



**Diana Isabel Teixeira Sousa**

Licenciatura em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica

**Validação de Método Analítico por Cromatografia  
Líquida de Alta Eficiência (HPLC) de um  
Medicamento de associação dupla (20mg + 40mg)**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Química e Bioquímica

Orientadora: Engenheira Clárisse Lourenço dos Santos Penedo,  
Diretora do Laboratório de Ensaios, Tecnimed S.A.

Coorientador: Professor Doutor Mário Fernando José Eusébio,  
Professor Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia –  
Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Pedro Miguel Calado Simões

Arguente: Prof. Doutora Elvira Maria Mendes Sardão Monteiro Gaspar

Vogal: Eng.<sup>a</sup> Clárisse Lourenço dos Santos Penedo



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Setembro de 2018**

**Diana Isabel Teixeira Sousa**

Licenciatura em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica

**Validação de Método Analítico por Cromatografia  
Líquida de Alta Eficiência (HPLC) de um  
Medicamento de associação dupla (20mg + 40mg)**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Química e Bioquímica

Orientadora: Engenheira Clárisse Lourenço dos Santos Penedo,  
Diretora do Laboratório de Ensaios, Tecnimed S.A.

Coorientador: Professor Doutor Mário Fernando José Eusébio,  
Professor Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia –  
Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Pedro Miguel Calado Simões

Arguente: Prof. Doutora Elvira Maria Mendes Sardão Monteiro Gaspar

Vogal: Eng.ª Clárisse Lourenço dos Santos Penedo

**Setembro de 2018**

“Validação de Método Analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) de um Medicamento de associação dupla (20mg + 40mg)” *Copyright* ©, Diana Isabel Teixeira Sousa, FCT/UNL e UNL.

#### **Indicação dos direitos de cópia**

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 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.

#### ***Copyright* ©**

Faculdade de Ciências e Tecnologia and Universidade Nova de Lisboa have the perpetual right with no geographical boundaries, to archive and publish this dissertation through printed copies reproduced on paper or digital form or by any means known or to be invented, and to divulge through scientific repositories and admit your copy and distribution for educational purposes or research, not commercial, as long as the credit is given to the author and editor.

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, quero agradecer ao Grupo Tecnimede, especialmente ao Dr. João Serra, por me ter concedido a oportunidade de realizar este estágio na empresa.

Seguidamente, gostaria de agradecer à Eng.<sup>a</sup> Clarisse Penedo, não só pela orientação e conhecimento que me transmitiu, permitindo-me solucionar e ultrapassar vários problemas que surgiram durante a realização deste trabalho, como também por todo o seu apoio incondicional e disponibilidade ao longo deste período.

Relativamente aos colaboradores do Laboratório de Ensaios, tenho um grande reconhecimento por todos eles pois receberam-me e trataram-me de uma forma muito simpática e única que me fez sentir bem acolhida e muito bem-recebida. Entre os mesmos, destacou-se uma pessoa que se revelou muito importante nesta etapa, sendo esta a Diana Parreira, a quem eu quero expressar um especial agradecimento por toda a amizade, companheirismo, apoio e conhecimento partilhado ao longo destes seis meses.

Ao professor Mário Eusébio, agradeço a orientação e apoio na realização e elaboração desta dissertação.

A todos os meus amigos que me acompanharam, não só nesta última fase como também durante estes cinco anos académicos de esforço e dedicação, agradeço todo apoio e amizade.

Por último, tenho uma enorme gratidão para com os meus pais, Jorge Sousa e Maria Filomena Sousa, e irmão, Pedro Sousa, pelo apoio incondicional, incentivo, amizade e ajuda em todas as etapas do meu percurso académico. Sem eles nada disto teria sido possível.



## **Resumo**

Com a evolução dos meios de informação e comunicação, tornando o consumidor mais consciente e com uma maior atenção na escolha dos produtos adquiridos, a implementação de programas de controlo e garantia de qualidade mais robustos tornou-se numa mais-valia. Deste modo, a validação detalhada de métodos analíticos é uma ferramenta necessária e essencial para estabelecer um elevado padrão de qualidade.

No presente trabalho descreve-se a validação de um método analítico para a quantificação do ensaio de dissolução através de uma análise cromatográfica (HPLC). O ensaio é utilizado no controlo de qualidade de um medicamento – sob forma sólida oral (comprimido) de associação dupla de substâncias ativas (ativo X +ativo Y).

Para esta validação consideraram-se como referências a Farmacopeia dos Estados Unidos da América (USP) e a Farmacopeia Europeia (Ph. Eur.), e, ainda, as diretrizes da *International Conference on Harmonization* (ICH).

Relativamente aos resultados obtidos, estes demonstram que o ensaio é específico, linear, exato, preciso e robusto na gama de trabalho, uma vez que, os critérios de aceitação estabelecidos foram cumpridos e respeitados.

Finalmente, classifica-se o ensaio como validado e conclui-se que o método desenvolvido e validado é adequado para o seu propósito final.

Palavras-chave: Validação de Métodos Analíticos, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), Qualidade, Indústria Farmacêutica.



## **Abstract**

The recently change in consumers' perception regarding the quality of products has led to an improved focus on quality control implementation and assurance programs. Thereafter, the validation of analytical methods is one of the necessary and essential tools for establishing a high quality standard in ensuring products quality.

In this document is described the validation of a dissolution assay present on an analytical method used on the quality control of a drug, which is based on a double association of active substances (ative X + ative Y), involving high performance liquid chromatography (HPLC).

During this validation, some references were taken such as the United States of America Pharmacopeia (USP) and the European Pharmacopeia (Ph. Eur.), and, also, the guidelines of the International Conference on Harmonization (ICH).

The experimental results obtained, are the proof that this assay is selective, specific, linear, accurate, precise and robust in the working range, fulfilling all the acceptance criteria for this validation.

In this work we conclude that this assay can be classified as validated and that this developed and validated method is suitable for its purpose.

**Keywords:** Validation of analytical methods, High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Quality, Pharmaceutical Industry.



## Índice

<b>1</b>	<b>Capítulo I - Introdução .....</b>	<b>1</b>
1.1	Objetivo e Estrutura da Dissertação .....	1
1.2	Enquadramento .....	2
<b>2</b>	<b>Capítulo II - Fundamentos Teóricos.....</b>	<b>5</b>
2.1	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	5
2.2	Validação de Método Analítico .....	9
2.3	Ensaio de Dissolução.....	15
<b>3</b>	<b>Capítulo III – Materiais e Métodos.....</b>	<b>19</b>
<b>4</b>	<b>Capítulo IV - Apresentação e Discussão de Resultados .....</b>	<b>23</b>
4.1	Adequabilidade do sistema .....	23
4.2	Especificidade .....	26
4.3	Linearidade .....	40
4.4	Limite de Quantificação ( <i>LoQ</i> ).....	47
4.5	Limite de Detecção ( <i>LoD</i> ).....	51
4.6	Precisão .....	54
4.7	Exatidão.....	61
4.8	Robustez .....	65
<b>5</b>	<b>Capítulo V – Conclusão e Proposta de Trabalho Futuro .....</b>	<b>69</b>
	<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>71</b>



## Índice de Figuras

Figura 2.1 Componentes de um sistema HPLC. ....	7
Figura 2.2 Demonstração da identificação dos analitos .....	8
Figura 2.3 Determinação do tempo de retenção.....	10
Figura 2.4 Cálculo da Resolução. ....	10
Figura 2.5 O efeito na resolução na separação dos picos cromatográficos .....	11
Figura 2.6 Cálculo do Fator de Simetria.....	12
Figura 2.7 Aparelho de Dissolução. ....	17
Figura 4.1 Cromatograma da solução padrão de trabalho. ....	27
Figura 4.2 Cromatograma da solução amostra.....	27
Figura 4.3 Cromatograma do meio de dissolução HCl 0,1N. ....	27
Figura 4.4 Cromatograma da solução placebo. ....	28
Figura 4.5 Cromatograma do branco da substância x – (Metanol).....	28
Figura 4.6 Cromatograma do branco da substância y – (H <sub>2</sub> O:ACN) (82:18). ....	28
Figura 4.7 Cromatograma da solução padrão de trabalho. ....	29
Figura 4.8 Cromatograma da solução amostra.....	29
Figura 4.9 Cromatograma do meio de dissolução Ph.Eur Tampão Fosfato pH 4,5.....	30
Figura 4.10 Cromatograma da solução placebo. ....	30
Figura 4.11 Cromatograma do branco da substância y – (H <sub>2</sub> O:ACN) (82:18). ....	30
Figura 4.12 Cromatograma da solução padrão de trabalho. ....	31
Figura 4.13 Cromatograma da solução amostra.....	32
Figura 4.14 Cromatograma do meio de dissolução USP Tampão Fosfato pH 6,8. ....	32
Figura 4.15 Cromatograma da solução placebo. ....	32
Figura 4.16 Cromatograma do branco da substância y– (H <sub>2</sub> O:ACN) (82:18).....	33
Figura 4.17 Cromatograma da solução padrão de trabalho. ....	33
Figura 4.18 Cromatograma da solução amostra.....	34
Figura 4.19 Cromatograma do meio de dissolução Ph.Eur. Tampão fosfato pH 4,5+2% Tween80®. ....	34
Figura 4.20 Cromatograma da solução placebo. ....	34
Figura 4.21 Cromatograma do branco da substância x – (Metanol).....	35
Figura 4.22 Cromatograma da solução padrão de trabalho. ....	35
Figura 4.23 Cromatograma de solução amostra.....	36
Figura 4.24 Cromatograma do meio de dissolução USP Tampão Fosfato pH 6,8+3% Tween80®.....	36
Figura 4.25 Cromatograma da solução placebo. ....	36
Figura 4.26 Cromatograma do branco da substância x – (Metanol).....	37
Figura 4.27 Varrimento e espectro 3D da solução padrão.....	38
Figura 4.28 Espectro 3D da Solução Padrão com máxima absorção a 225nm. ....	38
Figura 4.29 Varrimento e espectro 3D da solução amostra.....	39
Figura 4.30 Espectro 3D da Solução Amostra com máxima absorção a 225nm. ....	38
Figura 4.31 Varrimento e espectro 3D do meio de dissolução HCl 0,1N. ....	40
Figura 4.32 Retas de regressão linear para o meio HCl 0,1N.....	41
Figura 4.33 Distribuição dos resíduos. ....	41
Figura 4.34 Retas de regressão linear para o meio HCl 0,1N.....	42
Figura 4.35 Distribuição dos resíduos. ....	42
Figura 4.36 Retas de regressão linear para o Ph.Eur. Tampão Fosfato pH 4,5.....	43
Figura 4.37 Distribuição dos resíduos. ....	43
Figura 4.38 Retas de regressão linear para o USP Tampão Fosfato pH 6,8. ....	44
Figura 4.39 Distribuição dos resíduos. ....	44
Figura 4.40 Retas de regressão linear para o Ph.Eur. Tampão Fosfato pH 4,5+2% Tween80®. ....	45
Figura 4.41 Distribuição dos resíduos. ....	45
Figura 4.42 Retas de regressão linear para o tampão fosfato pH 6,8+3% tween80. ....	46
Figura 4.43 Distribuição dos resíduos. ....	46
Figura 4.44 Cromatograma da quantificação do <i>LoQ</i> da substância x. ....	49
Figura 4.45 Cromatograma da quantificação do <i>LoQ</i> da substância y. ....	50
Figura 4.46 Cromatograma da quantificação do <i>LoD</i> da substância x. ....	52
Figura 4.47 Cromatograma da quantificação do <i>LoD</i> da substância y. ....	53



## Índice de Tabelas

Tabela 3.1 Condições do ensaio de dissolução para substância ativa y.....	19
Tabela 3.2 Condições do ensaio de dissolução da substância ativa x.....	20
Tabela 3.3 Condições cromatográficas do sistema. ....	20
Tabela 4.1 Adequabilidade do sistema do ativo x no meio HCl 0,1N.....	23
Tabela 4.2 Adequabilidade do sistema do ativo y no meio HCl 0,1N.....	24
Tabela 4.3 Adequabilidade do sistema do ativo y no Ph.Eur. Tampão Fosfato pH 4,5.....	24
Tabela 4.4 Adequabilidade do sistema do ativo y no USP Tampão Fosfato pH 6,8. ....	25
Tabela 4.5 Adequabilidade do sistema do ativo x no Ph.Eur. Tampão Fosfato pH 4,5+2% Tween 80®.....	25
Tabela 4.6 Adequabilidade do sistema do ativo x no USP Tampão Fosfato pH 6,8+3% Tween 80®.....	25
Tabela 4.7 Resultados da especificidade para o HCl 0,1N. ....	26
Tabela 4.8 Resultados para a especificidade para o Ph.Eur.Tampão Fosfato pH 4,5. ....	29
Tabela 4.9 Resultados para a especificidade para o USP Tampão Fosfato pH 6,8. ....	31
Tabela 4.10 Resultados da especificidade para o Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5+2% Tween80®.....	33
Tabela 4.11 Resultados para a especificidade para o USP Tampão Fosfato pH 6,8+3% Tween80®. ....	35
Tabela 4.12 Resultados de linearidade para o meio de dissolução HCl 0,1N. ....	41
Tabela 4.13 Resultados de linearidade para o meio de dissolução HCl 0,1N.....	42
Tabela 4.14 Resultados da linearidade para o Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5.....	43
Tabela 4.15 Resultados da linearidade para o USP Tampão Fosfato pH 6,8.....	44
Tabela 4.16 Resultados da linearidade para Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5+2% Tween80®. ....	45
Tabela 4.17 Resultados da linearidade para o USP Tampão Fosfato pH 6,8+3% Tween80®.....	46
Tabela 4.18 Resultados do <i>Teste de Mandel</i> .....	47
Tabela 4.19 Limites de quantificação dos meios de dissolução. ....	48
Tabela 4.20 Limites de quantificação e concentração de 1º ponto de linearidade.....	48
Tabela 4.21 Valores de <i>LoQ</i> obtidos para substâncias ativas. ....	49
Tabela 4.22 Resultados da área do <i>LoQ</i> . ....	50
Tabela 4.23 Resultados da razão sinal/ruído do <i>LoQ</i> . ....	51
Tabela 4.24 Limites de detecção dos meios de dissolução.....	51
Tabela 4.25 Valores de <i>LoD</i> obtidos para substâncias ativas. ....	52
Tabela 4.26 Resultados da área do <i>LoD</i> . ....	53
Tabela 4.27 Resultados da razão sinal/ruído do <i>LoD</i> . ....	54
Tabela 4.28 Resultados da repetibilidade do sistema no meio HCl 0,1N.....	54
Tabela 4.29 Resultados da repetibilidade do sistema no meio HCl 0,1N.....	55
Tabela 4.30 Resultados da repetibilidade do sistema no Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5. ....	55
Tabela 4.31 Resultados da repetibilidade do sistema no USP Tampão Fosfato pH 6,8. ....	55
Tabela 4.32 Resultados da repetibilidade do sistema no Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5+2% Tween80®.....	56
Tabela 4.33 Resultados da repetibilidade do sistema no USP Tampão Fosfato pH 6,8+3% Tween80®. ....	56
Tabela 4.34 Resultados de repetibilidade de ensaio em HCl 0,1N.....	57
Tabela 4.35 Resultados de repetibilidade de ensaio em HCl 0,1N.....	57
Tabela 4.36 Resultados de repetibilidade de ensaio no Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5.....	57
Tabela 4.37 Resultados de repetibilidade de ensaio no USP Tampão Fosfato pH 6,8. ....	58
Tabela 4.38 Resultados de repetibilidade de ensaio no Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5+2% Tween80®.....	58
Tabela 4.39 Resultados de repetibilidade de ensaio no USP Tampão Fosfato pH 6,8+3% Tween80®. ....	58
Tabela 4.40 Resultados da precisão intermédia no meio HCl 0,1N. ....	59
Tabela 4.41 Resultados da precisão intermédia no meio HCl 0,1N. ....	59
Tabela 4.42 Resultados da precisão intermédia no Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5. ....	60
Tabela 4.43 Resultados da precisão intermédia no USP Tampão Fosfato pH 6,8.....	60
Tabela 4.44 Resultados da precisão intermédia no Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5+2% Tween80®.....	60
Tabela 4.45 Resultados da precisão intermédia no USP Tampão Fosfato pH 6,8+3% Tween80®. ....	61
Tabela 4.46 Resultados de exatidão no meio HCl 0,1N. ....	61
Tabela 4.47 Resultados de exatidão no meio HCl 0,1N. ....	62
Tabela 4.48 Resultados de exatidão no meio Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5.....	62
Tabela 4.49 Resultados de exatidão no meio USP Tampão Fosfato pH 6,8.....	62
Tabela 4.50 Resultados de exatidão no meio Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5+2% Tween80®. ....	63
Tabela 4.51 Resultados de exatidão no meio USP Tampão Fosfato pH 6,8+3% Tween80®.....	63

Tabela 4.52 Interferência do filtro em meio HCl 0,1N.....	64
Tabela 4.53 Interferência do filtro em meio HCl 0,1N.....	64
Tabela 4.54 Interferência do filtro em meio Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5.....	64
Tabela 4.55 Interferência do filtro em meio USP Tampão Fosfato pH 6,8.....	64
Tabela 4.56 Interferência do filtro para solução em meio Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5+2% Tween80®.....	65
Tabela 4.57 Interferência do filtro para solução em meio USP Tampão Fosfato pH 6,8+3% Tween80®.....	65
Tabela 4.58 Resultados de robustez no meio HCl 0,1N.....	66
Tabela 4.59 Resultados de robustez no meio HCl 0,1N.....	66
Tabela 4.60 Resultados da estabilidade intra-diária no meio HCl 0,1N.....	66
Tabela 4.61 Resultados da estabilidade intra-diária no meio HCl 0,1N.....	67
Tabela 4.62 Resultados da estabilidade intra-diária no meio Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5.....	67
Tabela 4.63 Resultados da estabilidade intra-diária no meio USP Tampão Fosfato pH 6,8.....	67
Tabela 4.64 Resultados da estabilidade intra-diária no meio Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5+2% Tween80®... ..	67
Tabela 4.65 Resultados da estabilidade intra-diária no meio USP Tampão Fosfato pH 6,8+3% Tween80®.....	68

## **Acrónimos e Siglas**

<b>BPF</b>	Boas Práticas de Fabrico
<b>DAD</b>	<i>Diode Array Detector</i> (detector de fotodíodo)
<b>HPLC</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
<b>ICH</b>	<i>International Conference on Harmonization</i>
<b>INFARMED</b>	Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P.
<b>IPAC</b>	Instituto Português de Acreditação
<b>LoD</b>	Limite de Detecção
<b>LoQ</b>	Limite de Quantificação
<b>r</b>	Coefficiente de Correlação
<b>r<sup>2</sup></b>	Coefficiente de Determinação
<b>RSD</b>	<i>Relative Standard Deviation</i> (Desvio Padrão Relativo)
<b>RPM</b>	Rotação Por Minuto
<b>SD</b>	<i>Standard Deviation</i> (Desvio Padrão)
<b>UPLC</b>	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> (cromatografia líquida de ultra eficiência)
<b>UV-VIS</b>	Ultravioleta – Visível.



# **1 CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO**

## **1.1 Objetivo e Estrutura da Dissertação**

A realização do estágio curricular no âmbito da Dissertação para obtenção de Grau de Mestre em Engenharia Química e Bioquímica teve como principal objetivo a validação de um método analítico por cromatográfica líquida de alta eficiência (HPLC). Deste modo, foi realizada a validação de um método usado no controlo de qualidade de um medicamento, nomeadamente o ensaio de dissolução.

Como referência, recorreu-se às condições definidas pela Farmacopeia dos Estados Unidos da América (USP) e pela Farmacopeia Europeia (Ph. Eur.) e, ainda, os ensaios validados de acordo com as diretrizes da *International Conference on Harmonization* (ICH) [1,2,3].

Os resultados obtidos foram compilados num relatório de validação analítica, contendo toda a informação referente ao ensaio de dissolução validado.

Quanto à estrutura, a presente dissertação encontra-se dividida em cinco capítulos, sendo estes:

### **◇ Capítulo I - Introdução**

Capítulo que consiste no enquadramento do trabalho realizado, sendo constituído pela apresentação da empresa e por uma breve abordagem da importância dos sistemas de garantia qualidade em vigor no Laboratório de Ensaios do Grupo Tecnimede.

