo em atenção o objetivo pretendido.

A validação de um método analítico é de extrema importância quando se pretende implementá-lo, pois tem como principal objetivo demonstrar que o mesmo é adequado para o fim proposto. Desta forma, o método analítico torna-se digno de confiança uma vez que os resultados obtidos da validação do mesmo são usados para avaliar a qualidade, a confiabilidade e a consistência dos resultados analíticos, visto que a validação de métodos analíticos é uma etapa crucial e um requisito regulatório que faz parte dos padrões de qualidade da maioria dos laboratórios.

Ao longo dos anos têm sido publicados vários guias de orientação com o objetivo de regulamentar a validação de métodos analíticos. Nesta perspetiva, a Cipan, com a preocupação de cumprir todas as exigências regulamentares, sugeriu o desenvolvimento deste trabalho centralizado na validação de um método analítico para o doseamento de impurezas de Cloridrato de Tetraciclina.

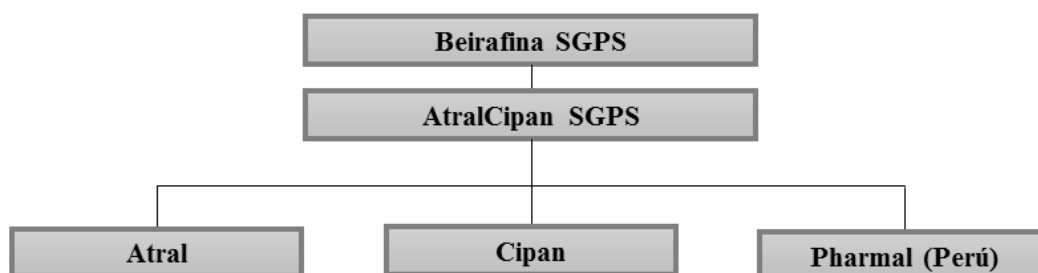
A dissertação encontra-se organizada em quatro capítulos, nos quais se encontra descrito o trabalho desenvolvido ao longo do estágio. Na primeira secção é ilustrada de forma sucinta a evolução da empresa, descreve-se brevemente o API em estudo e impurezas, fazendo a sua análise e classificação tendo em conta guias de orientação. Ainda nesta secção inúmeram-se e descrevem-se os parâmetros associados à validação do método e respetivos critérios de aceitação. No segundo capítulo procedeu-se a um resumo relativo à descrição e evolução do método cromatográfico (HPLC), descrevendo-se o plano de trabalho desenvolvido tendo em conta a instrução técnica e as condições cromatográficas desenvolvidas anteriormente no laboratório da Cipan. Na quinta secção estudaram-se os diferentes parâmetros de validação do método e apresentam-se os resultados associados a cada um deles procedendo-se à sua discussão. No último capítulo são enumeradas as conclusões do trabalho desenvolvido ao longo do estágio e os trabalhos futuros que podem ser realizados, ou seja, sugestões de aperfeiçoamento do trabalho em estudo ou simplesmente investigação de pequenas interrogações que tenham surgido no decorrer da validação do método.

## 1.2. GRUPO ATRALCIPAN

O Atral, fundado pelo Comendador Sebastião Alves, teve a sua origem no ano de 1947, constituído apenas por uma farmácia modesta num bairro de Alcântara em Lisboa. Após a aprovação pela Food & Drug Administration (FDA) das instalações fabris dos laboratórios Atral, a empresa deslocou-se para a Vala do Carregado, na Castanheira do Ribatejo onde estabeleceu uma parceria com a empresa Cipan, iniciando-se assim o grupo AtralCipan [1].

Em 1963 o grupo estreia-se na produção de três novos fármacos (oxitetraciclina, eritromicina e tetraciclina). Os laboratórios AtralCipan é um grupo químico-farmacêutico integrado no mercado mundial, o qual procura ocupar uma posição de liderança relativamente à produção e comercialização de substâncias ativas, medicamentos e produtos de saúde para uma melhor qualidade de vida da população. Ao longo dos anos foi notório o crescimento do grupo, sendo atualmente constituído por três empresas, ilustrado na Figura 1.1 [1-2].

A empresa AtralCipan em 2012 ocupava o quarto lugar das maiores empresas exportadoras na área das farmacêuticas, sendo a minociclina o principal produto exportado com mercado essencial os Estados Unidos. Para além dos Estados Unidos da América, destacam-se outros principais mercados como a Venezuela, o Perú, o Reino Unido, a Islândia e a Angola. Nos últimos anos as exportações do grupo apresentavam valores superiores a 20 milhões de euros, com as exportações para o exterior a representarem mais de 50% das vendas globais. O incentivo às exportações por parte da empresa é feito com o auxílio de um departamento próprio que periodicamente estabelece contato com os elementos das embaixadas de países terceiros, com a rede diplomática do grupo correspondente em coordenação com o AICEP com o qual são realizadas diversas ações além de “road-shows” [3].



**Figura 1.1** – Organização do grupo AtralCipan

### 1.2.1. Laboratórios Cipan

A Cipan é responsável pela produção de princípios ativos para a indústria farmacêutica, nomeadamente antibióticos. Além disso, a Cipan tem também experiência na produção e isolamento de impurezas, principalmente impurezas da família das tetraciclinas. Relativamente à qualidade dos princípios ativos, esta depende do controlo das suas impurezas, sendo necessário um conhecimento profundo do API pretendido, suas impurezas e respetivo processo de fabrico [4].

Na história da empresa destaca-se o ano de 1987, dado que a Cipan nessa data contava já com a produção de 12 antibióticos, dos quais 8 eram produzidos por fermentação (Oxitetraciclina, Tetraciclina, Demedociclina, Eritromicina, Penicilina, Gentamicina e Lincomicina) e os outros 4 antibióticos eram produzidos recorrendo à semi-síntese (Amoxilina, Ampicila, Cetalosporinas, Minociclina para além dos produtos intermediários como o 6-APA e 7-ADCA) [1].

A empresa Cipan e os seus produtos a partir do ano de 1965 passaram a ser submetidos a aprovação pela autoridade dos E.U.A. FDA (Food & Drug Association), uma vez que a maioria das vendas da Cipan são para o estrangeiro, nomeadamente para o continente americano. As instalações da empresa possuem um certificado de conformidade com as boas práticas de fabrico (GMPs), o qual foi emitido pela Autoridade Nacional Portuguesa (INFARMED) e, além disso, tem também uma licença industrial atribuída pelo governo português para a produção de produtos farmacêuticos ativos [4].

A Cipan foca-se essencialmente na valorização do atual portefólio de produtos, ou seja, o grupo das tetraciclinas. Outra missão centra-se no desenvolvimento de uma nova área de negócio, aproveitando o seu vasto conhecimento em processos fermentativos e na produção de produtos semissintéticos, e das suas infraestruturas. Assim, a empresa tem como principal objetivo posicionar-se como entidade prestadora de serviços, nas áreas de investigação e produção por contrato – “Contract Research and Manufacturing – CRAM’s” [5].

## 1.3. TETRACICLINAS

As tetraciclinas pertencem a um grupo de antibióticos, originalmente obtidas por fermentação de algumas estirpes da família das *Streptomyces*, possuindo o mesmo núcleo tetracíclico do naftaleno e propriedades terapêuticas similares. Uma característica das tetraciclinas é o largo espetro de

atividade que todas possuem, o qual engloba bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, clamídias e clamífilas, nickettsias, microplasma, espiroquetas, algumas micobactérias e alguns protozoários. Estes compostos encontram-se disponíveis no mercado para o tratamento de uma série de infecções bacterianas, no entanto não são os agentes antibacterianos escolhidos no tratamento de infecções provocadas por bactérias gram-positivas e gram-negativas devido ao rápido aparecimento de organismos resistentes e porque foram descobertas substâncias com espectro de atividade antimicrobiana mais estreito [4,6].

As tetraciclina são essencialmente usadas para o tratamento de infecções respiratórias, destacando-se a bronquite, gripe, pneumonia, feridas e brucelose. A sua estrutura química, ilustrada na Figura 1.2, é formada por quatro anéis aromáticos que contribuem para a sua denominação de tetraciclina ou tetraceno [6-7].

Benjamin Duggar, em 1945, descobriu o primeiro membro da família das tetraciclina, a Clortetraciclina que é um produto da fermentação natural de uma bactéria do solo. Entre os anos de 1950 e 1970 as tetraciclina encontravam-se entre os antibióticos mais usados nos Estados Unidos uma vez que nesse período foram descobertos outros membros da família das tetraciclina. Relativamente à história e classificação das tetraciclina, estas encontram-se distribuídas entre três gerações. Do grupo das tetraciclina de primeira geração fazem parte a Tetraciclina, Demeclociclina, Rolitetraciclina, Penimepíclina, Metaciclina, Limiciclina, Lauraciclina. As tetraciclina de segunda geração caracterizam-se pela sua lipossibilidade e atividade prolongada e, deste grupo fazem parte a Doxiciclina e a Minociclina. A Minociclina foi descoberta no ano de 1972. Por fim, existem as tetraciclina de terceira geração, onde se incorporam as Glicilclina que passaram a ser sintetizadas a partir do ano de 1993. As Glicilclina são considerados produtos semissintéticos muito semelhantes às tetraciclina e têm como vantagem o facto de serem ativos contra diversas bactérias resistentes às tetraciclina e a outro tipo de antibióticos [6].

Ao longo dos anos as tetraciclina têm sofrido um uso abusivo devido às suas inúmeras e benéficas propriedades, nomeadamente o amplo espectro de ação, a sua baixa toxicidade, o baixo custo e o facto de serem maioritariamente administradas por via oral. Este acontecimento tem provocado resistência num grupo diversificado de bactérias, destacando-se as tetraciclina de primeira geração. Apesar das restrições na utilidade clínica destes compostos, as tetraciclina representam uma enorme importância no uso clínico e, para além do seu uso em humanos são também utilizadas na terapia animal para o tratamento de infecções e promoção do crescimento. De forma a contornar o problema têm-se impulsionado estudos centralizados no desenvolvimento de novos membros da família das tetraciclina [6].

As tetraciclina são geralmente bacteriostáticas nas concentrações atingidas no organismo, ao contrário das penicilinas e aminoglicosídeos, tornando-as importantes no tratamento de doentes alérgicos à penicilina com doenças venéreas, actinomicoses, bronquites e leptospiroses [4].

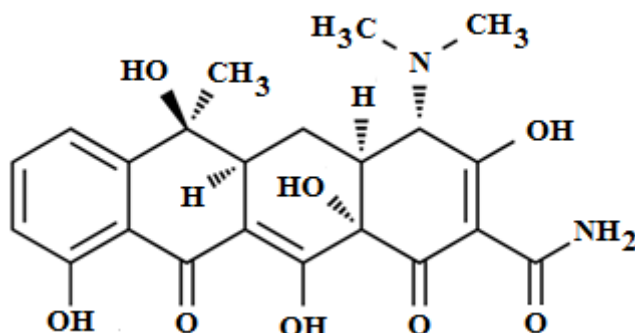


Figura 1.2- Estrutura Tetraciclina (TC) [7].

#### 1.4. CLASSIFICAÇÃO DE IMPUREZAS

O estudo de uma nova substância farmacológica é um processo altamente complexo, de longa duração e que tem elevados custos associados. O processo de desenvolvimento da nova substância ativa tem como principal preocupação proporcionar matérias-primas com elevado grau de pureza. Na realidade, tal facto não é possível, pois muitas vezes são encontradas impurezas juntamente com a substância ativa [8].

A Conferência Internacional de Harmonização (ICH) explica que uma impureza é um componente presente no fármaco cuja entidade química não é definida como a substância do medicamento e a sua presença afeta a pureza do produto ativo ou fármaco. Desta forma, qualquer material estranho presente na substância farmacológica é considerado uma impureza mesmo que seja inerte ou apresente propriedades farmacológicas superiores [9].

A natureza das impurezas produzidas depende essencialmente das condições das reações do produto de síntese e da estabilidade do produto final, influenciada pela temperatura, humidade, luz ou poder oxidante do meio envolvente [8].

O perfil das impurezas presentes em produtos farmacêuticos tem tido atenção redobrada por parte dos meios de comunicação devido à preocupação com a segurança dos fármacos. A produção de ingredientes ativos farmacêuticos (API) é feita recorrendo à síntese química orgânica, pelo que

ao longo do processo podem ser gerados diversos componentes, desde solventes residuais a quantidades vestigiais de componentes inorgânicos e orgânicos [9].

Intermediários/subprodutos, produtos de transformação, produtos de interação, produtos relacionados e produtos de degradação são algumas das fontes de impurezas que podem surgir no decorrer do processo de desenvolvimento de uma nova substância ativa. Durante a síntese do material desejado há o risco de se formarem intermediários que se encontram associados aos compostos produzidos entre as reações que não são planejadas previamente, podendo não ser possível identificar todos os subprodutos formados no processo. Os produtos transformados são semelhantes aos subprodutos e os produtos de interação podem surgir entre os vários produtos químicos envolvidos no processo, intencionalmente ou não. No caso de se formarem produtos cuja estrutura química é semelhante e apresentam uma atividade biológica potencialmente similar são intitulados de produtos relacionados. Os produtos de degradação resultam essencialmente da decomposição do ingrediente ativo farmacêutico (API) [9].

Segundo o documento ICH Q3A(R2) onde estão descritas orientações relativas a impurezas em novos fármacos, as impurezas encontram-se divididas em três categorias: impurezas orgânicas (API e processo), impurezas inorgânicas e solventes residuais [10].

As **impurezas orgânicas** podem surgir durante o processo e/ou armazenamento do API (ingredientes farmacêuticos ativos). Este tipo de impurezas podem ser identificados ou não identificados, voláteis ou não voláteis. A quantidade da impureza orgânica deve ser analisada, tanto para impurezas conhecidas como para impurezas desconhecidas, devendo estar num limite controlado e inferior ao que se encontra estabelecido. Desta categoria de impurezas fazem parte matérias-primas, subprodutos, intermediários, produtos de degradação, reagentes e catalisadores. O perfil de impurezas dos lotes de fármacos com destino à comercialização devem ser alvo de estudo, sendo comparados com os dos utilizados em desenvolvimento, e qualquer alteração encontrada deve ser discutida. Assim, qualquer impureza presente no fármaco, produzido através do processo comercial proposto, numa quantidade superior (>) ao limite de identificação deve ser identificada. Quando em condições de armazenamento recomendadas são encontrados produtos de degradação em quantidades superiores ao limite de identificação, recorrendo a estudos de estabilidade torna-se também necessário proceder à sua identificação. Regra geral, quando as impurezas são encontradas no fármaco em quantidades não superiores ao limite de identificação não é necessário fazer a sua identificação. No entanto, existem exceções à regra, sendo por essa razão necessário desenvolver procedimentos de análise para o caso em que a quantidade de impurezas presente no fármaco não é superior aos limites de identificação, uma vez que a esses níveis constituem efeitos tóxicos ou farmacológicos [10].

Durante o processo de fabrico podem resultar **impurezas inorgânicas**, as quais são maioritariamente conhecidas e identificadas. Este tipo de impurezas incluem reagentes, catalisadores, metais pesados ou outros metais residuais, sais inorgânicos e, por exemplo, materiais auxiliares de filtração [10].

Os **solventes residuais** são líquidos orgânicos ou inorgânicos usados como intermediários na preparação de soluções ou suspensões na síntese de uma nova substância farmacológica. Dado que a toxicidade destes solventes é conhecida, a escolha dos controlos a utilizar é facilmente alcançada. O controlo destes solventes quando utilizados no processo de fabrico de uma substância nova deve ser feito de acordo com as regras apresentadas no documento ICH Q3C [10].

Cada tipo de impureza tem um limite associado tendo em conta considerações de natureza toxicológica. No caso de impurezas orgânicas o processo de atribuição dos limites máximos torna-se complexo, uma vez que depende do desempenho do processo sintético relativamente à pureza da substância ativa e também das características de toxicidade das impurezas em estudo. Segundo o ICH existem diferentes formas de qualificar uma impureza, sendo este um processo que tem como principal objetivo avaliar um conjunto de dados de forma a estabelecer a segurança biológica de determinada impureza. O assunto da qualificação de impurezas será abordado mais detalhadamente na secção 1.5 [10].

A formação de impurezas em genéricos é um caso especial e pode ocorrer através das mesmas vias do fármaco de referência: materiais de partida, subprodutos e solventes residuais formados pela síntese de API; produtos de degradação formados durante o armazenamento e processo de longa duração; contaminantes de componentes de embalagens e outros medicamentos produzidos na mesma instalação. A identificação, quantificação e controle das impurezas constituem um papel importante do desenvolvimento do fármaco e da sua avaliação regulamentar [9].

## **1.5. QUALIFICAÇÃO DE IMPUREZAS**

O documento normativo ICH através das orientações presentes na diretriz Q3A\_R2 refere que a qualificação de uma impureza é um processo de aquisição e avaliação de dados que permite estabelecer a segurança biológica de uma impureza ou de um determinado perfil de impureza relativamente a um nível especificado [10].

Quando se está perante uma situação em que há evidência de que determinada impureza existente num fármaco tem provocado reações adversas nos pacientes, a qualificação de impurezas torna-se num aspeto bastante importante e, neste caso um limite de qualificação inferior pode ser apropriado. Relativamente ao limite superior de qualificação, este pode ser apropriado para os fármacos quando o nível de preocupação com a segurança é menor do que o normal tendo por base considerações semelhantes, por exemplo estudando a população de doentes [10].

Quando uma nova impureza é observada depois da fase de desenvolvimento do fármaco, esta deve ser identificada se o seu nível for superior (>) ao limite de identificação atribuído (Figura 1.3). A qualificação da impureza deve ser feita também quando o seu nível é superior ao limite de qualificação representado na Figura 1.3 [10].

A “Árvore de Decisão de Identificação e Qualificação” de Impurezas, representada na Figura 1.4, descreve as considerações feitas para a qualificação de impurezas quando os limites estabelecidos são ultrapassados. Na qualificação de uma impureza, os estudos considerados apropriados dependem de uma série de fatores, incluindo a população de doentes, a dose diária permitida e a via e duração da administração do medicamento. Normalmente, os estudos são realizados relativamente ao novo fármaco que contem as impurezas a serem controladas. No entanto, os estudos utilizando as impurezas isoladamente podem ser, por vezes, mais apropriados [10].

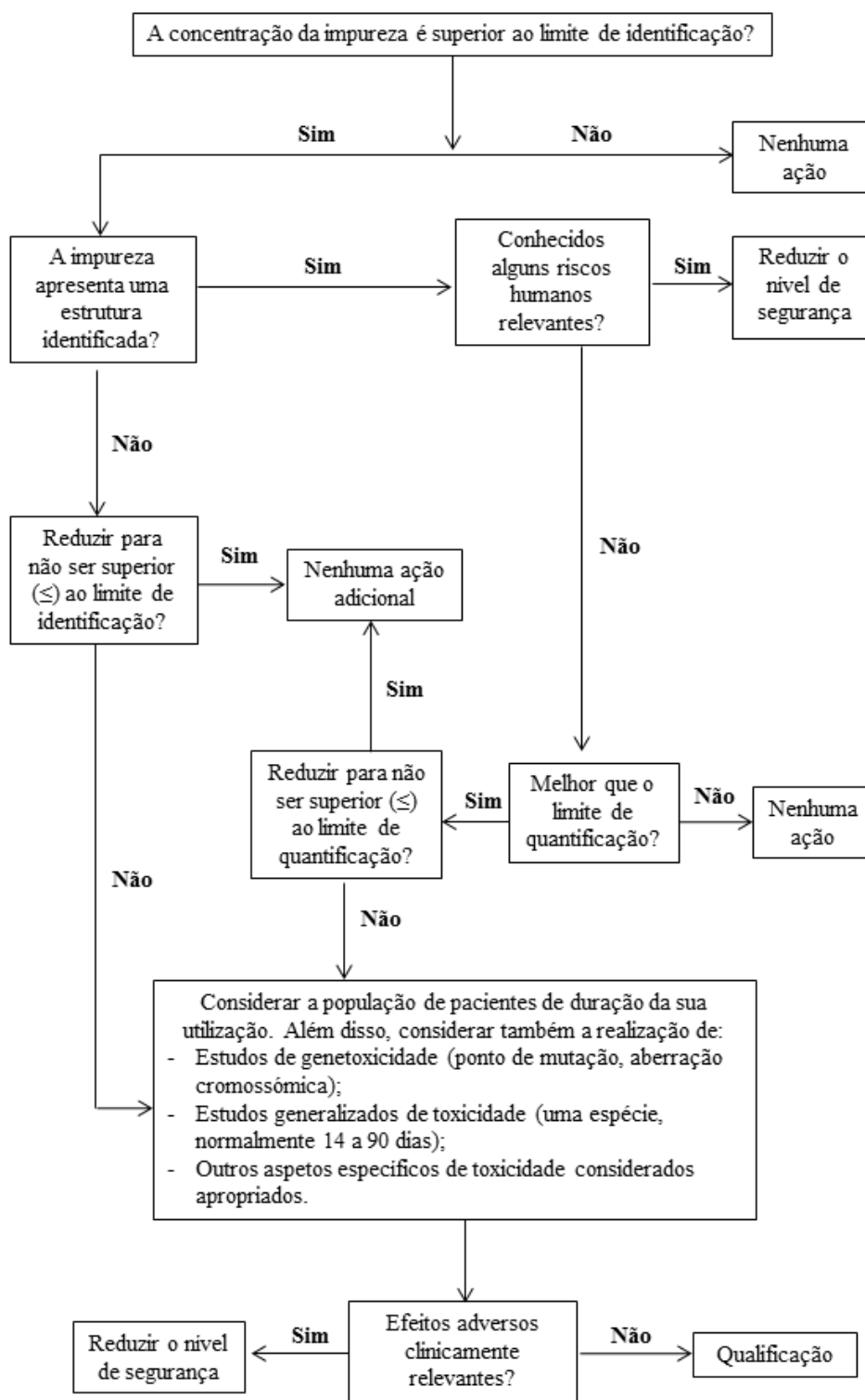
<b>Dose Diária Máxima<sup>1</sup></b>	<b>Limite de Corte<sup>2,3</sup></b>	<b>Limite de Identificação<sup>3</sup></b>	<b>Limite de Quantificação<sup>3</sup></b>
≤ 2g/dia	0.05%	0.10% ou 1.0mg/ dia (o que for menor)	0.15% ou 1.0mg/dia (o que for menor)
> 2g/dia	0.03%	0.05%	0.05%

**Figura 1.3** – Limites associados às impurezas

<sup>1</sup> Quantidade de fármaco administrada por dia

<sup>2</sup> Limites de notificação mais elevados devem ser justificados cientificamente

<sup>3</sup> Limites mais baixos podem ser apropriados no caso da impureza for exceccionalmente tóxica



**Figura 1.4** - Árvore de decisão e qualificação de impurezas, (adaptado [10]).

## 1.6. DOCUMENTAÇÃO

As Farmacopeias são livros legais que procuram acompanhar a evolução científica e tecnológica dos conhecimentos que dizem respeito aos medicamentos, garantindo a atualização da qualidade dos mesmos.

A farmacopeia dos Estados Unidos, USP, encontra-se dividida em três capítulos gerais, a qual incorpora requisitos específicos para impurezas em monografias. As farmacopeias podem sofrer alterações à medida que novas informações vão sendo descobertas e ficando disponíveis. Nestas monografias encontram-se descritos claramente conceitos e definições, no entanto com uma terminologia relativamente diferente da presente no documento normativo ICH.

Pela literatura e até ao momento, sabe-se que é obrigatório um dos três tipos de testes em produtos químicos farmacêuticos:

- Um teste de pureza cromatográfica acoplado com um ensaio não específico;
- Um método de pureza cromatográfica indicando que também serve como um ensaio.
- Um teste específico e limites para identificar as impurezas, sendo um procedimento que requer padrões de referência para as impurezas.

A Comissão Europeia decidiu que os princípios e terminologias de revisão do documento ICH Q3A deverá ser implementado nas monografias relativas a substâncias ativas novas e já publicadas da Farmacopeia Europeia (EP). Assim, um novo capítulo geral sobre o controlo de impurezas de substâncias farmacêuticas foi introduzido na quinta edição da Farmacopeia Europeia, enquanto uma revisão da monografia intitulada “Substâncias para uso farmacêutico” também tem sido feita [11].

De acordo com a política da Farmacopeia Europeia o controlo das impurezas relevantes em substâncias de drogas sintéticas é frequentemente monitorizado através do teste de substâncias relacionadas. Atualmente trata-se de um teste de limite, ou seja, comparação das áreas dos picos que progressivamente irá sofrer alteração até ser possível utilizar um critério de aceitação quantitativa.

## 1.7. CROMATOGRAFIA

A cromatografia teve a sua origem no termo grego “*chroma+graphein*” e ganhou a sua importância como método de separação por volta do ano de 1903. Esta técnica foi descoberta pelo russo botânico Mikhail Semenovich Tswett (Figura 1.5) depois de inúmeros trabalhos experimentais desenvolvidos no domínio da separação de pigmentos corados de plantas com uma coluna de vidro contendo carbonato de cálcio. Os diversos compostos apareciam como bandas coradas na coluna resultado da adsorção diferencial dos pigmentos corados que fluem com



**Figura 1.5** – Botânico Mikhail Semenovich Tswett [12].

velocidades diferentes e emergem separadamente da coluna. Apesar do desenvolvimento de inúmeros estudos semelhantes, o russo Mikhail Tswett foi o primeiro a compreender e interpretar o processo como é conhecido e aceite na atualidade, denominando por cromatografia as zonas coloridas que se moviam ao longo da coluna [12-13]

Segundo a International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) a cromatografia é definida como uma técnica utilizada na separação dos componentes de uma amostra e tem como objetivo a análise quantitativa dos componentes individuais presentes na amostra, os quais se distribuem entre duas fases, uma estacionária e outra móvel. A fase móvel é um fluido e a fase estacionária (sólida ou líquida) caracteriza-se por uma grande área superficial. A separação ocorre pelo facto de existirem diferentes velocidades de migração dos diversos componentes da amostra, consequência da deslocação desses componentes ao longo da fase estacionária pelo caudal da fase móvel [14].

Tendo em conta a natureza da fase móvel impregnada, podem-se destacar três tipos de cromatografia: cromatografia líquida (LC) no caso da fase móvel se encontrar no estado líquido; cromatografia gasosa (GC) quando a fase móvel é um gás; cromatografia supercrítica (SFC) que se caracteriza pela utilização de um fluido supercrítico como fase móvel [14].

### 1.7.1. Mecanismos de Separação

Em menos de trinta anos, a separação recorrendo à técnica da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência passou a ser um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos, devido à sua elevada adaptabilidade para determinações quantitativas com boa

sensibilidade, à capacidade que apresenta em separar espécies não voláteis e termicamente instáveis, destacando a indústria farmacêutica. A separação através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência pode ocorrer por diferentes mecanismos: partição, absorção, troca iônica, fase ligada ou por exclusão [15].

### **Cromatografia líquido-líquido ou Cromatografia por partição**

Em 1941, Martin e Synge desenvolveram um trabalho importante no qual descreveram um novo mecanismo de separação, a cromatografia por partição, também denominada por cromatografia líquido-líquido, utilizando como fase estacionária água em sílica e como fase móvel clorofórmio [16]. A finalidade do estudo desenvolvido por estes dois jovens bioquímicos era obter a separação de aminoácidos encontrados após a hidrólise das proteínas. O método consiste essencialmente na combinação de uma fase estacionária líquida e uma fase móvel de igual forma líquida que percorre sobre a fase estacionária, sendo uma polar e outra apolar. A fase estacionária através do processo de adsorção física fica retida na superfície da coluna que geralmente é empacotada com sílica [17-19].

A cromatografia líquido-líquido pode ser dividida em duas categorias, de acordo com a polaridade das fases estacionária e móvel. No caso da cromatografia líquido-líquido normal, a fase estacionária é polar e a fase móvel apolar. O contrário acontece na cromatografia líquido-líquido com fase reversa, onde a fase estacionária é apolar e a fase móvel polar. A cromatografia com fase normal utiliza como fase estacionária por exemplo a água e glicóis (etileno, dietileno) e como fase móvel, o hexano e éter isopropílico. Relativamente à cromatografia com fase reversa, esta utiliza como fase estacionária por exemplo cadeia C8 (-octil) e cadeia C18 (-octildecil) e como fase móvel, soluções aquosas de metanol e acetonitrilo [20].

Na cromatografia líquido-líquido, a solubilidade da fase estacionária na fase móvel pode ocasionalmente condicionar a reprodutibilidade nas separações repetitivas tendo como consequência a deterioração da coluna. Assim, com o intuito de solucionar o problema da perda da fase estacionária registado na cromatografia líquido-líquido, atualmente predominam métodos de cromatografia com fase ligada devido à sua maior estabilidade. Neste processo a fase estacionária surge quimicamente ligada à superfície de um suporte solucionando desta forma o problema da solubilidade da fase estacionária na fase móvel [21].

### **Cromatografia líquido-sólido ou Cromatografia por adsorção**

A cromatografia líquido-sólido, também denominada cromatografia por adsorção, teve a sua origem no século XX por Tsweet e, atualmente representa a forma mais clássica da cromatografia líquida, sendo considerada uma das mais importantes técnicas de separação dos métodos de HPLC devida às adaptações que sofreu. Este método de cromatografia caracteriza-se pela competição entre as moléculas do solvente e do soluto pelos sítios ativos do adsorvente na fase estacionária, sendo que a competição está relacionada com a interação existente entre os grupos funcionais das partículas do suporte da fase estacionária e os grupos polares das moléculas do soluto [19,21].

Neste método de cromatografia a fase estacionária mais usada é a sílica e a alumina, uma vez que se tratam de sólidos ativos com grande área superficial. No entanto, adsorventes muito ativos podem provocar adsorção irreversível do soluto e, como a sílica é ligeiramente ácida pode adsorver fortemente solutos básicos e o uso da alumina deve ser evitado em cromatografia de compostos sensíveis a bases uma vez que se trata de um adsorvente básico. Assim sendo a sílica é o adsorvente preferido para a maioria das aplicações uma vez que tem a capacidade de abranger uma grande escala de compostos. Relativamente à escolha do solvente que é de extrema importância dado que o solvente irá competir com o soluto pelos sítios de adsorção na fase estacionária e, quanto maior for a interação da fase móvel com a estacionária, menor será a adsorção do soluto [19,21].

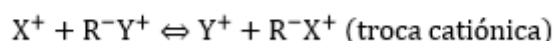
### **Cromatografia por troca iónica**

A industrialização da cromatografia por troca iónica registou-se no ano de 1970, onde se descobriu que o problema de misturas de aniões ou catiões pode ser resolvido recorrendo a colunas de HPLC empacotadas com resinas de permuta aniónica ou catiónica. Nesses estudos, a deteção foi realizada essencialmente com medições de condutividade, não sendo muito fiável devido às elevadas concentrações de eletrólitos presentes na fase móvel. Esta técnica caracteriza-se pela interação eletrostática entre o soluto e a fase estacionária, com o objetivo de se atingir o equilíbrio de troca entre iões que estejam em solução e iões com o mesmo sinal e presentes na superfície de um sólido, o qual deve ser caracteristicamente insolúvel e de elevado peso molecular. A cromatografia por troca iónica pertence ao ramo da cromatografia líquida e, semelhante a esta, é recomendado o uso de uma fase móvel líquida, uma coluna e um detetor capaz de medir as espécies eluídas a partir da coluna [19,21]

Neste método de separação, a fase estacionária normalmente utilizada é uma resina de poliestireno envolvida com divinilbenzeno, à qual são ligados os grupos iónicos. A natureza da fase estacionária utilizada determina o tipo de trocas, ou seja, catiónica ou aniónica. Relativamente às

trocas catiónicas, esta é caracterizada pelo facto das resinas possuírem sítios ativos negativos e contra-íões carregados positivamente, permitindo que os catiões da resina sejam tocados pelos catiões da amostra. Nas trocas aniónicas acontece precisamente o contrário, ou seja, os centros ativos da resina estão carregados positivamente e os contra-íões negativamente permitindo desta forma a sua troca com a fase móvel [19,21].

Na Figura 1.6 encontram-se representados os esquemas das trocas iónicas (catiónicas e aniónicas).



**Figura 1.6** - Esquema das diferentes trocas iónicas da cromatografia por troca iónica

### **Cromatografia por exclusão**

Este método é geralmente utilizado para a separação de componentes de elevado peso molecular e baseia-se numa separação de acordo com o tamanho das moléculas. As moléculas mais pequenas penetram nos poros da fase estacionária, ao contrário das moléculas maiores que não conseguem penetrar nos poros da fase estacionária e por isso são carregadas pela fase móvel, apresentando desta forma menor tempo de retenção (volume da fase móvel necessário para eluir um determinado soluto da coluna). As moléculas pequenas passam efetivamente em grande volume, fazendo com que as moléculas grandes sejam eluídas primeiro, sendo desta forma uma técnica usada na bioquímica e na química de polímeros para a purificação de macromoléculas [19].

A cromatografia por exclusão subdivide-se em cromatografia por filtração em gel utilizada na separação de espécies solúveis em água caracterizando-se pelo uso de fase estacionária hidrofílica, e em cromatografia com permeação sendo usados solventes orgânicos apolares e fases estacionárias hidrofóbicas. Desta forma, este método de separação permite a análise de substâncias polares e apolares, fazendo dele um método complementar [19,21].

A maior aplicação deste método centra-se no estudo de biomoléculas, sendo também utilizado na separação de compostos orgânicos e inorgânicos. Na cromatografia de exclusão o volume morto ou volume vazio corresponde ao volume da fase móvel na coluna fora da fase estacionária, sendo determinado através da passagem pela coluna de uma molécula inerte demasiado grande para conseguir entrar nos poros. Assim, as moléculas de tamanhos maiores que são excluídas da fase estacionária são eluídas no volume morto [19,21,24].

Com o objetivo de facilitar o empacotamento da coluna na cromatografia de exclusão molecular, este deve apresentar uma estrutura rígida, sendo geralmente utilizado para esse efeito, polímeros e partículas de sílica com diâmetro de 5 a 10  $\mu\text{m}$  [21].

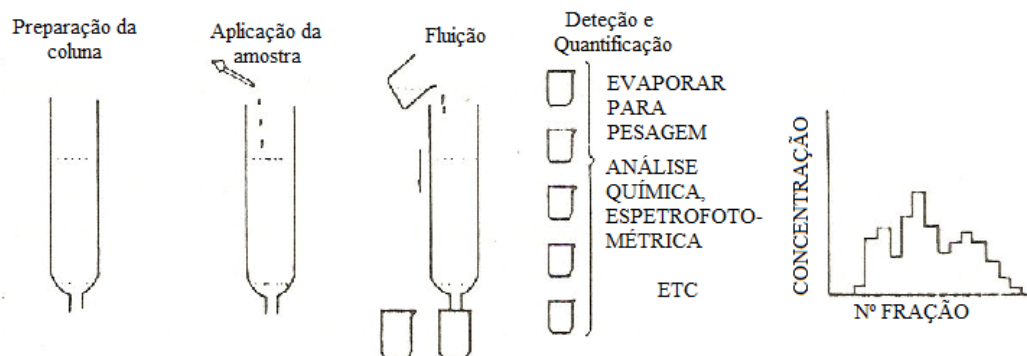
### **Comparação da Cromatografia Líquida Clássica (CLC) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)**

O equipamento utilizado na cromatografia líquida clássica é de baixo custo económico e o empacotamento da coluna cromatográfica é descartável, ou seja, a coluna deve-se encher em cada separação. Esta característica deve-se ao facto de parte da amostra poder ser adsorvida de forma irreversível. É de salientar o elevado desperdício de material e também de mão-de-obra subjacentes a este tipo de cromatografia. Neste método cromatográfico a eluição é feita através da acção da gravidade e, a quantificação e deteção são feitas analisando as frações individuais manualmente, o que torna o processo bastante demorado dado o elevado número de frações colhidas. A espectrofotometria, análise química ou registo gravimétrico são técnicas que podem auxiliar este processo, pelo que os resultados são expressos num cromatograma que se caracteriza por ser um gráfico da concentração da amostra em estudo em função do número da fração [25].

A principal diferença entre a cromatografia líquida clássica e a cromatografia líquida de alta eficiência é o facto desta última se caracterizar por um circuito fechado, sendo um método vantajoso porque permite a sua utilização inúmeras vezes. Na cromatografia líquida de alta eficiência é necessário ter um sistema de bombas de alta pressão, uma vez que, apesar da elevada eficiência das colunas cromatográficas, estas oferecem resistência ao escoamento da fase móvel. Este sistema de bombas contribui para o aumento da velocidade de eluição, tornando-se este método de separação mais utilizado do que CLC [25].

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) caracteriza-se pela precisão que apresenta das suas análises, quando comparadas com as análises feitas recorrendo ao método CLC, uma vez que o escoamento da fase móvel neste método é controlado de forma mais simplificada e rigorosa. Além disso, o método de HPLC é ainda vantajoso devido ao facto de não necessitar que os seus operadores sejam dotados de elevada experiência, sendo um método que apresenta elevada resolução, sensibilidade e reprodutibilidade. No entanto, apresenta a desvantagem relativamente aos seus equipamentos, ou seja, o sistema necessita de equipamentos caros, cuja manutenção e operação são igualmente de elevado custo monetário [25].

Na Figura 1.7 encontram-se ilustradas as várias etapas que constituem o processo da cromatografia líquida clássica (CLC) e na Figura 1.8 apresenta-se um esquema das etapas do procedimento do método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).



**Figura 1.7** – Etapas da Cromatografia Líquida Clássica (adaptado [25]).

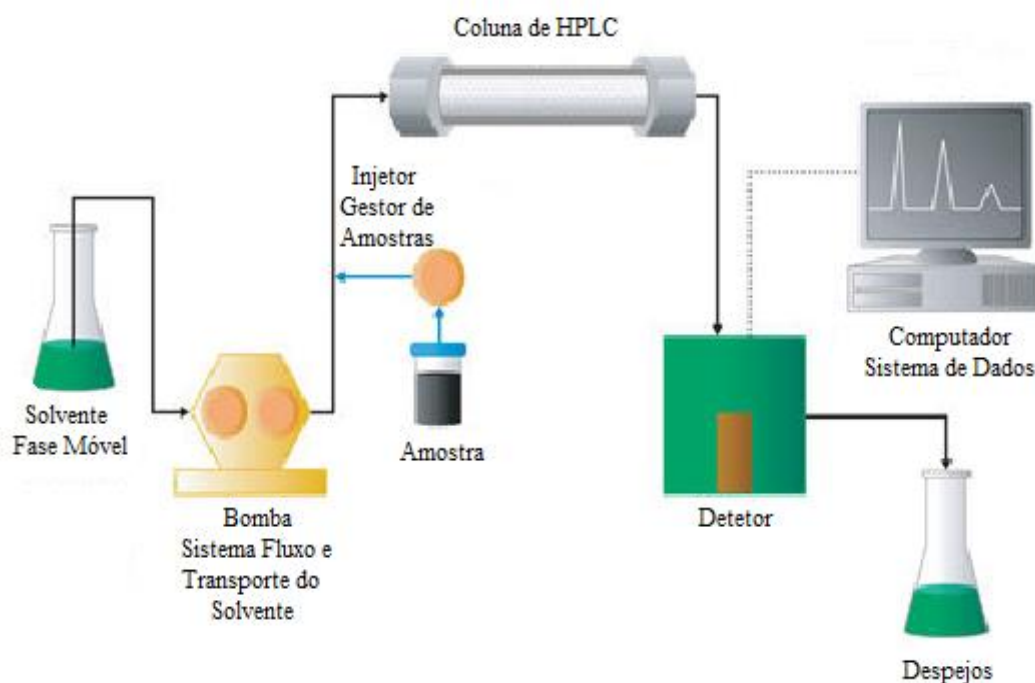


**Figura 1.8** – Etapas da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (adaptado 25)].

### **Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, HPLC**

No projeto em estudo a técnica de separação utilizada para o seu desenvolvimento é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e, por essa razão, a descrição pormenorizada da técnica focará essencialmente as características da cromatografia líquida e como complemento da informação apresenta-se um diagrama do equipamento em questão, Figura 1.9. A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) apresenta como vantagens o seu tempo reduzido de análise, o facto da fase estacionária poder ser usada inúmeras vezes, a sua alta resolução e detetabilidade e, ainda, a capacidade de fornecer uma análise qualitativa e quantitativa. No entanto, existem algumas limitações à técnica, das quais se destacam a inexistência de um detetor universal

sensível, a necessidade de experiência para o seu manuseamento e o elevado custo relativo à instrumentação, manutenção e operação [26].



**Figura 1.9** - Diagrama detalhado de um HPLC [27].

Na técnica de HPLC normalmente utilizam-se bombas recíprocas preferencialmente com dois pistões com o objetivo de minimizar a pulsação. A bomba tem como principal função conduzir a fase móvel desde o reservatório até à coluna cromatográfica, a qual pode ser responsável por um bombeamento isocrático ou bombeamento por gradiente. O bombeamento isocrático é utilizado no processo de validação em estudo, uma vez que a fase móvel se mantém constante ao longo de todo o processo cromatográfico e, neste caso é apenas necessário o uso de uma bomba. No entanto, algumas análises são realizadas recorrendo a variação da composição da fase móvel, sem alteração do escoamento total, tendo como principal objetivo o encurtamento do tempo de análise e melhoramento da separação dos componentes da amostra. Este tipo de bombeamento, o qual se denomina por bombeamento por gradiente, pode ser realizado a baixa ou alta pressão. No caso de bombeamento por gradiente de baixa pressão, onde apenas é usada uma bomba, a escolha do solvente a ser utilizado é feita através de válvula de múltiplas vias controladas pelo *software* do sistema. No bombeamento por gradiente de alta pressão, cada solvente possui uma bomba específica [28].

Na cromatografia líquida a amostra é injetada na coluna com a ajuda de uma micro-seringa ou uma válvula de injeção e é homogênea distribuída no topo da coluna. A fase móvel que transporta a amostra percola a coluna, consequência de uma ação externa que pode ser a força da gravidade denominando-se por cromatografia de baixa pressão ou uma força mais intensa gerada por uma bomba, a chamada cromatografia de alta pressão de forma a superar a resistência da coluna ao escoamento da fase móvel. No processo de percolação os componentes migram com velocidades distintas e são identificados à saída da coluna num detetor, o qual fornece um registo contínuo da composição da amostra em análise, denominado por cromatograma. A fase móvel deve ser filtrada antes de se proceder ao seu armazenamento no reservatório, retirando as partículas existentes e, desta forma evitando danos na bomba, injetor e coluna. Outro fator a ter em conta é a desgaseificação da fase móvel para evitar a formação de bolhas no processo de separação o que pode interferir no desempenho analítico. A técnica de desgaseificação é feita recorrendo por exemplo a ultrassom, refluxo com resistência de aquecimento, vácuo ou purga com hélio [29].

Os detetores mais utilizados na cromatografia líquida de alta eficiência são os detetores de ultra violeta (UV), os de índice de refração, os de fluorescência que são sensíveis a espécies que fluorescem e os eletroquímicos. A sensibilidade, versatilidade e baixo custo dos detetores de ultra violeta faz destes os mais utilizados para este método de cromatografia, HPLC. A deteção neste tipo de detetores depende essencialmente da presença de um grupo cromóforo. Os detetores fotométricos apresentam uma eficiente capacidade para ser possível alcançar bons resultados com todos os compostos que absorvem luz no comprimento de onde em que ele funciona [29].

Os detetores de fluorescência utilizados como método de deteção específica têm a capacidade de detetar quantidades na ordem dos picogramas. Os detetores por índice de refração acompanham continuamente a diferença detetada no índice de refração entre a fase móvel pura e o efluente que sai da coluna, o qual contém os componentes da amostra. Este tipo de detetor fornece uma resposta moderada, geralmente na ordem dos microgramas. Os detetores eletroquímicos são usados numa série de análises, devido à sua capacidade por uma deteção sensível e extremamente seletiva. Este tipo de detetores apresentam uma forte gama de aplicabilidade pois conseguem detetar inúmeros grupos funcionais, como por exemplo: hidrocarbonetos, ésteres, aldeídos, aminas, halogénicos, entre outros. O seu princípio de deteção baseia-se na oxidação ou redução da substância que se pretende analisar na superfície do eléctrodo de trabalho. Consequentemente produz-se uma corrente proporcional à concentração da substância a analisar ao passar pela célula de deteção, proveniente do ganho ou perda de eletrões resultante da redução ou oxidação da mesma [29].

**Tabela 1.1** - Comparação dos diferentes tipos de detetores usados em HPLC [30]

	<b>Tipos de Detetores</b>			
	<b>Índice de Refração</b>	<b>Espetrofotométricos UV-VIS</b>	<b>Fluorescência</b>	<b>Eletroquímica</b>
<b>Princípio de operação</b>	Mudança do IR da fase móvel	Absorvância de luz UV-VIS	Excitação com luz produz emissão fluorescente	Oxidação ou redução num potencial fixo
<b>Tipo</b>	Universal	Seletivo	Seletivo	Seletivo
<b>Quantidade mínima detetável</b>	Nanograma	Nanograma	< picograma	Fentograma
<b>Volume da cela (micrólito)</b>	3 - 15	1 - 20	8 - 25	5 - 10
<b>Sensibilidade a temperatura</b>	Alta	Baixa	Baixa	Média
<b>Aplicações</b>	Geral	Compostos eu absorvem na região UV-Vis	Compostos ou derivados que fluorescem	Espécies que oxidam ou reduzem

Uma coluna cromatográfica de enchimento é constituída de um modo geral por um tubo de material quimicamente inerte, no qual se encontram partículas porosas esféricas dispostas uniformemente de forma a que os espaços vazios entre elas sejam mínimos. A fase móvel ocupa os espaços intersticiais entre as partículas e deve ser um solvente que respeite algumas características, sendo a principal o facto de ter a capacidade de dissolver a amostra sem qualquer interação química entre ambas. O enchimento da coluna cromatográfica, fase estacionária, tem a capacidade de suportar pressões que em HPLC podem atingir valores superiores a 350 bar [31]. Quando a fase estacionária é mais polar que a fase móvel a cromatografia assume o conceito de cromatografia de fase normal, onde os principais adsorventes usados são a sílica e a alumina. Pelo contrário, ou seja, quando a fase estacionária é menos polar que o solvente, a cromatografia denomina-se por cromatografia de fase reversa, onde os adsorventes mais usados são substâncias polares quimicamente ligadas, apresentando grupos funcionais cadeias com terminações do tipo ciano, diol, fenil, amino e os eluentes utilizados frequentemente são a água, o metanol e o acetonitrilo [31].

Para separar dois componentes é necessário que estes permaneçam retidos na coluna durante tempos diferentes. As moléculas do soluto que são transportadas pela fase móvel apresentam diferentes tempos de retenção, como consequência da afinidade com a fase estacionária. O tempo de retenção,  $t_r$ , corresponde ao tempo que decorre entre o momento da injeção até ao momento em que ocorre o máximo de concentração do pico eluído. A passagem do solvente pela coluna permite que os componentes que não possuem a capacidade de interagir com a coluna sejam eluídos nesse tempo, denominado por  $t_0$ . A resolução dos picos cromatográficos depende da seletividade e eficiência da coluna. A seletividade pode ser medida através da distância entre os máximos de dois picos, encontrando-se representada pela Equação 1.1, representada pela razão entre os fatores de retenção,  $k'$ , de dois solutos diferentes. Para garantir a separação dos compostos a seletividade,  $\alpha$ , deve apresentar um valor superior a 1 [31].

$$\alpha = \frac{k'(A)}{k'(B)} \quad (1.1)$$

O fator de retenção de um soluto,  $k'$ , pode ser calculado através do tempo de retenção ou volume de retenção, sendo que o caudal de eluente deve ser constante. A descrição do fator de retenção encontra-se representada pela Equação 1.2 onde,  $t_0$  e  $V_0$  correspondem ao tempo e volume de um composto que não foi possível reter.

$$k' = \frac{(t_r - t_0)}{t_0} = \frac{(V_r - V_0)}{V_0} \quad (1.2)$$

O volume de retenção,  $V_r$ , caracteriza-se pelo solvente necessário para eluir o soluto em causa. Na Equação 1.3 encontra-se representado o cálculo para o volume de retenção que se encontra relacionado com o tempo de retenção ( $t_r$ ), o volume da fase estacionária ( $V_s$ ) e o volume da fase móvel ( $V_m$ ) [31].

$$V_r = t_r \times f = V_m + (K \times V_s) \quad (1.3)$$

onde,  $f$  representa o caudal e  $K$  o coeficiente de partição do soluto entre a fase móvel e a fase estacionária [31].

A eficiência de uma coluna cromatográfica expressa-se pelo número total de pratos teóricos,  $N$ . A Equação 1.4 exprime o cálculo para o número de pratos teóricos, o qual tem em conta o tempo de retenção ( $t_r$ ) e o desvio padrão do pico Gaussiano ( $\sigma$ ) [31].

$$N = \left(\frac{t_r}{\sigma}\right)^2 \quad (1.4)$$

Para o cálculo do parâmetro da resolução,  $R_s$ , ilustrado pela Equação 1.5, consideram-se as larguras da base dos picos de dois componentes ( $W^A$  e  $W^B$ ) e os respectivos tempos de retenção ( $t_r^A$  e  $t_r^B$ ) [31].

$$R_s = \frac{2(t_r^A - t_r^B)}{W^A + W^B} = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right) \left(\frac{k_B}{1 + k_B}\right) \quad (1.5)$$

## 1.8. MÉTODOS ANALÍTICOS E SUA VALIDAÇÃO

A validação de um método analítico é um aspeto relevante na indústria farmacêutica, sendo um processo necessário durante o desenvolvimento e produção de um medicamento. O objetivo da validação de um método analítico é demonstrar que o método em questão é adequado para a utilização a que se destina, por exemplo, para a avaliação de impurezas. Assim sendo, a principal intenção da validação de métodos analíticos passa por proporcionar evidência científica de que o método nem estudo apresenta fiabilidade e consistência para que seja possível utilizá-lo em análises de rotina do analito [32].

O processo de validação caracteriza-se por diferentes estratégias, as quais se encontram expressas em artigos, protocolos e relatórios elaborados pelas comissões industriais e autoridades reguladores. No entanto, é importante existir um consenso mundial na validação de métodos analíticos utilizados na indústria farmacêutica e, isso foi possível depois da publicação das diretrizes da ICH [33].

A Conferência Internacional de Harmonização (ICH) regulamenta nas suas orientações que a validação de métodos analíticos é essencial no que respeita ao desenvolvimento e caracterização de fármacos. A validação de métodos analíticos passa pela identificação e quantificação de impurezas, tendo em conta diversos procedimentos, nomeadamente testes de identificação; testes quantitativos de impurezas; testes de limite quantitativo de impurezas e testes quantitativos da

fração ativa na amostra do fármaco no medicamento ou noutros componentes selecionados no fármaco [34].

Na validação de métodos analíticos são realizados testes a diferentes parâmetros, os quais se encontram apresentados na Tabela 1.2, onde o sinal (+) representa que a característica em causa é normalmente avaliada e, o sinal (-) representa que a característica não é normalmente avaliada. Assim, o conjunto de parâmetros essenciais para validar um método analítico varia consoante o tipo de procedimento analítico que se estuda [34-35].

A robustez, apesar de não estar integrada na Tabela 1.2, deve ser avaliada em alguns casos durante o desenvolvimento do método analítico [34].

**Tabela 1.2** – Características necessárias para validar os diferentes tipos de procedimento analítico, ICH 2005, (adaptado [34]).

Caraterísticas		Tipo de Procedimento Analítico			
		Identificação	Teste para Impurezas		Doseamento
			Quantitativo	Limite	
Precisão	Especificidade <sup>(1)</sup>	+	+	+	+
	Linearidade	-	+	-	+
	Gama de Trabalho	-	+	-	+
	Limite de Quantificação	-	+	-	-
	Limite de Detecção	-	- <sup>(2)</sup>	+	-
	Exatidão	-	+	-	+
	Repetibilidade	-	+	-	+
	Precisão Intermédia	-	+ <sup>(3)</sup>	-	+ <sup>(3)</sup>
	Reprodutibilidade	-	+	-	+

(1) a falta de especificidade de um procedimento analítico poderia ser compensada através de um outro procedimento analítico de apoio.

(2) pode ser necessária em alguns casos.

(3) nos casos em que a reprodutibilidade foi realizada, a precisão intermédia, não é necessária.

### 1.8.1. Especificidade/Seletividade

O conceito de especificidade é muitas vezes confundido na literatura com o termo seletividade. A especificidade define a capacidade que o método em análise possui para detetar o analito de interesse na presença de interferentes como produtos de degradação, a matriz da amostra ou

brancos. A seletividade diz respeito à capacidade do método para detetar substâncias, sendo que algumas organizações reguladoras assumem a especificidade como o último “grau da seletividade”. Quando na amostra existem compostos com estrutura química semelhante ao verdadeiro analito de interesse, o método deve ser capaz de diferenciar estes compostos, podendo ser necessário recorrer a mais processos de análise de forma a garantir o nível de especificidade pretendido [34].

### **1.8.2. Linearidade**

A linearidade de um procedimento analítico corresponde à capacidade do detetor fornecer respostas, dentro de um determinado intervalo, diretamente proporcionais à concentração do analito presente na amostra [34].

Segundo o ICH a gama de validação para o método da linearidade é estabelecida entre o limite de quantificação (LQ) e 120% do limite de especificação de determinado analito. No estudo deste parâmetro recomenda-se que a linearidade seja realizada através de diluições em série a partir da mesma solução mãe, uma vez que a preparação de soluções usando diferentes pesos de padrão introduz erros de pesagem na análise da linearidade da substância em análise [35].

Inicialmente deve ser feita uma calibração analítica nas condições pretendidas e na gama de trabalho que se pretende estudar. Para a análise da linearidade recorre-se à representação gráfica da área de cada pico (grandeza aleatória) em função da concentração (grandeza controlada), onde a qualidade da reta é dada pelo coeficiente de determinação,  $r^2$ . Caso se confirme a linearidade do método devem ser analisadas no mínimo cinco concentrações relativamente ao coeficiente de correlação da regressão, ordenada na origem e também à soma dos quadrados dos resíduos de forma a quantificar os resultados obtidos para o estudo da linearidade [34-37].