### **◇ Capítulo II - Fundamentos Teóricos**

Neste capítulo podem ser encontrados os conceitos teóricos subjacentes à realização deste trabalho, sendo abordados conceitos e procedimentos necessários ao processo de validação de métodos analíticos.

### **◇ Capítulo III – Métodos e Materiais**

No terceiro capítulo são apresentados os métodos e materiais necessários à validação do método analítico.

### **◇ Capítulo IV - Apresentação e Discussão de Resultados**

Neste capítulo estão apresentados os resultados experimentais obtidos para os diversos parâmetros determinados no decorrer da validação do método analítico.

### **◇ Capítulo V - Conclusão e Proposta de Trabalho Futuro**

No último capítulo são apresentadas as principais conclusões referentes à validação assim como uma proposta de possível melhoria futura para este método analítico.

## **1.2 Enquadramento**

Ao longo dos anos, tem-se vindo a observar uma evolução na indústria farmacêutica, relativamente à implementação de programas de garantia da qualidade. Foram vários os fatores que influenciaram esta mudança e contribuíram para um controlo de qualidade mais exigente, sendo estes: o crescimento do mercado, a evolução tecnológica, a competitividade entre os laboratórios e a maior consciencialização dos consumidores [4].

A importância em garantir que a produção de fármacos seja realizada de uma forma criteriosa é cada vez mais relevante. Pretendendo-se, que sejam mantidos, em todas as etapas deste processo, elevados padrões de exigência não só em matéria de qualidade como também em segurança e eficácia. De forma a alcançar este objetivo estabeleceram-se diretrizes que garantem que os fármacos são adequados ao uso estabelecido. Indo ao encontro deste objetivo, os sistemas de gestão de qualidade asseguram o cumprimento de requisitos relacionados com a segurança, qualidade e eficácia do fármaco, ao longo de todo o ciclo produtivo e de distribuição do medicamento [4].

No âmbito do controlo de qualidade tem-se como uma ferramenta essencial a validação de metodologias analíticas, de forma a estabelecer um elevado padrão de qualidade, uma vez que este processo atesta que o medicamento está a ser produzido e será liberto para comercialização cumprindo todos os critérios de aceitação estabelecidos para os parâmetros que no seu conjunto asseguram a sua qualidade e que a mesma será mantida não só ao longo de todo o ciclo produtivo, como também no circuito de distribuição e no uso do medicamento, no decorrer do seu período de vida útil [4].

Por fim, a validação de métodos analíticos deve cumprir os requisitos técnicos e legais exigidos pelas autoridades reguladoras do setor farmacêutico [4].

### **Boas Práticas de Fabrico (BPF's)**

As Boas Práticas de Fabrico foram editadas pela primeira vez no Estados Unidos da América, em 1963, e, atualmente, constituem um Sistema de Garantia da Qualidade cujo âmbito de aplicação são laboratórios que realizam ensaios, geralmente de natureza repetitiva, para demonstrar as suas boas práticas [5].

Este sistema tem o objetivo de criar uma evidência documental das atividades que se realizam, para que qualquer pessoa ou entidade externa ao laboratório possa verificar a fiabilidade, rastreabilidade e integridade dos resultados gerados [5].

O organismo responsável pela acreditação deste sistema é o INFARMED [5].

## **Norma NP EN ISO/IEC 17025:2017 – Acreditação de Laboratórios**

A norma NP EN ISO/IEC 17025 foi criada devido à constante necessidade de implementação de métodos de trabalho que visassem o rigor dos resultados obtidos pelos laboratórios. Esta norma baseia-se em requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração, apresentando os princípios técnicos e de gestão a serem seguidos de forma a garantir a qualidade dos serviços prestados e demonstrar a sua competência técnica [6].

O organismo de acreditação desta norma, em Portugal, é o Instituto Português de Acreditação (IPAC). Este reconhece formalmente que uma instituição é competente para realizar determinadas tarefas [6].

### **A Empresa - Grupo Tecnimede**

O Grupo Tecnimede é constituído por um conjunto privado de empresas farmacêuticas, cuja atividade se baseia no desenvolvimento e comercialização de medicamentos indicados para uso humano. Deste modo, tem como missão contribuir para a melhoria tanto a nível de saúde como a nível do acesso a medicamentos, a uma escala mundial [7].

O grupo tem como objetivo o alcance da excelência no desempenho e na qualidade, por isso, implementou um programa de garantia da qualidade como forma de assegurar que todos os estudos são realizados em conformidade com estes princípios [7].

O Laboratório de Ensaios da Tecnimede está integrado num grupo de departamentos que no seu conjunto são designados por Labor Qualitas, constituindo desde 1998 (tendo as instalações de Caixaria – Dois Portos, estado dedicadas a atividade laboratorial desde o início dos anos 90) o polo de investigação e desenvolvimento do Grupo Tecnimede. O Laboratório de Ensaios da Tecnimede é certificado desde 2005 pelo INFARMED para as Boas Práticas de Fabrico e pelo IPAC para a norma NP EN/ IEC ISO 17025 desde 1994[7].



## 2 CAPÍTULO II - FUNDAMENTOS TEÓRICOS

A cromatografia é definida como uma técnica utilizada na separação de constituintes de uma mistura, baseando-se esta separação na diferença estrutural e correspondentes propriedades físico-químicas dos mesmos, assim como, nas diferentes interações entre estes e a fase móvel e fase estacionária [8,9].

A fase móvel circula através da fase estacionária, transportando consigo os componentes da mistura. Esta etapa no processo separativo pode ser rápida ou demorada dependendo da diferente interação e afinidade que os constituintes da mistura apresentem com a fase estacionária. Se um composto apresentar uma forte afinidade com a fase estacionária isto significa que este irá sofrer maior número de interações ao longo do percurso e, portanto, vai mover-se mais lentamente na coluna – e, conseqüentemente, a separação será mais demorada. Por outro lado, se o composto apresentar uma baixa afinidade com a fase estacionária, a separação acontece mais rapidamente.

Consoante os diferentes tipos de interação, a técnica cromatográfica pode ser classificada de quatro formas diferentes: partição, adsorção, exclusão e troca iônica - sendo a cromatografia de partição a forma de separação presente neste trabalho [10].

Relativamente a esta cromatografia, é constituída por uma fase estacionária a qual depositada sobre um sólido, ou quimicamente ligada a determinados grupos funcionais e uma fase móvel líquida. Como modelo deste tipo de cromatografia tem-se a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) [10].

### 2.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A cromatografia líquida de alta eficiência ou *performance*, mais conhecida por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), é uma técnica avançada da cromatografia líquida tendo-se tornado numa importante técnica analítica ao longo dos anos [11]. Tem como principal objetivo a separação, identificação e quantificação de cada constituinte que se encontra numa mistura [12].

A cromatografia líquida de alta eficiência pode ser definida em dois modos, dependendo da polaridade da fase estacionária: cromatografia de fase normal e a cromatografia de fase reversa.

A cromatografia de fase normal é utilizada quando o composto ou analito de interesse é apolar, utilizando uma fase estacionária polar e uma fase móvel apolar. A força de adsorção aumenta à medida que aumenta a polaridade, logo, amplia a interação entre o composto e a fase estacionária causando um aumento do tempo de retenção [13].

De modo geral, os analitos polares ficam retidos mais tempo na coluna cromatográfica enquanto que analitos de menor polaridade são eluídos mais rapidamente da coluna cromatográfica, uma vez que, têm mais afinidade com a fase móvel [14].

Relativamente à cromatografia de fase reversa, esta consiste numa fase móvel polar e uma fase estacionária apolar, portanto, é utilizada quando o composto ou analito de interesse é polar pois tem uma maior afinidade com a fase móvel enquanto os compostos menos polares têm uma maior afinidade com a fase estacionária. Ou seja, ficam retidos por um maior período de tempo na coluna, comparativamente, aos analitos de elevada polaridade. Uma das fases estacionárias mais utilizadas para este tipo de cromatografia é a sílica quimicamente modificada com cadeias de hidrocarbonetos, as quais são denominadas de colunas C<sub>8</sub> e C<sub>18</sub>, classificadas consoante o número de hidrocarbonetos adicionadas à sua estrutura base de sílica. Além disto, na cromatografia de fase reversa, comparativamente à de fase normal, é a que tem uma maior gama de aplicação [14].

De um modo geral, um analito demonstra diferentes graus de afinidade tanto com a fase móvel como com a fase estacionária, por influência da sua estrutura molecular e grupos funcionais, onde a substância ativa com menor afinidade com a coluna é aquela que elui mais cedo, enquanto, que a de maior afinidade elui em último.

### **Instrumentação**

Um sistema de HPLC é constituído por diversos componentes dos quais se destacam um sistema de bombas, um injetor de amostra, uma coluna cromatográfica, um detetor e um sistema de registo e tratamento da resposta analítica do detetor, ou seja, um computador e *software* apropriado. O sistema é aberto, pelo que para além dos componentes já descritos anteriormente, tem-se um reservatório de admissão de fase móvel e um outro, para recolha do resíduo, no final do circuito – na linha de saída do detetor. Na figura 2.1, podem ser observados todos os componentes que integram um sistema de HPLC [15].

Relativamente a estes principais componentes, tem-se, primeiramente, o reservatório de fase móvel, a qual é propulsionada para circulação no equipamento através de um sistema de bombas que tem como função promover a circulação da fase móvel, a um determinado fluxo. A bomba pode ser programada em modo de fluxo constante ou variável ao longo do tempo e também com introdução dos componentes da fase móvel em proporções variáveis ou numa proporção constante, consoante isto, é designado por eluição em gradiente e eluição isocrática, respetivamente [15].

Posteriormente, o injetor tem a função de introduzir a amostra na coluna. Quanto à coluna cromatográfica, a sua função é separar os constituintes da amostra, sendo referida como a fase estacionária, no entanto, o verdadeiro responsável pela separação é o material que constitui o seu enchimento [15].

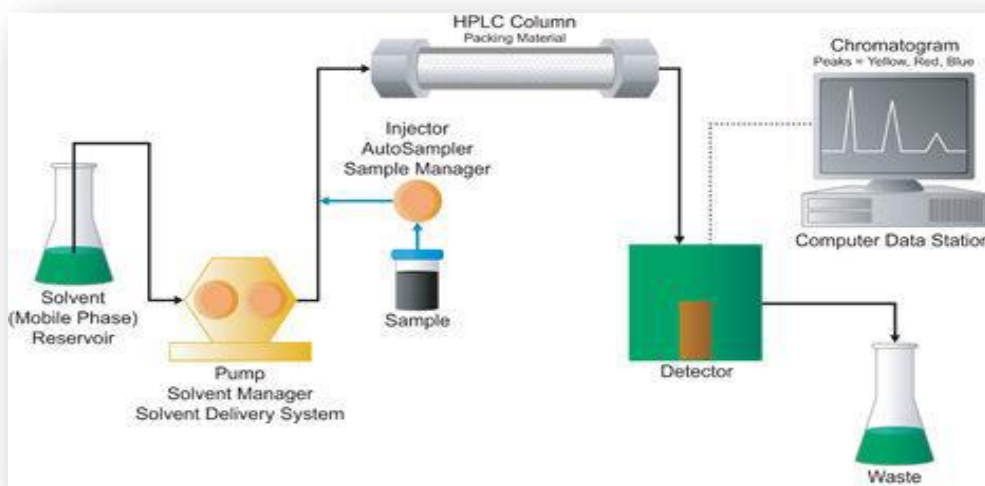


Figura 2.1 Componentes de um sistema HPLC [15].

Seguidamente, encontra-se o detetor, cuja função é analisar e identificar as bandas de separação dos analitos à medida que estes vão eluindo da coluna. As características dos detetores são diversas, entre as mesmas tem-se: alta sensibilidade; seletividade; linearidade; pouca sensibilidade às variações de temperatura e fluxo; precisão e reprodutibilidade.

Na seleção de um detetor, deve ser tido em consideração a sua sensibilidade para registar as diversas variações de sinal nas concentrações dos analitos a separar bem como as características químicas e físicas do analito. Os tipos de detetor mais utilizados são os de comprimento de onda de deteção programável na gama do ultravioleta-visível (UV-Vis) - onde a análise pode decorrer a um ou dois comprimentos de onda e os detetores de Fotodíodos – vulgarmente designados por PDA ou DAD (*Diode Array Detector*). A deteção em DAD permite fazer a aquisição de espectros (e não apenas do sinal captado a um ou dois comprimentos de onda). Nestes detetores (DAD) consegue-se também fazer a análise da pureza do pico, mapas de controlo (varrimento) e exibição do espectro 3D numa gama de comprimentos de onda alargada (tipicamente 200nm – 400nm) [16].

A informação adquirida pelo detetor é enviada para uma interface de aquisição de dados, que através de um *software* específico consegue processar a resposta analítica na forma de um cromatograma.

Para aumentar a eficiência do sistema, poderão ainda ser acoplados adicionalmente:

- Unidade desgaseificadora - para eliminação, em linha, de eventuais bolhas de ar presentes na fase móvel (a mistura de solventes orgânicos e aquosos pode levar ao aparecimento de bolhas, as quais interferem na resposta do detetor);

- Unidade de refrigeração da bandeja de amostras do Injetor – particularmente importante para a automatização do processo e para estabilização de amostras que em solução (após preparação para análise no HPLC) possam não ser estáveis por um grande período de tempo;

- Forno de coluna, para termostatização da coluna cromatográfica, permitindo ainda que a separação decorra a diferentes temperaturas (e não apenas à temperatura ambiente), consoante os métodos [15].

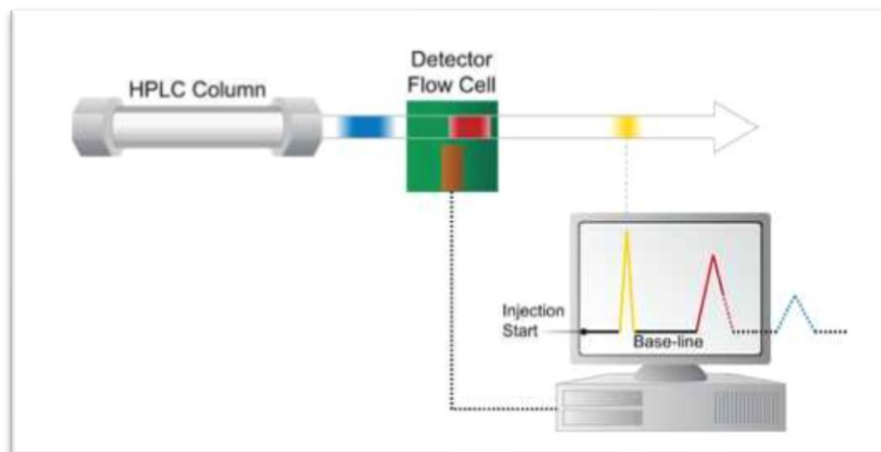


Figura 2.2 Demonstração da identificação dos analitos [15].

### **Vantagens e Desvantagens**

A técnica de HPLC apresenta várias vantagens, entre as quais se destacam a sua aplicabilidade na quantificação de diversos tipos de analitos, englobando tanto pequenas moléculas orgânicas e iões como também grandes biomoléculas e polímeros, bem como a sua capacidade de separação e a sua sensibilidade. Finalmente, a precisão e robustez demonstrada faz desta técnica uma ferramenta indispensável para o controlo de qualidade em diversas áreas de aplicação [17].

Apresenta como principal desvantagem, o seu elevado custo, devido à elevada pureza dos reagentes utilizados e ao elevado custo de equipamento, inerente à sua operação e manutenção [18].

### **Aplicações**

As aplicações da técnica de HPLC são diversas, sendo uma técnica muito utilizada na indústria farmacêutica para o controlo de qualidade assim como no ramo de investigação e desenvolvimento.

Tendo igualmente aplicabilidade noutras áreas como no sector industrial, alimentar e química forense [19, 12].

## **Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC)**

Atualmente, a cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) é a técnica mais recente e inovadora no que respeita à cromatografia líquida. Na UPLC o principal contributo para a maior eficiência é devido ao reduzido tamanho de partícula constituinte da fase estacionário com conseqüente aumento da área superficial disponível para interação com o analito (portanto um maior número de pratos teóricos que caracteriza a separação).

A UPLC dá um novo sentido à cromatografia líquida, uma vez que promove a melhoria de, principalmente, três parâmetros: velocidade, resolução e sensibilidade [20].

### **2.2 Validação de Método Analítico**

A importância de um sistema de controlo de qualidade é cada vez maior, sendo fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios para demonstrar que os métodos de ensaio utilizados permitem obter resultados fiáveis e apropriados à qualidade exigida pelas normas do sector farmacêutico (entre outros).

Para um controlo efetivo dos resultados, o método analítico é submetido a uma série de etapas, ou seja, a um processo de avaliação, que estime a sua eficiência e garanta a sua fiabilidade [21, 22].

O objetivo principal da validação de um método analítico consiste na demonstração que o mesmo é adequado para o seu propósito, pretendendo-se confirmar que quando utilizado em rotina, nas diversas fases do ciclo de vida do produto, é capaz de manter resultados fiáveis e reproduzíveis. É importante que o protocolo de validação esteja descrito num procedimento laboratorial e que a determinação dos diversos parâmetros seja efetuada em equipamentos analíticos devidamente qualificados e calibrados.

A validação de um método analítico deve ser considerada quando se desenvolve uma nova metodologia ou efetua adaptações a metodologias já existentes e validadas, como a inclusão de novas técnicas ou o uso de diferentes equipamentos [21, 22].

Um método analítico é considerado validado se as suas características estiverem de acordo com os pré-requisitos estabelecidos [21, 22].

#### **Parâmetros de Validação de Método Analítico**

Na validação de um método analítico devem ser avaliados diversos parâmetros, nomeadamente: Adequabilidade do Sistema, Especificidade, Linearidade, Exatidão, Precisão, Limites de Detecção e Quantificação e Robustez. Sendo que os parâmetros sujeitos a avaliação estão descritos na “*ICH-Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*” [3].

Seguidamente, encontram-se descritos os parâmetros de validação de um método analítico, documentados e adotados nas diretrizes em vigor para a indústria farmacêutica.

#### ◆ Adequabilidade do Sistema

É a capacidade de o sistema analítico, neste caso HPLC, reportar um pico cromatográfico adequando no que respeita aos parâmetros de avaliação da qualidade cromatográfica (resolução, tempo de retenção, número de pratos teóricos, fator de simetria e repetibilidade do sistema). A determinação destes parâmetros baseia-se na seguinte forma:

- **Tempo de retenção:** Corresponde ao tempo que decorre entre o ponto de injeção até meia eluição (máximo do pico) [10].

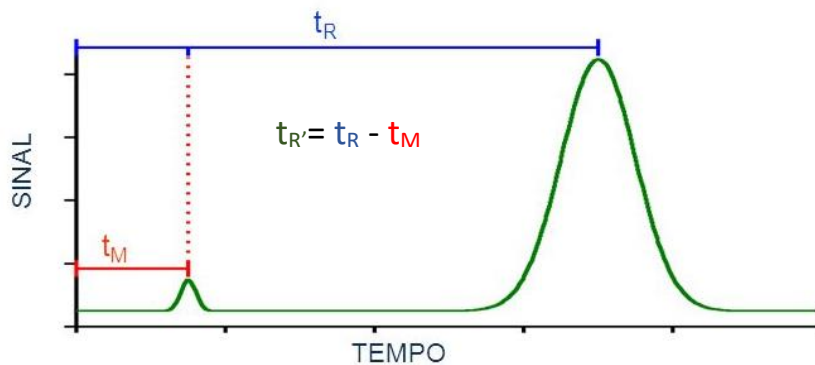


Figura 2.3 Determinação do Tempo de Retenção [23].