### **1.8.3. Limite de Quantificação (LQ) e Limite de Detecção (LD)**

O limite de quantificação (LQ) de um procedimento analítico corresponde à quantidade mais baixa de analito presente numa amostra que pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão. Este parâmetro é normalmente estudado para níveis relativamente baixos de compostos detetados na matriz das amostras e, em particular é utilizado para a determinação de impurezas e/ou produtos de degradação. O limite de deteção (LD) de um procedimento analítico diz respeito à menor quantidade de analito presente numa amostra que pode ser detetado mas não necessariamente quantificada [33].

Tal como está enunciado no ICH a determinação dos limites de quantificação e detecção pode ser feita recorrendo a diferentes abordagens, a qual é escolhida consoante se trate de um procedimento não instrumental ou instrumental [34].

Recorrendo à análise do desvio padrão, a qual se baseia no desvio padrão da resposta, através da equação 1.6 é possível determinar o limite de quantificação (LQ) e a equação 1.7 traduz o limite de detecção (LD).

$$LQ = \frac{10\sigma}{S} \quad (1.6)$$

$$LD = \frac{3.3\sigma}{S} \quad (1.7)$$

Onde:

$\sigma$  representa o desvio padrão da resposta e S o declive da curva de calibração da substância a ser analisada.

Uma avaliação visual permite de igual forma determinar o limite de quantificação e limite de detecção. Esta abordagem aplica-se, essencialmente, a métodos não instrumentais mas também pode ser aplicada a métodos instrumentais. Este parâmetro é determinado pela análise de amostras com diferentes concentrações de analito conhecidas, sendo estabelecido o nível mínimo em que é possível detetar o analito na amostra [34-36].

A abordagem da análise da razão Sinal/Ruído só pode ser aplicado exclusivamente a procedimentos analíticos que apresentem ruído na linha de base. A relação Sinal/Ruído é calculada por comparação entre o sinal obtido para a amostra do analito e o sinal da amostra do branco e, posteriormente calcula-se a respetiva concentração mínima a que o analito pode ser quantificado ou detetado. O parâmetro torna-se aceitável quando o limite de quantificação apresenta uma relação S/N de 10:1 ( $S/N \geq 10$ ) e o limite de detecção com uma relação S/N de 3:1 ( $S/N \geq 3$ ) [34-35].

Inerente aos cálculos os limites há sempre dois tipos de erros/riscos associados. O erro do tipo I (risco  $\alpha$ ) reflete a probabilidade de concluir a presença da substância a dosear quando a mesma não existe, denominado como o falso positivo. O erro do tipo II (risco  $\beta$ ) está associado à probabilidade de concluir a ausência da substância a dosear quando a mesma se encontra presente, denominado como o falso negativo [35].

#### **1.8.4. Exatidão**

A exatidão de um procedimento analítico é a aproximação dos resultados obtidos pelo método aplicado com os verdadeiros valores. A exatidão deve ser estabelecida em toda a gama de trabalho. No caso de análise quantitativa de impurezas, o parâmetro da exatidão deve ser avaliada em amostras inoculadas com quantidades conhecidas da impureza a ser analisada [34-35].

Os erros sistemáticos colocam em causa a veracidade do resultado experimental, ou seja é notório um afastamento do resultado quando comparativamente ao verdadeiro valor presente na amostra analisada. Segundo a literatura os erros sistemáticos podem ser classificados em três categorias diferentes: erros instrumentais, erros operativos e erros de método. Os erros instrumentais englobam os erros associados a calibrações do material e ainda às avarias parciais que podem ocorrer nos equipamentos. Os erros operativos estão relacionados com os erros dos analistas e, os erros de método geralmente estão associados à existência de reações secundárias durante o procedimento do método analítico [38-39].

#### **Testes de Recuperação**

O estudo da exatidão recorrendo a testes de recuperação desempenham um papel importante na gestão financeira de um laboratório, uma vez que não necessita de recorrer ao uso de materiais certificados, sendo utilizados apenas soluções de padrão e amostras. A dificuldade de encontrar materiais certificados com matrizes similares ao que se quer avaliar na realidade é uma característica que torna este teste vantajoso, uma vez que permite testar a resposta a partir da matriz da própria amostra em estudo.

A Equação 1.8 (função de recuperação) traduz a equação do polinómio de primeiro grau que melhor ajusta o gráfico que se obtém quando se representa a concentração recuperada ( $x_{rec}$ ) em função da concentração adicionada ( $x_{adc}$ ).

$$x_{rec} = a + b \times x_{adc} \quad (1.8)$$

#### **1.8.5. Precisão**

A precisão de um procedimento analítico expressa o grau de concordância que existe entre uma série de valores registados, os quais são preparados a partir de uma amostra homogénea sob condições prescritas. Caso a homogeneidade não seja possível são preparadas amostras a partir de uma solução de amostra [34-36].

O parâmetro da precisão é avaliado pelo desvio padrão absoluto ( $\sigma$ ) com um número significativo de medições. No entanto, o número de medições na validação de métodos analíticos é pequeno, uma vez que é apenas necessário o estudo de três concentrações diferentes dentro do intervalo de trabalho e, desta forma calcula-se a estimativa do desvio padrão absoluto (s). Parâmetros como o desvio padrão relativo (RSD) e o respetivo intervalo de confiança devem ser analisados para a avaliação da precisão do método analítico [34].

O estudo da precisão deve ser feito recorrendo a três níveis diferentes: repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade [34-35].

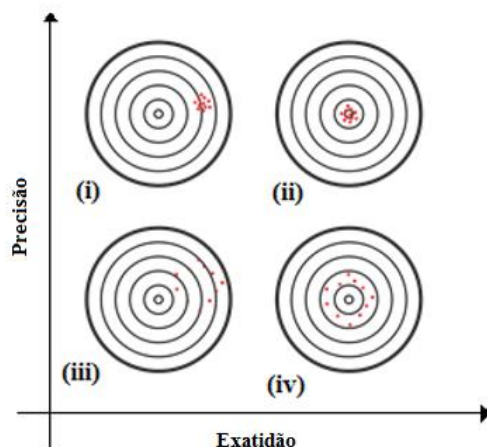
#### **1.8.5.1. Repetibilidade**

Relativamente à **repetibilidade**, esta corresponde a uma medida de precisão sob as mesmas condições de operação durante um longo intervalo de tempo. O ICH permite duas opções de ensaio para investigar a repetibilidade do procedimento. Um ensaio passa pela análise de, no mínimo, nove réplicas da mesma amostra dentro da gama especificada para o processo e a outra opção de ensaio diz respeito à análise de seis determinações a 100% da concentração de ensaio [34-36].

#### **1.8.5.2. Precisão Intermédia**

A **precisão intermédia** é definida como a variação que pode existir dentro do mesmo laboratório, ou seja variações relativamente à rotina, analista e equipamento. A precisão intermédia informa sobre a precisão do método em diferentes amostras quando estão expostas a configurações distintas do equipamento e/ou quando são preparadas por diferentes analistas em dias distintos. A Figura 1.10 representa esquematicamente os casos possíveis para caracterizar os resultados obtidos quanto à sua precisão e exatidão.

O ICH permite a isenção do estudo da precisão intermédia desde que a reprodutibilidade do procedimento seja comprovada. É de referir que este parâmetro da validação do método analítico permite ter uma noção do comportamento do parâmetro da robustez do método em estudo [34-36].



**Figura 1.10** – Ilustração representativa da diferença entre precisão e exatidão.

(i) - Resultados precisos, mas não exatos; (ii) - Resultados precisos e exatos; (iii) - Resultados nem precisos, nem exatos; (iv) - Resultados exatos, mas não precisos

O parâmetro da precisão intermédia pode ser avaliada através de três formas diferentes, como se encontra descrito na norma ISO 5725:3. O estudo pode ser feito recorrendo a cartas de controlo de amplitudes aplicadas a réplicas, a duplicados da amostra e a padrões, isto quando se realizam n ensaios sobre t amostras ou padrões ou quando são feitas n medições sobre uma mesma amostra e, ainda, através de amostras idênticas ou o mesmo padrão.

### 1.8.5.3. Reprodutibilidade

A **reprodutibilidade** diz respeito à precisão do método existente entre diferentes laboratórios. Este parâmetro deve ser tido em conta na padronização de um procedimento analítico, por exemplo, na inclusão de procedimentos em farmacoceias. Com o objetivo de validar esta característica são realizados estudos similares noutros laboratórios usando uma amostra homogénea do mesmo lote e o mesmo desenho experimental [34-35].

### 1.8.6. Robustez

A robustez de um procedimento analítico diz respeito à capacidade do processo permanecer inalterado por efeito de pequenas variações deliberadas pelos parâmetros do método e fornece uma indicação da sua aptidão durante o seu uso normal. Para o estudo da robustez devem ser escolhidos os parâmetros que mais poderão influenciar a qualidade dos resultados [34-36].

No processo de HPLC podem ocorrer diferentes variações:

- Variação do pH da fase móvel;
- Variação da temperatura da coluna;

- Variação do fluxo;
- Diferentes colunas;
- Variação do gradiente.

A avaliação do parâmetro da robustez deve ser considerada durante o desenvolvimento do processo analítico. Caso as medições sejam suscetíveis a variações nas condições analíticas, estas devem ser adequadamente controladas, uma vez que a robustez de um procedimento analítico fornece a indicação da confiabilidade durante o uso normal do processo [34-36].

### 1.8.7. Critérios de Aceitação

A validação de métodos analíticos envolve diferentes parâmetros, tais como a Estabilidade, Especificidade/Seletividade, Linearidade, Exatidão, Precisão (Repetibilidade e Precisão Intermédia), Limite de Detecção (LD), Limite de Quantificação (LQ) e Robustez.

Na Tabela 1.3 encontram-se presentes os critérios de aceitação correspondentes a cada um dos parâmetros estudados na validação do método analítico.

**Tabela 1.3** – Critérios de aceitação de cada parâmetro da validação do método analítico

	<b>Características</b>	<b>Critérios de Aceitação</b>
	<b>Estabilidade</b>	Perfil cromatográfico não é afetado, ou seja as áreas correspondentes às impurezas permanecem as mesmas
	<b>Especificidade</b>	Resolução (R) $\geq 1,5$ (resolução entre o primeiro de cada impureza e o pico do Cloridrato de Tetraciclina) Resolução (R) $\geq 1.5$ (resolução entre picos consecutivos de impurezas)
	<b>Linearidade</b>	$r^2 \geq 0,99$
	<b>Limite de Quantificação</b>	$S/N \geq 10$ $RSD \leq 10\%$
	<b>Limite de Detecção</b>	$S/N \geq 3$ $RSD \leq 10\%$
	<b>Exatidão</b>	Recuperação: 90% - 110%
<b>Precisão</b>	<b>Repetibilidade</b>	$RSD \leq 10\%$
	<b>Precisão Intermédia</b>	$RSD \leq 10\%$
	<b>Robustez</b>	Tempos de Retenção permanecem inalterados por pequenas variações

## 1.9. FATOR DE RESPOSTA RELATIVO

Na indústria farmacêutica o fator de resposta relativo é um método que desempenha um papel fundamental, uma vez que diminui o tempo de análise das amostras de rotina do laboratório. O fator de resposta (RF) está associado à resposta do fármaco ou da substância relacionada por unidade de peso, sendo calculado pela Equação 1.9 [40].

$$RF = \frac{\text{resposta (unidades respectivas)}}{\text{concentração } \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}}\right)} \quad (1.9)$$

O fator de resposta relativo (RRF) apresenta como utilidade a correção das diferenças na resposta relativa entre substâncias numa amostra de fármaco.

O RRF é determinado usando a Equação 1.10 [40].

$$RRF = \frac{RF \text{ (substância relacionada)}}{RF \text{ (fármaco)}} \quad (1.10)$$

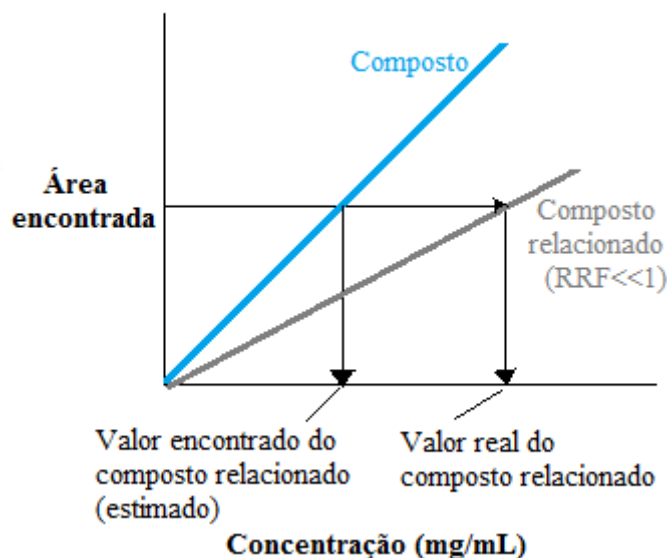
Caso as curvas de calibração sejam definidas através de um modelo linear, o fator de resposta relativo (RRF) pode ser calculado por comparação entre os declives das equações como se encontra representado na Equação 1.11 [40].

$$RRF = \frac{\text{declive (substância relacionada)}}{\text{declive (fármaco)}} \quad (1.11)$$

O valor do fator de resposta relativo (RRF) permite calcular o fator de correção (CF), sendo definido pela Equação 1.12 [39].

$$CF = \frac{1}{RRF} \quad (1.12)$$

O cálculo da relação fator de resposta por comparação das retas de calibração está representado esquematicamente na Figura 1.9 [40].



**Figura 1.11** – Fator de Resposta Relativo (RRF), (adaptado [40]).

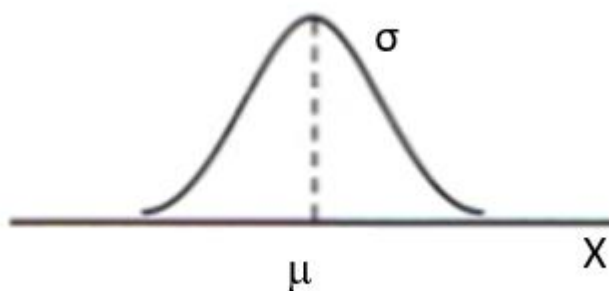
## 1.10. TRATAMENTO ESTATÍSTICO DE DADOS

### Desvio Padrão

O desvio padrão é uma medida que permite descrever a largura da distribuição normal, ou seja mede a variabilidade dos valores à volta da média. Quando o valor do desvio-padrão é zero (valor mínimo possível do desvio-padrão), significa que não existe variabilidade, como tal todos os valores são iguais à média. Este parâmetro corresponde à distância horizontal que se pode medir entre o vértice e o ponto da inflexão da curva Gaussiana, o qual se traduz pela Equação 1.13, onde o  $\sigma_x$  representa um estimador da dispersão da distribuição, N traduz o número de observações realizadas,  $x_i$  indica o valor obtido e  $\bar{X}$  representa o valor médio obtido [39,41].

$$\sigma_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{X})^2}{N}} \quad (1.13)$$

Na Figura 1.12 apresenta-se um exemplo de uma distribuição Normal ou de Gauss caracteriza-se pela sua forma simétrica [39].



**Figura 1.12** – Distribuição Normal [39].

A dimensão da amostra influencia o parâmetro do desvio-padrão, uma vez que quando a amostra apresenta uma dimensão pequena ( $N < 30$ ) o desvio-padrão caracteriza-se por apresentar tendencialmente valores por defeito. Devido a esse facto deve ser feita uma correção atendendo ao número de graus de liberdade da amostra, ou seja, uma alteração da estimativa do desvio-padrão ( $S_x$ ), expressa pela Equação 1.14.

$$S_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{X})^2}{N - 1}} \quad (1.14)$$

No ramo da indústria farmacêutica na maioria das vezes encontram-se séries de dados de dimensão pequena, as quais variam relativamente pouco dentro da escala teórica da população em estudo. Quanto menor for o número de dados utilizados para o cálculo do desvio-padrão, maior é a sua variabilidade. Quando ocorre o contrário, ou seja, o número de dados é elevado, a distribuição apresenta-se mais estreita e torna-se mais simétrica.

Para o estudo da variabilidade analítica na indústria farmacêutica normalmente recorre-se a outro conceito, o Coeficiente de Variação (CV), também designado por desvio padrão relativo (RSD) que se calcula dividindo o desvio padrão pela média respetiva dos dados considerados. Este parâmetro expressa a relação percentual da estimativa do desvio padrão com a média dos valores obtidos no método de análise.

## Intervalo de Confiança

Quando o erro sistemático não existe e as estimativas efetuadas são não tendenciosas é de esperar que os valores dos parâmetros da validação do método sejam próximos do valor pretendido, contudo esses valores nunca são considerados os valores exatos, uma vez que existem erros aleatórios associados. Há método que permitem estimar esses parâmetros recorrendo a estimadores pontuais ou a intervalos de confiança. [39].

Os estimadores pontuais expressam-se através de um único valor, pelo que a estimação pontual apesar de ser útil não apresenta um grau de precisão associado, uma vez que não fornece qualquer informação no que respeita ao afastamento da estimativa do valor verdadeiro do parâmetro em estudo. Posto isto, é preferível exprimir a estimativa através de um conjunto de dois valores limites entre os quais o parâmetro estimado tem grande probabilidade de estar localizado, os chamados intervalos de confiança, definindo-se desta forma a estimação por intervalo [39].

Um parâmetro pode ser estimado por um intervalo expresso por duas estatísticas, onde o verdadeiro valor do parâmetro se encontra contido com um determinado nível de confiança  $(1-\alpha)100\%$ , representado pela Equação 1.15 onde  $\theta$  designa o parâmetro em estudo,  $L_I$  e  $L_S$  representam as duas estatísticas que definem o intervalo em causa. A Equação 1.16 expressa o intervalo de confiança a  $(1-\alpha)100\%$  para o parâmetro  $\theta$ , sendo  $L_I$  e  $L_S$  os limites de confiança [39].

$$P\{L_I \leq \theta \leq L_S\} = 1 - \alpha \quad (1.15)$$

$$L_I \leq \theta \leq L_S \quad (1.16)$$

Quando a ausência de erros sistemáticos é evidenciada, a amostragem de uma determinada população dita normal ( $x \sim N[\mu, \sigma^2]$ ) conduz a uma estimativa do tipo ( $x \sim N[\bar{x}, s^2]$ ) [39].

É importante definir o intervalo de confiança indicando a gama de valores que abrangem maioritariamente a distribuição. Por exemplo, os percentis  $P_{0.025}$  e  $P_{0.975}$  permitem definir o intervalo de confiança dos valores da distribuição em estudo a um nível de 95% [39].

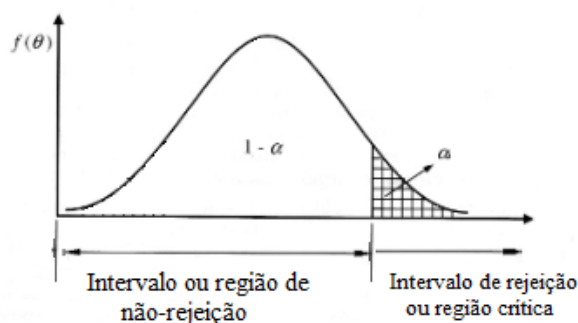
## Testes Estatísticos

Relativamente ao teste de hipóteses, este é um método que permite verificar se uma dada hipótese feita sobre uma população em estudo pode ou não ser rejeitada através dos resultados obtidos de uma amostra [39].

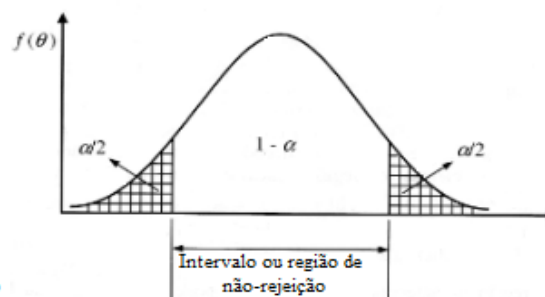
Na indústria farmacêutica o uso de intervalos de confiança com uma gama larga pode induzir a erro, ou seja, ocultar diferenças que sejam inaceitáveis devido ao facto de ser utilizado um reduzido número de dados nos estudos analíticos realizados. No entanto, como ocorrem pequenas anomalias nas séries analíticas, as diferenças acabam por ser identificadas como significantes, não apresentando qualquer relevância em termos práticos.

Quando se realiza um teste de hipóteses há determinadas etapas que têm de ser cumpridas. Inicia-se pela especificação das Hipóteses Nula ( $H_0$ ) e Alternativa ( $H_1$ ) e, dentro da hipótese considerada identifica-se a estatística de teste e caracteriza-se a sua distribuição. A Hipótese Nula deve ser formulada de forma a não existir diferença dentro do intervalo de confiança da estimativa ( $1-\alpha$ ) e a Hipótese Alternativa refere-se à diferença significativa, ou seja não está conforme e encontra-se fora do intervalo de confiança da estimativa.

Posto isto, indica-se um determinado nível de significância  $\alpha$ , com o qual se pretende obter conclusões. O nível de significância geralmente é pequeno e deve ser estabelecido previamente. Também se define a regra de decisão, ou seja, define-se uma região de rejeição (conjunto de valores da estatística de teste que conduzem à rejeição da Hipótese Nula) e a correspondente região de não rejeição que pode ser unilateral ou bilateral. Nas Figuras 1.13 e 1.14 encontram-se representados o teste unilateral (à direita) e o teste bilateral (simétrico), respetivamente. O nível de significância do teste escolhido representa a probabilidade que a estatística de teste apresenta pelo facto de pertencer à região de rejeição quando a Hipótese Nula é verdadeira [39].



**Figura 1.13** – Teste Unilateral (à direita) [39].



**Figura 1.14** – Teste Bilateral (simétrico) [39].

Posteriormente retira-se uma amostra de forma aleatória, calcula-se a estatística amostral e determina-se o valor da estatística de teste respetiva. Caso o valor da estatística de teste se encontre dentro do intervalo de não-rejeição, não se rejeita a Hipótese Nula correspondente a um nível de confiança de  $100(1-\alpha)\%$ . Se, pelo contrário, a estatística de teste estiver dentro da região de rejeição, a Hipótese Nula é rejeitada para um nível de significância  $\alpha$  [39].

Quando se realiza um teste estatístico podem-se cometer dois tipos de erros: Erro do Tipo I e Erro do Tipo II. O Erro do Tipo I diz respeito à rejeição da Hipótese Nula quando esta é verdadeira e o Erro do Tipo II consiste em rejeitar a Hipótese Nula quando esta é falsa. Estes dos tipos de erros ocorrem com uma certa probabilidade, a qual é expressa por  $\alpha$  e  $\beta$ , respetivamente [39].

$$\alpha = P\{\text{Erro Tipo I}\} = P\{\text{Rejeitar } H_0 | H_0 \text{ é verdadeira}\}$$

$$\beta = P\{\text{Erro Tipo II}\} = P\{\text{Não Rejeitar } H_0 | H_0 \text{ é falsa}\}$$

### **Análise de Variância**

A análise de variância (analysis of variance – ANOVA) tem como principal objetivo a comparação de mais do que dois grupos relativamente à sua localização, ou seja caracteriza-se como uma ferramenta que tem a capacidade de distinguir dentro da variabilidade total de diferentes valores experimentais, a contribuição aleatória e sistemática entre as amostras em estudo [39].

Se o fator em estudo (factor A) não influencia significativamente, ambas as dispersões são estimativas da variância da componente aleatória. Já se o factor apresenta uma influência significativa, a dispersão devida ao factor A ( $s_A$ ) torna-se maior que a componente puramente aleatória ( $s_0$ ). A Equação 1.17 representa o teste F, onde são comparadas as dispersões. Na equação o símbolo n representa o número de níveis de fator e o símbolo m diz respeito ao número de réplicas em cada nível [39].

$$F = \frac{s_A^2}{s_0^2} \leq F_{0.05(n-1, n(m-1))} \quad (1.17)$$

Quando o valor do teste não excede o valor crítico tabelado previsto para o nível de confiança de 95%, assume-se a hipótese nula como verdadeira. No entanto, quando o valor do teste calculado excede o valor crítico tabelado previsto para o nível de confiança de 95%, mas ainda se encontra abaixo do valor crítico para o nível de significância de 99% a hipótese nula é considerada dúbia. No caso em que o valor do teste calculado excede o valor crítico previsto para o nível de significância de 99%, a hipótese nula é rejeitada e a hipótese alternativa é aceite [39].

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. DETERMINAÇÃO DA EATC/ATC/ETC E TC POR CROMATOGRAFIA

O método cromatográfico desenvolvido pela empresa e utilizado para a detecção de impurezas que poderão estar presentes non Cloridrato de Tetraciclina encontra-se descrito na Tabela 2.1. Não foi necessário proceder a alterações ao procedimento usado no decorrer do método analítico, pelo que foi utilizado o procedimento descrito na Instrução Técnica desenvolvida até ao momento pela CIPAN.

Tabela 2.1 – Parâmetros do método analítico em HPLC.

Parâmetros do Método Analítico	Descrição Detalhada
Coluna	Coluna Phenomenex PolymerX (5µm) Comprimento da coluna: 250 mm Diâmetro da coluna: 4,6 mm
Técnica	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC-UV)
Modo de funcionamento	Isocrático
Fluxo da fase móvel (F.M.)	1,0 mL/min
Detetor UV	254 nm
Solvente para dissolução de amostras	Ácido Clorídrico 0,01 M
Fase Móvel (1L)	95mL de Butanol Terciário (Merk) 100mL Solução de Fosfato Dipotássico a 3,5% 200mL de Bissulfato de Tetrabutílamónio a 1,0% 10mL de EDTA disódico a 4,0%
pH da Fase Móvel	9
Volume de injeção	20 µL
Tempo de corrida das amostras*	
Estudo da impureza 4-Epitetraciclina	20 min
Estudo da impureza 4-Epianidrotetraciclina	40 min
Estudo da impureza Anidrotetraciclina	80 min
Temperatura da coluna	60 °C

\*o tempo de corrida das amostras durante o processo de validação poderá sofrer pequenas alterações, uma vez que a fase móvel influencia o tempo de corrida das amostras.

A quantidade de Butanol Terciário para a preparação da fase móvel corresponde a 95mL, tendo sido este valor ajustado para um cliente da empresa e, por essa razão não corresponde ao que se encontra descrito na Farmacopeia Europeia (84g), no entanto trata-se de um valor que se encontra dentro do que é permitido pela farmacopeia . No decorrer do processo de validação, a pesagem do Butanol Terciário (95mL) levantou algumas questões, uma vez que o tempo de corrida das amostras aumentou demasiado, ultrapassando os 100 minutos. Como as fases móveis só tem a duração de 7 dias, todas as semanas era preparada uma nova fase móvel e, como a temperatura no laboratório tornou-se um pouco superior e, a medição em volume tem sempre erros associados, a partir de determinada altura do processo de validação deixou de se medir os 95mL de Butanol Terciário e passou a pesar-se o valor correspondente a esse volume, ou seja, 74g.

## **2.2. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE REAGENTES**

Para a preparação da fase móvel e das amostras é necessário procedeu à preparação de algumas soluções de reagentes. A preparação dessas soluções encontra-se descrito nos itens seguintes, procedimento que pode ser consultado na Farmacopeia Europeia.

### **2.2.1. Solução de hidróxido de sódio diluído (2M), Panreac 98%**

Dissolver 8,5g de hidróxido de sódio em água, em balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com o mesmo solvente.

### **2.2.2. Ácido fosfórico diluído**

A 115 g de ácido fosfórico concentrado adicionar 885 mL de água e agitar.

### **2.2.3. Solução de fosfato dipotássico a 3,5%, pH 9,0**

Dissolver 35 g de fosfato dipotássico em água, em balão volumétrico de 1000 mL e completar o volume com o mesmo solvente. Acertar o pH em 9,0 com solução de hidróxido de sódio diluído.

#### **2.2.4. Bissulfato de tetrabutilamônio a 1,0% (m/v), pH 9,0**

Dissolver 10 g de bissulfato de tetrabutilamônio em água, em balão volumétrico de 1000 mL e completar o volume com o mesmo solvente. Acertar o pH em 9,0 com solução de hidróxido de sódio diluído.

#### **2.2.5. EDTA disódico a 4,0% (m/v), pH 9,0**

Dissolver 40 g de EDTA disódico em água, em balão volumétrico de 1000 mL e completar o volume com o mesmo solvente. Ajustar o pH em 9,0 com solução de hidróxido de sódio diluído.

#### **2.2.6. Ácido clorídrico 0,01 M**

Diluir 10 mL de ácido clorídrico 1 M (87,3 mL de ácido clorídrico concentrado/1000 mL) com água, em balão volumétrico de 1000 mL e completar o volume com o mesmo solvente.



## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

Neste capítulo apresentam-se os resultados obtidos ao longo do desenvolvimento do trabalho. Numa primeira fase encontram-se esquematizados os resultados relativos à pré-validação do método cromatográfico e, conclui-se esta secção com os resultados obtidos para cada parâmetro da validação do método.

Um aspeto que não é referenciado na farmacopeia é a filtração das amostras antes da sua análise no HPLC-UV, pelo que se assumiu não ser necessário esse procedimento para o método cromatográfico em estudo. No entanto, é de conhecimento cromatográfico que ao fim de algumas injeções de amostras, nomeadamente amostras mais concentradas corre-se o risco de permanecer na coluna resíduos indesejados. Assim, de forma a precaver qualquer resíduo, a coluna foi regularmente lavada com solvente (metanol) em diferentes concentrações.

### 3.1 PRÉ-VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Antes do processo de validação desenvolveu-se uma fase de pré-validação do mesmo, com o objetivo de traçar os critérios de validação a serem utilizados no processo, nomeadamente no que diz respeito ao procedimento usado e aos cálculos inerentes a cada parâmetro de validação.

Nesta secção foram realizados os testes para determinar o limite de quantificação (LQ) e o limite de deteção (LD) das impurezas do Cloridrato de Tetraciclina, tais como, 4-Epitetraciclina (ETC), 4-Epianidrotetraciclina (EATC) e Anidrotetraciclina (ATC). Este procedimento caracteriza-se pela identificação e quantificação de cada impureza em estudo do Cloridrato de Tetraciclina.

A farmacopeia informa dos limites de especificação de cada impureza, os quais se encontram inumerados na Tabela 3.1 em termos de concentração (mg/mL).

**Tabela 3.1** – Limite de Especificação das Impurezas do Cloridrato de Tetraciclina

<b>Impureza</b>	<b>Limite de Especificação (%)</b>
<b>4-Epitetraciclina</b>	3,0
<b>4-Epianidrotetraciclina</b>	0,5
<b>Anidrotetraciclina</b>	0,5

Uma vez que o método aplicado, descrito na Farmacopeia Europeia, deteta eficazmente as impurezas, relativamente ao limite de especificação, começou-se por baixar a concentração de cada impureza para determinar o seu limite de quantificação (LQ) e o limite de deteção (LD). Para tal concretização recorreu-se ao método S/N (Sinal/Ruído), ou seja comparou-se o sinal obtido para cada impureza isoladamente com o sinal de base do branco. Através de diversas tentativas tentou-se encontrar o limite de quantificação mais baixo possível, uma vez que no Laboratório de Controlo da Qualidade da CIPAN as concentrações das impurezas em estudo são relativamente baixas. Assim, a concentração de cada impureza correspondente ao LD obtém-se para o valor de  $S/N \geq 3$  e a concentração correspondente ao LQ obtém-se para o valor de  $S/N \geq 10$ .

O parâmetro S/N foi determinado comparando-se o sinal obtido para a amostra da impureza (ETC, EATC ou ATC) com o sinal de uma amostra de branco, ambos no mesmo tempo de retenção. Para esse cálculo recorreu-se às Equações 3.1 e 3.2. No anexo II encontram-se as Figuras II.1 e II.2 onde se encontra um exemplo para o cálculo do limite de deteção (LD) e outro para o cálculo do limite de quantificação (LQ).

$$S/N = \frac{2 \times H}{h} \quad (3.1)$$

Na Equação 3.1:

H – altura do pico da impureza (cm);

h – altura do sinal de base do branco (cm).

O valor da altura do sinal de base do branco (h) é determinado através do máximo e do mínimo do sinal observado a uma distância igual a 5 vezes a largura a meia altura, Equação 3.2. O ponto médio considerado corresponde ao tempo de retenção da impureza em estudo.

$$l = 5 \times y \quad (3.2)$$

Na equação 3.2:

l – largura medida para o ruído do branco no mesmo tempo de retenção,  $t_r$  (cm);

y – largura do pico à meia altura (cm).

Nas tabelas seguintes (da Tabela 3.2 à Tabela 3.4) encontram-se representadas as concentrações correspondentes ao LQ e LD para cada impureza em estudo, através do método S/N com um período de tempo equivalente a 5 vezes a largura do pico a meia altura, definição presente na versão da USP de 2011. A versão da USP de 2010 dita o método do S/N com um período de tempo equivalente de 20 vezes a largura do pico a meia altura e, como o objetivo era atingir concentrações equivalentes ao limite de quantificação e ao limite de detecção o mais baixas possível, optou-se pela legislação da USP de 2011.

**Tabela 3.2** – Limite de Quantificação e Limite de Detecção da Impureza 4-Epitetraciclina, calculados pelo método S/N para período de tempo equivalente a 5 vezes a largura a meia altura

	<b>Limite de Especificação</b>		<b>Limite de Quantificação</b>		<b>Limite de Detecção</b>
<b>Concentração (mg/ml)</b>	$3,0 \times 10^{-2}$	$3,75 \times 10^{-3}$	$3,0 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-3}$	$1,2 \times 10^{-3}$
<b>4-Epitetraciclina</b>		43,0	13,3	10,3	6,5

**Tabela 3.3** – Limite de Quantificação e Limite de Detecção da Impureza 4-Epianidrotetraciclina, calculados pelo método S/N para período de tempo equivalente a 5 vezes a largura a meia altura.

	<b>Limite de Especificação</b>	<b>Limite de Quantificação</b>	<b>Limite de Detecção</b>
<b>Concentração (mg/ml)</b>	$5,0 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-3}$	$5,0 \times 10^{-4}$
<b>4-Epianidrotetraciclina</b>		10,4	6,1

**Tabela 3.4** – Limite de Quantificação e Limite de Detecção da Impureza Anidrotetraciclina, calculados pelo método S/N para período de tempo equivalente a 5 vezes a largura a meia altura.

	<b>Limite de Especificação</b>		<b>Limite de Quantificação</b>		<b>Limite de Detecção</b>
<b>Concentração (mg/ml)</b>	$5,0 \times 10^{-3}$	$3,0 \times 10^{-3}$	$2,4 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-3}$
<b>Anidrotetraciclina</b>		13,3	12,6	7,4	5,4

Concluída a determinação da concentração equivalente ao limite de quantificação e limite de detecção das três impurezas em estudo, centrou-se o estudo na linearidade que constitui um parâmetro da validação do método cromatográfico com elevada relevância e, por esse motivo foram realizados testes na fase de pré-validação. Assim, com os estudos do LQ e LD foi possível verificar, numa primeira abordagem, que o sinal emitido por cada impureza é proporcional à sua concentração.

## **3.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO**

O principal objetivo da CIPAN centra-se com a validação do método analítico seguindo as condições cromatográficas descritas na Tabela 2.1. De forma a desenvolver a validação do método, realizaram-se os testes associados a cada parâmetro de validação de acordo com os critérios impostos pelas diferentes entidades: ICH, FE e USP.

### **3.2.1 Especificidade**

A especificidade do método analítico centra-se na capacidade que este tem para discriminar o analito pretendido de outras substâncias que eventualmente poderão estar presentes na amostra analisada. Na prática foram analisadas diferentes soluções e comparados os seus cromatogramas de forma a verificar se existiria alguma interferência entre os picos da substância ativa Cloridrato de Tetraciclina e cada uma das suas impurezas em estudo (4-ETC, 4-EATC e ATC).

A avaliação deste parâmetro pode ser feita recorrendo ao teste de recuperação do analito ou ao teste de resolução. Relativamente ao teste de recuperação, fortificou-se a amostra de padrão de Cloridrato de Tetraciclina de concentração 1mg/mL com concentrações conhecidas das três impurezas de forma a analisar as taxas de recuperação. Para que o método seja específico e seletivo é necessário obter taxas de recuperação próximas de 100% e pela Tabela 3.5 verifica-se esse critério, ou seja o método em estudo caracteriza-se pela sua especificidade e seletividade. Para determinar as taxas de recuperação recorreu-se à análise cromatográfica e calculou-se a concentração de cada impureza em estudo detetada na solução padrão de Cloridrato de Tetraciclina fortificada comparando-se os valores do sinal obtido com um padrão de referência da impureza (retas de calibração), na mesma gama de concentrações em estudo.

**Tabela 3.5** – Resultados da Especificação do método a partir do teste de recuperação.

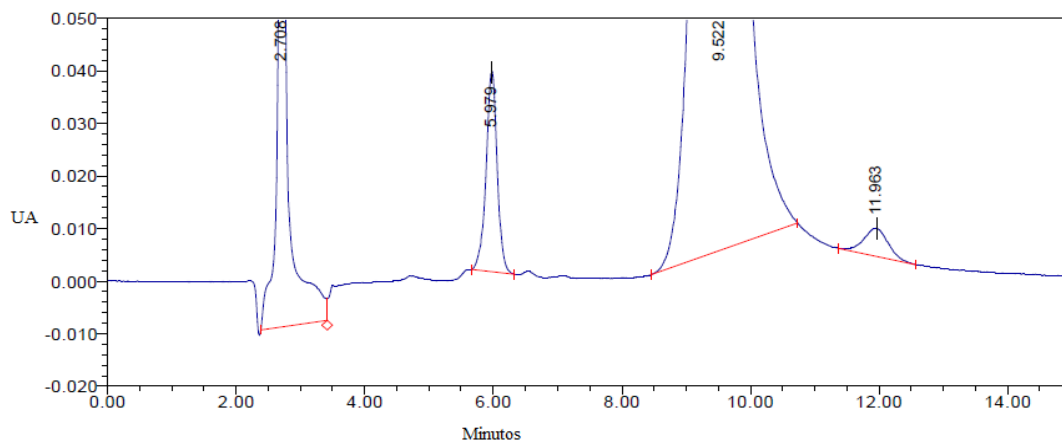
	<b>Concentração Teórica (mg/mL)</b>	<b>Área (UA*min)</b>	<b>Concentração Experimental (mg/mL)</b>	<b>Recuperação (%)</b>	<b>Recuperação do método (%)</b>
<b>4-ETC</b>	$1,46 \times 10^{-2}$	931672	$2,93 \times 10^{-2}$	100,9	99,71
<b>4-EATC</b>	$4,70 \times 10^{-3}$	249973	$4,67 \times 10^{-3}$	99,29	
<b>ATC</b>	$2,36 \times 10^{-3}$	230663	$4,31 \times 10^{-3}$	98,98	

Outra forma para avaliar a especificidade do método é através do teste de resolução, onde foi analisada a solução preparada com padrão de Cloridrato de Tetraciclina e fortificada com quantidades conhecidas de cada impureza (a mesma solução usada para o teste de recuperação). Para que o método seja considerado específico é necessário que a resolução entre os picos das impurezas e o pico do Cloridrato de Tetraciclina seja igual ou superior a 1,5 ( $R \geq 1,5$ ) e ainda que a resolução entre impurezas consecutivas seja também igual ou superior a 1,5 ( $R \geq 1,5$ ).

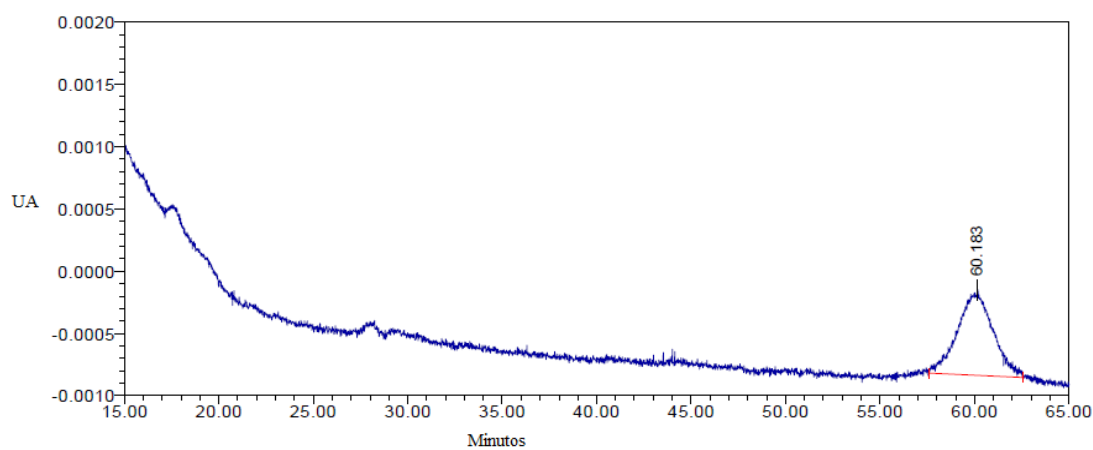
As Figuras 3.1 e 3.2 representam os picos das impurezas (4-ETC, 4-EATC e ATC) e do pico do princípio ativo (Cloridrato de Tetraciclina) relativamente à solução preparada antes de sofrer fortificação e, as Figuras 3.3 e 3.4 são referentes à mesma solução depois de ocorrer a fortificação da mesma com as impurezas em estudo.

As Figuras 3.3 e 3.4 foram usadas para a avaliação da especificidade através do teste de resolução, sendo que na Tabela 3.6 se encontram os valores correspondentes às resoluções entre os picos das diferentes impurezas e o pico do Cloridrato de Tetraciclina e ainda o pico entre impurezas consecutivas (4-Epitetraciclina, 4-Epianidrotetraciclina; 4-Epianidrotetraciclina, Anidrotetraciclina).

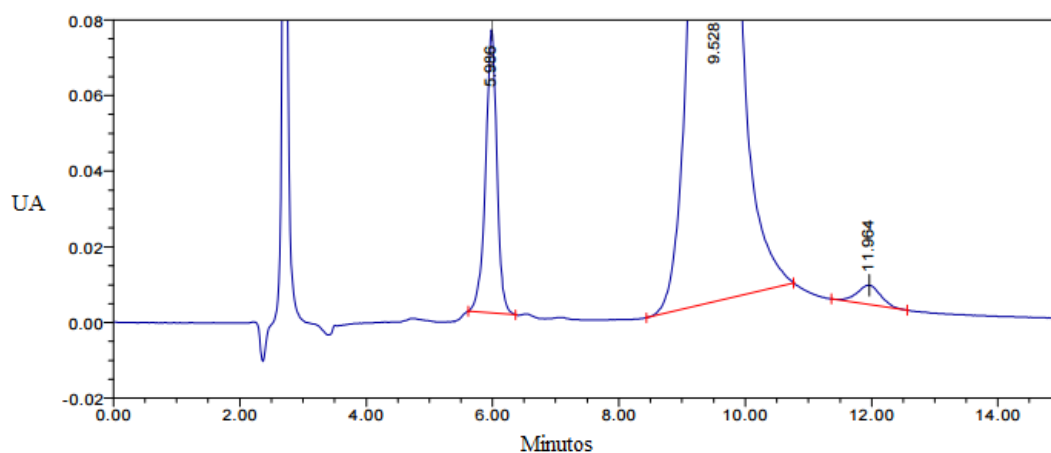
Os cromatogramas encontram-se divididos, ou seja apresenta-se um cromatograma até ao tempo de corrida 15min e outro cromatograma desde os 15 minutos de corrida até ao fim (65min), devido ao ajuste de escala feito de forma a ser possível observar os picos do Cloridrato de Tetraciclina e as respetivas impurezas em estudo.



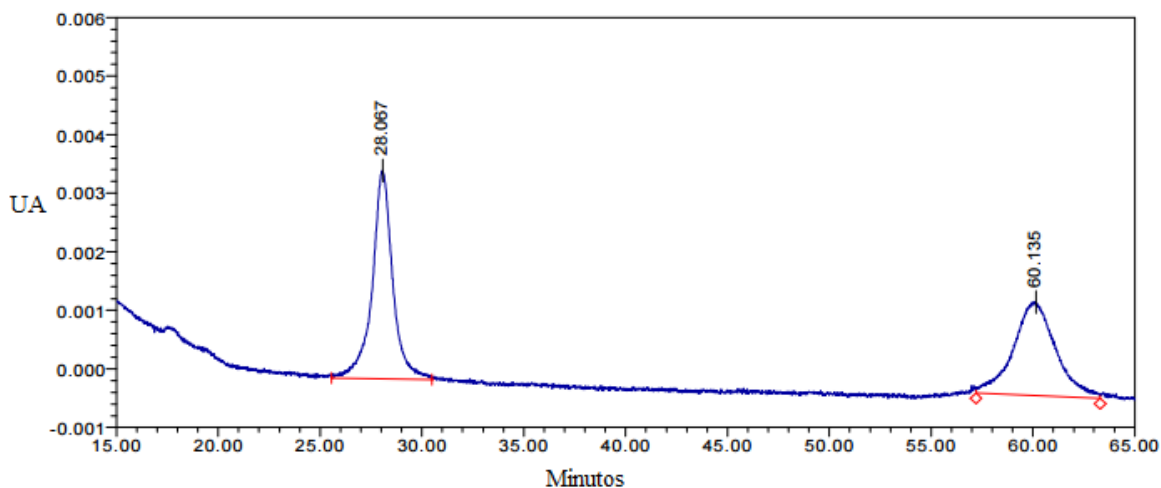
**Figura 3.1** – Cromatograma da solução de padrão de Cloridrato de Tetraciclina sem fortificação (0min-15min).



**Figura 3.2** – Cromatograma da solução de padrão de Cloridrato de Tetraciclina sem fortificação (15min-65min).

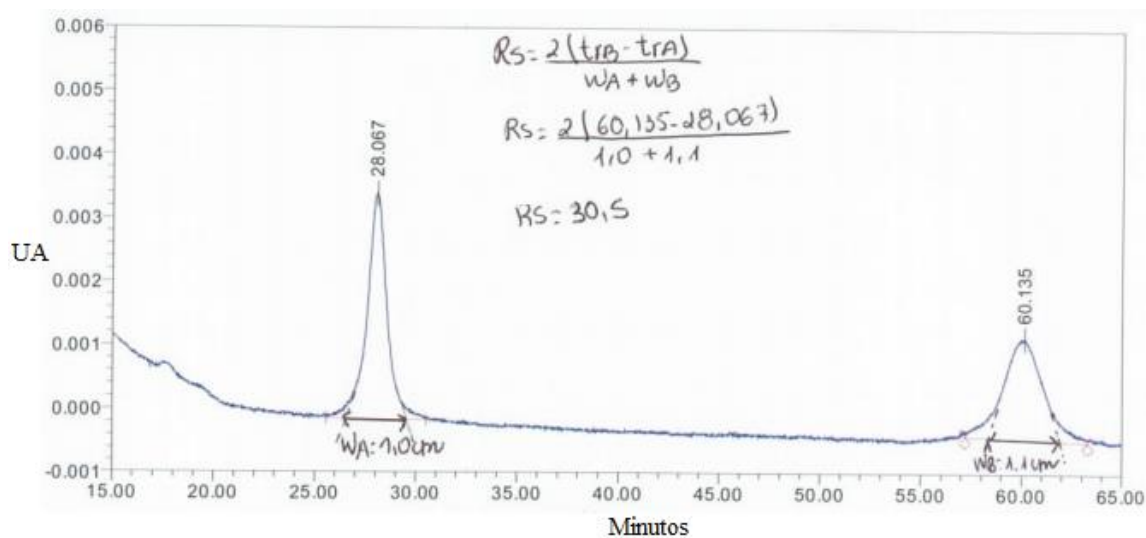


**Figura 3.3** – Cromatograma da solução de padrão de Cloridrato de Tetraciclina fortificada com quantidades conhecidas das impurezas 4-ETC, 4-EATC e ATC (0min-15min).



**Figura 3.4** – Cromatograma da solução de padrão de Cloridrato de Tetraciclina fortificada com quantidades conhecidas das impurezas 4-ETC, 4-EATC e ATC (15min-65min).

Na Figura 3.5 encontra-se o cromatograma com o esquema do método utilizado para determinar a resolução entre o pico da 4-Epianidrotetraciclina e Anidrotetraciclina, utilizando a Equação 1.5. Todas as resoluções para análise da estabilidade do método e presentes na Tabela 3.6 foram calculadas seguindo o mesmo raciocínio.



**Figura 3.5** – Esquema ilustrativo do procedimento de cálculo da resolução entre os picos da impureza 4-Epianidrotetraciclina (RT=28,067) e da impureza Anidrotetraciclina (RT=60,135).

**Tabela 3.6** – Resultados da Resolução para as impurezas 4-ETC, 4-EATC e ATC.

<b>Impureza</b>	<b>Tempo de Retenção (RT)</b>	<b>Tempo de Retenção Relativo (Rr)</b>	<b>Resolução entre os picos da impureza e do Cloridrato de Tetraciclina (R)</b>	<b>Resolução entre impurezas consecutivas (R)</b>
<b>4-ETC</b>	5,986	0,63	2,6	26,0
<b>4-EATC</b>	28,067	2,95	12,4	
<b>ATC</b>	60,135	6,33	32,6	30,5

A especificidade do método analítico poderia ter sido avaliada recorrendo ao número de pratos teóricos, calculados pela Equação 1.4, sendo que o número de pratos entre 10000 e 20000 é indicador de uma boa eficiência da coluna cromatográfica. Relativamente à seletividade ( $\alpha$ ), Equação 1.1, caso o valor deste parâmetro seja idealmente superior a 1 indica que existe uma boa separação dos compostos. Estes dois parâmetros poderiam ser determinados computacionalmente. No entanto, pelos resultados presentes na Tabela 3.6 verifica-se que o método em estudo permite obter uma boa separação das impurezas presentes numa solução de padrão de Cloridrato de Tetraciclina, mesmo contendo fortificação das três impurezas em concentrações previamente conhecidas. Assim, pode-se afirmar que o método é específico uma vez que se cumprem os critérios estabelecidos para o parâmetro da seletividade (Tabela 1.3).

### **3.2.2 Linearidade**

A linearidade relaciona-se diretamente com a capacidade do método para gerar resultados linearmente proporcionais à concentração da substância em estudo, dentro de uma gama analítica especificada. A avaliação deste parâmetro é demonstrada recorrendo ao coeficiente de correlação do gráfico analítico, o qual não deve ser estatisticamente diferente de 1 e, deve ser devidamente avaliado pelo teste “t” de Student. Outro aspeto a ser avaliado é a inclinação da reta do gráfico que deve ser diferente de zero. Assim os critérios a serem cumpridos para a linearidade do método é obter coeficiente de correlação estatisticamente diferente de um e coeficiente angular diferente de zero.

O estudo da linearidade do método foi determinada através da construção de uma curva de calibração para a 4-ETC, 4-EATC e ATC. Para a realização do teste foram injetadas amostras de

cada impureza em estudo com concentrações desde o limite de quantificação até 120% do limite de especificação (Tabela 3.1). Para cada impureza foram utilizadas seis concentrações, distribuídas ao longo do intervalo de trabalho (Tabela 3.7), e cada amostra foi analisada em triplicado. Em termos estatísticos, o parâmetro da linearidade foi avaliada tendo como referência a norma ISO 8466-1 [42].

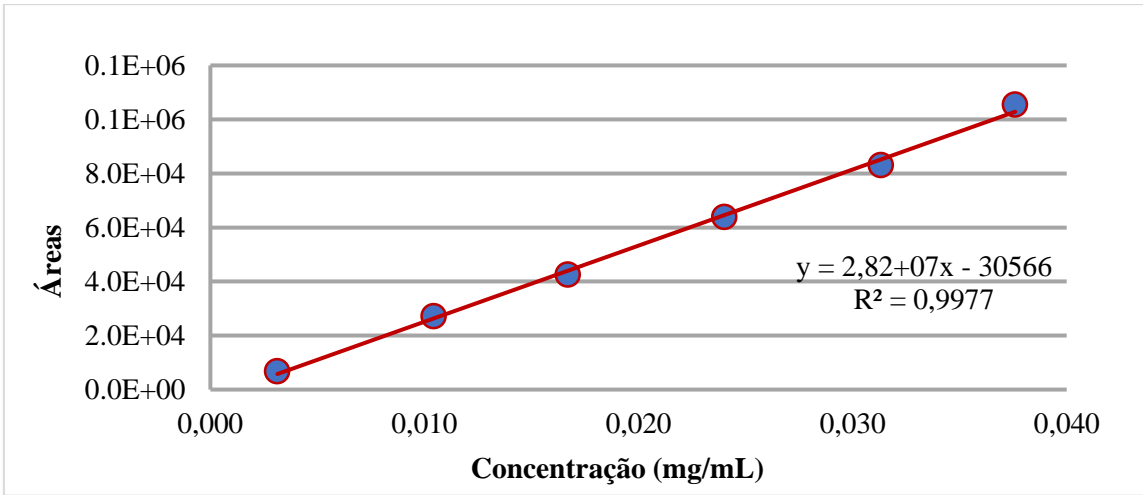
**Tabela 3.7** – Intervalo de Trabalho das impurezas 4-ETC, 4-EATC e ATC

<b>Impurezas</b>	<b>Intervalo de Trabalho</b>
<b>4-Epitetraciclina</b>	3ppm – 36ppm
<b>4-Epianidrotetraciclina</b>	1ppm – 6ppm
<b>Anidrotetraciclina</b>	2,4ppm – 6ppm

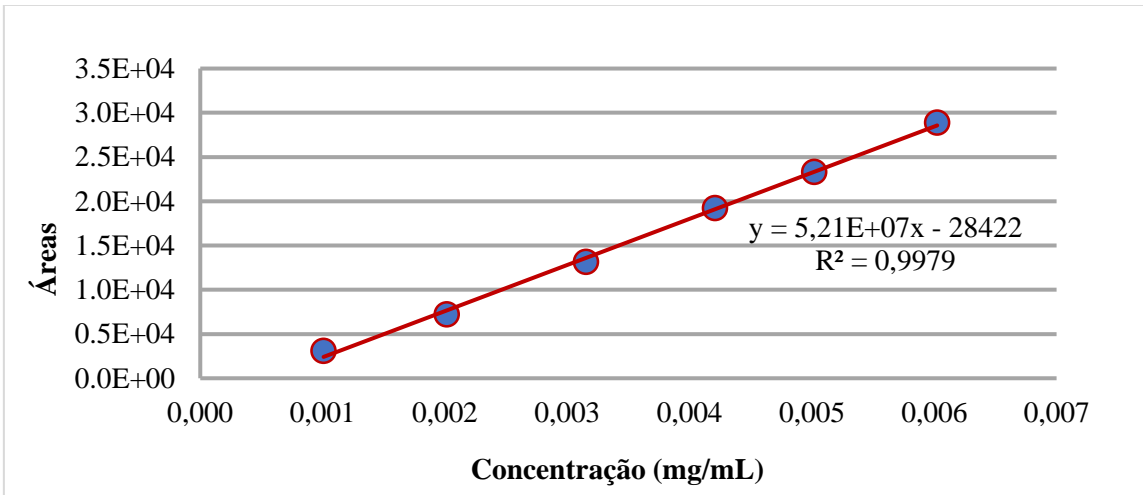
As retas de calibração para cada impureza em estudo foram determinadas recorrendo ao método dos mínimos quadrados. Essas retas de calibração foram construídas através do sinal obtido (área média) para cada nível de concentração, Tabela 3.8. Os gráficos das retas de calibração das impurezas 4-ETC, 4-EATC e ATC encontram-se da Figura 3.6 à Figura 3.8 e da Figura 3.9 à Figura 3.11 representam-se respetivamente os gráficos dos resíduos da concentração das três impurezas do Cloridrato de Tetraciclina em estudo para a validação do método.