$t_R$  - Tempo de retenção de um analito

$t_M$  - Tempo de retenção de um analito não retido

$t_{R'}$  - Tempo de retenção ajustado

- **Resolução:** Refere-se à separação de dois picos adjacentes e o seu cálculo é demonstrado na equação 2.1 [10].

$$RS = 2 \times \left( \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_1 + W_2} \right) \quad (2.1)$$

$RS$  - Resolução

$t_{R1}$  e  $t_{R2}$  - Tempo de retenção de dois picos adjacentes

$W_1$  e  $W_2$  - Largura dos picos na base, em unidades de tempo

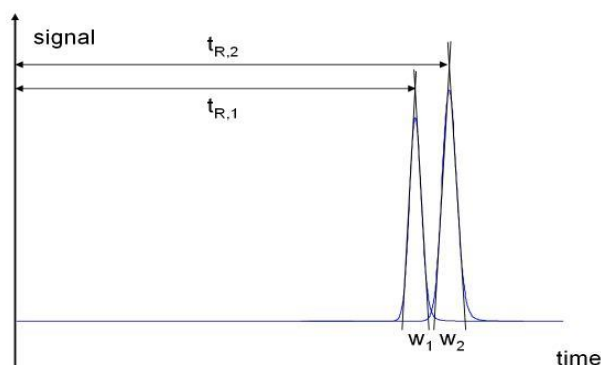


Figura 2.4 Cálculo da Resolução [10].

O valor deste parâmetro reflete o grau de perfeição com que os picos cromatográficos são separados. O efeito da resolução no grau de separação dos picos está ilustrado na figura 2.5.

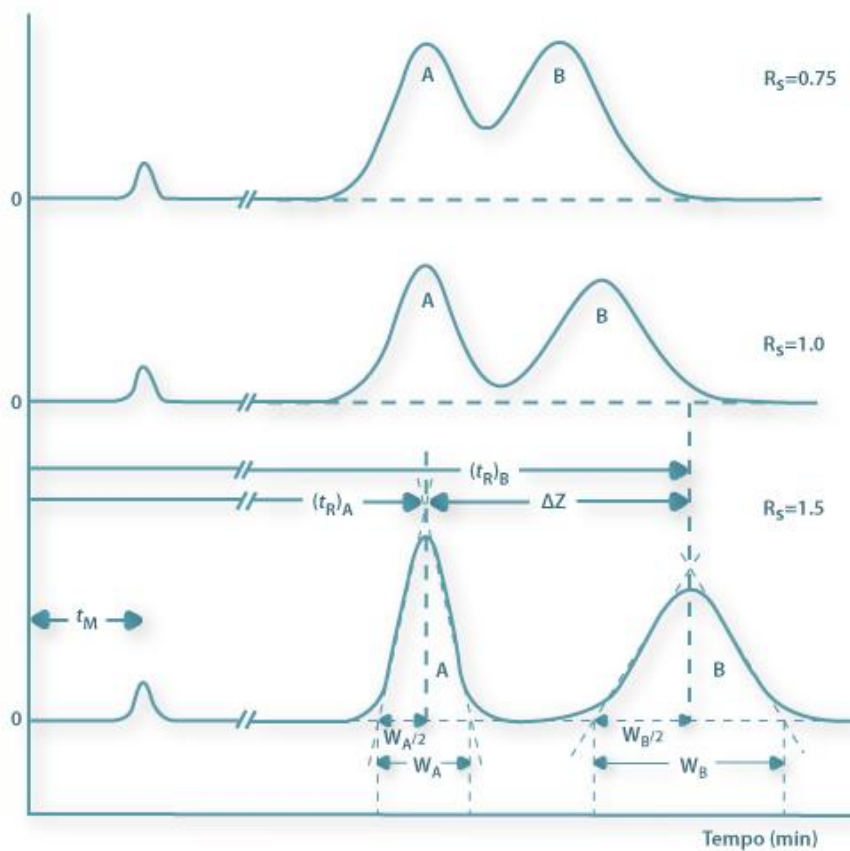


Figura 2.5 O efeito na resolução na separação dos picos cromatográficos [10].

- $R_s \leq 1,5$ : não existe uma separação completa dos picos.
- $R_s = 1,5$ : separação dos picos é praticamente completa.
- $R_s \geq 1,5$ : existe 100% de separação para os picos.

- **Fator de Simetria:** Corresponde à medida de simetria do pico cujo cálculo se baseia na equação 2.2 [24].

$$T = \frac{W_{0,05}}{2f} \quad (2.2)$$

$W_{0,05}$  - Largura do pico a 5% da altura

$f$  - Distância do máximo do pico até a borda inicial do pico

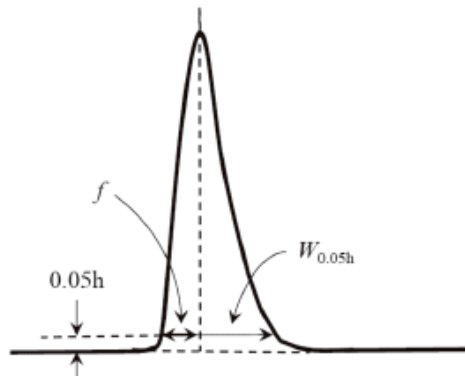


Figura 2.6 Cálculo do Fator de Simetria [24].

- **Número de Pratos Teóricos:** Refere-se à medida de eficiência da coluna cromatográfica. Considerando que o pico cromatográfico representa uma distribuição aproximadamente gaussiana, o número de pratos teóricos determina-se, de acordo, com a equação 2.3 [24].

$$N = 5,54 \left( \frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (2.3)$$

**N** – Número de pratos teóricos

**t<sub>R</sub>** – Tempo de retenção de um analito

**W** – Largura do pico cromatográfico a metade da sua altura.

#### ◆ Especificidade

É a capacidade que o método possui de identificar e quantificar um determinado analito, de forma diferenciada de outros, com estrutura idêntica ou não, presentes na mesma matriz. Por outro lado, mede o grau de interferência dos restantes componentes do sistema analítico ou da matriz de outros componentes da amostra [22].

#### ◆ Linearidade

Este parâmetro traduz a capacidade de um ensaio em reportar resultados diretamente proporcionais às concentrações do analito, dentro da gama de trabalho definida. Deste modo, existe a necessidade de ser conhecida a relação entre a resposta medida e a concentração de analito. Sendo muitas vezes, uma relação linear direta, que é possível através da construção de uma curva de calibração pelo Método dos Mínimos Quadrados, apresentado na equação 2.4 [25].

$$y = (m \times x) + b \quad (2.4)$$

Em que: **y** – Resposta (área do pico do Cromatograma)

**x** – Concentração de analito

**b** – Ordenada na origem

**m** – Declive da Curva de calibração

Para a determinação da Linearidade, pode ser aplicada a equação 2.4, Métodos dos Mínimos Quadrados (regressão linear), sendo possível obter-se o valor do declive, o coeficiente de correlação (r) e o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) – o qual é uma medida da adequação do modelo no seu ajuste aos dados experimentais em análise. Quanto ao valor do declive, este dá informação sobre a sensibilidade do método, sendo que quanto maior o declive maior a sensibilidade.

A utilização de curvas de calibração facilita a avaliação da linearidade do método de múltiplas formas, nomeadamente, através do *Teste de Mandel* onde se calculam as funções linear e polinomial, assim como os respetivos desvios padrão residuais ( $S_{y/x}$  e  $S_{y^2}$ ). A diferença de variâncias é determinada pela equação 2.5 [26].

$$DS^2 = (N - 2) \times S_{y/x}^2 - (N - 3) \times S_{y^2}^2 \quad (2.5)$$

Em que: N - Número de padrões de calibração  
 $S_{y/x}$  - Desvio padrão residual de função linear  
 $S_{y^2}$  - Desvio padrão da função polinomial

Posteriormente, é determinado o valor do teste PG, através da equação 2.6.

$$PG = \frac{DS^2}{S_{y^2}^2} \quad (2.6)$$

O valor obtido é comparado com o valor tabelado da distribuição de Fisher, sendo feita a seguinte análise:

- **PG ≤ F**: a curva de calibração é uma função linear.
- **PG > F**: a curva de calibração é uma função polinomial.

Sendo considerado o conjunto de dados uma função polinomial pode ser feito um ajuste da gama de trabalho, restringindo-a ao conjunto de dados que apresenta uma relação linear.

#### ◆ Exatidão

Consiste na avaliação do grau de aproximação entre o valor obtido experimentalmente e o seu valor teórico.

A exatidão baseia-se na taxa de recuperação da quantidade de analito quantificado em amostras preparadas a uma concentração conhecida de acordo com os passos experimentais do método analítico a validar. Na avaliação desta taxa, tem de ser tido em conta o seguinte [22]:

- **Taxas de recuperação inferiores a 100%**: podem indicar que o modo de preparação da amostra tem de ser otimizado, com possível alteração de solvente ou tempo de agitação;

▪ **Taxas de recuperação superiores a 100%:** tendem a indicar que outros constituintes da matriz têm uma resposta analítica quantificável no comprimento de onda da análise e, conseqüentemente, interferem com a mesma.

▪ **Variação inerente à repetibilidade do método:** as percentagens obtidas para a taxa de recuperação terão subjacente a variação que é verificada na validação do ensaio de repetibilidade do método.

Finalmente, no sentido de abordar o efeito dos fatores acima descritos, são estabelecidos critérios de aceitação que têm uma tolerância em torno de 100%, garantindo a fiabilidade do método.

#### ◆ Precisão

A precisão demonstra a concordância entre os resultados obtidos para uma determinada ação repetida várias vezes, permitindo avaliar o grau de interferência gerado pelos erros aleatórios. Este parâmetro é avaliado em três níveis, sendo estes os seguintes [22]:

▪ **Repetibilidade do Sistema:** traduz a variabilidade inerente aos componentes do sistema cromatográfico;

▪ **Repetibilidade do Método:** mede a variabilidade inerente ao método, que inclui a variabilidade do procedimento experimental utilizado na preparação das soluções de amostra;

▪ **Precisão Intermédia:** consiste na variabilidade intra-laboratorial do ensaio, englobando alterações, tais como, o operador, o equipamento e o dia de análise.

#### ◆ Limite de Quantificação (*LoQ*)

O limite de quantificação trata-se da menor concentração de um analito que um determinado ensaio tem capacidade de quantificar com exatidão e precisão pretendida. De forma que, o método se mantenha adequado para quantificação (preciso, linear, exato) nesse ponto.

O *LoQ* equivale à concentração mais baixa da gama de linearidade e deve ser comprovado através do cálculo do coeficiente de variação e medidas de exatidão apropriadas, utilizando pelo menos cinco diluições distintas de uma solução padrão. Os valores médios devem estar compreendidos entre limites fixos, normalmente devem apresentar  $\pm 10\%$  do valor nominal e apresentar um coeficiente de variação que não exceda os 10% [27].

A razão sinal/ruído pode ser utilizada para determinar o *LoQ* através da comparação entre o sinal medido para soluções com baixas concentrações conhecidas de analito, com o sinal apresentado por soluções isentas de analito, estabelecendo a mínima concentração à qual o analito pode ser seguramente quantificado. A razão é de 10:1 [27].

Por outro lado, a determinação do limite de quantificação pode ser realizada através da aplicação dos dados obtidos pela regressão linear através da equação 2.7.

$$LoQ = \frac{10 \times Ep}{B} \quad (2.7)$$

Em que: Ep - Desvio Padrão  
B -Declive

#### ♦ Limite de Detecção (LoD)

O limite de detecção corresponde à menor quantidade de analito que se pode detetar acima do ruído da linha de base do sistema de análise. A determinação do *LoD* pode ser realizada por três processos diferentes, que são: avaliação visual; relação sinal/ruído e o método baseado em parâmetros da curva de calibração [27].

A avaliação visual baseia-se na adição de quantidades conhecidas de analito a uma matriz, de modo a ser possível distinguir o sinal analítico do ruído da linha de base, estabelecendo assim o limite de detecção através da menor quantidade que é possível de visualizar, ou seja, detetar [27].

A relação sinal ruído é obtida por comparação dos sinais apresentados por soluções com baixas concentrações conhecidas, com o sinal apresentado pela matriz isenta da substância ativa. A concentração mínima para a qual o analito pode ser detetado é, assim, estabelecida, sendo aceite uma proporção de 3:1. Nos métodos cromatográficos, o *LoD* é, frequentemente, calculado com base na relação obtida para a altura do pico e a máxima oscilação do ruído na linha de base (3:1) medida para uma dada distância (20 vezes a largura do pico a meia altura) [27].

A determinação do valor de *LoD* baseado em parâmetros da curva de calibração é realizada através da equação 2.8.

$$LoD = \frac{3 \times Ep}{B} \quad (2.8)$$

Em que: Ep - Desvio Padrão  
B - Declive

#### ♦ Robustez

A robustez consiste na capacidade de um método analítico não ser afetado na consistência dos resultados que reporta, quando sujeito a ligeiras alterações dos seus parâmetros, tais como: fluxo; temperatura de coluna; proporção de fase móvel e comprimento de onda, dando uma indicação da fiabilidade do método quando utilizado no dia a dia.

### **2.3 Ensaio de Dissolução**

O ensaio de dissolução trata-se de um processo de solubilização da substância ativa, após desagregação da forma farmacêutica que a contem, tornando-a disponível para absorção. O ensaio de dissolução é um teste físico-químico importante para a demonstração *in vitro* do desempenho de

fármacos que necessitam de estar solubilizados para melhor absorção e, conseqüente, efeito terapêutico [28].

No ensaio de dissolução é avaliado um número definido de unidades de fármaco (conjuntos de 6 unidades individuais, por lote), em condições experimentais definidas. Após decorrido o ensaio é realizada a quantificação da percentagem de substância ativa libertada ao longo do período de tempo definido [28].

No desenvolvimento do medicamento, o ensaio de dissolução é utilizado para identificar fatores de formulação que influenciam e podem ter um efeito crucial sobre a biodisponibilidade da substância ativa, ou seja, a quantidade de substância ativa absorvida [28].

Com a composição e o processo de fabrico definidos, no caso de medicamentos genéricos, o ensaio de dissolução é utilizado no controlo de qualidade de lotes de produção regular, de modo a garantir que estes apresentem um comportamento similar aos lotes do ensaio clínico realizado, com o qual foi comprovada *in vivo* a Bioequivalência da formulação testada [28].

Em suma, o objetivo principal deste ensaio consiste em realizar uma avaliação *in vitro* da *performance* da formulação, por intermédio da avaliação da velocidade de libertação da substância ativa contida no fármaco. Sendo que, posteriormente, estes dados são correlacionáveis com os resultados obtidos na avaliação de biodisponibilidade e bioequivalência verificada nos estudos *in vivo*.

De modo geral, os estudos de dissolução têm como propósitos [28]:

- **Testar a qualidade de um produto:** sendo utilizado como uma ferramenta para o controlo de qualidade, demonstrando a consistência no fabrico;

- **Complemento e/ou Substituto de Bioequivalência:** sendo utilizado em determinados casos para demonstrar a similaridade entre diferentes formulações de uma dada substância ativa e do medicamento de referência. Ainda, para demonstração de similaridade *in vitro* de comportamento de dosagens múltiplas da biodosagem (em formulações de composição isométrica) e conseqüente comprovação da bioisenção para as referidas dosagens múltiplas.

Ao longo do tempo, foram desenvolvidos sistemas de dissolução, com diversos equipamentos e condições, que podem ser encontrados na Farmacopeia Europeia [2], na qual são descritos ensaios de dissolução para diversas fórmulas farmacêuticas [28, 29].

### **Aparelho de Dissolução**

O equipamento utilizado para a realização do ensaio de dissolução é constituído por seis copos (no mínimo) cilíndricos de vidro ou plástico, com fundo hemisférico e topo achatado. Tem, ainda, hastes metálicas de aço inoxidável para agitar o meio de dissolução com a possibilidade de ter dois tipos de agitadores nos seus extremos: cestos e pás (aparelho 1 e 2, respetivamente). Associado a um sistema para seleção da velocidade de agitação que conduza a haste à velocidade de rotação pretendida [30].

Os aparelhos 1 e 2 são os mais utilizados em ensaios de dissolução de comprimidos e cápsulas. Com uma velocidade de agitação comum em cestos de 50 a 100 RPM e em pás de 50 a 75 RPM.

Outros aparelhos são utilizados para a realização do ensaio de dissolução, sendo estes cilindros alternantes (aparelho 3) e célula de fluxo (aparelho 4). A aplicação de outros aparelhos, tais como pá sobre disco, cilindro rotatório, disco alternante, pode ser avaliada de acordo com a substância ativa que se pretende submeter ao ensaio de dissolução [30].



Figura 2.7 Aparelho de Dissolução [31].

### **Meios de Dissolução**

A escolha de um meio apropriado para o ensaio de dissolução depende tanto da solubilidade da substância ativa como também de outros fatores, tais como: volume; temperatura; pH e contração de tensoativo [32].

A solubilidade é um parâmetro que pode ser influenciado pelos fatores fisiológicos de pH, sendo que um fármaco ácido é mais solúvel no intestino, onde o pH é mais básico. Esta relação entre o pH e a solubilidade deve-se ao grau de ionização das moléculas.

Tomando por base a solubilidade e o parâmetro pKa da substância ativa, é possível estimar a sua dissolução ou libertação no trato gastrointestinal [32].

Relativamente ao volume de meio de dissolução, nos aparelhos 1 e 2, estes são operados com um volume de ensaio entre 500 e 1000 mL, sendo 900 mL o mais usual [33].

A temperatura, durante o ensaio, deve permanecer a 37°C, com variação de  $\pm 0.5^\circ\text{C}$ , mimetizando a temperatura corporal do ser humano[32].

Quanto ao pH do meio de dissolução, este tem em conta o tipo de formulação que pode ser caracterizada segundo uma libertação imediata, prolongada ou modificada, bem como o local de absorção da substância ativa.

Os ensaios de dissolução são realizados numa gama de pH compreendida entre 1,2 e 6,8, mimetizando a gama de pH do trato gastrointestinal. A maioria dos estudos iniciais realizam-se em HCl

0,1N ou em soluções tamponadas com pH próximo ao do suco gástrico, pH 1,2. Sendo que este, de modo geral, o mais utilizado como meio de controlo de qualidade no ensaio de dissolução [32].

A adição de um agente surfactante, tensioativo, aos meios de dissolução, tem a finalidade de melhorar e facilitar a solubilização de substâncias ativas pouco solúveis. A adição de tensioativo realiza-se na menor quantidade possível, de forma, a fornecer uma melhor correlação entre as condições *in vivo* e os dados *in vitro*. Como exemplo de tensioativo, tem-se o polissorbato 80, também conhecido por Tween80® [32].

### 3 CAPÍTULO III – MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta validação de método analítico, foi validado o ensaio de dissolução por uma técnica de cromatografia líquida de alta eficiência.

O tipo de cromatografia líquida utilizada é a cromatografia de partição em sistema de fase reversa, acoplado um detetor UV-Vis.

Em relação à coluna cromatográfica utilizada, esta é hidrofóbica, ou seja, apolar e própria para o sistema de fase reversa. É constituída por uma cadeia de sílica modificada com 18 carbonos (C<sub>18</sub>), com a particularidade desta sílica ser composta por uma única porção de sílica-gel com elevada pureza.

Quanto ao ensaio de dissolução, a validação foi realizada em 5 meios de dissolução diferentes, sendo estes os seguintes: HCl 0,1N; Ph. Eur. Tampão fosfato pH 4,5; USP Tampão fosfato pH 6,8; Ph. Eur. Tampão fosfato pH 4,5+2% Tween80<sup>®</sup> e USP tampão fosfato pH 6,8+3% Tween80<sup>®</sup>. Neste conjunto, tem-se como meio de controlo de qualidade o meio HCl 0,1N.

Relativamente ao fármaco em estudo, apresenta-se como uma associação dupla, ou seja, é constituído por 2 substâncias ativas, sendo estas referidas como substância X e substância Y. A sua ação terapêutica é no sentido de atuar na redução dos sintomas de vertigem.

O meio de controlo de qualidade é o único no qual as duas substâncias ativas apresentam uma solubilidade equivalente. Isoladamente, o ativo X é quantificado nos meios de dissolução com tensoativo adicionado (Ph. Eur. Tampão fosfato pH 4,5+2%Tween80<sup>®</sup> e USP Tampão fosfato pH 6,8+3%Tween80<sup>®</sup>) e o ativo Y é quantificado nos restantes (Ph. Eur. Tampão fosfato pH 4,5 e USP Tampão fosfato pH 6,8).