**Tabela 3.8** – Áreas da curva de calibração das impurezas ETC, EATC e ATC

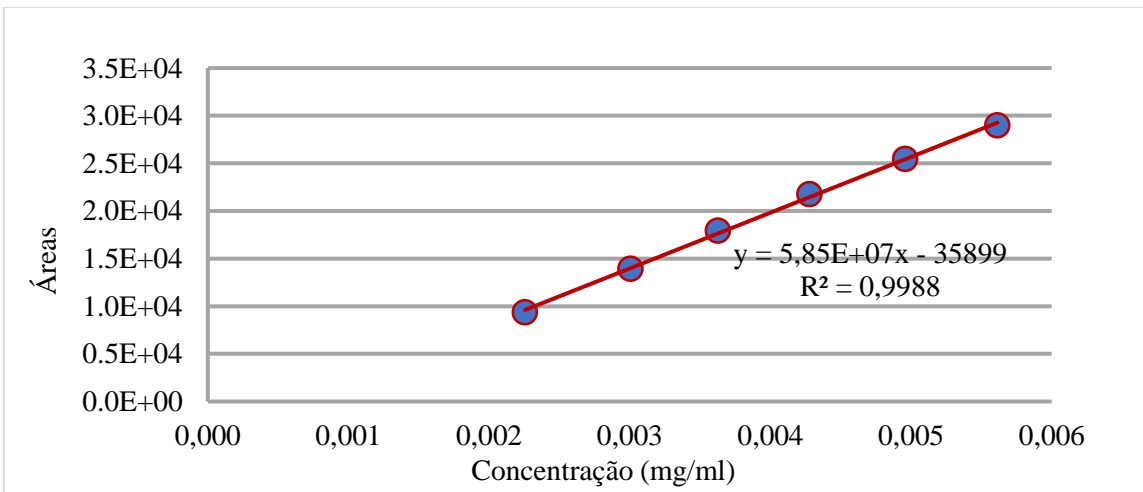
<b>4-ETC mg/mL</b>	<b>Área Média (1x10<sup>5</sup>)</b>	<b>4-EATC mg/mL</b>	<b>Área Média (1x10<sup>5</sup>)</b>	<b>ATC mg/mL</b>	<b>Área Média (1x10<sup>5</sup>)</b>
3,13x10 <sup>-3</sup>	0,676	1,01x10 <sup>-3</sup>	0,306	2,25x10 <sup>-3</sup>	0,936
1,04x10 <sup>-2</sup>	2,71	2,02x10 <sup>-3</sup>	0,719	3,01x10 <sup>-3</sup>	1,39
1,67x10 <sup>-2</sup>	4,26	3,16x10 <sup>-3</sup>	1,31	3,63x10 <sup>-3</sup>	1,79
2,40x10 <sup>-2</sup>	6,39	4,21x10 <sup>-3</sup>	1,92	4,28x10 <sup>-3</sup>	2,18
3,13x10 <sup>-2</sup>	8,31	5,02x10 <sup>-3</sup>	2,33	4,96x10 <sup>-3</sup>	2,54
3,76x10 <sup>-2</sup>	10,5	6,02x10 <sup>-3</sup>	2,89	5,61x10 <sup>-3</sup>	2,90



**Figura 3.6** – Representação gráfica das áreas dos picos em função da concentração da impureza ETC.

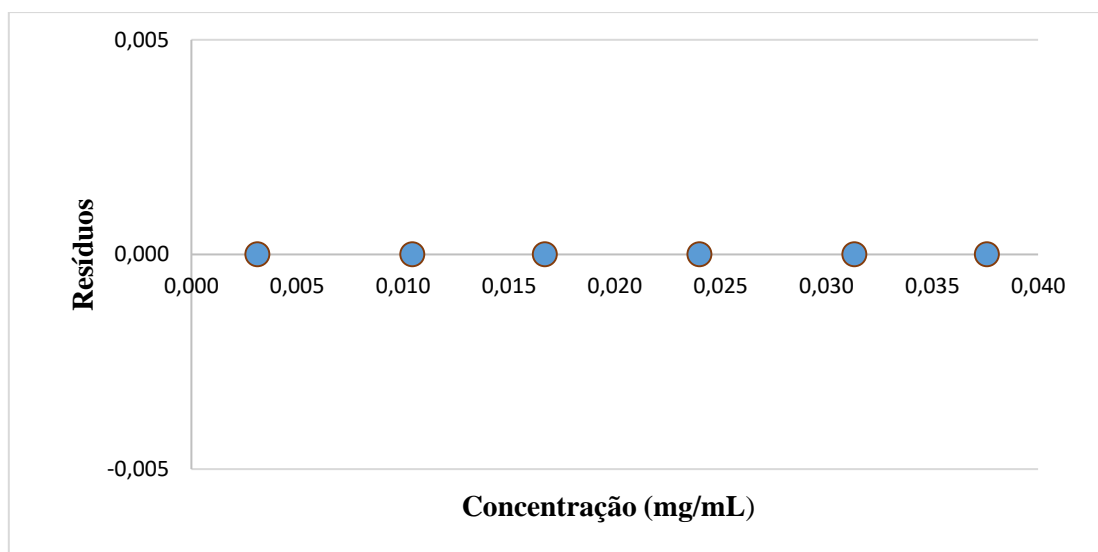


**Figura 3.7** – Representação gráfica das áreas dos picos em função da concentração da impureza EATC.

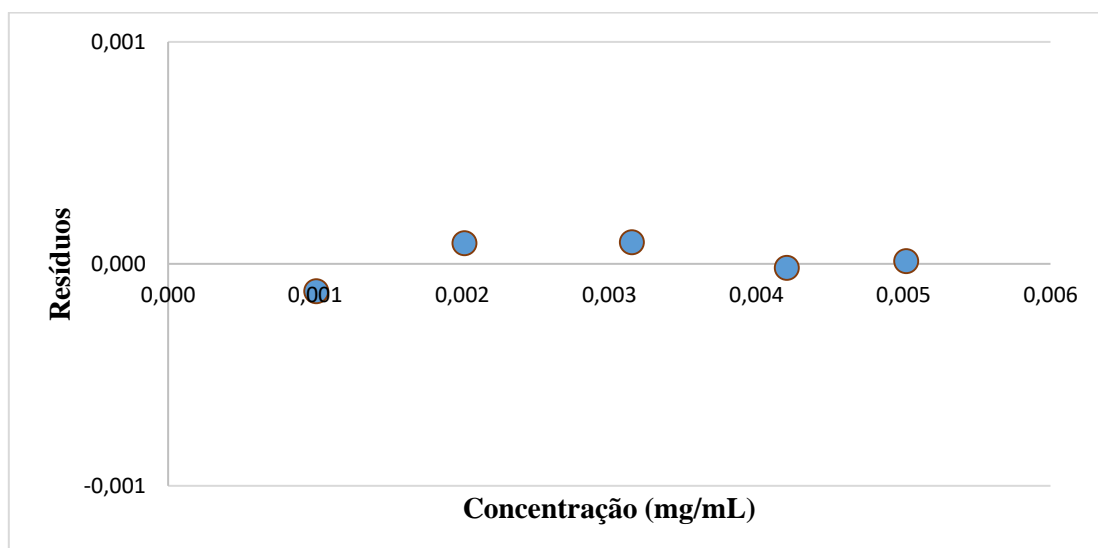


**Figura 3.8** – Representação gráfica das áreas dos picos em função da concentração da impureza ATC.

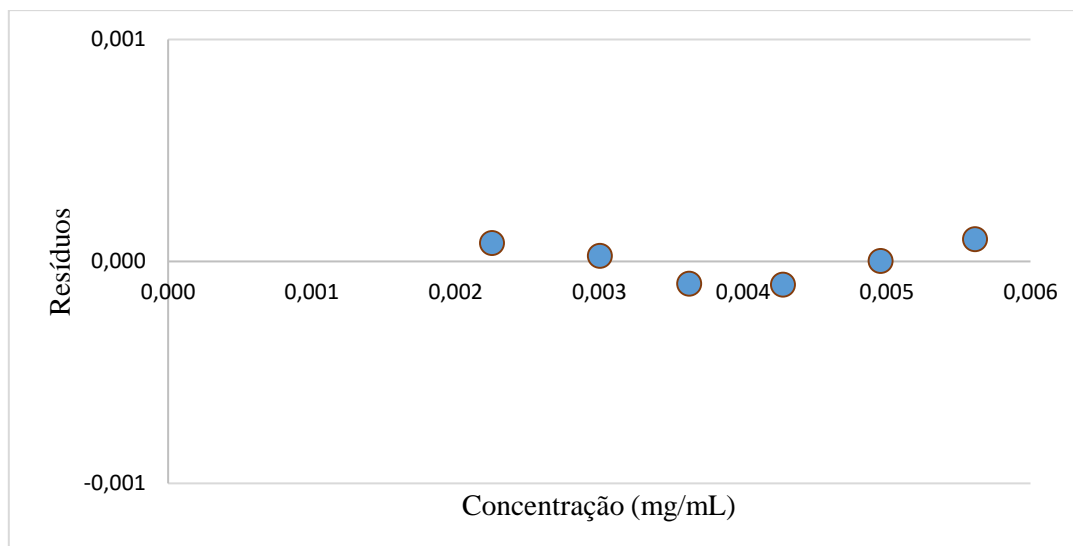
Pela análise dos gráficos das retas de calibração das diferentes impurezas verifica-se que o coeficiente de correlação é superior a 0,99 para todos os casos, respeitando desta forma um dos critérios de aceitação para a validação do método. O outro critério de validação é o valor do desvio padrão relativo (RSD) ser inferior a 10% para cada concentração analisada ao longo da gama de trabalho das três impurezas em estudo (ETC, EATC e ATC) e, pelos dados presentes no Anexo I para o RSD considera-se que o método apresenta linearidade e a reta de calibração representa com rigor o sinal obtido em função da concentração de impureza.



**Figura 3.9** – Gráfico dos resíduos da concentração para a reta de calibração da impureza 4-Epitetraciclina.



**Figura 3.10** – Gráfico dos resíduos da concentração para a reta de calibração da impureza 4-Epianidrotetraciclina.



**Figura 3.11** – Gráfico dos resíduos da concentração para a reta de calibração da impureza Anidrotetraciclina.

Os gráficos dos resíduos das concentrações para as retas de calibração das três impurezas analisadas permitem verificar que os pontos se distribuem aleatoriamente em torno do valor zero, uns resíduos positivos e outros negativos. Assim, com esta representação dos resíduos, prevê-se que os erros associados sejam independentes, com uma média calculada nula e variância constante, verificando-se desta forma a homocedasticidade dos erros.

Relativamente à ordenada na origem (b), testou-se a hipótese de esta poder ser nula procedendo à realização do teste de regressão linear através do método ANOVA onde se testou a hipótese nula  $\{H_0: b=0\}$  e a hipótese alternativa  $\{H_1: b \neq 0\}$ . Na hipótese nula está subjacente que a variação do sinal obtido (y) não depende da concentração da impureza (x) e, dessa forma a rejeição de  $H_0$  permite admitir que o sinal obtido é função da concentração. A comparação do valor da média do quadrado (MQ) da regressão e da média do quadrado dos resíduos é um método a ter em conta para verificar se é correto rejeitar a hipótese nula. Pela Tabela 3.9, onde se encontram representados os valores da média do quadrado da regressão e dos resíduos para cada impureza em estudo, verifica-se que a MQ da regressão apresenta valores claramente superiores à MQ dos resíduos, permitindo desta forma rejeitar-se a hipótese nula ( $H_0$ ). Rejeitando  $H_0$  conclui-se que o sinal obtido (y) é função da concentração (x) e por esse motivo a ordenada na origem (b) não se pode considerar nula. Os resultados da ANOVA desenhada para cada impureza encontram-se no Anexo I.

**Tabela 3.9** – Média do Quadrado (MQ) da regressão e dos resíduos a partir dos resultados da ANOVA.

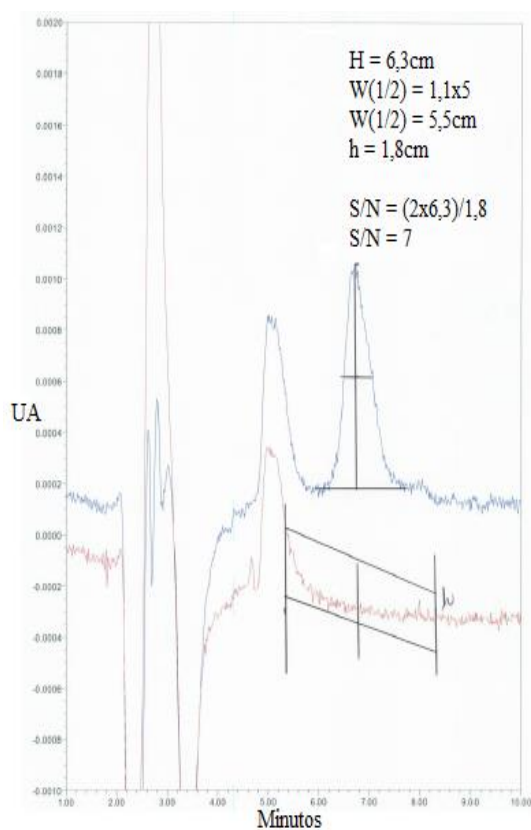
<b>Impureza</b>	<b>Média do Quadrado da Regressão</b>	<b>Média do Quadrado dos Resíduos</b>
<b>4-Epitetraciclina</b>	$6,66 \times 10^{11}$	$3,80 \times 10^8$
<b>4-Epianidrotetraciclina</b>	$4,81 \times 10^{10}$	$2,51 \times 10^7$
<b>Anidrotetraciclina</b>	$2,61 \times 10^{10}$	$6,01 \times 10^6$

### **3.2.3 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)**

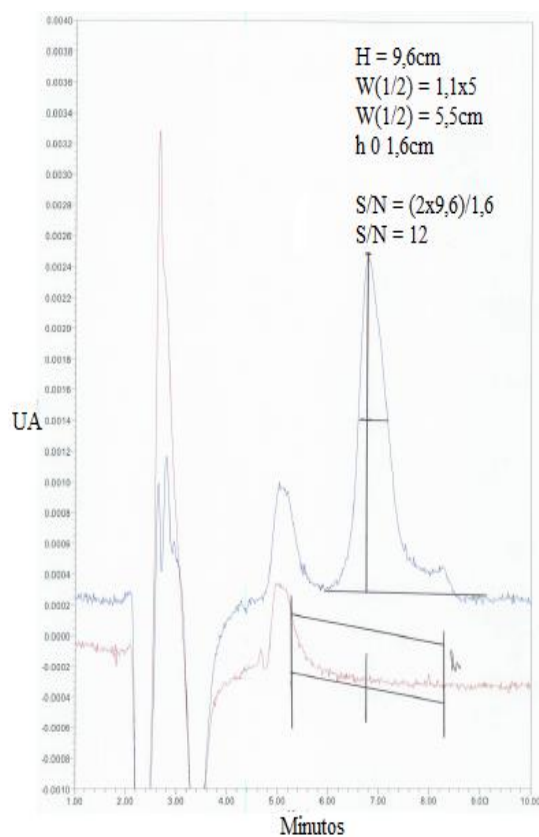
O estudo do limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) de cada uma das impurezas foi determinado recorrendo ao método Sinal/Ruído (S/N). O teste deste parâmetro caracterizou-se pela diluição de soluções das impurezas de forma a se verificar uma relação do sinal da impureza com o ruído do branco analisado, no caso deste estudo é ácido clorídrico 0,01M para HPLC, uma vez que é o solvente utilizado na preparação das soluções das impurezas. A relação verificada para o limite de quantificação é de 10:1 e a relação para o limite de detecção é de 3:1.

Na pré-validação do método determinou-se a concentração de cada impureza equivalente ao limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ). Nesta secção para a validação do método cromatográfico, foram preparadas duas amostras correspondentes ao limite de detecção e limite de quantificação, dias diferentes ou no mesmo dia mas em preparadas em momentos diferentes e injetadas em triplicado.

As Figuras 3.12 à 3.17 dizem respeito aos cromatogramas das soluções preparadas com concentrações equivalentes aos limites de detecção e quantificação das três impurezas em estudo e também se encontra esquematizado o procedimento usado para o cálculo do parâmetro S/N, o qual também se encontra explicado pormenorizadamente no Anexo II. Os resultados mais relevantes no estudo dos limites LD e LQ das impurezas 4-ETC, 4-EATC e ATC encontram-se representados nas Tabelas 3.10 à 3.12, tal como o parâmetro S/N para as diferentes soluções preparadas correspondentes aos limites estipulados.



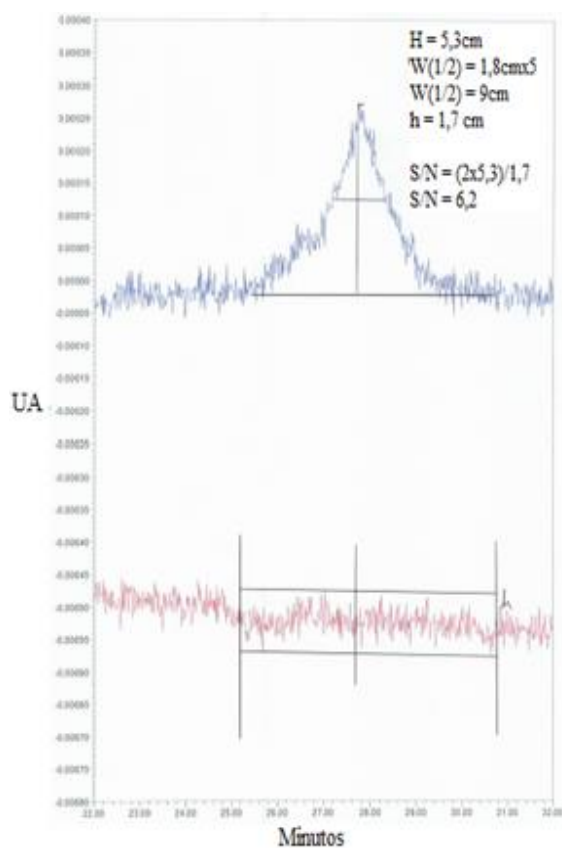
**Figura 3.12** - Cromatograma correspondente ao Limite de Detecção da impureza 4-Epitetraciclina.



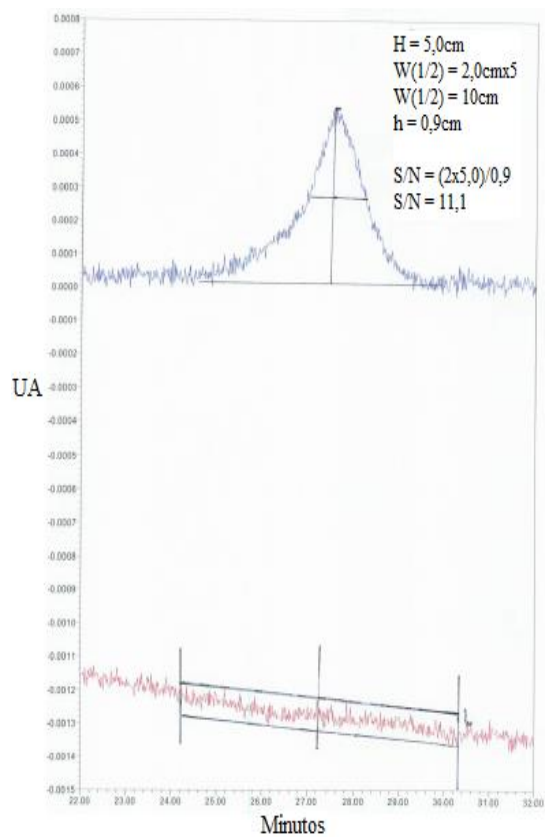
**Figura 3.13** - Cromatograma correspondente ao Limite de Quantificação da impureza 4-Epitetraciclina.

**Tabela 3.10** – Resultados dos limites LD e LQ da impureza 4-Epitetraciclina.

		Data	Concentração (mg/ml)	S/N	Média da Área	RSD (%)
4-Epitetraciclina	LD	16/07/2016	$1,24 \times 10^{-3}$	6,5	27191	2,10
				7,1		
				7		
		18/07/2016	$1,22 \times 10^{-3}$	6,6	23549	0,80
				6		
				6,1		
	LQ	15/07/2016	$3,03 \times 10^{-3}$	12,0	78581	0,97
				13,3		
				13,6		
		16/07/2016	$3,06 \times 10^{-3}$	14,4	74942	1,02
15,2						
14						



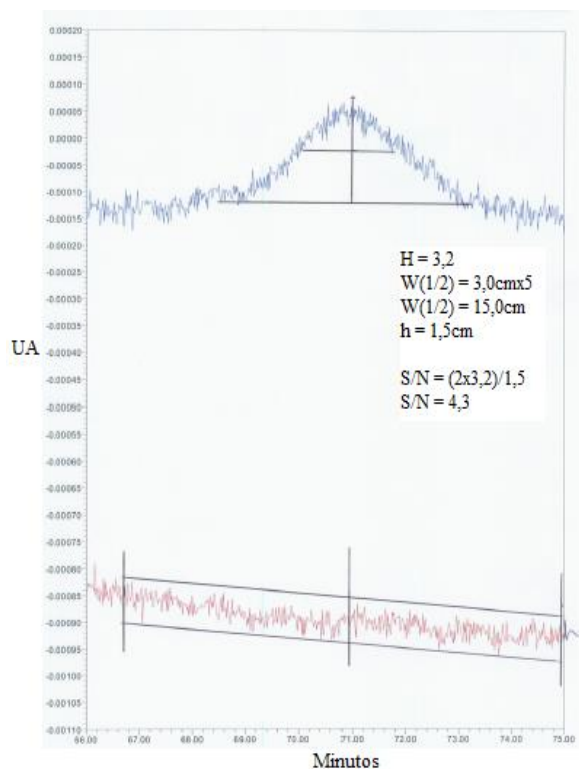
**Figura 3.14** – Cromatograma correspondente ao Limite de Detecção da impureza 4-Epianidrotetraciclina.



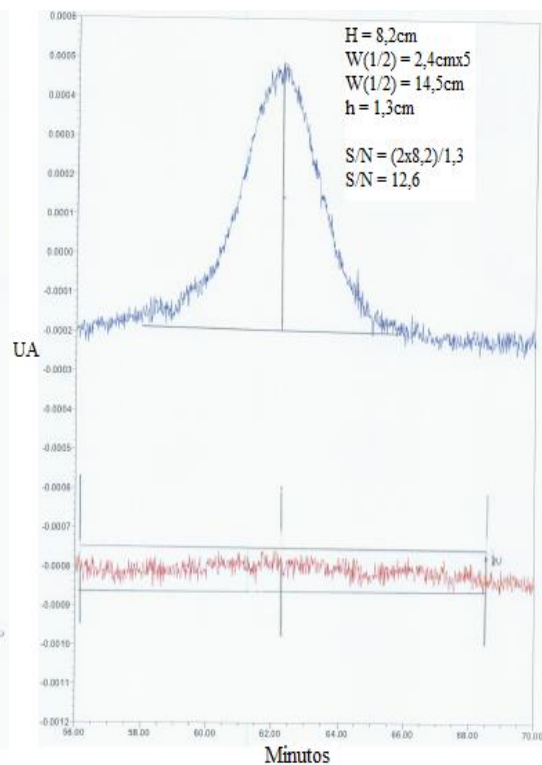
**Figura 3.15** – Cromatograma correspondente ao Limite de Quantificação da impureza 4-Epianidrotetraciclina.

**Tabela 3.11** – Resultados dos limites LD e LQ da impureza 4-Epianidrotetraciclina.

		Data	Concentração (mg/ml)	S/N	Média da Área	RSD (%)
4-Epianidrotetraciclina	LD	05/07/2016	$6,08 \times 10^{-4}$	6,1	23089	2,8
				6,2		
				6,2		
		06/07/2016	$5,99 \times 10^{-4}$	5,6	21968	1,3
				5,3		
	LQ	05/07/2016	$9,95 \times 10^{-4}$	10,4	40739	5,8
				10,3		
				10,5		
		06/07/2016	$1,02 \times 10^{-3}$	11,1	44164	1,8
				10,8		
10,2						



**Figura 3.16** – Cromatograma correspondente ao Limite de Detecção da impureza 4-Epianidrotetraciclina.



**Figura 3.17** – Cromatograma correspondente ao Limite de Quantificação da impureza 4-Epianidrotetraciclina.

**Tabela 3.12** – Resultados dos limites LD e LQ da impureza Anidrotetraciclina.

		Data	Concentração (mg/ml)	S/N	Média da Área	RSD (%)
Anidrotetraciclina	LD	31/05/2016	$8,67 \times 10^{-4}$	5,4	22286	0,72
				5,5		
				4,3		
	LD	01/06/2016	$8,76 \times 10^{-4}$	3,9	22689	0,69
				4,0		
				4,1		
	LQ	07/06/2016	$2,17 \times 10^{-3}$	12,6	102492	0,41
				12,7		
				12,8		
		07/06/2016	$2,09 \times 10^{-3}$	13,2	102599	0,31
12,7						
12,5						

### 3.2.4 Sensibilidade

A sensibilidade do método tem como característica avaliar a sua capacidade para distinguir pequenas diferenças a nível de concentração de uma substância e, corresponde à primeira derivada da curva de calibração. No caso em estudo como cada impureza apresenta uma curva de calibração de polinómio de primeiro grau, o valor da sensibilidade corresponde ao declive dessa reta, ou seja, a sensibilidade é constante ao longo de todo o intervalo de trabalho das impurezas ETC, EATC e ATC.

Quando se trata de métodos sensíveis, por mais pequena que seja a diferença na concentração da substância em estudo, esta alteração gera uma grande variação no valor do sinal analítico em causa. Desta forma, o parâmetro da sensibilidade informa sobre a capacidade do procedimento analítico em originar diferentes valores da propriedade avaliada, consequência da pequena alteração na quantidade do analito. Atualmente usa-se o termo para designar que um método caracteriza-se por um baixo limite de deteção (LD), o qual é incorreto afirmar [43].