Encontra-se em anexo confidencial o relatório de validação analítica executado, a caracterização e descrição das substâncias ativas e informação complementar sobre o tipo de coluna utilizada nesta validação.

#### ◇ Condições do Ensaio de Dissolução para a Substância Ativa Y:

Tabela 3.1 Condições do Ensaio de Dissolução da Substância ativa Y.

<b>Meio de Dissolução</b>	HCl 0,1N (Meio de Controlo de Qualidade) Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5 USP Tampão Fosfato pH 6,8
<b>Aparelho</b>	Pás
<b>Velocidade de Rotação</b>	50 rpm
<b>Temperatura</b>	37 °C ± 0.5°C
<b>Filtro</b>	Whatman nº2
<b>Volume</b>	900 mL
<b>Tempo de Dissolução</b>	30 minutos

◇ **Condições do Ensaio de Dissolução para a Substância Ativa X:**

Tabela 3.2 Condições do Ensaio de dissolução para substância ativa X.

<b>Meio de Dissolução</b>	HCl 0,1N (Meio de Controle de Qualidade) Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5 + 2% Tween80® USP Tampão Fosfato pH 6,8 + 3% Tween80®
<b>Aparelho</b>	Pás
<b>Velocidade de Rotação</b>	50 rpm - HCl 0,1N (Meio de Controle de Qualidade)
	75 rpm – Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5 + 2% Tween80®
	75 rpm – USP Tampão Fosfato pH 6,8 + 3% Tween80®
<b>Temperatura</b>	37 °C ± 0.5°C
<b>Filtro</b>	Whatman nº2
<b>Volume</b>	900 mL
<b>Tempo de Dissolução</b>	30 minutos (HCl 0,1N)
	150 minutos (Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5 + 2% Tween80®; USP Tampão Fosfato pH 6,8 + 3% Tween80®)

◇ **Condições Cromatográficas do Sistema de Quantificação:**

Tabela 3.3 Condições Cromatográficas do Sistema.

<b>Sistema</b>	Sistema de HPLC com detetor DAD (utilizado como UV)			
<b>Coluna</b>	Chromolith Performance RP 18e 100x4,6 mm ou equivalente			
<b>Gradiente da Fase Móvel</b>	Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)	Fluxo (mL/min)
	0,0	82	18	1,6
	1,0	82	18	1,6
	3,0	50	50	1,6
	4,5	20	80	2,5
	5,0	20	80	2,5
	5,5	82	18	1,6
	7,0	82	18	1,6
<b>Volume de Injeção</b>	25 µL			
<b>Detetor (λ)</b>	UV a 225 nm			
<b>Temperatura da Coluna</b>	40°C			

Seguidamente, é apresentada a composição de cada eluente, que compõe a fase móvel, e meios de dissolução assim como a preparação das soluções de padrão e de amostra, de cada substância ativa.

◇ **Fase Móvel:**

O Eluente A é composto por 10g/L de trietilamina, sendo necessário o acerto a pH 2,50, com uma solução de ácido fosfórico a 85%.

O Eluente B é composto por 100% de acetonitrilo.

◇ **Solução Mãe de Substância Ativa X:**

Pesar rigorosamente 22,22 mg de padrão de trabalho de substância X e transferir, cuidadosamente, para um balão volumétrico de 200 mL. Adicionar metanol, cerca de 2/3 do volume, e colocar no banho ultrassônico, em banho frio, durante 5 minutos. Por fim, perfazer o volume do balão com o mesmo diluente.

◇ **Solução Mãe de Substância Ativa Y:**

Pesar rigorosamente 22,22 mg de padrão de trabalho de substância Y e transferir, cuidadosamente, para um balão volumétrico de 100 mL. Adicionar uma mistura de água:acetonitrilo (82:18), cerca de 2/3 do volume, e colocar no banho ultrassônico, em banho frio, durante 5 minutos. Por fim, perfazer o volume do balão com o mesmo diluente.

◇ **Solução Padrão de Trabalho:**

Pipetar, rigorosamente, 4 mL de ambas as *soluções mãe* para um balão volumétrico de 20 mL. Adicionar meio de dissolução, cerca de 2/3 do volume. Agitar manualmente e completar o balão com o mesmo diluente.

- Concentração final do ativo X é, aproximadamente, 22,22 µg/mL.

- Concentração final do ativo Y é, aproximadamente, 44,44 µg/mL.

◇ **Solução Amostra:**

Realizar o ensaio com 6 comprimidos, colocando cada unidade num copo de dissolução e programar o aparelho para a condição de dissolução pretendida. Recolher uma alíquota de 5 mL de cada copo e filtrar com papel de filtro *Whatman* N°2.

- Concentração final do ativo X é, aproximadamente, 22,22 µg/mL.

- Concentração final do ativo Y é, aproximadamente, 44,44 µg/mL.

◇ **Meio de Dissolução – HCl 0.1N**

Diluir 1,66 mL de HCl a 37% (m/m) em 200 mL de água purificada.

◇ **Meio de Dissolução – Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5**

Transferir 1,36 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  para um balão volumétrico de 200 mL e perfazer o volume com água purificada.

◇ **Meio de Dissolução – USP Tampão Fosfato pH 6,8**

Transferir 1,36 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 0,18 g de NaOH para um balão volumétrico de 200 mL e perfazer o volume com água purificada.

◇ **Meio de Dissolução – Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5 + 2% Tween80®**

Transferir 1,36 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  para um balão volumétrico de 200 mL. Adicionar 4,0 g de Tween80® e perfazer o volume com água purificada.

◇ **Meio de Dissolução – USP Tampão Fosfato pH 6,8 + 3% Tween80®**

Transferir 1,36 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  para um balão volumétrico de 200mL. Adicionar 6,0 g de Tween80® e perfazer o volume com água purificada.

Relativamente aos reagentes utilizados, estes são os seguintes:

- ◇ Água Purificada
- ◇ Acetonitrilo: artº1000309030, Merck
- ◇ Fosfato monopotássio: artº 121512, Panreac
- ◇ Hidróxido de Sódio: artº.131687, Panreac
- ◇ Ácido Clorídrico 37%: artº.30721, Fluka
- ◇ Polisorbato 80 (Tween®80): artº142050, PanReac
- ◇ Metanol: artº1060079030, Merck
- ◇ Trietilamina: artº131032, Carlo Erga
- ◇ Ácido Fosfórico 85%: artº.131032, Panreac

## 4 CAPÍTULO IV - APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Tendo em conta as condições descritas no capítulo 3, foram determinados e validados os seguintes parâmetros: especificidade; linearidade; limite de quantificação; limite de detecção; precisão; exatidão; estabilidade intra-diária e robustez. Deste modo, serão demonstrados os resultados obtidos para cada parâmetro, de acordo, com o meio no qual foi validado.

### 4.1 Adequabilidade do sistema

A adequabilidade do sistema foi determinada através da injeção em sextuplicado de uma solução padrão preparada à concentração de trabalho estabelecida, calculando-se os parâmetros cromatográficos para os seis cromatogramas obtidos para cada substância ativa.

O critério de aceitação baseia-se num desvio padrão relativo (RSD) inferior a 2,0%, num número de pratos teóricos superior a 1000 e num fator de simetria contido no intervalo de 0,8 a 1,5.

Por fim, os resultados obtidos para cada meio de dissolução são apresentados na tabelas e figuras apresentadas abaixo.

#### Meio HCl 0,1N

Este meio de dissolução, meio de controlo de qualidade, quantifica em simultâneo os dois ativos (X e Y) presentes neste medicamento. Sendo importante realçar que a substância ativa Y é constituído por 2 compostos pelo que, a sua quantificação, resulta da soma dos picos cromatográficos obtidos para cada um dos seus constituintes.

Tabela 4.1 Adequabilidade do Sistema do ativo X no meio HCl 0,1N.

Injeção	Solução Padrão			
	Tempo de Retenção (min)	Área	Fator de Simetria	Pratos Teóricos
1	4,81	2103994	1,40	33007
2	4,79	2106110	1,30	52294
3	4,80	2131323	1,31	52261
4	4,79	2126783	1,35	32650
5	4,80	2145240	1,32	52423
6	4,77	2085599	1,33	51205
Média	4,79	2116508	1,34	45640
SD (%)	0,01	21774		
RSD (%)	0,29	1,03		

Tabela 4.2 Adequabilidade do Sistema do ativo Y no meio HCl 0,1N.

Injeção	Solução Padrão			
	Tempo de Retenção (min)	Área	Fator de Simetria	Pratos Teóricos
1	1,39 e 3,93	4420959	1,46	13578
2	1,38 e 4,00	4380000	1,30	12983
3	1,39 e 4,00	4396346	1,44	12932
4	1,39 e 4,00	4405828	1,41	13471
5	1,38 e 3,99	4382686	1,41	12914
6	1,39 e 3,99	4379110	1,37	20373
<b>Média</b>	<b>1,39 e 3,99</b>	<b>4394155</b>	<b>1,40</b>	<b>14375</b>
<b>SD (%)</b>	<b>0,01 e 0,03</b>	<b>16839</b>		
<b>RSD (%)</b>	<b>0,37 e 0,69</b>	<b>0,38</b>		

#### Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5

Neste meio de dissolução apenas é quantificado o ativo Y do fármaco. Como referido anteriormente, na sua constituição tem 2 compostos, então a quantificação é baseada na soma dos picos cromatográficos obtidos para os mesmos.

Tabela 4.3 Adequabilidade do Sistema do ativo Y no Ph. Eur. Tampão fosfato pH 4,5.

Injeção	Solução Padrão			
	Tempo de Retenção (min)	Área	Fator de Simetria	Pratos Teóricos
1	1,39 e 3,95	4588809	1,33	18472
2	1,39 e 3,95	4588647	1,32	12220
3	1,39 e 3,93	4565394	1,33	18238
4	1,39 e 3,94	4569840	1,26	18295
5	1,39 e 3,93	4575513	1,31	18256
6	1,39 e 3,94	4580386	1,33	17864
<b>Média</b>	<b>1,39 e 3,94</b>	<b>4578098</b>	<b>1,31</b>	<b>17224</b>
<b>SD (%)</b>	<b>0,00 e 0,01</b>	<b>9669</b>		
<b>RSD (%)</b>	<b>0,00 e 0,23</b>	<b>0,21</b>		

#### USP Tampão Fosfato pH 6,8

Este meio dissolução, à semelhança do anterior, só realiza a quantificação do ativo Y, recorrendo à soma dos seus constituintes para o quantificar.

Tabela 4.4 Adequabilidade do Sistema do ativo Y no USP Tampão fosfato pH 6,8.

Injeção	Solução Padrão			
	Tempo de Retenção (min)	Área	Fator de Simetria	Pratos Teóricos
1	1,39 e 3,95	4445696	1,29	18253
2	1,39 e 3,95	4423685	1,44	18174
3	1,39 e 3,95	4439329	1,27	12000
4	1,39 e 3,95	4417322	1,37	12055
5	1,39 e 3,94	4442673	1,45	18120
6	1,39 e 3,94	4428340	1,41	11942
<b>Média</b>	<b>1,39 e 3,95</b>	<b>4432841</b>	<b>1,37</b>	<b>15090</b>
<b>SD (%)</b>	<b>0,00 e 0,01</b>	<b>11392</b>		
<b>RSD (%)</b>	<b>0,00 e 0,13</b>	<b>0,26</b>		

**Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5+2% Tween 80<sup>®</sup>**

Neste meio de dissolução, assim como nos dois últimos apresentados, só se faz a quantificação de uma substância ativa, sendo que, neste caso, trata-se do ativo X.

Tabela 4.5 Adequabilidade do Sistema do ativo X no Ph. Eur. Tampão fosfato pH 4,5+2% Tween 80<sup>®</sup>.

Injeção	Solução Padrão			
	Tempo de Retenção (min)	Área	Fator de Simetria	Pratos Teóricos
1	4,67	2111014	1,18	28493
2	4,68	2102326	1,16	45164
3	4,68	2109995	1,49	45086
4	4,68	2109401	1,15	44893
5	4,66	2106966	1,12	44458
6	4,67	2110077	1,44	28461
<b>Média</b>	<b>4,67</b>	<b>2108297</b>	<b>1,26</b>	<b>39426</b>
<b>SD (%)</b>	<b>0,01</b>	<b>3227</b>		
<b>RSD (%)</b>	<b>0,17</b>	<b>0,15</b>		

**USP Tampão Fosfato pH 6,8+3% Tween 80<sup>®</sup>**

Neste meio de dissolução, assim como no anterior, só é feita a quantificação do ativo X.

Tabela 4.6 Adequabilidade do Sistema do ativo X no USP Tampão fosfato pH 6,8+3% Tween 80<sup>®</sup>.

Injeção	Solução Padrão			
	Tempo de Retenção (min)	Área	Fator de Simetria	Pratos Teóricos
1	4,57	2083052	1,48	42743
02	4,57	2078084	1,12	42884
3	4,56	2080144	1,49	42576
4	4,56	2078278	1,11	42585
5	4,56	2076893	1,48	42586
6	4,57	2084308	1,17	27318
<b>Média</b>	<b>4,57</b>	<b>2080127</b>	<b>1,31</b>	<b>40115</b>
<b>SD (%)</b>	<b>0,01</b>	<b>2970</b>		
<b>RSD (%)</b>	<b>0,12</b>	<b>0,14</b>		

Após análise dos dados obtidos para o sistema cromatográfico, nos diversos meios a serem dados como validados, conclui-se que estes demonstraram cumprir com os critérios de aceitação que caracterizam este parâmetro de validação.

## 4.2 Especificidade

Para a validação da especificidade do método analítico, foram injetadas as seguintes soluções: solução padrão; solução amostra; meio de dissolução; solução placebo e branco.

Relativamente ao critério de avaliação deste parâmetro, este baseia-se na ausência de picos interferentes ao tempo de retenção dos picos dos analitos.

Os resultados obtidos na avaliação da especificidade de cada meio de dissolução são apresentados na tabelas e figuras apresentadas abaixo.

### Meio HCl 0,1N

Este meio de dissolução é o único que permite quantificar ambas as substâncias ativas em simultâneo, substância X e substância Y. Além disto, tem-se em conta que o ativo Y é constituído por 2 compostos, deste modo, nas figuras referentes à solução padrão e à solução amostra estão representados no total três picos. No entanto, a quantificação do ativo Y, nesta validação, é feita pela soma das áreas dos seus dois constituintes.

Tabela 4.7 Resultados da Especificidade para o Meio de Dissolução HCl 0,1N.

Nome	Substância Ativa	Tempo de Retenção (min)	Figura
<b>Solução Padrão de Trabalho</b>	Substância Y (1)	1,38	<b>4.1</b>
	Substância Y (2)	3,99	
	Substância X	4,80	
<b>Solução Amostra</b>	Substância Y (1)	1,38	<b>4.2</b>
	Substância Y (2)	3,99	
	Substância X	4,79	
<b>Meio de Dissolução</b>	-	-	<b>4.3</b>
<b>Solução Placebo</b>	-	-	<b>4.4</b>
<b>Branco -X (Metanol)</b>	-	-	<b>4.5</b>
<b>Branco -Y (H<sub>2</sub>O:ACN)</b>	-	-	<b>4.6</b>

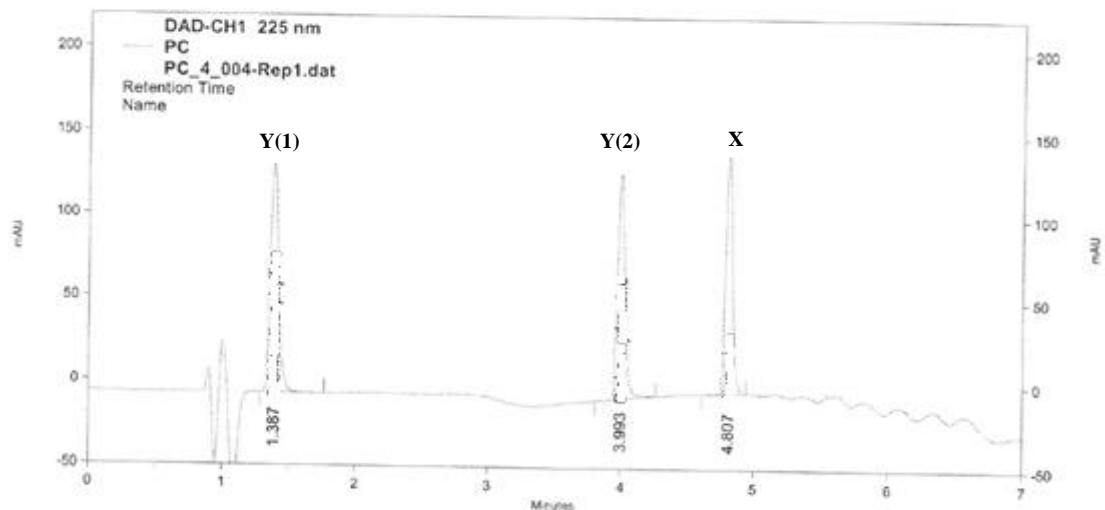


Figura 4.1 Cromatograma da Solução Padrão de Trabalho.

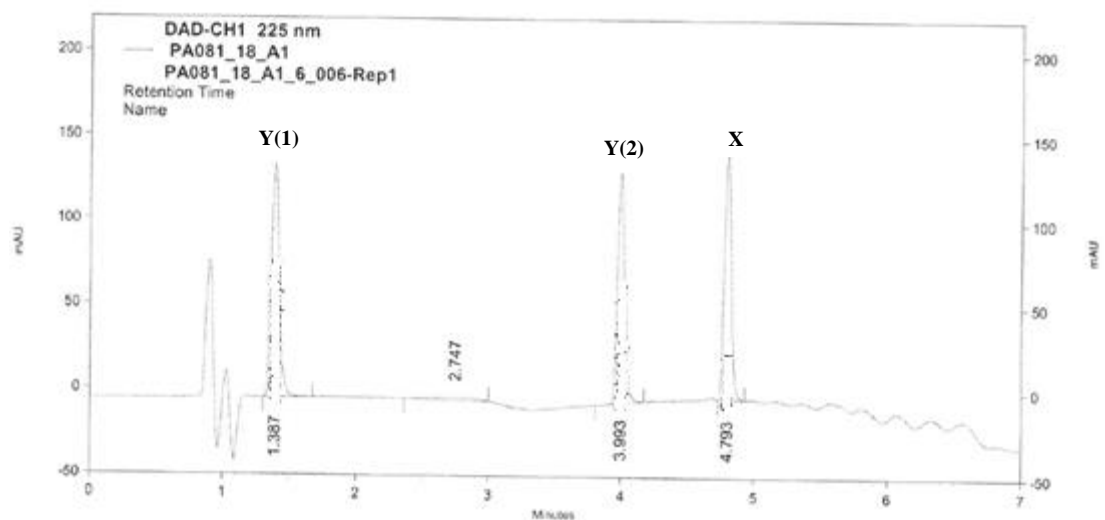


Figura 4.2 Cromatograma da Solução Amostra.

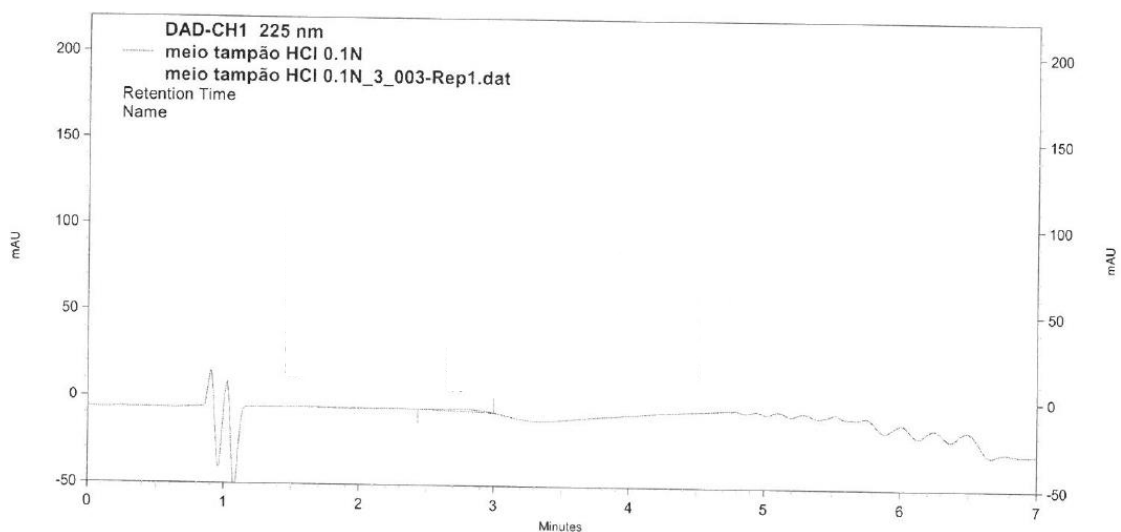


Figura 4.3 Cromatograma do Meio de Dissolução HCl 0,1N.

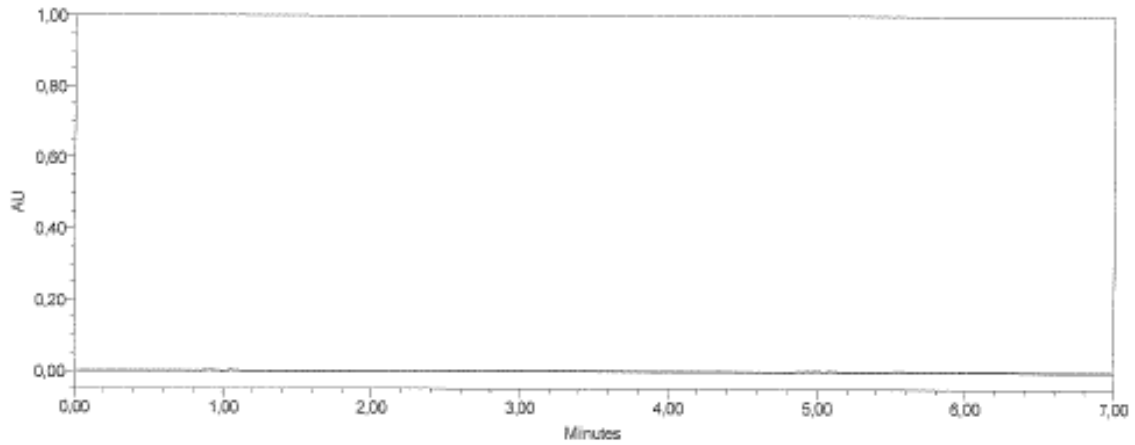


Figura 4.4 Cromatograma da Solução Placebo.

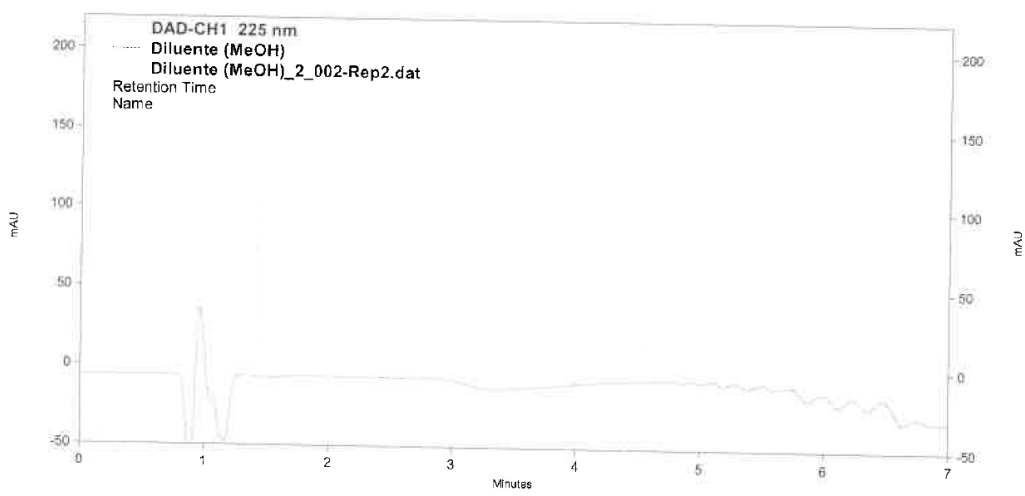


Figura 4.5 Cromatograma do Branco da substância X - Metanol.

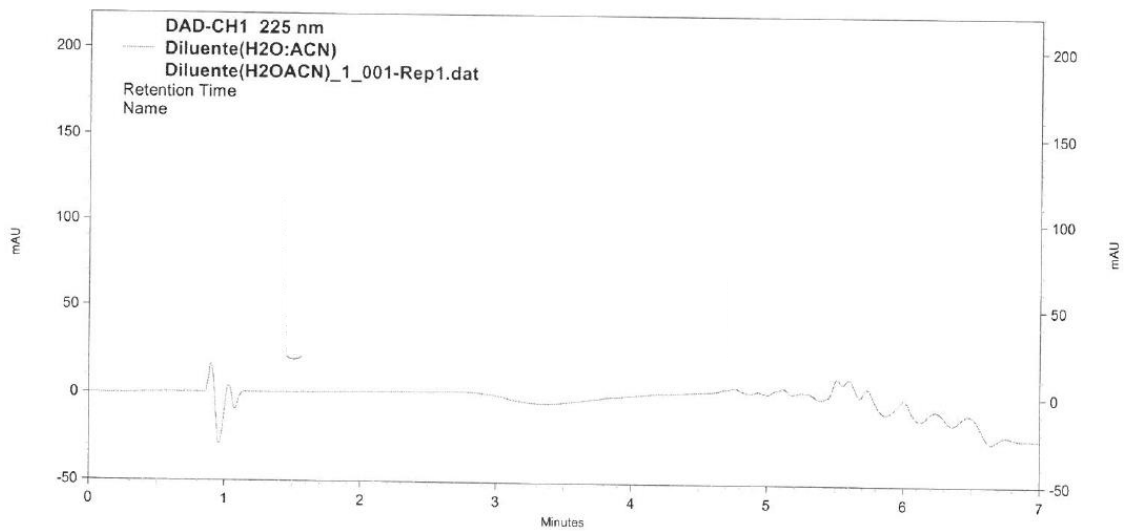


Figura 4.6 Cromatograma do Branco da substância Y – (H<sub>2</sub>O:ACN) (82:18).

## Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5

Neste meio apenas é quantificado o ativo Y, pelo que os cromatogramas da solução padrão e da solução amostra apresentam no total dois picos. No entanto, na quantificação deste ativo, recorre-se à soma das áreas dos seus dois constituintes.

Tabela 4.8 Resultados para a Especificidade para o Meio de Dissolução Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5.

Nome	Substância Ativa	Tempo de Retenção (min)	Figura
Solução Padrão de Trabalho	Substância Y (1)	1,39	4.7
	Substância Y (2)	3,95	
Solução Amostra	Substância Y (1)	1,39	4.8
	Substância Y (2)	3,94	
Meio de Dissolução	-	-	4.9
Solução Placebo	-	-	4.10
Branco - Y (ACN:H <sub>2</sub> O)	-	-	4.11

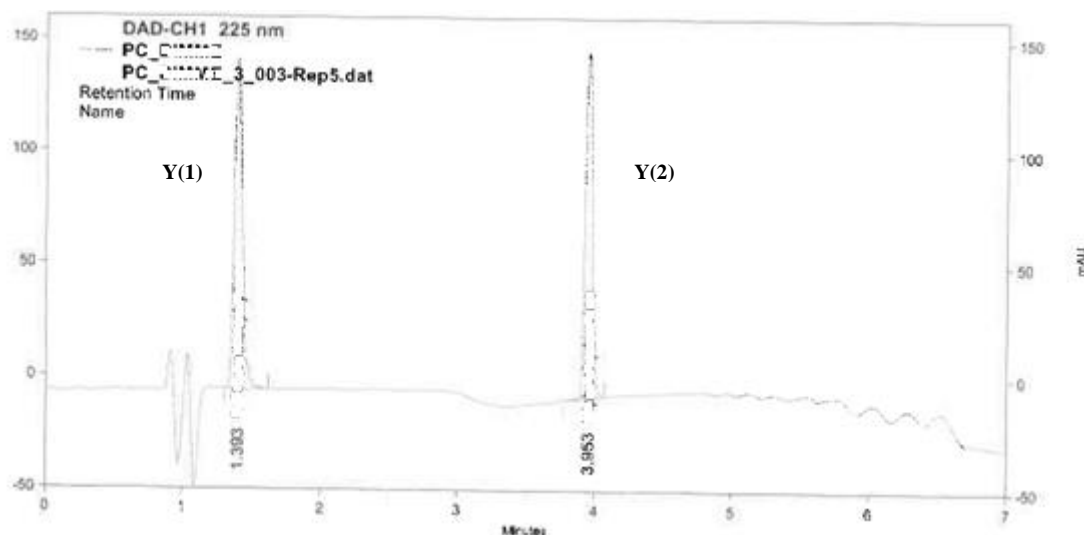


Figura 4.7 Cromatograma da Solução Padrão de Trabalho.

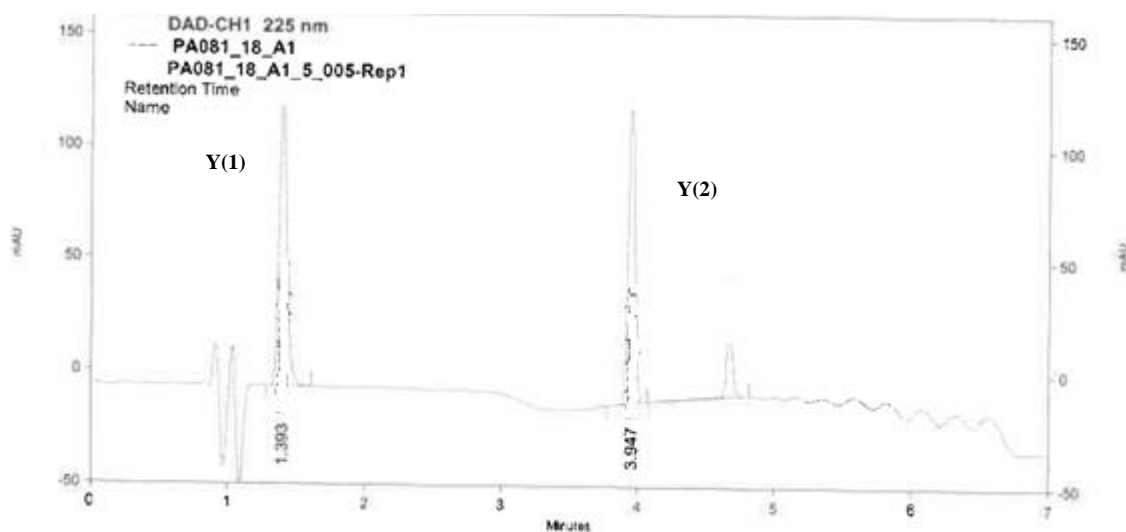


Figura 4.8 Cromatograma da Solução Amostra.

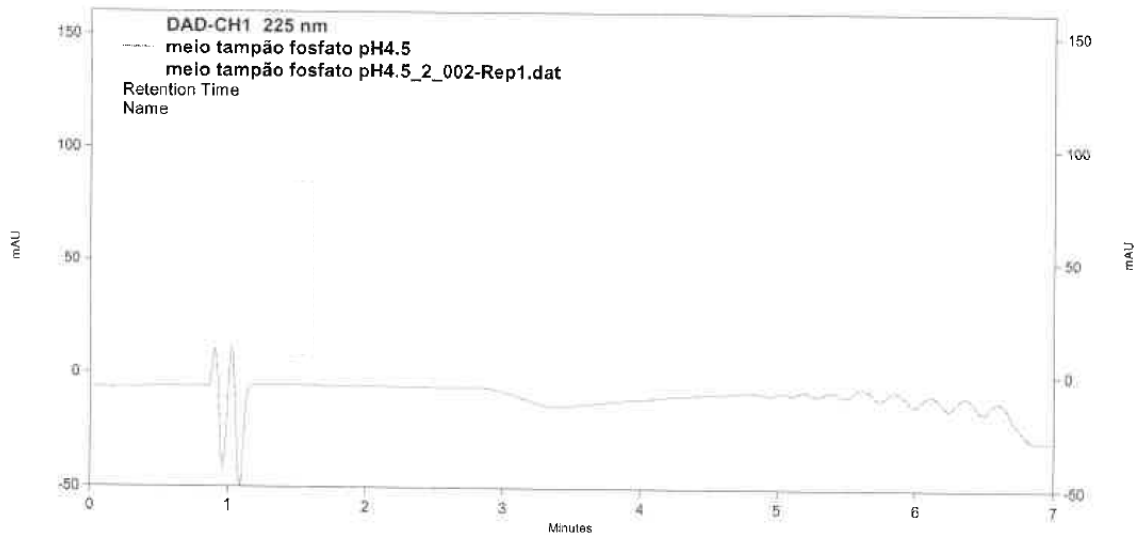


Figura 4.9 Cromatograma do Meio de Dissolução Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5.

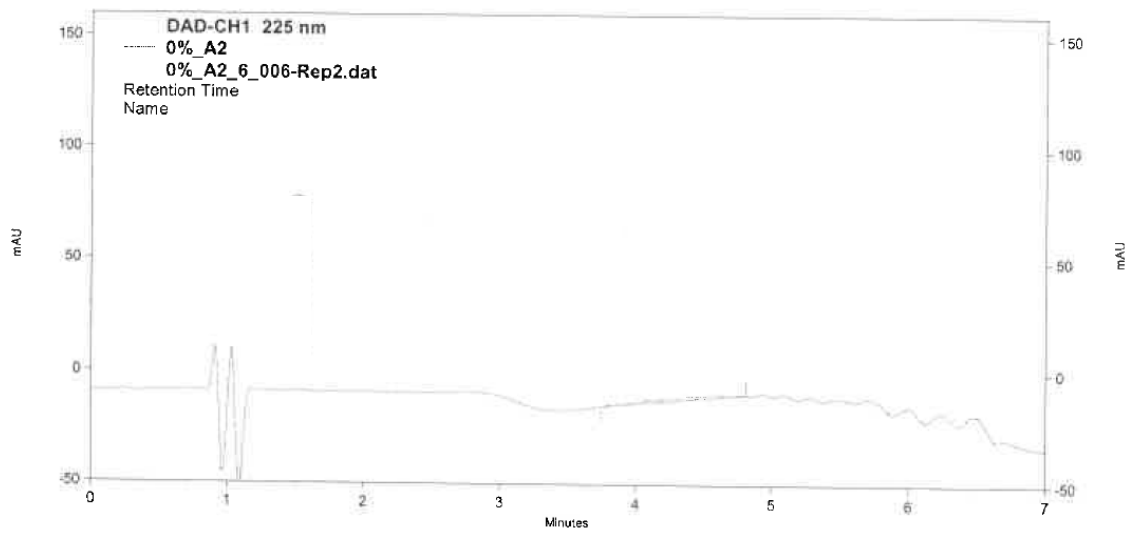


Figura 4.10 Cromatograma da Solução Placebo.

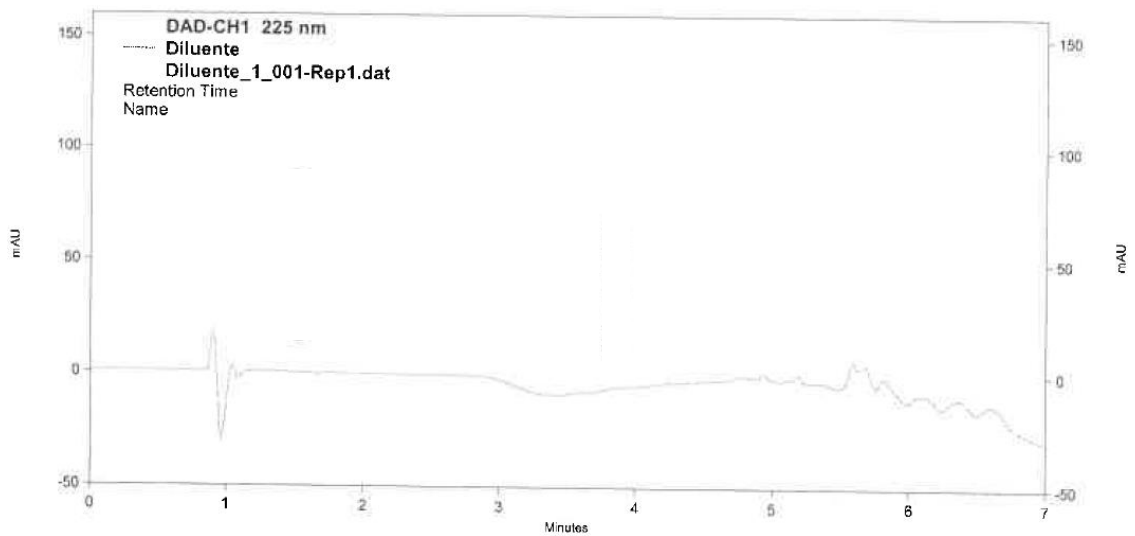


Figura 4.11 Cromatograma do Branco da Substância Y – (H<sub>2</sub>O:ACN) (82:18).

## USP Tampão Fosfato pH 6,8

Este meio de dissolução, á semelhança do anterior, só quantifica o ativo Y, pelo que nos cromatogramas, tanto da solução padrão como da solução amostra, apenas se observa dois picos.

Relativamente à quantificação deste ativo, neste meio de dissolução, é feita recorrendo-se à soma dos seus constituintes.

Tabela 4.9 Resultados para a Especificidade para o Meio de Dissolução USP Tampão Fosfato pH 6,8.

Nome	Substância Ativa	Tempo de Retenção (min)	Figura
<b>Solução Padrão de Trabalho</b>	Substância Y (1)	1,38	<b>4.12</b>
	Substância Y (2)	3,94	
<b>Solução Amostra</b>	Substância Y (1)	1,39	<b>4.13</b>
	Substância Y (2)	3,94	
<b>Meio de Dissolução</b>	-	-	<b>4.14</b>
<b>Solução Placebo</b>	-	-	<b>4.15</b>
<b>Branco -Y (H<sub>2</sub>O:ACN)</b>	-	-	<b>4.16</b>

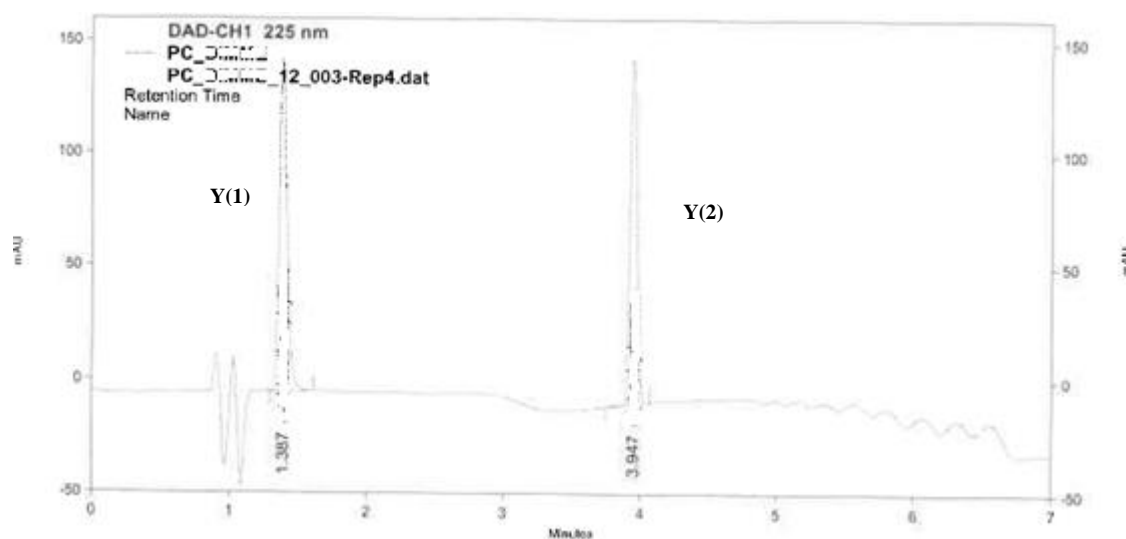


Figura 4.12 Cromatograma da Solução Padrão de Trabalho.