Na tabela 3.13 encontram-se retratados resumidamente os resultados do estudo da sensibilidade para cada impureza da Tetraciclina em estudo, valores que surgem do teste de linearidade concretizado anteriormente e apresentado no ponto 3.2.1.

**Tabela 3.13** – Resultados da sensibilidade das impurezas ETC, EATC, ATC

<b>Impurezas</b>	<b>Sensibilidade (UA *min/(mg/min))</b>
<b>Epitetraciclina</b>	$2,82 \times 10^{-7}$
<b>Epianidrotetraciclina</b>	$5,21 \times 10^{-7}$
<b>Anidrotetraciclina</b>	$5,85 \times 10^{-7}$

Pela tabela 3.13 verifica-se que a impureza Anidrotetraciclina apresenta o valor mais alto de sensibilidade, o que significa que com pequenas variações na concentração da impureza é possível obter grandes variações nos sinais medidas, garantindo desta forma a diferenciação entre duas concentrações de Anidrotetraciclina com elevada proximidade. O mesmo se aplica para as outras duas impurezas que, apesar de terem valores de sensibilidade inferiores à Anidrotetraciclina, consideram-se valores bastante elevados.

A sensibilidade do método é capaz de medir a relação entre o sinal do instrumento utilizado e a concentração da solução que está a ser analisada. Por exemplo, o declive da reta de calibração da impureza 4-Epitetraciclina ( $2,82 \times 10^7$ ) significa que um aumento de 1mg/mL na concentração de ETC corresponde a um aumento de  $2,82 \times 10^7$  unidades no sinal obtido.

No geral observa-se que o método apresenta grande sensibilidade, pois os coeficientes angulares das retas de calibração das impurezas em estudo caracterizam-se por valores elevados, proporcionando a diferenciação entre duas concentrações de analito próximas.

### **3.2.5 Exatidão**

Numa visão geral, pode-se dizer que a exatidão do método é avaliada principalmente pelo cálculo da recuperação do analito.

O ICH Q2 recomenda a realização no mínimo de três determinações em cada uma de três concentrações diferentes de impureza, capazes de abranger toda a gama especificada, sendo normalmente testada uma concentração próxima do limite de quantificação (LQ), outra a meio da gama e um terceiro nível de concentração relativamente mais elevado. Para esse efeito procedeu-se à preparação de amostras de Cloridrato de Tetraciclina, fortificadas com as diferentes impurezas em estudo, de forma a se obter soluções com concentrações de 4-ETC, 4-EATC e ATC em três níveis diferentes da gama de trabalho e, as amostras foram analisadas em triplicado.

As impurezas 4-Epitetraciclina (4-ETC) e 4-Epianidrotetraciclina (4-EATC) são estáveis ao longo do tempo, ou seja as diferenças detetadas no sinal obtido não têm influência relevante nos resultados. Desta forma, para o estudo da exatidão destas impurezas, preparou-se uma solução mãe da impureza (50mg/25mL) da qual se prepararam 4 soluções a partir da diluição mãe (5mL/10mL) de forma a obter soluções com concentração de 1mg/mL. Dessas 4 amostras, uma foi injetada sem adição de concentração conhecida de impureza de forma a perceber a quantidade inicial de impureza presente na amostra, já as outras três amostras foram fortificadas, ou seja adicionou-se concentração conhecida da impureza em estudo.

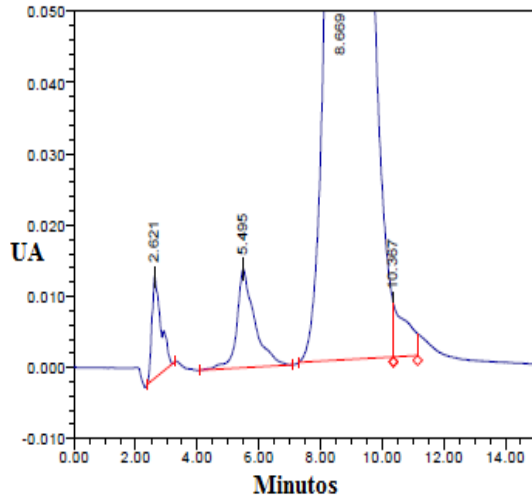
A análise da impureza Anidrotetraciclina (ATC) necessita de mais tempo de corrida no método cromatográfico para eluir conduzindo a alterações significativas nas áreas dos picos caso se preparassem todas as soluções fortificadas a partir de uma solução-mãe. Para não se terem resultados falsos foi necessário preparar três soluções-mãe (50mg/25mL) e de cada uma dessas soluções através de diluição prepararam-se duas soluções iguais (5mL/10mL) sendo uma delas fortificada, ou seja adiciona-se a essa solução uma concentração conhecida da impureza ATC. Este procedimento realizou-se para os três níveis de concentração estabelecidas na gama de

trabalho. O nível mais baixo onde a exatidão foi testada corresponde à concentração equivalente ao limite de quantificação (LQ), ou seja procedeu-se à fortificação da solução com concentração conhecida da impureza com o objetivo da concentração da impureza já existente nessa solução antes da fortificação juntamente com a adição da quantidade conhecida da impureza correspondesse a uma concentração relativamente próxima do nível pretendido. A exatidão foi avaliada tendo em conta mais dois níveis de concentração, um com concentração abaixo do limite de especificação e o nível mais elevado diz respeito à concentração equivalente ao limite de especificação da impureza Anidrotetraciclina ( $LE = 0,005\text{mg/mL}$ ), seguindo o mesmo procedimento do nível mais baixo de concentração explicado anteriormente.

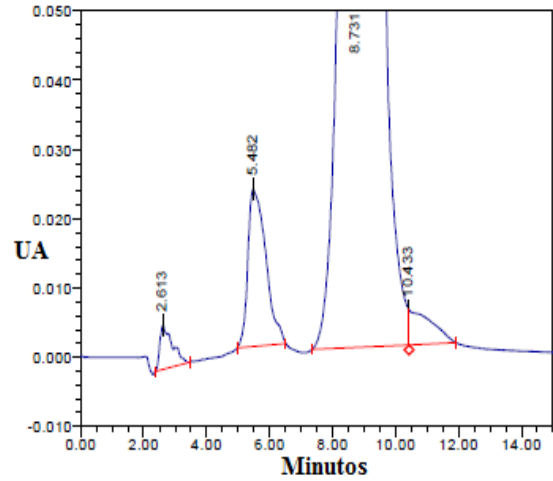
Depois da adição das concentrações conhecidas das impurezas à amostra de Cloridrato de Tetraciclina, recorrendo à análise cromatográfica calcula-se a concentração da impureza em estudo que se deteta na amostra, comparando-se esses valores obtidos com um padrão de referência da impureza, na mesma gama de concentrações. Posteriormente determinou-se a percentagem de recuperação associada a cada nível de concentração analisado (Tabela 3.14). Os critérios enumerados pela Farmacopeia Europeia e utilizados para o estudo da exatidão do método analítico foram o valor de  $RSD \leq 10\%$  e uma taxa de recuperação entre 90% e 110% como se encontra representado na tabela 1.3.

Nas Figuras 3.18 à 3.23 encontram-se os cromatogramas usados para o estudo da exatidão, ou seja apresenta-se um exemplo para cada impureza da solução-padrão de Cloridrato de Tetraciclina e da mesma solução depois de sofrer fortificação com concentração conhecida da impureza em questão. Os cromatogramas são referentes ao nível intermédio de concentração para as impurezas 4-ETC, 4-EATC e ATC.

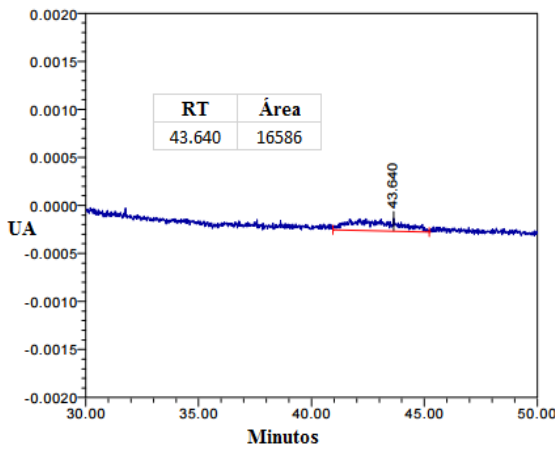
É de referir que na amostra de Cloridrato de Tetraciclina preparada para o estudo da exatidão da impureza 4-Epianidrotetraciclina (4-EATC), a quantidade desta impureza é inferior à concentração equivalente ao limite de deteção, verificado pelo área do pico da impureza em estudo ( $16586\text{ UA}\cdot\text{min} < 21958\text{ UA}\cdot\text{min}$ ). Os valores obtidos permitem considerar a quantidade de impureza presente na solução-mãe nula, portanto a concentração teórica (mg/mL) é igual à concentração adicionada (mg/mL) como se pode observar na Tabela 3.14, onde se encontram os resultados mais relevantes para o estudo da exatidão do método analítico.



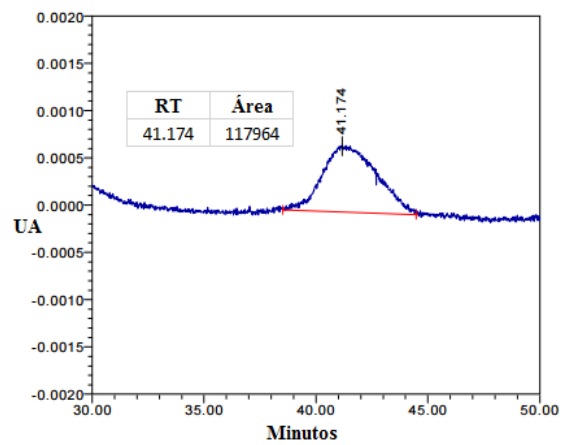
**Figura 3.18** – Cromatograma da solução padrão de Cloridrato de Tetraciclina para o estudo da exatidão da impureza 4-ETC.



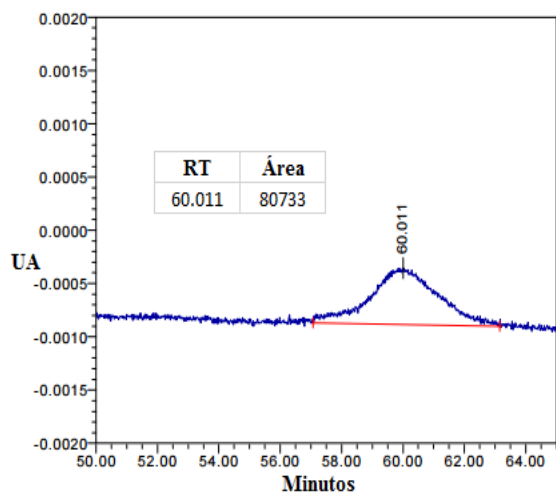
**Figura 3.19** – Cromatograma da solução padrão de Cloridrato de Tetraciclina depois de sofrer fortificação para o estudo da exatidão da impureza 4-ETC.



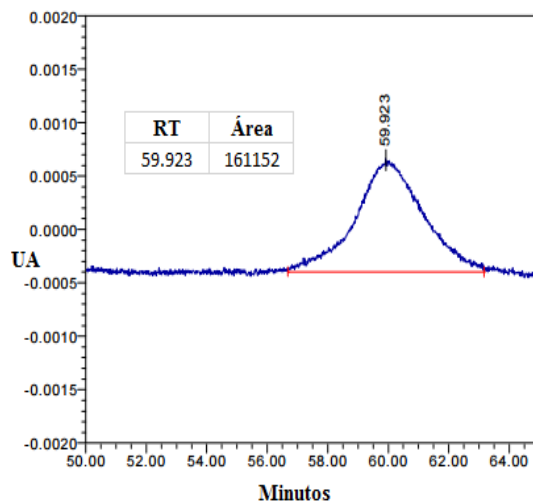
**Figura 3.20** – Cromatograma da solução padrão de Cloridrato de Tetraciclina para o estudo da exatidão da impureza 4-EATC.



**Figura 3.21** – Cromatograma da solução padrão de Cloridrato de Tetraciclina depois de sofrer fortificação para o estudo da exatidão da impureza 4-EATC.



**Figura 3.22** – Cromatograma da solução padrão de Cloridrato de Tetraciclina para o estudo da exatidão da impureza ATC.



**Figura 3.23** – Cromatograma da solução padrão de Cloridrato de Tetraciclina depois de sofrer fortificação para o estudo da exatidão da impureza ATC.

**Tabela 3.14** – Resultados da Recuperação para as impurezas 4-ETC, 4-EATC e ATC

	Concentração Adicionada (mg/ml)	Concentração Teórica (mg/ml)	Média da Área (UA *min)	RSD (%)	Concentração Experimental (mg/ml)	Recuperação (%)
<b>4-ETC</b>	$4,22 \times 10^{-4}$	$1,65 \times 10^{-2}$	607666	1,3	$1,76 \times 10^{-2}$	106,8
	$7,85 \times 10^{-3}$	$2,39 \times 10^{-2}$	897806	0,24	$2,60 \times 10^{-2}$	108,8
	$1,56 \times 10^{-2}$	$3,165 \times 10^{-2}$	1157880	0,17	$3,36 \times 10^{-2}$	106,0
<b>4-EATC</b>	$9,50 \times 10^{-4}$	$9,50 \times 10^{-4}$	53546	0,52	$1,02 \times 10^{-3}$	107,2
	$2,18 \times 10^{-3}$	$2,18 \times 10^{-3}$	117970	0,59	$2,24 \times 10^{-3}$	102,7
	$3,80 \times 10^{-3}$	$3,80 \times 10^{-3}$	205431	0,65	$3,91 \times 10^{-3}$	102,8
<b>ATC</b>	$9,95 \times 10^{-4}$	$2,79 \times 10^{-3}$	138043	9,07	$2,97 \times 10^{-3}$	106,55
	$1,58 \times 10^{-3}$	$3,26 \times 10^{-3}$	165738	3,37	$3,45 \times 10^{-3}$	105,61
	$2,41 \times 10^{-3}$	$4,26 \times 10^{-3}$	221481	5,88	$4,61 \times 10^{-3}$	99,58

Analisando a coluna da Tabela 3.14 referente ao RSD (%) e à Recuperação (%) de cada impureza em estudo verifica-se que os critérios implementados foram cumpridos, pelo que se considera que o estudo da exatidão para as três impurezas é válido. Ainda relativamente ao critério do RSD, é de referir que a impureza Anidrotetraciclina é a que apresenta valores mais elevados e próximos

do critério estabelecido, uma vez que é a impureza que apresenta estabilidade mais reduzida nas suas soluções devido ao facto de precisar de muito mais tempo na coluna cromatográfica para eluir e como já foi referido as soluções depois de algum tempo acabam por se degradar e tornar-se instável e, para avaliar esse comportamento foi estudado pormenorizadamente o parâmetro da estabilidade das soluções, o qual vai ser apresentado detalhadamente no ponto 3.2.8.

No que respeita às taxas de recuperação das três impurezas em estudo verifica-se que todas são superiores a 100%, o que pode levantar questões devido ao facto de ser possível recuperar mais quantidade de impureza do que teoricamente existia na solução, tal facto pode ser explicado pela ocorrência de reações secundárias que levam à formação de determinada impureza e como se pode observar a impureza Anidrotetraciclina apresenta uma média de recuperações de 107%, ou seja muito próximas do limite do critério estabelecido ( $90\% \leq \text{Recuperação} \leq 110\%$ ), o que leva a concluir que esta impureza se vai formando a partir das outras impurezas (4-ETC e 4-EATC) juntamente com a substância ativa Cloridrato de Tetraciclina, sendo também um dos motivos que conduz à reduzida estabilidade das soluções de Anidrotetraciclina. As outras duas impurezas em estudo também apresentam recuperações muito elevadas, as quais são explicadas pelo mesmo motivo enumerado para a impureza Anidrotetraciclina anteriormente.

### 3.2.6 Precisão

A precisão de um método analítico expressa o grau de concordância dos resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre a mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, com determinadas condições definidas. No caso em estudo foram utilizados resultados de padrões das impurezas e foi avaliado quanto à repetibilidade e precisão intermédia. Este parâmetro é geralmente expresso como o desvio-padrão, variância ou coeficiente de variação (também designado por desvio padrão relativo – RSD) de diversas medidas. A equação X representa a fórmula de determinar o valor de RSD (%), onde  $s$  diz respeito ao desvio-padrão do sinal obtido para cada uma das pesagens do padrão da impureza em estudo e  $M$  corresponde à média dos sinais respetivos.

$$RSD (\%) = \frac{s}{M} \times 100 \quad (3.3)$$

## **Repetibilidade e Precisão Intermédia**

No que respeita ao parâmetro da repetibilidade, este avalia a concordância entre os resultados obtidos para as medições sucessivas relativamente ao método analítico e nas mesmas condições de operação (equipamento, analista, condições ambientais), como se encontra explícito na norma ISO 3534. A repetibilidade pode ser avaliada através de no mínimo nove determinações dentro do intervalo de trabalho a três níveis de concentração, onde cada amostra é analisada em triplicado. Outra forma de determinar a repetibilidade do método é com no mínimo seis determinações para uma mesma concentração-teste [32-33,41].

O estudo da repetibilidade das impurezas 4-Epitetraciclina e Anidrotetraciclina foi feito através da análise de seis amostras para uma mesma concentração do padrão de Cloridrato de Tetraciclina (1mg/mL) e avaliadas através do desvio padrão relativo (RSD). Para a impureza 4-Epianidrotetraciclina, uma vez que a quantidade de impureza presente no padrão de Cloridrato de Tetraciclina (1mg/mL) é inferior ao limite de deteção (LD), prepararam-se três amostras de padrão de Cloridrato de Tetraciclina e realizou-se a fortificação com uma quantidade conhecida de padrão de EATC a três níveis diferentes de concentração (seguiu-se o mesmo raciocínio do parâmetro da exatidão), sendo preparadas três soluções para cada nível e analisadas através do desvio padrão relativo (RSD) e da percentagem de recuperação [32-33].

A concentração da impureza em estudo que se deteta no padrão de Cloridrato de Tetraciclina (solução de concentração 1mg/mL) é determinada comparando-se os valores das áreas obtidas para o pico da impureza com um padrão de referência da mesma, na mesma gama de concentrações (retas de calibração).

Relativamente ao parâmetro da precisão intermédia, este representa a variabilidade dos resultados existentes no laboratório onde o método é validado, ou seja estuda a variabilidade intermédia do método em questão, como se encontra expresso na norma ISO 5725-3. Para o estudo da precisão intermédia reproduziu-se o procedimento usado para o parâmetro da repetibilidade, com uma única diferença, as soluções foram preparadas por outro analista do laboratório.

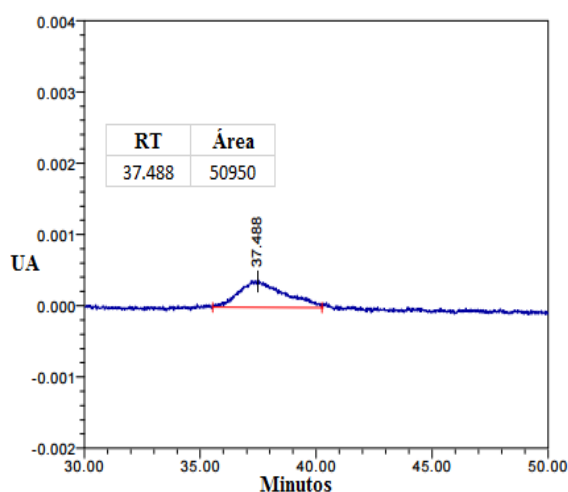
Nas Figuras 3.24 à 3.27 encontram-se exemplos de cromatogramas das soluções padrão de Cloridrato de Tetraciclina preparadas para o estudo da repetibilidade e precisão intermédia das impurezas 4-ETC e ATC, ou seja, para cada impureza representa-se o cromatograma respetivamente preparado pelo analista 1 e pelo analista 2, em dias diferentes. E, através dos cromatogramas repara-se na semelhança dos picos das duas impurezas, apesar das soluções serem preparadas por analistas diferentes.

Para a impureza 4-EATC apresentam-se os cromatogramas referentes aos três níveis de concentração da impureza depois da fortificação da solução padrão de Cloridrato de Tetraciclina,

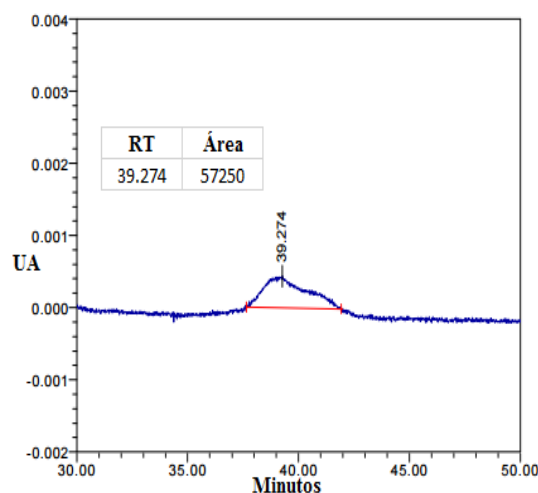
quer pelo analista 1 como também pelo analista 2 (Figuras 3.24 à 3.29). Pela observação dos seis cromatogramas apresentados verifica-se também a semelhança entre os cromatogramas correspondentes às soluções preparadas pelo analista 1 e pelo analista 2, desta forma comprova-se uma variabilidade intermédia do método analítico satisfatória.

Nas Tabelas 3.15 e 3.16 estão representados os resultados considerados mais relevantes para o estudo de ambos os parâmetros (repetibilidade e precisão intermédia) relativamente às impurezas 4-Epitetraciclina e Anidrotetraciclina. Na Tabela 3.17 encontram-se os resultados dos testes relativamente à impureza 4-Epianidrotetraciclina, sendo usado um procedimento relativamente diferente face às outras duas impurezas como já foi explicado anteriormente nesta secção.

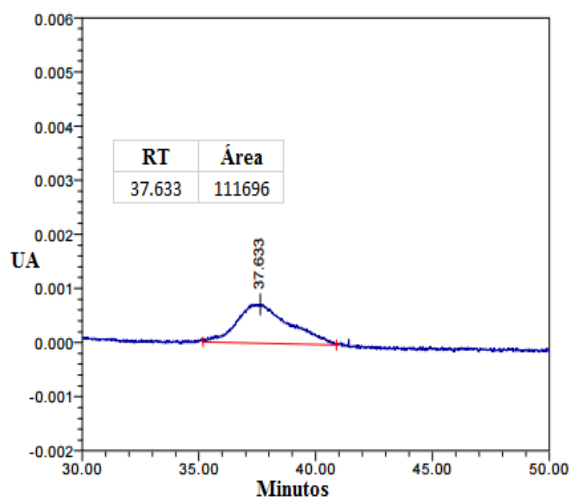
A precisão intermédia das impurezas 4-Epitetraciclina e Anidrotetraciclina foi ainda avaliada por analistas e dias diferentes pelo teste da ANOVA e os resultados encontram-se na Tabela 3.18, sendo que este método postula que os dois grupos de resultados têm médias iguais, tal facto é verificado por  $F_0 \leq F_{\text{crítico}}$ . As tabelas referentes à ANOVA encontram-se discriminadas no Anexo III.



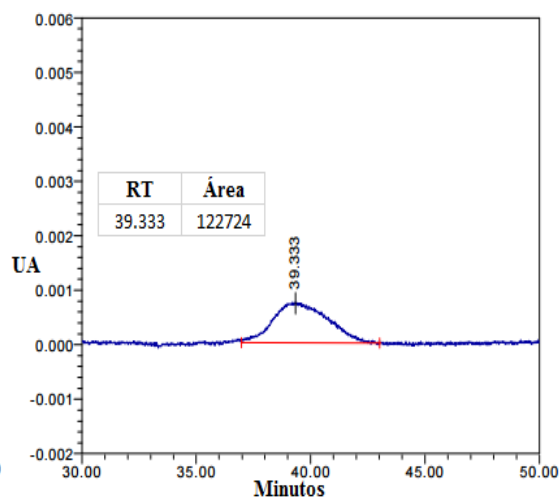
**Figura 3.24** – Cromatograma para o estudo da precisão da impureza 4-EATC referente ao nível mais baixo de concentração adicionada à solução padrão de Cloridrato de Tetraciclina (preparada pelo analista 1).



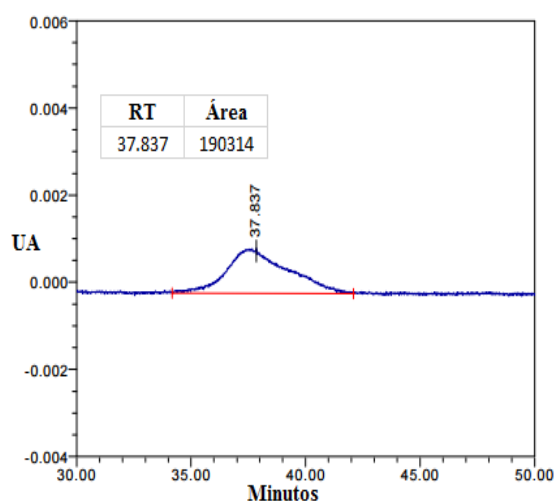
**Figura 3.25** – Cromatograma para o estudo da precisão da impureza 4-EATC referente ao nível mais baixo de concentração adicionada à solução padrão de Cloridrato de Tetraciclina (preparada pelo analista 2).



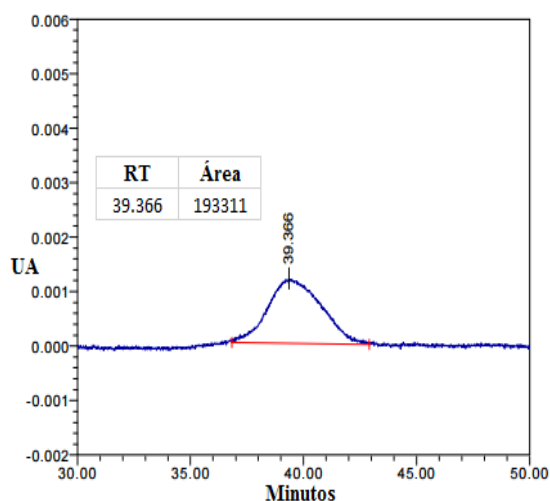
**Figura 3.26** – Cromatograma para o estudo da precisão da impureza 4-EATC referente ao nível intermédio de concentração adicionada à solução padrão de Cloridrato de Tetraciclina (preparada pelo analista 1).



**Figura 3.27** – Cromatograma para o estudo da precisão da impureza 4-EATC referente ao nível intermédio de concentração adicionada à solução padrão de Cloridrato de Tetraciclina (preparada pelo analista 2).



**Figura 3.28** – Cromatograma para o estudo da precisão da impureza 4-EATC referente ao nível mais elevado de concentração adicionada à solução padrão de Cloridrato de Tetraciclina (preparada pelo analista 1).



**Figura 3.29** – Cromatograma para o estudo da precisão da impureza 4-EATC referente ao nível mais elevado de concentração adicionada à solução padrão de Cloridrato de Tetraciclina (preparada pelo analista 2).