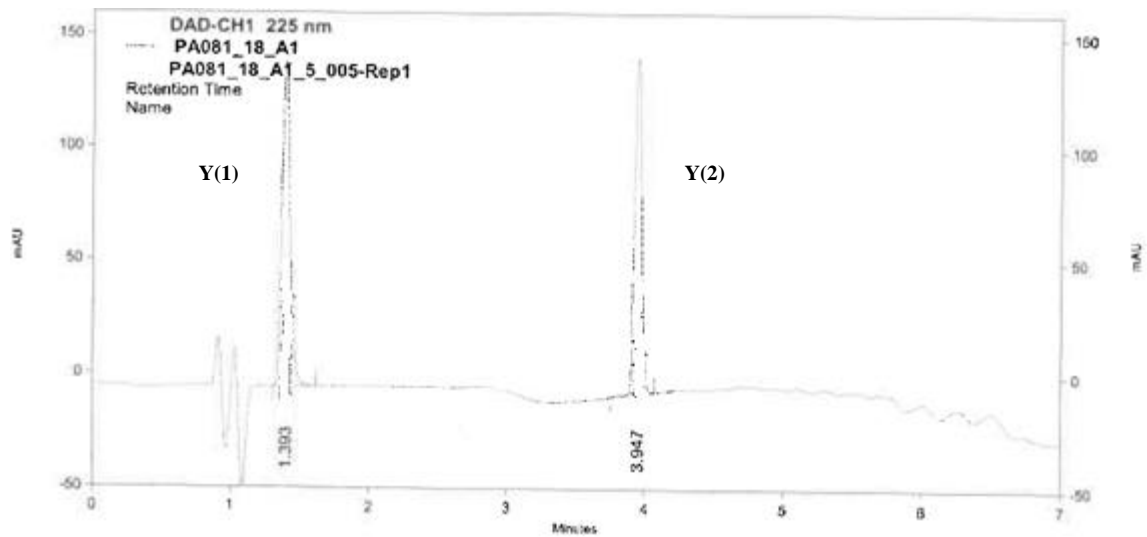


Figura 4.13 Cromatograma da Solução Amostra.

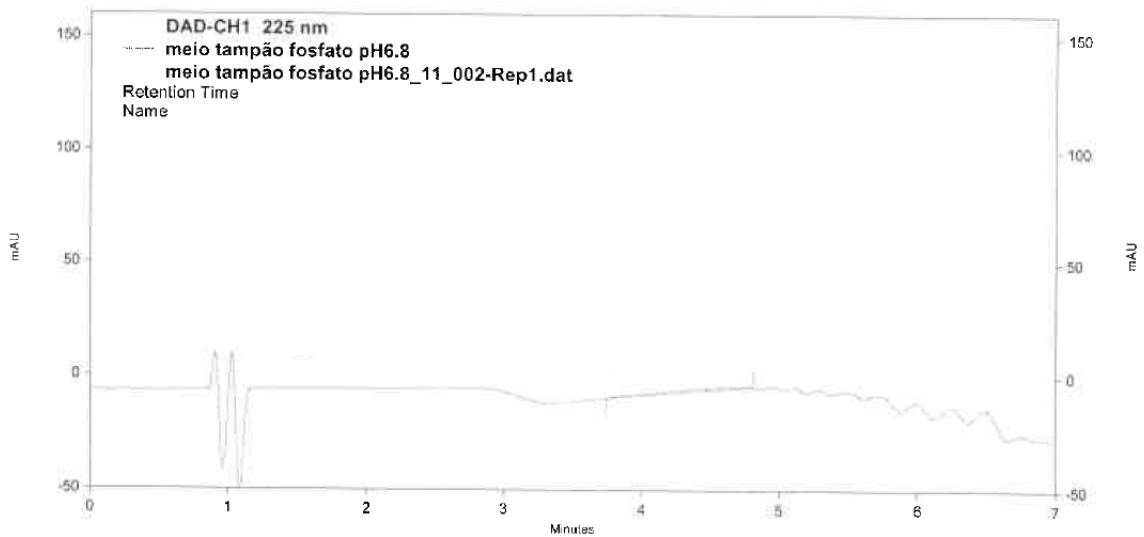


Figura 4.14 Cromatograma do Meio de Dissolução USP Tampão Fosfato pH 6,8.

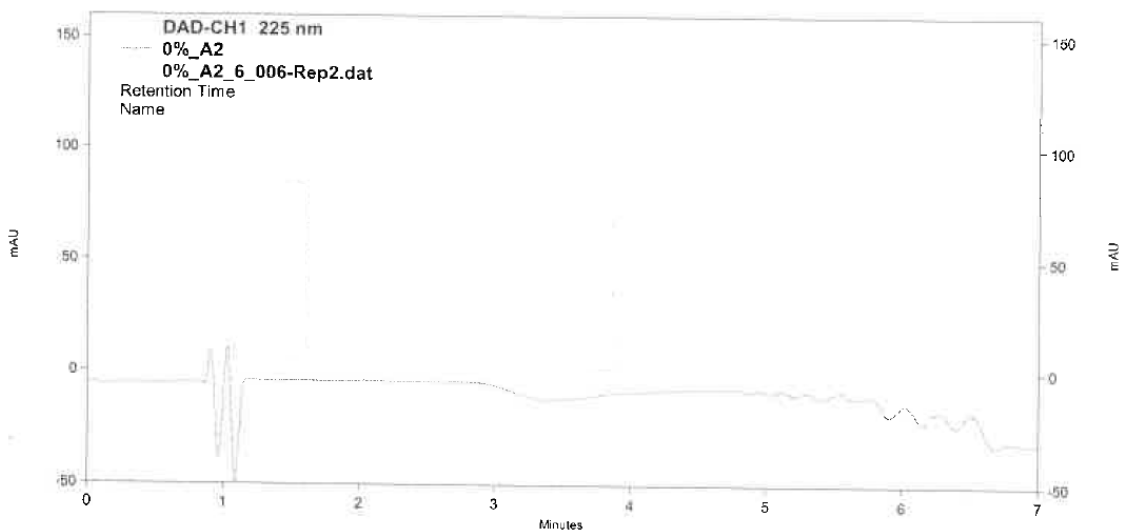


Figura 4.15 Cromatograma da Solução Placebo.

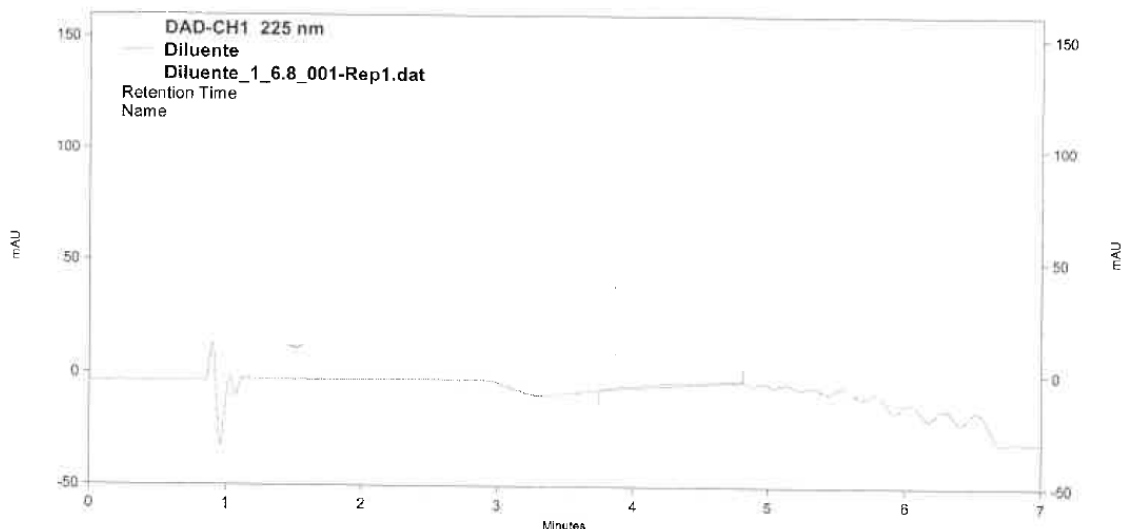


Figura 4.16 Cromatograma do Branco da Substância Y – (H<sub>2</sub>O:ACN) (82:18).

**Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5 + 2% Tween80®**

Neste meio apenas é quantificado a substância X, pelo que os cromatogramas apresentados da solução padrão e da solução amostra apenas apresentam o pico deste ativo.

Tabela 4.10 Resultados da Especificidade do Meio de Dissolução Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5+2% Tween80®.

Nome	Substância Ativa	Tempo de Retenção (min)	Figura
Solução Padrão de Trabalho	Substância X	4,60	4.17
Solução Amostra	Substância X	4,60	4.18
Meio de Dissolução	-	-	4.19
Solução Placebo	-	-	4.20
Branco-X (metanol)	-	-	4.21

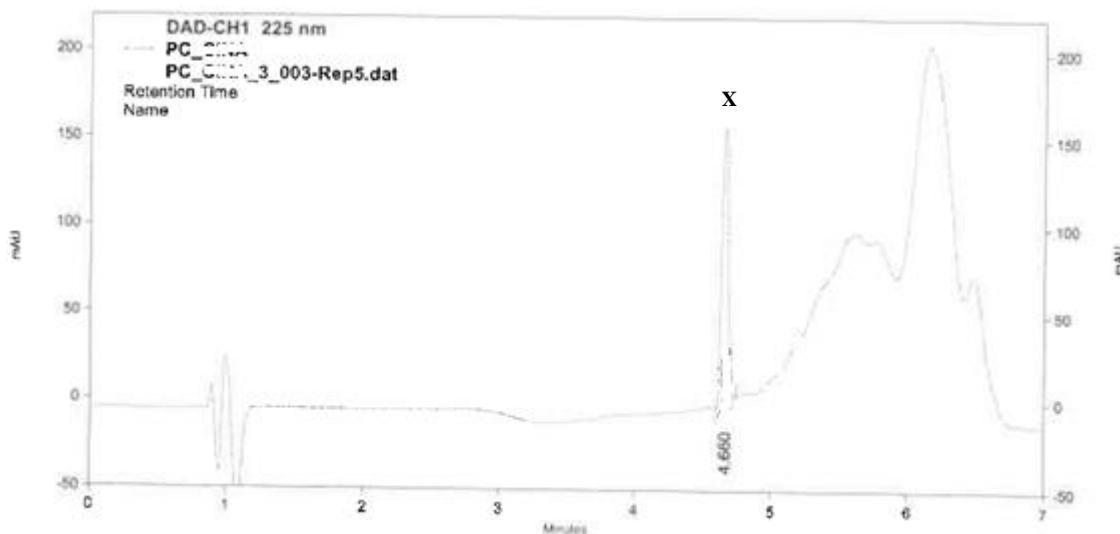


Figura 4.17 Cromatograma da Solução Padrão de Trabalho.

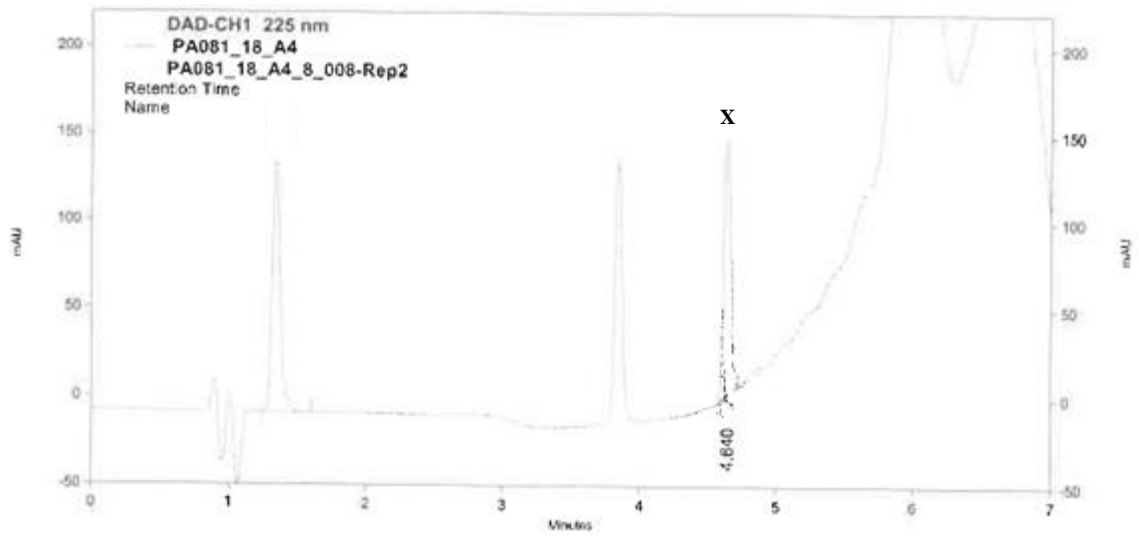


Figura 4.18 Cromatograma da Solução Amostra.

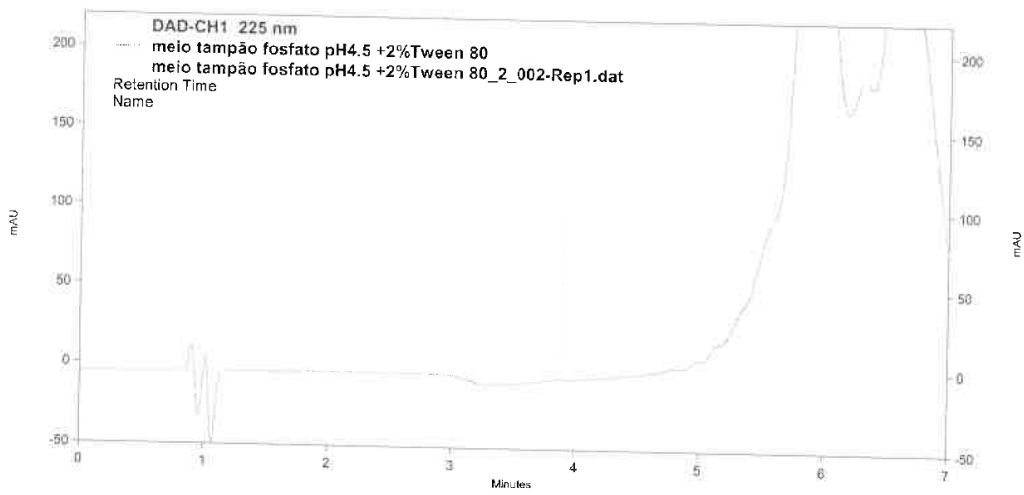


Figura 4.19 Cromatograma do Meio de Dissolução Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5+2%Tween80®.

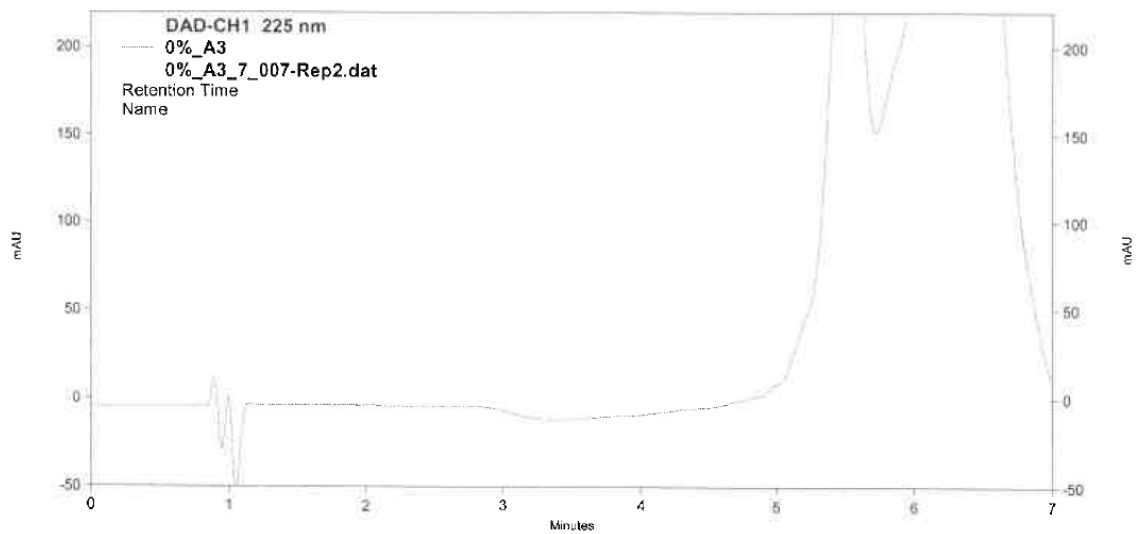


Figura 4.20 Cromatograma da Solução Placebo.

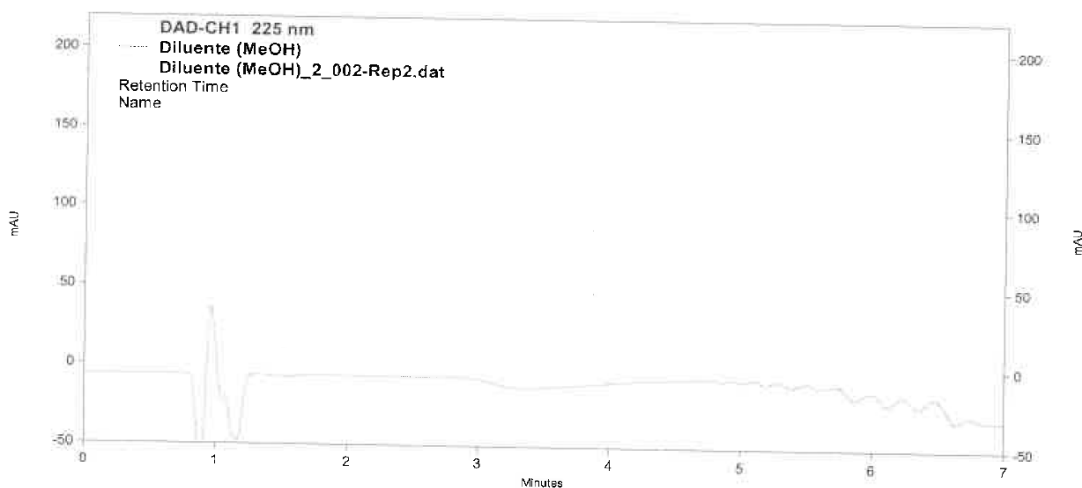


Figura 4.21 Cromatograma do Branco da substância X - (Metanol).

### USP Tampão Fosfato pH 6,8 + 3% Tween80®

Neste meio, à semelhança do anterior, só é quantificada a substância X, pelo que os cromatogramas apresentados da solução padrão e da solução amostra apenas apresentam um pico.

Tabela 4.11 Resultados para a Especificidade do Meio de Dissolução USP Tampão Fosfato pH 6,8+3% Tween80®.

Nome	Substância Ativa	Tempo de Retenção (min)	Figura
Solução Padrão de Trabalho	Substância X	4,60	4.22
Solução Amostra	Substância X	4,50	4.23
Meio de Dissolução	-	-	4.24
Solução Placebo	-	-	4.25
Branco-X (Metanol)	-	-	4.26

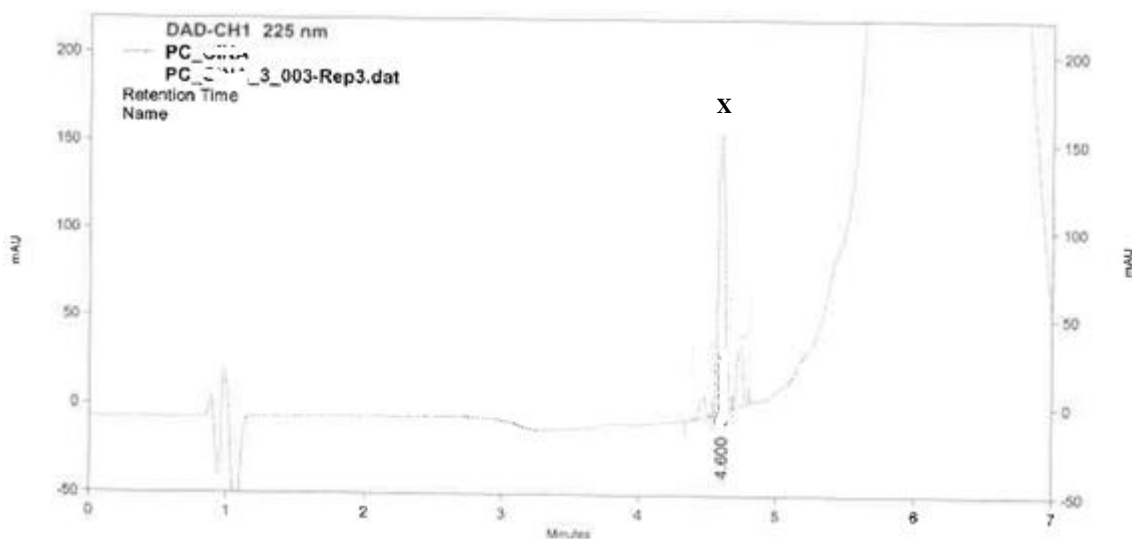


Figura 4.22 Cromatograma da Solução Padrão de Trabalho.