**Tabela 3.15** – Resultados para a análise do parâmetro da repetibilidade da impureza 4-Epitetraciclina.

Data	Analista	Padrão de Cloridrato de Tetraciclina (mg/mL)	Área do Pico da impureza (UA*min)	Concentração da impureza (mg/mL)	RSD (%)
14-Julho	1	0,979	592789	$1,97 \times 10^{-2}$	3,61
		1,01	585674	$1,94 \times 10^{-2}$	
		0,991	592257	$1,97 \times 10^{-2}$	
		0,983	552388	$1,83 \times 10^{-2}$	
		0,987	555675	$1,84 \times 10^{-2}$	
		0,987	602232	$2,00 \times 10^{-2}$	
19-Julho	2	1,04	778411	$1,96 \times 10^{-2}$	7,06
		0,998	749856	$1,89 \times 10^{-2}$	
		1,03	840027	$2,12 \times 10^{-2}$	
		1,05	761382	$1,92 \times 10^{-2}$	
		1,08	876866	$2,21 \times 10^{-2}$	
		1,06	875116	$2,21 \times 10^{-2}$	
<b>RSD (%)</b>				6,40	

**Tabela 3.16** – Resultados para a análise do parâmetro da precisão da impureza Anidrotetraciclina.

Data	Analista	Padrão de Cloridrato de Tetraciclina (mg/mL)	Área do Pico da impureza (UA*min)	Concentração da impureza (mg/mL)	RSD (%)
14-Julho	1	0,981	141188	$2,45 \times 10^{-3}$	8,84
		0,987	150353	$2,61 \times 10^{-3}$	
		0,986	126453	$2,19 \times 10^{-3}$	
		1,001	146761	$2,55 \times 10^{-3}$	
		0,993	150232	$2,61 \times 10^{-3}$	
		0,985	166117	$2,88 \times 10^{-3}$	
16-Junho	2	1,00	116095	$2,59 \times 10^{-3}$	5,96
		0,992	107498	$2,40 \times 10^{-3}$	
		0,946	101438	$2,26 \times 10^{-3}$	
		0,985	103058	$2,30 \times 10^{-3}$	
		0,986	115159	$2,57 \times 10^{-3}$	
		0,950	114749	$2,56 \times 10^{-3}$	
<b>RSD (%)</b>				7,55	

**Tabela 3.17** – Resultados para a análise do parâmetro da precisão da impureza 4-Epianidotetraciclina.

Data	Analista	Concentração de impureza adicionada (mg/mL)	Padrão de Cloridrato de Tetraciclina (mg/mL)	Área do Pico da impureza (UA*min)	Concentração da impureza no padrão de Cloridrato de Tetraciclina (mg/mL)	RSD (%)
22-Julho	1	3,69x10 <sup>-3</sup>	0,985	189822	3,60x10 <sup>-3</sup>	0,66
			0,989	190314	3,61x10 <sup>-3</sup>	
			0,985	192197	3,65x10 <sup>-3</sup>	
27-Julho	2	3,94x10 <sup>-3</sup>	1,00	193311	3,94x10 <sup>-3</sup>	0,69
			1,01	192843	3,93x10 <sup>-3</sup>	
			1,01	195346	3,98x10 <sup>-3</sup>	
<b>RSD (%)</b>					4,75	
22-Julho	1	2,21x10 <sup>-3</sup>	0,988	112832	2,14x10 <sup>-3</sup>	0,87
			0,991	111696	2,12x10 <sup>-3</sup>	
			1,01	110896	2,10x10 <sup>-3</sup>	
27-Julho	2	2,32x10 <sup>-3</sup>	0,993	122724	2,50x10 <sup>-3</sup>	0,52
			1,01	123892	2,52x10 <sup>-3</sup>	
			0,995	123747	2,52x10 <sup>-3</sup>	
<b>RSD (%)</b>					9,27	
22-Julho	1	9,14x10 <sup>-4</sup>	0,986	51504	9,77x10 <sup>-4</sup>	1,47
			0,995	50029	9,49x10 <sup>-4</sup>	
			0,996	50950	9,67x10 <sup>-4</sup>	
27-Julho	2	1,17x10 <sup>-3</sup>	1,03	56036	1,11E-03	2,21
			1,02	54777	1,10E-03	
			1,03	57250	1,13E-03	
<b>RSD (%)</b>					9,32	

Pelas Tabelas 3.15 à 3.17 verifica-se que todos os valores de RSD (%) são inferiores a 10%, pelo que cumprem com os requisitos estabelecidos na Tabela 1.3. Além disso, ainda é de referir que os valores de RSD (%) relativamente ao parâmetro de repetibilidade realizado pelo analista 1 são mais baixos comparativamente aos valores de RSD (%) quando se tem em conta todos os resultados das concentrações das impurezas (analista 1 e analista 2), o que era de prever uma vez

que as soluções são preparadas por analistas diferentes e em dias diferentes, no entanto o método continua a ser preciso, uma vez que o valor de RSD (%) é sempre inferior a 10.

**Tabela 3.18** – Resultados do teste da ANOVA para o estudo da precisão intermédia das impurezas 4-ETC e ATC.

	<b>4-Epitetraciclina</b>	<b>Anidrotetraciclina</b>
<b>F<sub>0</sub></b>	3,81	0,86
<b>F<sub>crítico</sub></b>	4,96	4,96
<b>Valor de P</b>	0,08	0,38

Pelos resultados da Tabela 3.18 verifica-se que para as duas impurezas o valor de  $F_0$  é inferior ao valor de  $F_{crítico}$ , levando à não rejeição da hipótese nula ( $H_0$ ), podendo considerar-se que as médias entre os dois grupos de resultados (analista 1 e analista 2) são iguais para a impureza 4-Epitetraciclina e Anidrotetraciclina. Para a impureza 4-Epianidrotetraciclina a precisão intermédia não foi avaliada aplicando o método da ANOVA, tendo sido apenas avaliada recorrendo ao valor de RSD (%), ou seja analisou-se o RSD para os três níveis de concentração tendo em conta os resultados do analista 1 e 2, obtendo-se para todos os níveis valores de RSD(%)  $\leq 10$ , cumprindo desta forma os requisitos estabelecidos para o parâmetro da precisão.

### 3.2.7 Intervalo de Linearidade

O intervalo de linearidade representa o intervalo em que o método é considerado preciso, exato e linear. Para o caso em estudo das impurezas, o intervalo considerado encontra-se entre o limite de quantificação de cada impureza e 120% do limite de especificação. O limite de linearidade para cada impureza pode-se observar na Tabela 3.7 que se encontra discriminada na secção 3.2.2 que detalha o estudo do parâmetro da linearidade do método analítico.

### 3.2.8 Estabilidade das Soluções

A estabilidade das soluções analíticas usadas na validação de um método deve ser um parâmetro estudado ainda na fase de desenvolvimento de forma a perceber quanto tempo as soluções podem permanecer preparadas antes de serem analisadas cromatograficamente, sem alterações

significativas na resposta obtida, ou seja o composto em análise deve permanecer praticamente inalterável.

Para testar a estabilidade das soluções de Cloridrato de Tetraciclina e das impurezas ETC, EATC e ATC repetiu-se a análise da mesma solução de quatro em quatro horas, num período total de doze horas. Para o estudo do Cloridrato de Tetraciclina analisou-se uma solução de 1mg/mL. Relativamente às impurezas em estudo analisaram-se soluções de concentração equivalente ao limite de quantificação (LQ) e limite de especificação (LE), ou seja, concentrações para cada impureza foi analisada a estabilidade quando se trata de concentrações mais baixas e quando se está perante soluções de concentrações mais elevadas de cada uma das três impurezas em estudo.

A estabilidade das soluções é avaliada calculando o desvio da resposta da análise cromatográfica de uma amostra num instante t relativamente à resposta no momento imediatamente a seguir à preparação da solução ( $t_0$ ), o qual não pode ser superior a 2%. Os resultados relativamente ao parâmetro da estabilidade das soluções de cada impureza (4-ETC, 4-EATC e ATC) e ainda do Cloridrato de Tetraciclina encontram-se representados na Tabela 3.19.

**Tabela 3.19** – Resultados do parâmetro da estabilidade das soluções para um tempo total de 12 horas.

Impurezas	Tempo em Solução			
	t=0h	t=4h	t=8h	t=12h
<b>Cloridrato de Tetraciclina (1mg/mL)</b>	27271639	27180978	27019252	26726557
<b>4-Epitetraciclina (LQ)</b>	80285	80780	81642	81640
<b>4-Epitetraciclina (LE)</b>	983086	973055	970811	966128
<b>4-Epianidrotetraciclina (LQ)</b>	35220	35028	35015	34885
<b>4-Epianidrotetraciclina (LE)</b>	226401	224850	223190	223159
<b>Anidrotetraciclina (LQ)</b>	84984	85861	85794	88831
<b>Anidrotetraciclina (LE)</b>	213229	214026	214149	223406

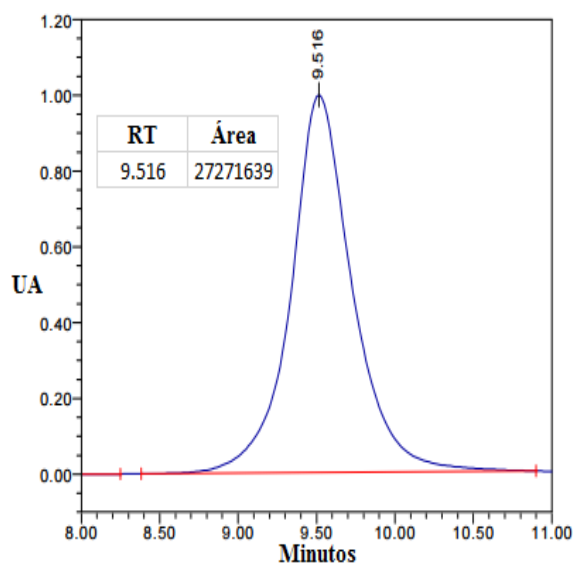
O estudo foi feito para um período total de 12 horas, uma vez não se pretendia ter as soluções preparadas mais do que esse tempo e, no entanto, durante o processo de validação, foram raras as vezes em que as soluções permaneciam preparadas para além de 5 horas.

Pelos resultados presentes na Tabela 3.19 verifica-se que para o período de 12 horas as soluções de Cloridrato de Tetraciclina e das impurezas ETC e EATC apresentam desvios inferiores a 2%,

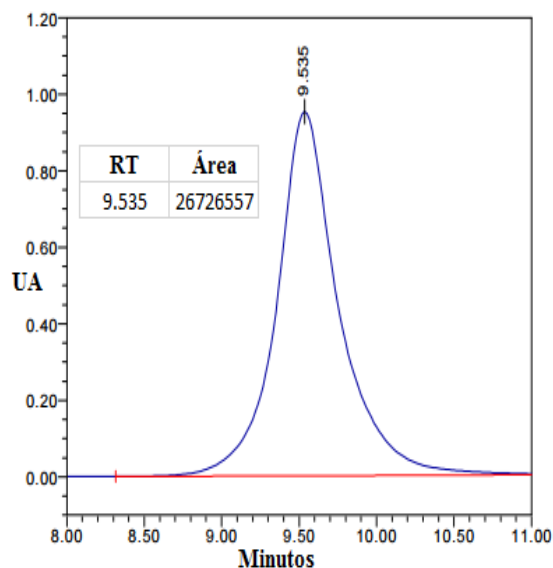
no entanto a impureza Anidrotetraciclina é a que apresenta uma estabilidade menor uma vez que ao fim de 12 horas o desvio associado à solução com concentração equivalente ao limite de quantificação é de 4,5% e da solução com concentração equivalente ao limite de especificação é de 4,8%, pelo que se considera que a impureza ATC apresenta estabilidade apenas num período de 8 horas.

No entanto, todas as soluções devem ser preparadas o mais próximo possível da sua injeção, não permanecendo muito tempo preparadas antes de serem analisadas, para que a quantificação da impureza em estudo seja o mais próximo da quantidade real.

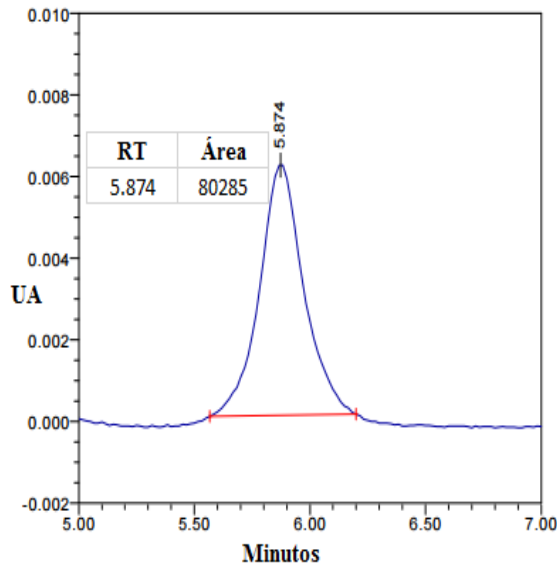
Nas Figuras 3.30 à 3.39 representam-se os cromatogramas das diferentes soluções preparadas no instante  $t_0$  e  $t=12h$  para o caso do Cloridrato de Tetraciclina e das impurezas 4-ETC e 4-EATC. Nas Figuras 3.40 à 3.44 apresentam-se os cromatogramas referentes às soluções da impureza ATC para o instante  $t_0$  e  $t=8h$ . Pela observação dos cromatogramas também se verifica que os picos dos analitos não sofrem alterações significativas na sua forma (picos gaussianos) e área correspondente como apresentado pormenorizadamente na Tabela 3.19.



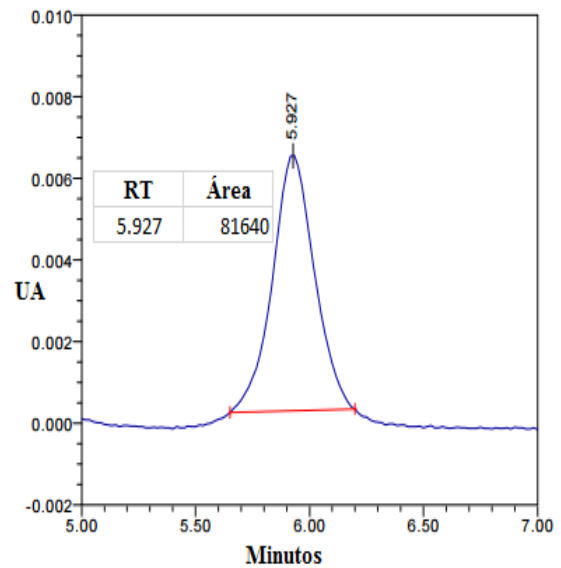
**Figura 3.30** – Cromatograma da solução padrão de Cloridrato de Tetraciclina para o estudo da estabilidade das soluções (instante  $t_0$ ).



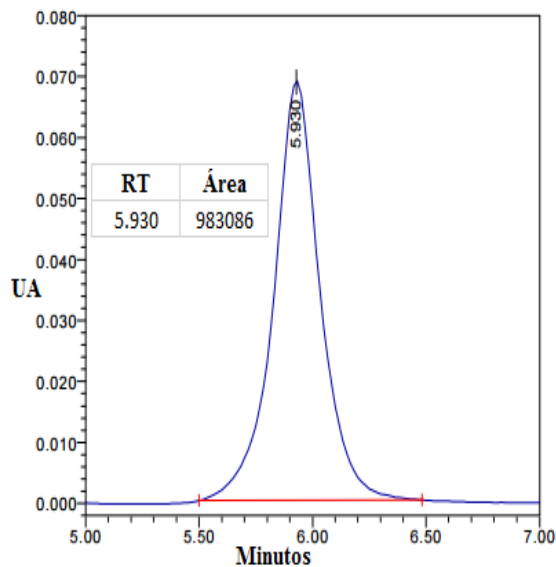
**Figura 3.31** – Cromatograma da solução padrão de Cloridrato de Tetraciclina para o estudo da estabilidade das soluções (instante  $t=12h$ ).



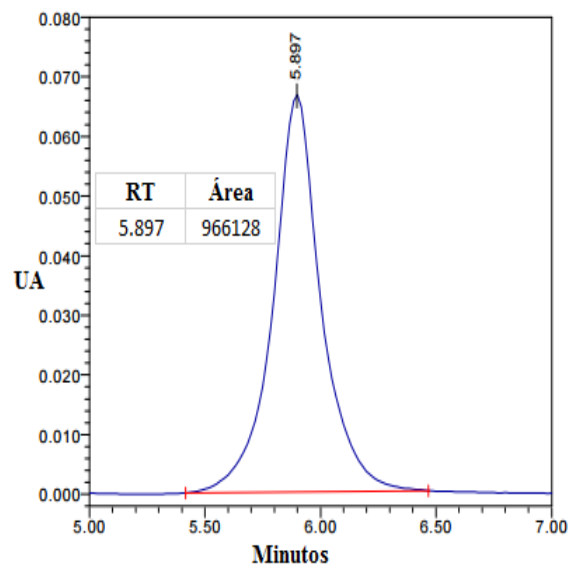
**Figura 3.32** – Cromatograma da solução correspondente à concentração equivalente ao LQ da impureza 4-ETC para o estudo da estabilidade das soluções (instante  $t_0$ ).



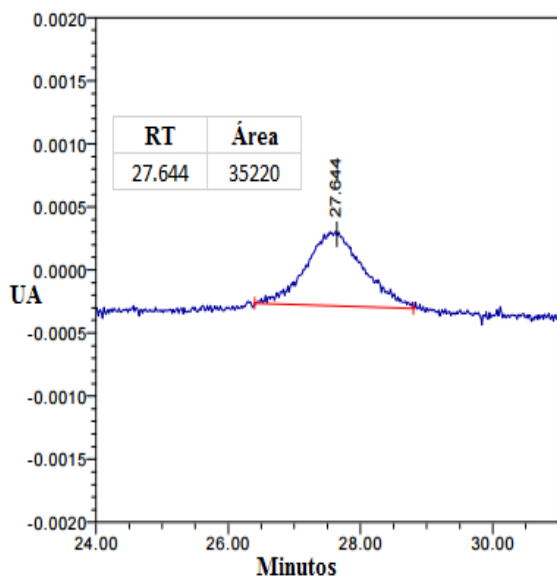
**Figura 3.33** – Cromatograma da solução corresponde à concentração equivalente ao LQ da impureza 4-ETC para o estudo da estabilidade das soluções (instante  $t=12h$ ).



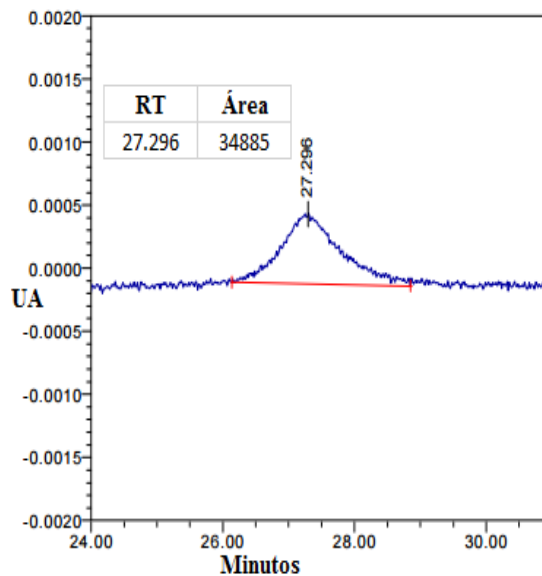
**Figura 3.34** – Cromatograma da solução correspondente à concentração equivalente ao LE da impureza 4-ETC para o estudo da estabilidade das soluções (instante  $t_0$ ).



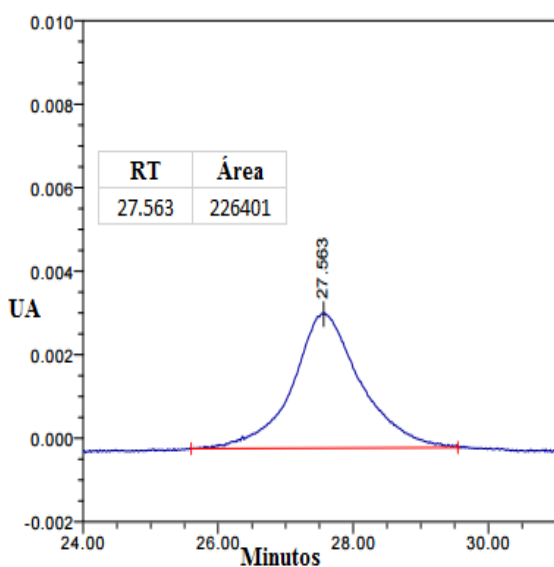
**Figura 3.35** - Cromatograma da solução corresponde à concentração equivalente ao LE da impureza 4-ETC para o estudo da estabilidade das soluções (instante  $t=12h$ ).



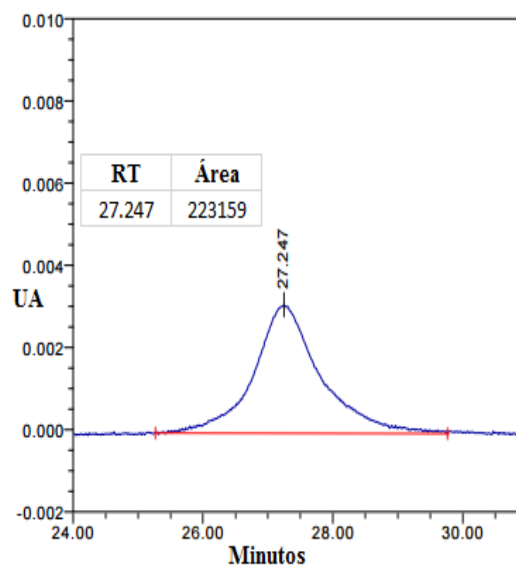
**Figura 3.36** - Cromatograma da solução correspondente à concentração equivalente ao LQ da impureza 4-EATC para o estudo da estabilidade das soluções (instante  $t_0$ ).



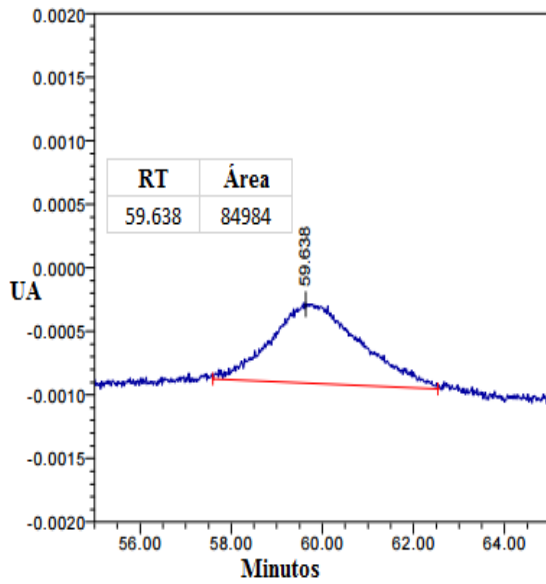
**Figura 3.37** - Cromatograma da solução corresponde à concentração equivalente ao LQ da impureza 4-EATC para o estudo da estabilidade das soluções (instante  $t=12h$ ).



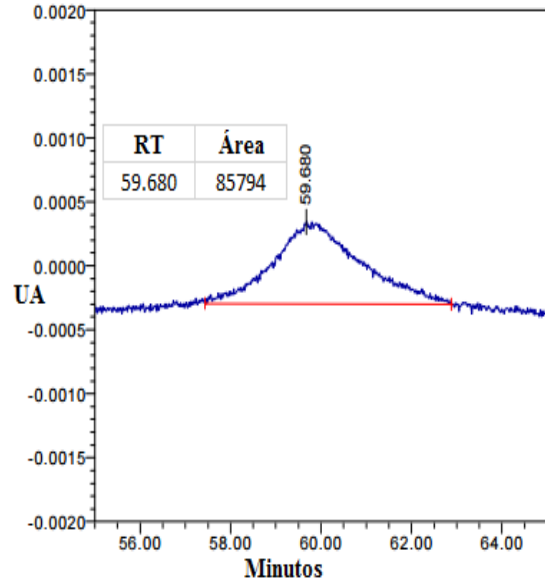
**Figura 3.38** - Cromatograma da solução correspondente à concentração equivalente ao LE da impureza 4-EATC para o estudo da estabilidade das soluções (instante  $t_0$ ).



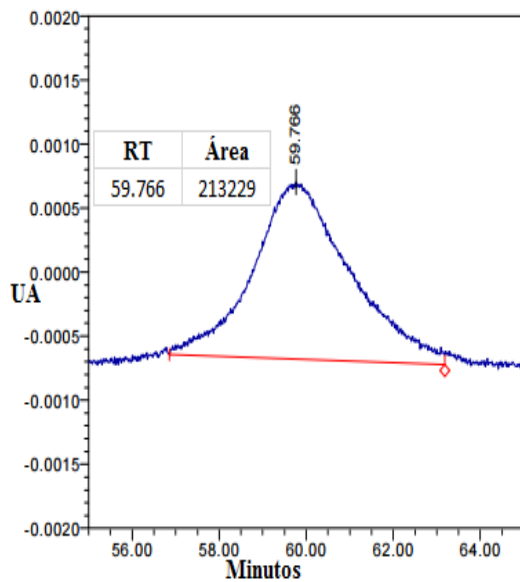
**Figura 3.39** - Cromatograma da solução corresponde à concentração equivalente ao LE da impureza 4-EATC para o estudo da estabilidade das soluções (instante  $t=12h$ ).



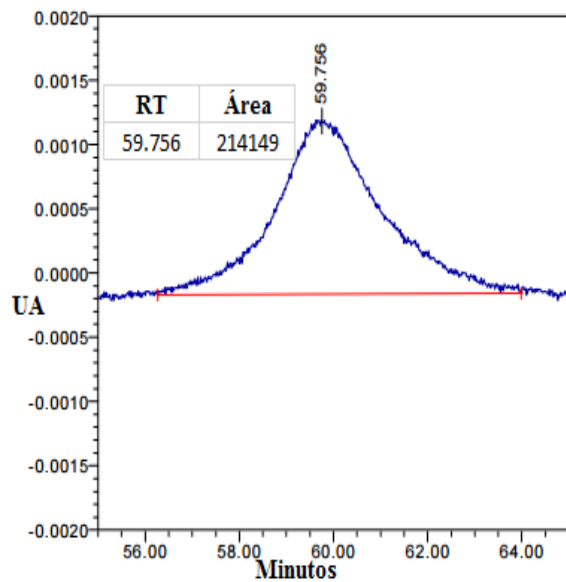
**Figura 3.40** - Cromatograma da solução correspondente à concentração equivalente ao LQ da impureza ATC para o estudo da estabilidade das soluções (instante  $t_0$ ).



**Figura 3.41** - Cromatograma da solução corresponde à concentração equivalente ao LQ da impureza ATC para o estudo da estabilidade das soluções (instante  $t=8h$ ).



**Figura 3.42** - Cromatograma da solução correspondente à concentração equivalente ao LE da impureza ATC para o estudo da estabilidade das soluções (instante  $t_0$ ).



**Figura 3.43** - Cromatograma da solução corresponde à concentração equivalente ao LE da impureza ATC para o estudo da estabilidade das soluções (instante  $t=8h$ ).

Pela análise da Tabela 3.19 e dos cromatogramas apresentados anteriormente conclui-se que os sinais obtidos das soluções de impurezas preparadas algumas horas antes da sua análise são considerados válidos, até um período máximo de 12 horas no caso das impurezas ETC e EATC e de 8 horas relativamente à impureza ATC.