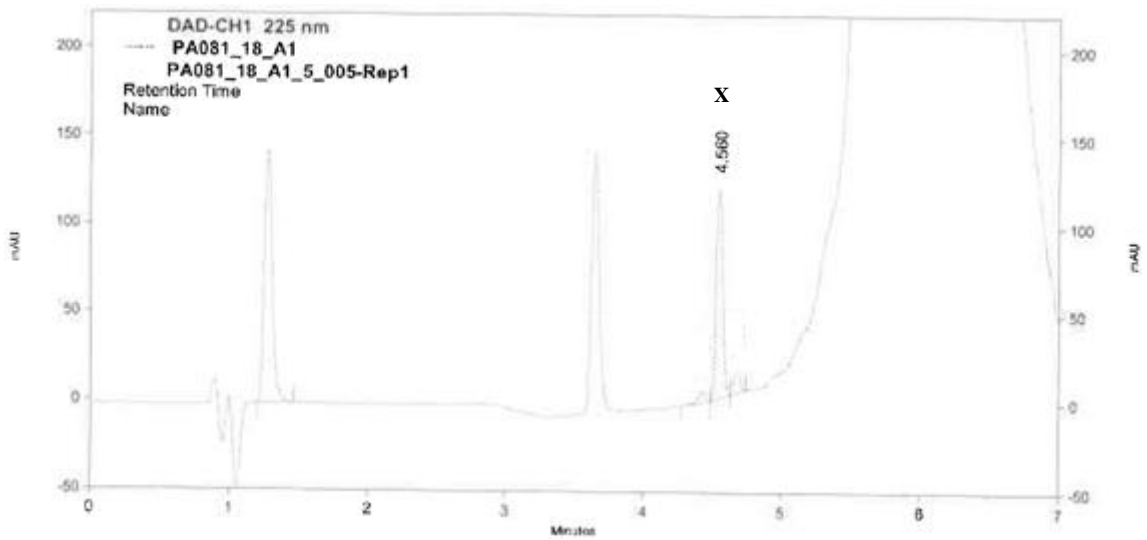


Figura 4.23 Cromatograma de Solução Amostra.

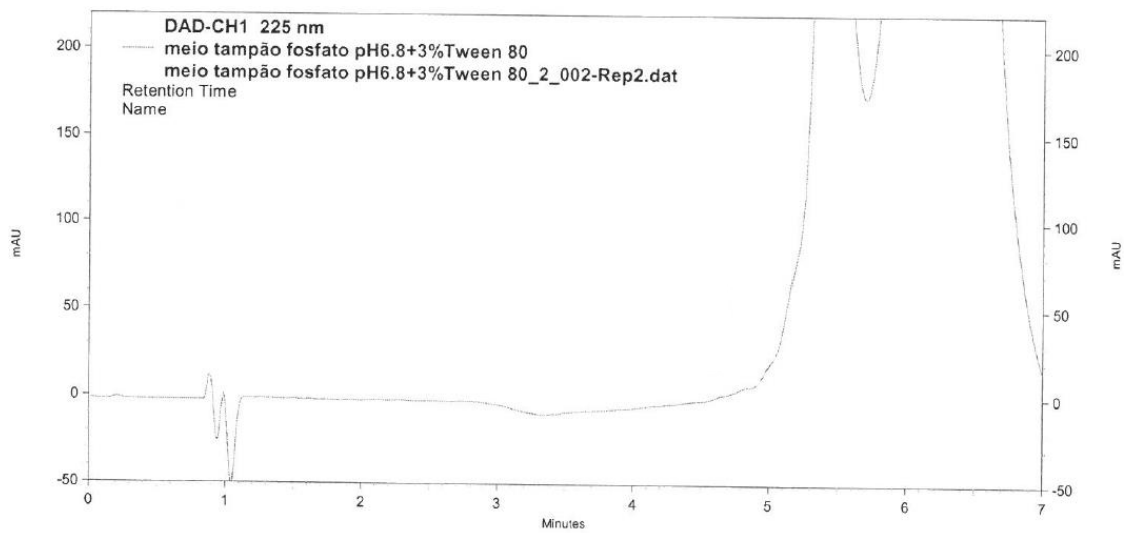


Figura 4.24 Cromatograma do Meio de Dissolução USP Tampão Fosfato pH 6,8+3%Tween80®.

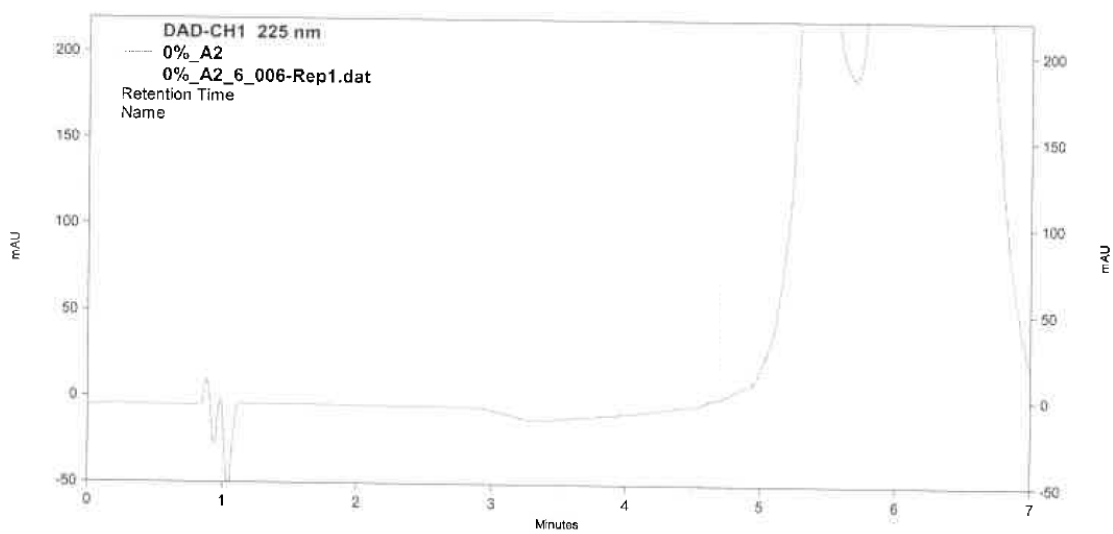


Figura 4.25 Cromatograma da solução placebo.

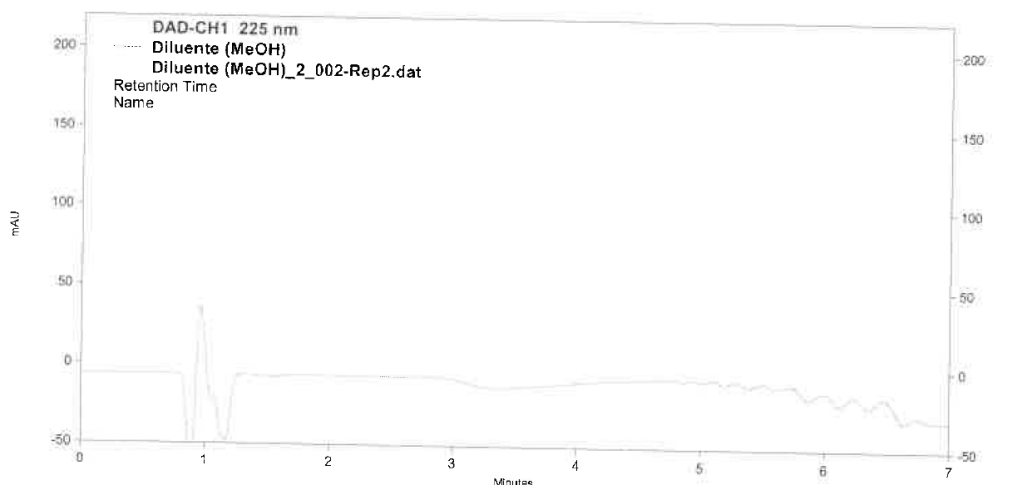


Figura 4.26 Cromatograma do Branco da Substância X – (Metanol).

Através dos resultados obtidos e apresentados para os diferentes meios de dissolução, é possível observar que não existem picos interferentes ao tempo de retenção dos picos cromatográficos dos analitos. Deste modo, pode-se afirmar que o critério de avaliação para a especificidade é cumprido. Concluindo-se que o método é específico para a quantificação das soluções amostra dos ensaios de dissolução da formulação comprimidos revestidos a 20mg + 40mg de (X+Y).

### Espetro 3D - Identificação DAD

Em relação ao detetor do sistema de HPLC, este trata-se de um detetor DAD, mas durante a validação foi utilizado com UV-Vis, como tal, tem como característica o facto de conseguir realizar varrimentos na gama do visível e UV.

Tem-se apresentado os espectros em 3D destes varrimentos, sendo que estes foram realizados tanto para a solução padrão como para a solução amostra. Realçando que foram executadas preparações no meio controlo de qualidade (HCl 0,1N) uma vez que, este é o único meio de dissolução em que ambas as substâncias ativas apresentam solubilidade equivalente e onde, portanto, se consegue realizar experimentalmente a obtenção de um único espectro das referidas substâncias.

Utilizando esta possibilidade, foi traçado um espectro na gama (190nm - 400nm), observando-se que o comprimento de onda máximo de absorvância, para qualquer dos analitos, é de cerca de 225nm.

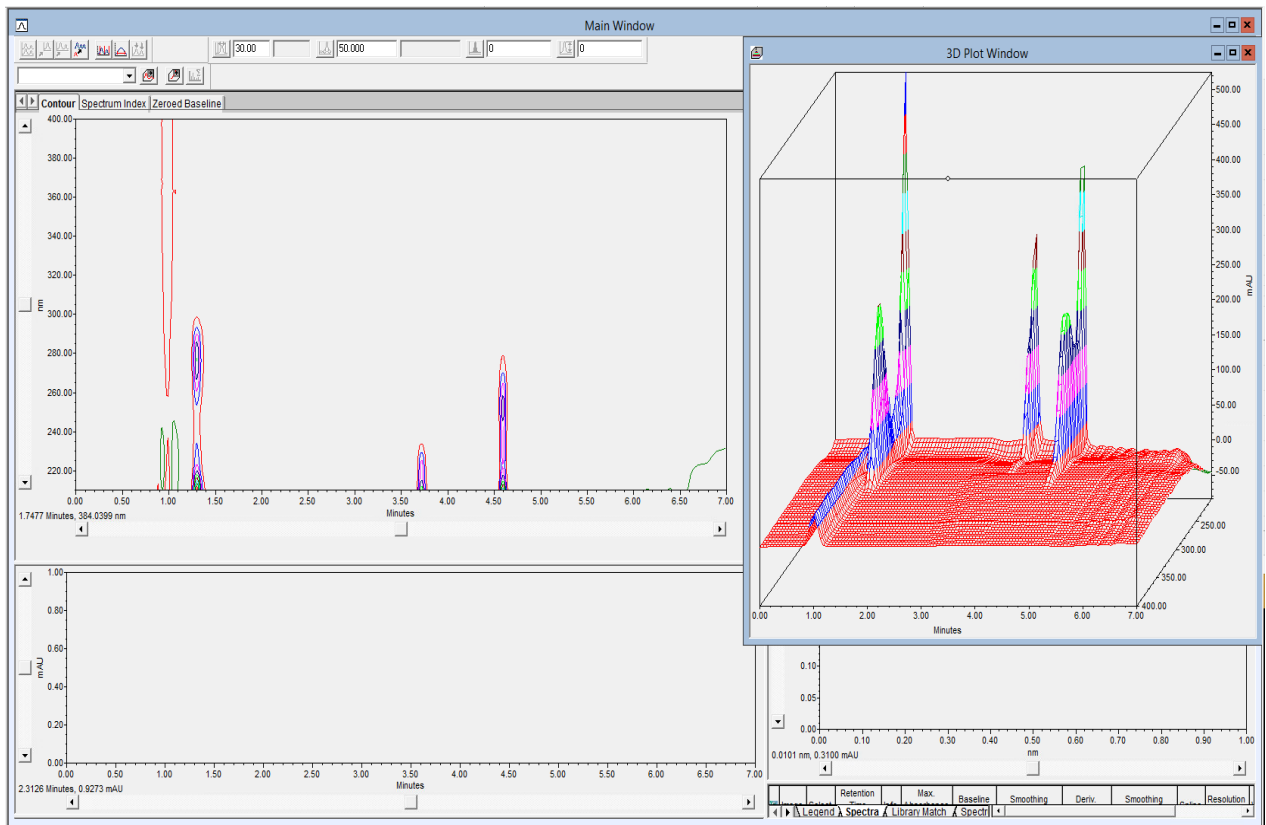


Figura 4.27 Varrimento e Espectro 3D da Solução Padrão.

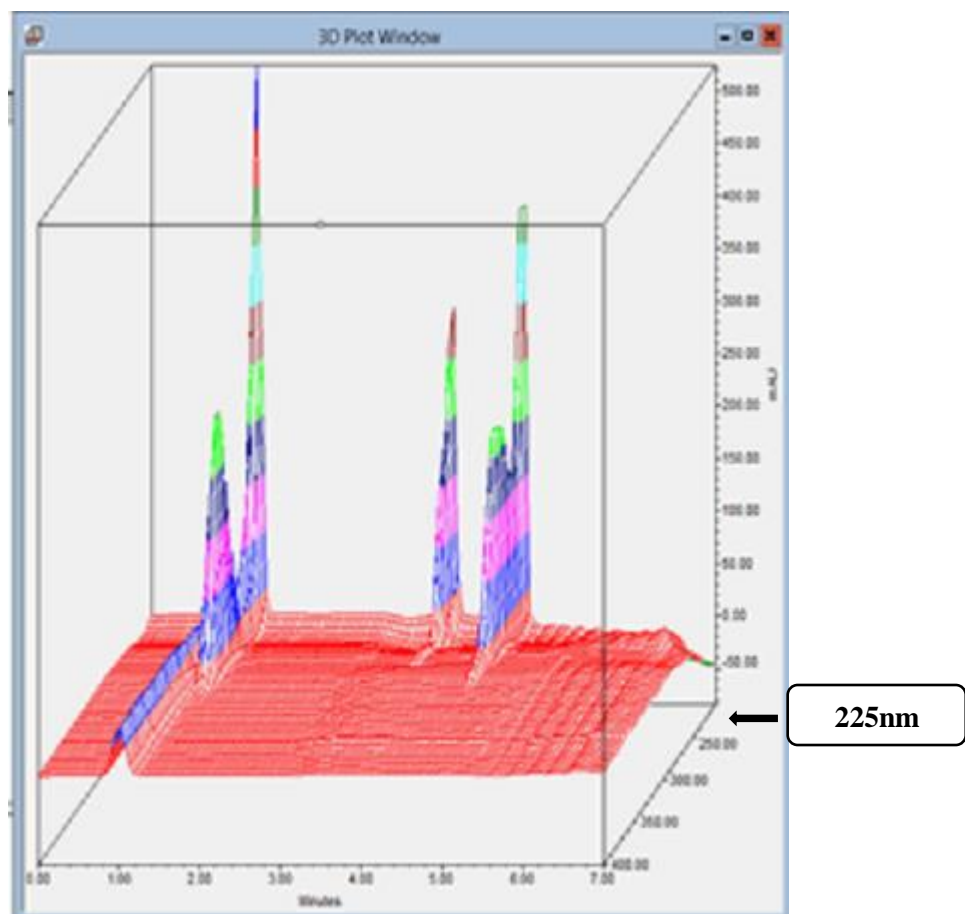


Figura 4.28 Espectro 3D da Solução Padrão com máxima absorção a 225nm.

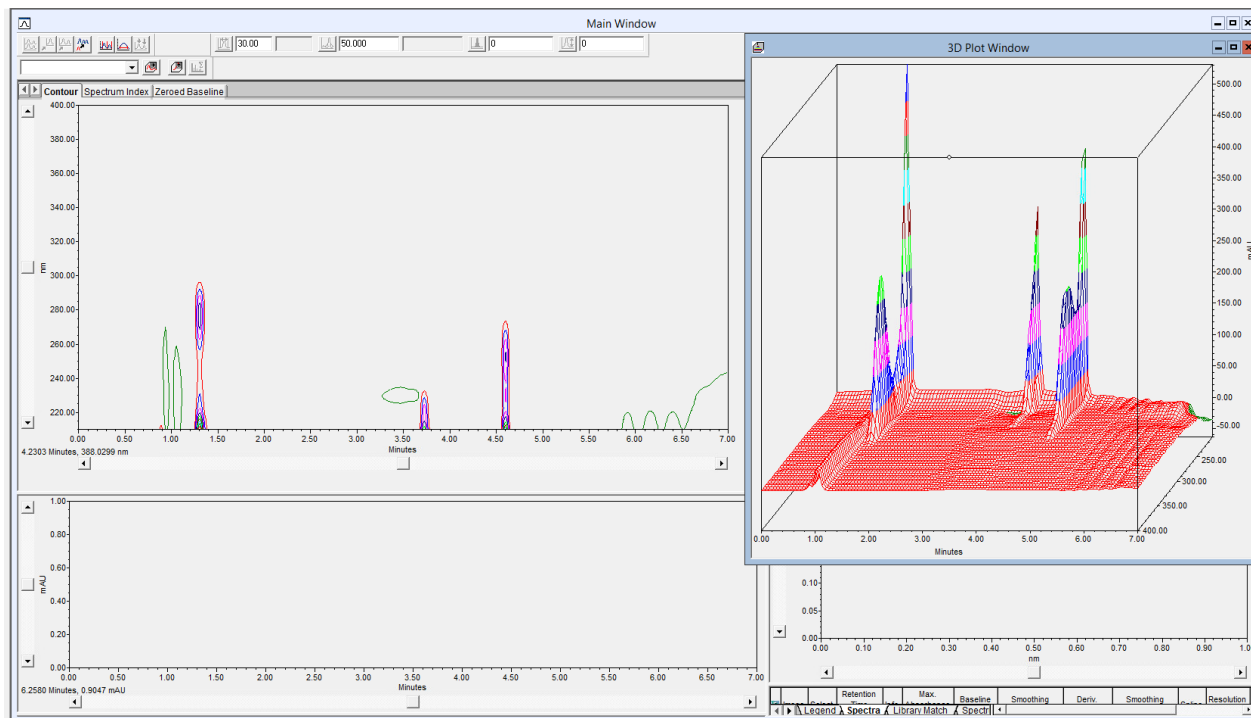


Figura 4.29 Varrimento e Espectro 3D da Solução Amostra.