### **3.2.9 Robustez**

O parâmetro da robustez de um método analítico é avaliado com o objetivo de demonstrar a confiabilidade de uma análise quando durante o processo podem ocorrer variações dos parâmetros do método.

No caso em estudo procedeu-se à variação do pH da fase móvel, temperatura da coluna e o fluxo da fase móvel. Assim, relativamente ao pH da fase móvel fez-se variar de 9 para 8,5 e 9,5, sendo que o valor intermédio é o considerado na farmacopeia. A variação da temperatura foi de 60°C para 58°C numa primeira alteração e para 62°C posteriormente. Por fim, ainda se estudou a variação do fluxo da fase móvel, ou seja de 1,0mL/min alterou-se primeiramente para 0,9mL/min e posteriormente para 1,3mL/min. Cada alteração foi feita individualmente, ou seja quando por exemplo se variou a temperatura da coluna para 58°C, o pH da fase móvel e o fluxo da fase móvel mantiveram-se como está descrito na farmacopeia (pH=9 e fluxo=1,0mL/min), sendo usado o mesmo raciocínio para as restantes alterações consideradas.

Na prática para cada alteração efetuada ao procedimento descrito na farmacopeia procedeu-se à análise de soluções dos diferentes padrões, tanto da substância ativa como das três impurezas em estudo. As soluções padrão das impurezas prepararam-se com concentrações equivalentes ao limite de especificação da respetiva impureza e o padrão de Cloridrato de Tetraciclina preparou-se com concentração igual a 1mg/mL como se encontra na farmacopeia.

Para o estudo da robustez procede-se à avaliação dos tempos de retenção correspondentes a cada impureza e qual a influência da alteração feita no método nos tempos de retenção do Cloridrato de Tetraciclina e das impurezas ETC, EATC e ATC. Os tempos relativos de retenção correspondentes a cada impureza encontram-se descritos na Tabela 3.20 para o caso das alterações da fase móvel (pH e fluxo da fase móvel) e na Tabela 3.21 os resultados obtidos relativamente à alteração da temperatura da coluna cromatográfica.

**Tabela 3.20** – Tempos relativos de retenção obtidos para o parâmetro da robustez (alteração da fase móvel).

<b>Impureza</b>	<b>pH=9 T=60°C Fluxo=1,0mL/ min</b>	<b>pH=8,5</b>	<b>pH=9,5</b>	<b>Fluxo 0,9mL/min</b>	<b>Fluxo 1,3mL/min</b>
<b>4-ETC</b>	0,62	0,54	0,67	0,62	0,60
<b>4-EATC</b>	3,11	2,36	3,70	3,00	3,08
<b>ATC</b>	6,72	6,28	7,29	6,57	6,81

**Tabela 3.21** – Tempos relativos de retenção obtidos para o parâmetro da robustez (alteração da temperatura da coluna cromatográfica).

<b>Impureza</b>	<b>pH=9 T=60°C Fluxo=1,0mL/min</b>	<b>T=58°C</b>	<b>T=62°C</b>
<b>4-ETC</b>	0,62	0,60	0,63
<b>4-EATC</b>	3,11	3,13	2,98
<b>ATC</b>	6,72	6,89	6,38

Pela análise da Tabela 3.20, referente às alterações realizadas na fase móvel verifica-se que o maior impacto prende-se com a variação do pH, ou seja, quando se altera o pH da fase móvel de 9 para 9,5 constata-se que os tempos relativos de retenção aumentam significativamente. O contrário acontece para o caso da diminuição do pH da fase móvel de 9 para 8,5. As impurezas que mais são afetadas com esta alteração são a 4-EATC e a ATC.

A variação da temperatura da coluna não altera significativamente os tempos relativos de retenção dos diferentes analitos analisados, tal aconteceu também com a alteração do fluxo da fase móvel. Desta forma, é possível considerar o método analítico robusto, ou seja pequenas alterações como as exemplificadas acima não originam resultados muito diferentes no método analítico.



## 4 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

O trabalho desenvolvido na empresa Cipan teve como objetivo central a planificação e execução da validação de um método analítico, aplicado a um sistema de cromatografia de alta eficiência (HPLC), com a finalidade de quantificar as impurezas do Cloridrato de Tetraciclina. O projeto desenvolvido acarreta uma extrema importância, uma vez que possibilita quantificar as impurezas em concentrações baixas e não apenas tendo em conta limites especificados. É também um projeto importante porque testar e validar o método permite verificar se é adequado e se pode posteriormente ser aplicado em análises de rotina no Laboratório de Controlo de Qualidade.

O procedimento para a realização da validação do método analítico foi feito tendo em conta documentos normativos específicos para a validação de impurezas e os critérios de aceitação utilizados para a validação encontram-se definidos por entidades reguladoras como o ICH, USP e EP.

A concretização da validação de um método analítico é essencial para que seja possível assegurar que as metodologias analíticas utilizadas são rigorosas, precisas, lineares e seletivas dentro de uma gama de valores, na qual o analito é avaliado. O objetivo final é obter um processo de validação bem definido e documentado, uma vez que desta forma é fornecida uma evidência objetiva de que o sistema que é usado para o método é adequado para o fim a que se destina.

Relativamente às amostras das soluções padrão das diferentes impurezas, verifica-se que estas são estáveis pelo menos durante 12 horas para o caso das soluções padrão das impurezas 4-Epitetraciclina e 4-Epianidrotetraciclina com concentrações equivalentes ao Limite de Quantificação (LQ) e Limite de Especificação (LE) respetivamente de cada impureza. As amostras de solução padrão da impureza Anidrotetraciclina também para concentrações equivalentes ao Limite de Quantificação (LQ) e Limite de Especificação (LE) são estáveis para um período de 8 horas. As soluções são estáveis, uma vez que o desvio padrão relativo entre as 0 horas e as 12 horas é inferior a 2% no caso das impurezas 4-Epitetraciclina e 4-Epianidrotetraciclina e, na impureza Anidrotetraciclina o valor de RSD é inferior a 2% entre as 0 horas e as 8 horas.

Na Tabela 4.1 encontram-se representados resumidamente os resultados obtidos para a validação do método analítico, ou seja os valores dos diferentes parâmetros de validação relativamente às três impurezas do Cloridrato de Tetraciclina.

**Tabela 4.1** – Resultados dos parâmetros de validação do método analítico de HPLC para as impurezas do Cloridrato de Tetraciclina.

Parâmetros	Resultados	Critérios de Aceitação
<b>Linearidade</b>	4-Epitetraciclina: 0,0031 mg/mL to 0,0376 mg/mL $r = 0,9977$ 4-Epianidrotetraciclina: 0,001 mg/mL to 0,006 mg/mL $r = 0,9979$ Anidrotetraciclina: 0,0023 mg/mL to 0,0056 mg/mL $r = 0,9988$	$r \geq 0,99$
<b>LQ</b>	4-Epitetraciclina: 0,003 mg/mL S/N = 13,8 and RSD = 1,0% 4-Epianidrotetraciclina: 0,001 mg/mL S/N = 10,5 and RSD = 3,8% Anidrotetraciclina: 0,0024 mg/mL S/N = 12,8 and RSD = 0,4%	S/N $\geq 10$ e RSD $\leq 10\%$
<b>LD</b>	4-Epitetraciclina: 0,001 mg/mL S/N = 6,6 and RSD = 1,5% 4-Epianidrotetraciclina: 0,0006 mg/mL S/N = 5,9 and RSD = 2,1% Anidrotetraciclina: 0,001 mg/mL S/N = 4,5 and RSD = 0,7%	S/N $\geq 3$ e RSD $\leq 10\%$
<b>Seletividade e Especificidade</b>	<b>Resolução (R) entre cada impureza e o Cloridrato de Tetraciclina:</b> 4-Epitetraciclina <b>R = 2,6</b> 4-Epianidrotetraciclina <b>R = 12,4</b> Anidrotetraciclina <b>R = 32,6</b>  <b>Resolução (R) entre impurezas consecutivas:</b> 4-Epitetraciclina e 4-Epianidrotetraciclina <b>R = 26,0</b> 4-Epianidrotetraciclina e Anidrotetraciclina <b>R = 30,5</b>	Resolução (R) $\geq 1,5$ (resolução entre cada impureza e o Cloridrato de Tetraciclina) Resolução (R) $\geq 1,5$ (resolução entre impurezas consecutivas).
<b>Exatidão</b>	4-Epitetraciclina: Recuperação: 106,0% a 108,8% 4-Epianidrotetraciclina: Recuperação: 107,7% a 107,2% Anidrotetraciclina: Recuperação: 105,6% a 108,1%	Recuperação: 90% - 110%
<b>Repetibilidade</b>	4-Epitetraciclina: RSD = 3,6% 4-Epianidrotetraciclina: RSD(1) = 0,7% RSD(2) = 0,9% RSD(3) = 1,5% Anidrotetraciclina: RSD = 8,8%	RSD $\leq 10$
<b>Precisão Intermédia</b>	4-Epitetraciclina: RSD = 7,1% 4-Epianidrotetraciclina: RSD(1) = 0,7% RSD(2) = 0,5% RSD(3) = 2,2% Anidrotetraciclina: RSD = 5,9%	RSD $\leq 10$
<b>Robustez</b>	O tempo de retenção relativo de cada impureza não é significativamente afetado pelas alterações efetuadas à fase móvel nem à temperatura da coluna cromatográfica.	

O método atende aos limites pré estabelecidos para os parâmetros de validação e um método analítico de HPLC, o qual apresenta uma boa especificidade, linearidade para as impurezas com  $R^2 \geq 0,99$ , exatidão com recuperação entre os 90% - 110% e precisão com  $RSD \leq 10\%$ .

O método foi validado para um intervalo de concentrações desde o limite de quantificação da impureza até 120% do seu limite de especificação. Foram determinados os limites de quantificação e limite de detecção para cada impureza, com concentrações equivalentes ao S/N superior a 3 para o LD e superior a 10 para o LQ.



## 5 TRABALHOS FUTUROS

---

Como proposta para trabalhos futuros pode ser sugerido um estudo mais aprofundado relativamente à robustez do método, uma vez que poderiam ser estudadas outras alterações do método, principalmente a quantidade do Butanol Terciário da fase móvel porque é um composto que influencia o tempo de corrida das amostras.

No futuro pode ainda ser feito um estudo da influência do pH das soluções da fase móvel no tempo de corrida também das amostras. Outra sugestão para trabalho futuro passa pelo cálculo das quantidades de impurezas usando apenas o fator de resposta, sendo vantajoso na rotina do laboratório uma vez que por este método é necessário utilizar apenas padrões e, conseqüentemente o processo torna-se mais económico.



## 6 BIBLIOGRAFIA

---

- [1] “AtralCipan” [Online]. Disponível em: <http://www.atralcipan.com/atralcipan/historia>. [Acedido em 17 de Março de 2016].
- [2] “AtralCipan” [Online]. Disponível em: <http://www.atralcipan.com/atralcipan/empresas-do-grupo>. [Acedido em 17 de Março de 2016].
- [3] MARCELINO, Irina. (24 de Julho 2012). “Quem é quem na Indústria Farmacêutica – Conheça as empresas farmacêuticas que mais apostam nas exportações”. *Diário Económico*, Lisboa.
- [4] “Cipan” [Online]. Disponível em: <http://www.atralcipan.com/cipan/principios-farmaceuticos-activos/principios-activos>. [Acedido em 17 de Março de 2016].
- [5] “Cipan” [Online]. Disponível em: <http://www.atralcipan.com/cipan/sobre-a-cipan/evolucao-dos-negocios>. [Acedido em 17 de Março de 2016].
- [6] Pereira-Maia, E.C., P. Silva, W. Batista de Almeida, H. Santos, B. Marcial, R. Ruggiero, and W. Guerra, *Tetraciclinas e glicilciclinas; uma visão geral*. *Química Nova* [online], 2010. 33(3): p.700-706.
- [7] Sigma-Aldrich. 87128. Disponível em:  
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/87128?lang=pt&region=PT>. [Acedido em 14 de Abril de 2016].
- [8] “Sociedade Portuguesa de Química” [Online]. Disponível em:  
<http://www.spq.pt/magazines/BSPQ/624/article/30001284/pdf>. [Acedido em 5 de Abril de 2016].
- [9] Prabu, S. Lakshmana, and T. N. K. Suriyaprakash. “Impurities and Its Importance in Pharmacy.” *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 3, no. 2 (2010): p.66-71.
- [10] ICH, *Guidance for Industry, Impurities in New Drug Substance Q3A(R2)*. 2006.
- [11] General chapter 5.10. Control of impurities in substances for pharmaceutical use and general monograph (2008)
- [12] Portal laboratórios virtuais de processos químicos. Disponível em:  
[http://labvirtual.eq.uc.pt/siteJoomla/index.php?Itemid=451&id=103&option=com\\_content&task=view](http://labvirtual.eq.uc.pt/siteJoomla/index.php?Itemid=451&id=103&option=com_content&task=view). [Acedido em 14 de Abril de 2016].

- [13] LANÇAS, Fernando M. *Cromatografia em fase gasosa*. São Carlos: Acta, 1993. p.254.
- [14] “Química Suprema” [Online]. Disponível em: <http://www.quimicasuprema.com/2013/12/o-que-e-cromatografia.html> [Acedido em 2016 15 de Abril].
- [15] Tonhi, Edivan, Kenneth E. Collins, ICSF Jardim, and Carol H. Collins. “Fases Estacionárias Para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Em Fase Reversa (CLAE-FR) Baseadas Em Superfícies de Óxidos Inorgânicos Funcionalizados.” *Quim. Nova* 25, no. 4 (2002): 616–623.
- [16] Martin, A. J. P., and R. L. M. Synge. “A New Form of Chromatogram Employing Two Liquid Phases.” *Biochemical Journal* 35, no. 12 (December 1941): 1358–68.
- [17] COLLINS, Carol H. “III. Os Primórdios Da Cromatografia Líquido-Líquido.” [Online]. Disponível em: <http://scientiachromatographica.com/files/v1n3/v1n3a1.pdf> [Acedido em 15 de Abril de 2016].
- [18] COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. *Fundamentos de cromatografia*. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. 452p.
- [19] HARRIS, Daniel C. *Quantitative Chemical Analysis*. 7th ed. W. H. Freeman and Company, 2007.
- [20] ADÃO, Daniele, “Métodos Cromatográficos – Introdução a Cromatografia”, Faculdade Educacional de Araucária [Online]. Disponível em: [http://200.195.175.98/Materiais/1969\\_779.pdf](http://200.195.175.98/Materiais/1969_779.pdf) [Acedido em 20 de Abril de 2016].
- [21] Skoog, D., West, D., Holler, F., Crouch, S., *Fundamentals of Analytical Chemistry*. Nelson Education, 2013.
- [22] “Ion Chromatography” [Online]. Disponível em: <http://machias.edu/ICElectronic-learning-module.html> [Acedido em 20 de Abril de 2016].
- [23] M., Yasser, and Rania E. “Ion Exchange Chromatography - An Overview.” In *Column Chromatography*, edited by Dean Martin. InTech, 2013.
- [24] HARRIS, Daniel C. *Exploring Chemical Analysis*. 4th ed. W. H. Freeman and Company, 2009.
- [25] GUIMARÃES, Luis F. Lopes; COLLINS, CAROL H. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: *Introdução a métodos cromatográficos*. 7ª ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1997.
- [26] “Cromatografia Líquida de Alta Eficiência” [Online]. Disponível em: <http://analiticaqmc.paginas.ufsc.br/files/2013/05/aula-HPLC-daniel.pdf> [Acedido em 15 de Abril de 2016]

- [27] Waters, “How Does High Performance Liquid Chromatography Work?”, Waters, 2015. [Online]. Disponível em: [http://www.waters.com/waters/en\\_US/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en\\_US%3E](http://www.waters.com/waters/en_US/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en_US%3E). [Accessed: 2016 15 de Abril].
- [28] ADÃO, Daniele, “*Métodos Cromatográficos – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência*”, Faculdade Educacional de Araucária [Online]. Disponível em: [http://200.195.175.98/Materiais/2030\\_806.pdf](http://200.195.175.98/Materiais/2030_806.pdf) [Acedido em 20 de Abril de 2016].
- [29] CHUST, Rafael. “Introdução à Cromatografia de Líquidos (HPLC)”, 1990 [Online]. Disponível em: <http://www.spq.pt/magazines/BSPQ/563/article/3000458/pdf> [Acedido em 20 de Abril de 2016].
- [30] MINICURSOS CRQ-IV-2010” [Online] Disponível em: [http://www.crq4.org.br/sms/files/file/conceitos\\_hplc\\_2010.pdf](http://www.crq4.org.br/sms/files/file/conceitos_hplc_2010.pdf) [Acedido em 20 de Abril de 2016]
- [31] COSTA PESSOA, João (1993) Técnicas Experimentais, Departamento de Química, Instituto Superior Técnico de Lisboa. Disponível em: <http://www.spq.pt/magazines/BSPQ/574/article/3000592/pdf> [Acedido em 21 de Abril de 2016]
- [32] WEBSTER, E. (16/12/13). Peer Reviewed: Method Validation. Statistical Analysis in Analytical Method Validation|IVT-JVT. Disponível em: <http://www.ivtnetwork.com/article/statistical-analysis-analytical-method-validation>. [Acedido em 16 de Junho de 2016];
- [33] ICH Q1A (R2), *Stability testing of new drug substances and products*, 2003.
- [34] ICH. *ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. in *CPMP/ICH/381/95.1995*.
- [35] Chung Chow Chan, P.D., *Potency Method Validation, in Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification*, Y.C.L. Chung Chow Chan, Herman Lam, Xue-Ming Zhang, Editor. 2004, John Wiley & Sons, Inc.: New Jersey. p. 11-26.
- [36] FERREIRA, António - Validação de Métodos Analíticos [projeção visual]. Waters, The Science of What’s Possible, 2014.
- [37] CTR03, *Guia RELACRE 13: Validação de métodos internos de ensaio em análise química*. 2000, Lisboa.

- [38] Leadbetter, M. G. (7, November, 2005), "Guidance for Industry, Validation of Analytical Procedures for Type C Medicated Feeds, U. S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Veterinary Medicine, Rockville".
- [39] R. J.F.G and Z. L. Pereira, "QUALIDADE: Planejamento e Controle Estatístico de Processos," Prefácio, 2008.
- [40] Lee, Y.C., *Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification*, in *Method validation for HPLC analysis of related substances in pharmaceutical drug products*, I. John Wiley & Sons, Editor. 2004. p. 27-49.
- [41] "Tabelas de Frequência." Disponível em:  
<http://stat2.med.up.pt/cursop/glossario/dpadrao.html> [Acedido em 11 de Agosto de 2016]
- [42] Chung Chow Chan, P.D., *Method Validation for HPLC Analysis of Related Substances in Pharmaceutical Drug Products*, in *Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification*, Y.C.L. Chung Chow Chan, Herman Lam, Xue-Ming Zhang, Editor. 2004, John Wiley & Sons, Inc.: New Jersey. p. 27-49.
- [43] AMARANTE Jr., O. P. de; CALDAS, E. P. A.; BRITO, N. M.; SANTOS, T. C. R. dos; VALE, M. L. B. F. *Validação de métodos analíticos: uma breve revisão*. Cad. Pesq., v. 12, p. 116-131, 2001.

## 7 ANEXOS

---

### I. Linearidade do método analítico

Para o estudo da linearidade do método analítico encontram-se nas Tabelas I.1 à I.3 os resultados mais relevantes desse parâmetro de validação para as três impurezas em estudo (4-ETC, 4-EATC e ATC). Nas tabelas I.4 à I.6 representam-se os resultados obtidos para a regressão, através da ANOVA, também para as três impurezas.

**Tabela 7.1** – Resultados para o estudo da linearidade da impureza 4-Epitetraciclina.

Concentração (mg/mL)	Área Média do Sinal (UA*min)	RSD (%)	Critério
$3,13 \times 10^{-3}$	67643	0,48	RSD $\leq$ 10%
$1,04 \times 10^{-2}$	270645	0,15	
$1,67 \times 10^{-2}$	425578	0,53	
$2,40 \times 10^{-2}$	638919	0,57	
$3,13 \times 10^{-2}$	831023	0,62	
$3,76 \times 10^{-2}$	1054332	1,76	

**Tabela 7.2** – Resultados para o estudo da linearidade da impureza 4-Epianidrotetraciclina.

Concentração (mg/mL)	Área Média do Sinal (UA*min)	RSD (%)	Critério
$1,01 \times 10^{-3}$	30623	0,30	RSD $\leq$ 10%
$2,02 \times 10^{-3}$	71887	0,84	
$3,16 \times 10^{-3}$	131127	0,41	
$4,21 \times 10^{-3}$	191982	0,97	
$5,02 \times 10^{-3}$	232746	1,08	
$6,02 \times 10^{-3}$	288669	1,37	

**Tabela 7.3** – Resultados para o estudo da linearidade da impureza Anidrotetraciclina.

Concentração (mg/mL)	Área Média do Sinal (UA*min)	RSD (%)	Critério
2,25x10 <sup>-3</sup>	93641	0,15	RSD ≤ 10%
3,01x10 <sup>-3</sup>	139346	0,11	
3,63x10 <sup>-3</sup>	179349	0,22	
4,28x10 <sup>-3</sup>	217609	0,15	
4,96x10 <sup>-3</sup>	254326	0,12	
5,61x10 <sup>-3</sup>	289805	0,15	

**Tabela 7.4** – Dados relativamente à ANOVA da regressão linear da impureza 4-Epitetraciclina.

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,998862
Quadrado de R	0,997725
Quadrado de R ajustado	0,997157
Erro-padrão	19481
Observações	6

<b>ANOVA</b>					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	6,66E+11	6,66E+11	1755	1,94E-06
Residual	4	1518075498	379518874		
Total	5	6,67E+11			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interceptar	-30566	15939	-1,92	0,13	-74820	13687
Variável X 1	28172138	672573	41,89	1,94E-06	26304777	30039499

**Tabela 7.5** – Dados relativamente à ANOVA da regressão linear da impureza 4-Epianidrotetraciclina.

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,998956
Quadrado de R	0,997913
Quadrado de R ajustado	0,997391
Erro-padrão	5014
Observações	6

<b>ANOVA</b>					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	48077896435	48077896435	1912	1,63E-06
Residual	4	100556291	25139073		
Total	5	48178452726			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interceptar	-28422	4725	-6,01	3,85E-03	-41542	-15302
Variável X 1	52144630	1192371	43,73	1,63E-06	48834077	55455183

**Tabela 7.6** – Dados relativamente à ANOVA da regressão linear da impureza Anidrotetraciclina.

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,999382118
Quadrado de R	0,998764617
Quadrado de R ajustado	0,998455772
Erro-padrão	2867,955214
Observações	6

<b>ANOVA</b>					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	26599067764	26599067764	3234	5,73E-07
Residual	4	32900668	8225167		
Total	5	26631968432			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interceptar	-35899	4237	-8,47	1,06E-03	-47664	-24135
Variável X 1	58526569	1029182	56,87	5,73E-07	55669102	61384037

A linearidade do método analítico foi avaliada recorrendo a um modelo estatístico discriminado na norma ISO 8466-1, o qual foi aplicado a um conjunto de pares ordenados, ou seja, o estudo foi feito a cada impureza (4-ETC, 4-EATC e ATC). Tomando como referência esta norma começou por se traçar a linha de regressão e, posteriormente utilizando o método dos mínimos quadrados determinou-se a expressão analítica (reta  $y=mx+b$ ), onde  $y$  representa a resposta obtida pelo equipamento cromatográfico,  $x$  diz respeito às concentrações de cada padrão de impureza utilizado,  $m$  define o declive da reta (Equação 7.1),  $b$  representa a ordenada na origem (Equação 7.2) e  $r$  expressa o valor do coeficiente de correlação (Equação 7.3). Além disso, a norma ainda sugere o cálculo do desvio residual da reta de regressão ( $S_{y/x}$ ) através da Equação 7.4.

$$m = \frac{\sum_{i=1}^N [(x_i - \bar{x}) \times (y_i - \bar{y})]}{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \quad (7.1)$$

$$b = \bar{y} - b \times \bar{x} \quad (7.2)$$

$$r = \frac{\sum_{i=1}^N [(x_i - \bar{x}) \times (y_i - \bar{y})]}{\sqrt{[\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 \times \sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2]}} \quad (7.3)$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [y_i - (a + b \times x_i)]^2}{N - 2}} \quad (7.4)$$



## I. Cálculo do Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Nesta secção encontra-se explicado detalhadamente o cálculo da razão sinal/ruído (S/N), o qual é utilizado para determinar o limite de deteção (LD) e do limite de quantificação (LQ) correspondente a cada impureza em estudo. Assim, o S/N foi determinado através da análise cromatográfica de concentrações das impurezas sucessivamente diluídas, com o objetivo de encontrar o valor de S/N o mais próximo possível de 3 para o caso do limite de deteção ( $S/N \geq 3$ ) e próximo de 10 para o limite de quantificação ( $S/N \geq 10$ ). O sinal/ruído correspondente aos limites foi calculado utilizando as equações 7.5 e 7.6, através da comparação dos sinais obtidos para a amostra de cada impureza com determinada concentração e o sinal da amostra de um branco (HCl 0.01M) relativamente ao mesmo tempo de retenção.

$$S/N = \frac{2 \times H}{h} \quad (7.5)$$

Na Equação 7.5, H representa a altura do pico da impureza (cm). A altura do sinal de base do branco (h), medido em cm, é determinado através do máximo e do mínimo do sinal observado para o branco a uma distância igual a 5 vezes a largura a meia altura (Equação 7.6) em que o ponto intermédio corresponde ao tempo de retenção da impureza. Na equação 7.6, l representa a largura medida para o ruído do branco no mesmo tempo de retenção ( $t_r$ ), em cm, e y diz respeito à altura do pico à meia altura (cm).

$$l = 5 \times y \quad (7.6)$$



## II. Resultados da ANOVA para o estudo da Precisão

Nas Tabelas 7.7 à 7.9 encontram-se os resultados da ANOVA para o estudo da precisão intermédia avaliada para dois analistas e dias diferentes. Relativamente a este teste, a hipótese nula significa que os dois grupos apresentam médias iguais, ou seja, quando  $F_0 \leq F$  crítico a hipótese nula é verdadeira. Este teste foi realizado apenas para a impureza 4-Epitetraciclina e Anidrotetraciclina.

**Tabela 7.7** – Resultados da ANOVA para o estudo da precisão intermédia da impureza 4-Epitetraciclina.

<b>SUMÁRIO</b>				
<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
18/07/2016	6	0,12	0,02	4,83E-07
19/07/2016	6	0,12	0,02	2,10E-06

<b>ANOVA</b>						
<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	4,92E-06	1	4,92E-06	3,81	0,08	4,96
Dentro de grupos	1,29E-05	10	1,29E-06			
<b>Total</b>	<b>1,79E-05</b>	<b>11</b>				

**Tabela 7.8** – Resultados da ANOVA para o estudo da precisão intermédia da impureza Anidrotetraciclina.

<b>SUMÁRIO</b>				
<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
28/07/2016	6	0,02	2,55E-03	5,08E-08
15/06/2016	6	0,01	2,45E-03	2,13E-08

<b>ANOVA</b>						
<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	3,10E-08	1	3,10E-08	0,86	0,38	4,96
Dentro de grupos	3,60E-07	10	3,60E-08			
<b>Total</b>	<b>3,91E-07</b>	<b>11</b>				