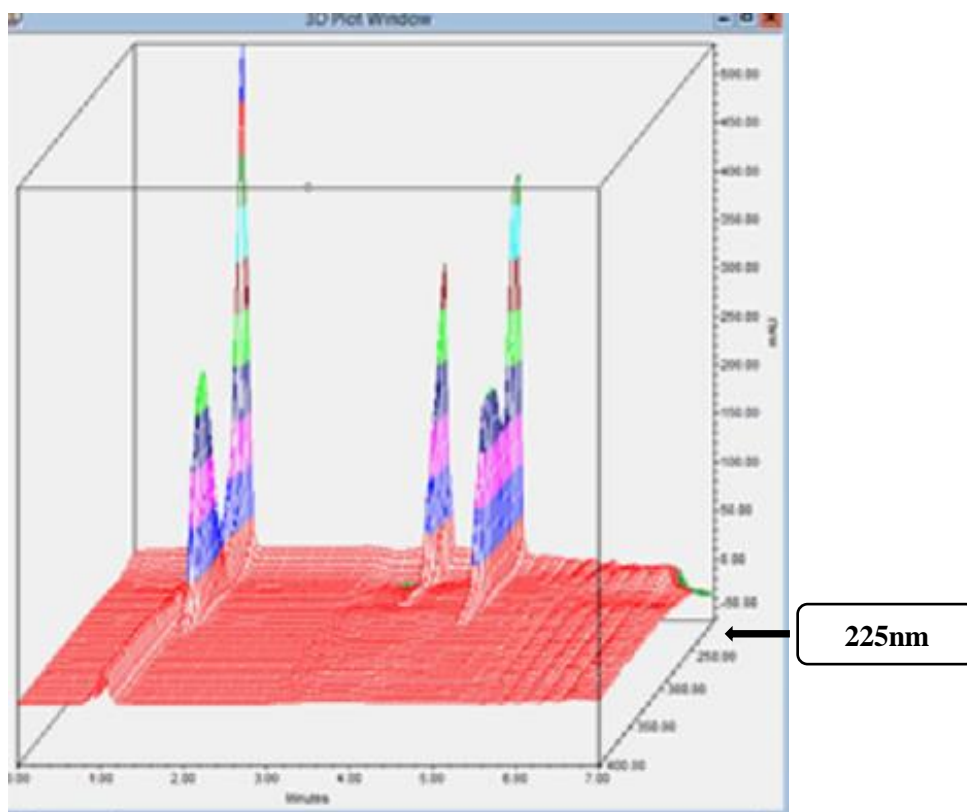


Figura 4.30 Espectro 3D da Solução Amostra com máxima absorção a 225nm.

Através da observação das figuras 4.27 e 4.29, pode ser comprovado que as substâncias ativas são absorvidas numa extensa gama. No entanto, pelo espectro 3D, figuras 4.28 e 4.30, pode ser verificado que o comprimento de onda que exibe e quantifica um pico de ativo maior é o de 225nm. Concluindo-se que a máxima absorção para os 3 ativos é, então, no comprimento de onda indicado pelo método.

Por último, é apresentado um espectro 3D do meio HCl 0.1N, de forma, a demonstrar que o mesmo não apresenta qualquer pico de cromatográfico ao comprimento de onda 225nm, ou seja, não absorve nesta gama.

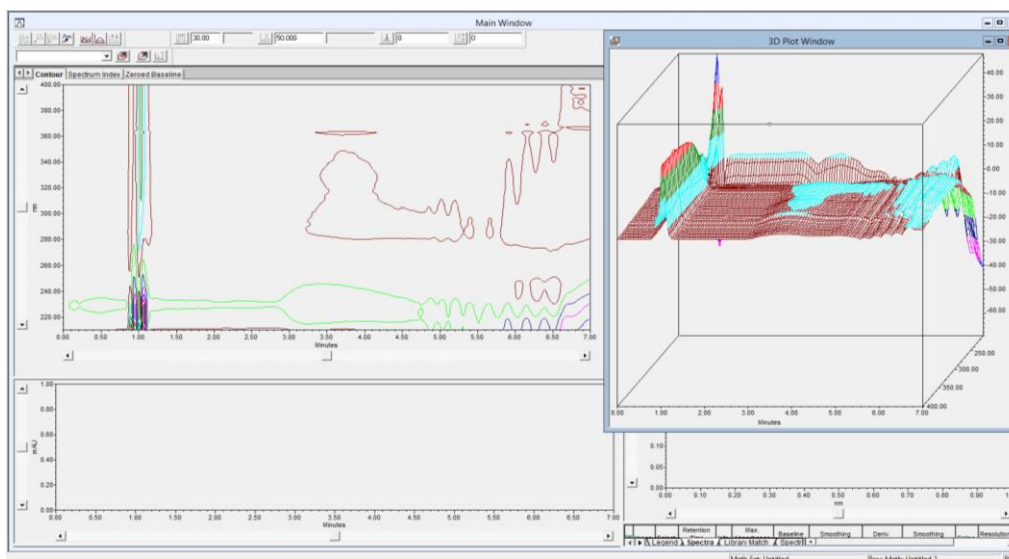


Figura 4.31 Varrimento e Espectro 3D do Meio de Dissolução HCl 0,1N.

### 4.3 Linearidade

Para o estudo deste parâmetro, que abrange de 10% a 150% da concentração de trabalho, foram preparadas oito soluções de concentração crescente, as quais foram injetadas em triplicado. Posteriormente, a linearidade foi determinada recorrendo à aplicação do método dos mínimos quadrados, ou seja, regressão linear e pelo *teste de mandel*.

Relativamente ao seu critério de aceitação, este é baseado em dois fatores, sendo estes:

- ◇ Coeficiente de determinação ( $r^2$ ) maior ou igual do que 0,999;
- ◇ Resíduos distribuídos aleatoriamente em torno de zero.

Nas tabelas e figuras apresentadas abaixo, tem-se os resultados experimentais obtidos para o parâmetro da linearidade em cada meio de dissolução.

#### Meio HCl 0.1N

Este é o único meio de dissolução, no qual são quantificados ambos os ativos.

## Substância X

Tabela 4.12 Resultados de Linearidade para o Meio de Dissolução HCl 0,1N.

Solução	Concentração (%)	Concentração (µg/mL)	Área	RSD (%)
1	9,97	2,22	55350	0,32
2	19,95	4,43	110180	0,94
3	29,95	6,65	167394	0,27
4	49,87	11,08	274689	0,27
5	79,79	17,73	441062	0,46
6	99,73	22,16	543935	0,24
7	119,68	26,39	654006	0,12
8	149,60	33,24	823673	0,23
<b>Interceção</b>			1496	
<b>Declive</b>			24644	
<b>Coefficiente de Correlação (r)</b>			0,999	
<b>Coefficiente de Determinação (r<sup>2</sup>)</b>			0,999	
<b>Limites de Interceção no IC<sub>95%</sub></b>			<b>Inferior</b>	<b>Superior</b>
			-2624	5316

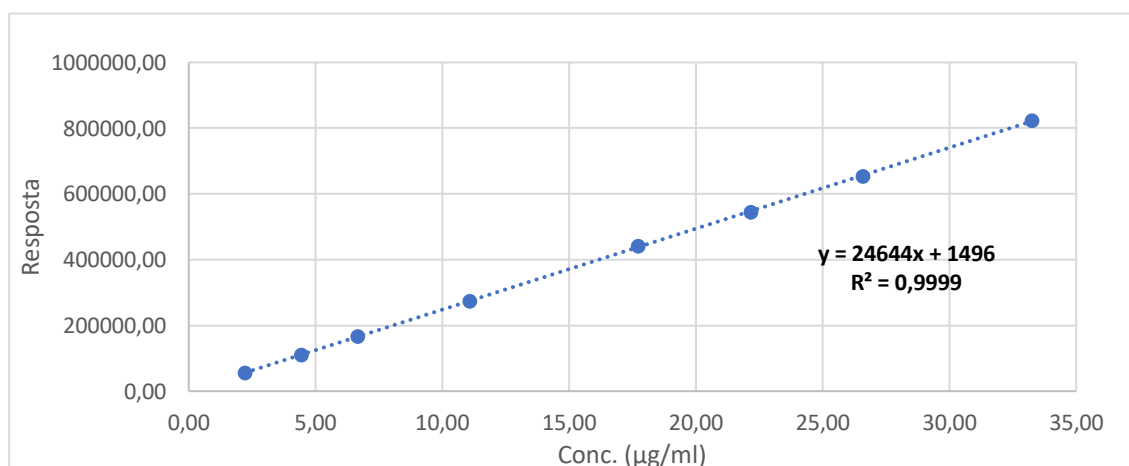


Figura 4.32 Retas de regressão linear da substância X para o meio de dissolução HCl 0,1N.

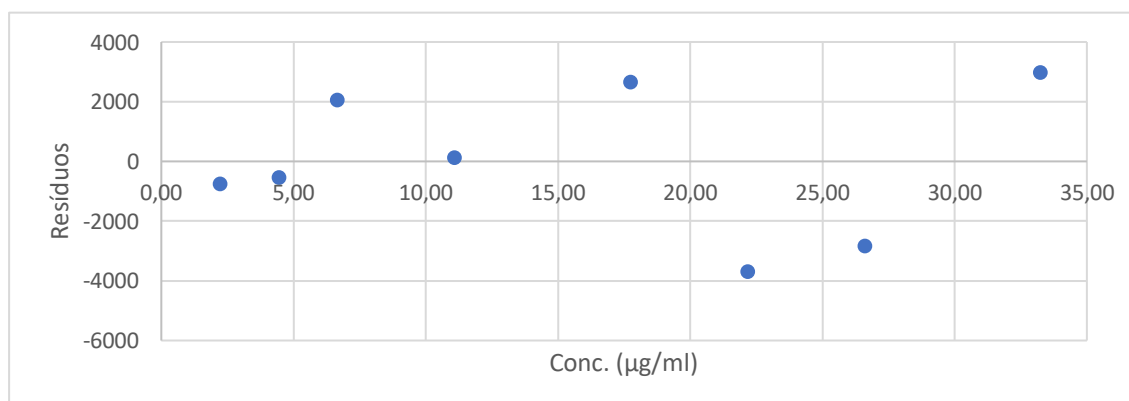


Figura 4.33 Distribuição dos resíduos.

## Substância Y

Tabela 4.13 Resultados de Linearidade para o Meio de Dissolução HCl 0,1N

Solução	Concentração (%)	Concentração (µg/mL)	Área	RSD (%)
1	9,96	4,43	115122	0,42
2	19,92	8,85	225656	0,98
3	29,88	13,28	340152	0,04
4	49,79	22,13	561177	0,06
5	79,67	35,40	912414	1,13
6	99,58	44,26	112074	0,06
7	119,50	53,11	1347156	0,17
8	149,38	66,38	1701167	0,23
<b>Interceção</b>			312	
<b>Declive</b>			25506	
<b>Coefficiente de Correlação (r)</b>			0,999	
<b>Coefficiente de Determinação (r<sup>2</sup>)</b>			0,999	
<b>Limites de Interceção no IC<sub>95%</sub></b>			<b>Inferior</b>	<b>Superior</b>
			-10375	10999

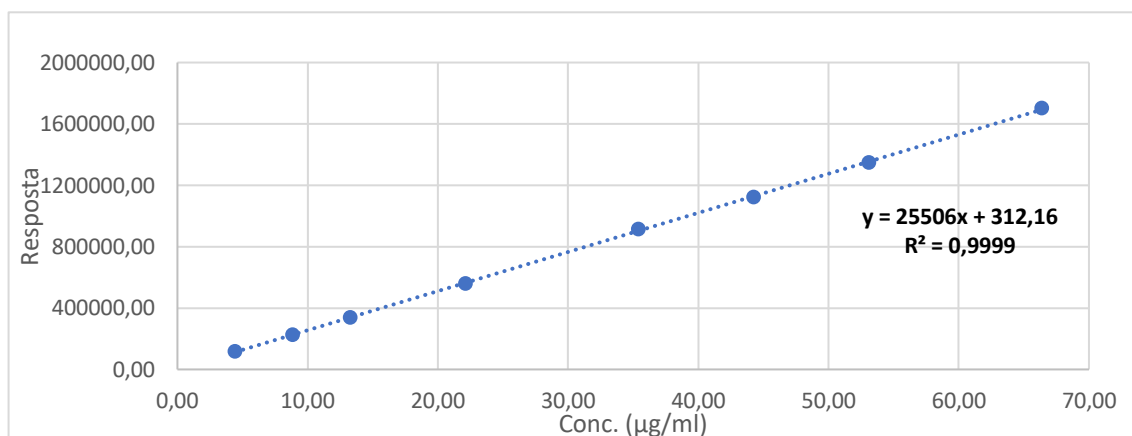


Figura 4.34 Retas de regressão linear da substância Y para o meio de dissolução HCl 0,1N.

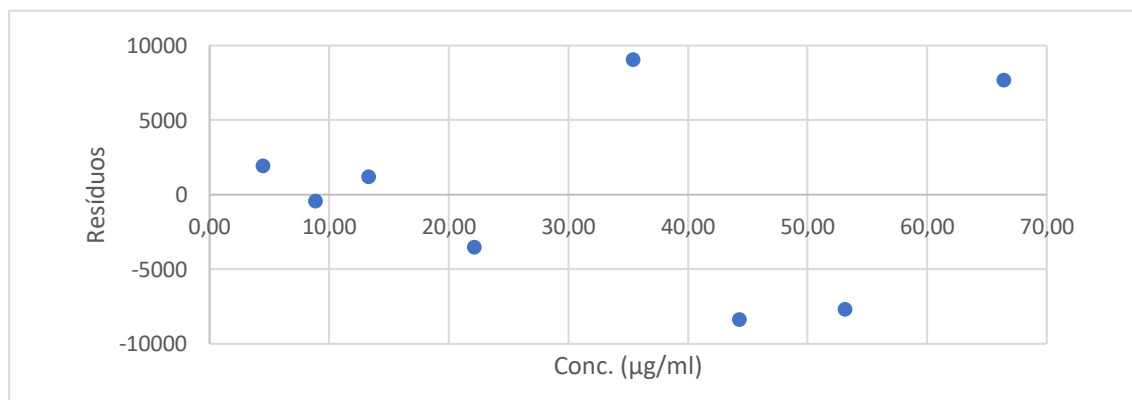


Figura 4.35 Distribuição dos resíduos.

## Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5

Tabela 4.14 Resultados da Linearidade para o Meio de Dissolução Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5.

Solução	Concentração (%)	Concentração (µg/mL)	Área	RSD (%)
1	10,00	4,45	418525	1,81
2	20,01	8,89	911684	0,64
3	30,01	13,34	1260037	0,42
4	50,01	22,23	2283803	0,55
5	80,02	35,56	3534418	0,52
6	100,03	44,45	4519120	0,42
7	120,03	55,34	5293993	0,16
8	150,04	66,68	6738327	0,27
<b>Interceção</b>			-21885	
<b>Declive</b>			100972	
<b>Coefficiente de Correlação (r)</b>			0,999	
<b>Coefficiente de Determinação (r<sup>2</sup>)</b>			0,999	
<b>Limites de Interceção no IC<sub>95%</sub></b>			<b>Inferior</b>	<b>Superior</b>
			-108566	64796

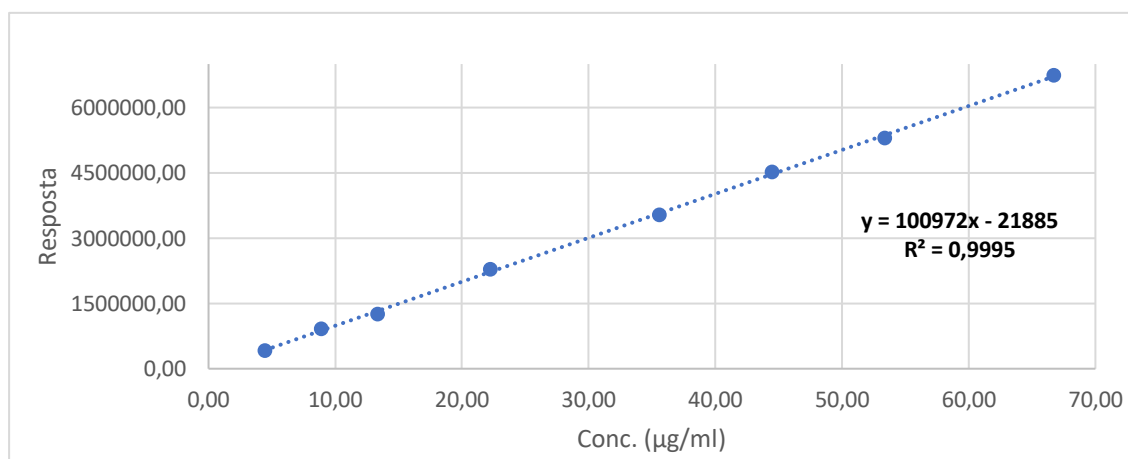


Figura 4.36 Reta de regressão linear da substância Y para o meio de dissolução Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5.

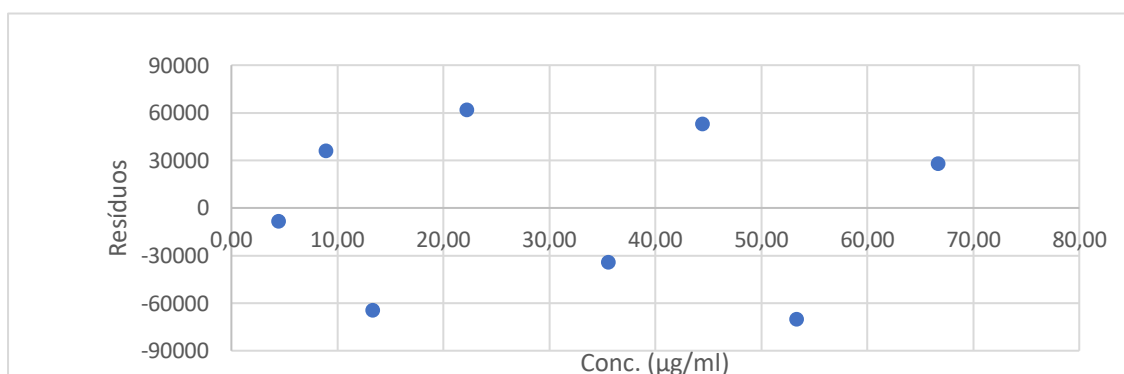


Figura 4.37 Distribuição dos Resíduos.

## USP Tampão Fosfato pH 6,8

Tabela 4.15 Resultados da Linearidade para o Meio de Dissolução USP Tampão Fosfato pH 6,8.

Solução	Concentração (%)	Concentração (µg/mL)	Área	RSD (%)
1	10,00	4,44	466191	2,39
2	20,00	8,89	921295	0,85
3	30,00	13,33	1400585	0,59
4	50,00	22,22	2306471	0,86
5	80,00	35,55	3644499	0,54
6	100,00	44,44	4494030	0,27
7	120,00	55,33	5379125	0,15
8	150,00	66,66	6714445	0,07
<b>Interceção</b>			50096	
<b>Declive</b>			100159	
<b>Coefficiente de Correlação (r)</b>			0,999	
<b>Coefficiente de Determinação (r<sup>2</sup>)</b>			0,999	
<b>Limites de Interceção no IC<sub>95%</sub></b>			<b>Inferior</b>	<b>Superior</b>
			101199	89218

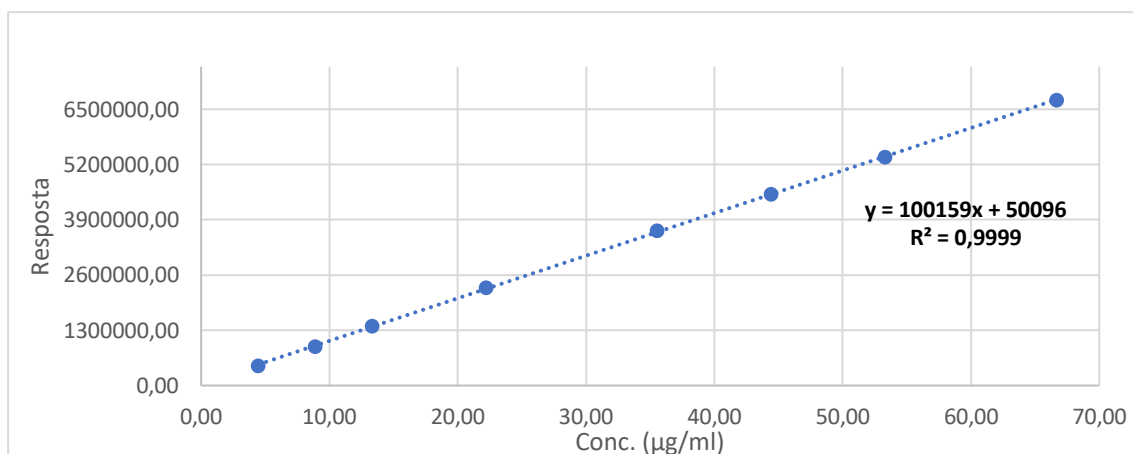


Figura 4.38 Retas de regressão linear para a substância Y para o meio de dissolução USP Tampão Fosfato pH 6,8.

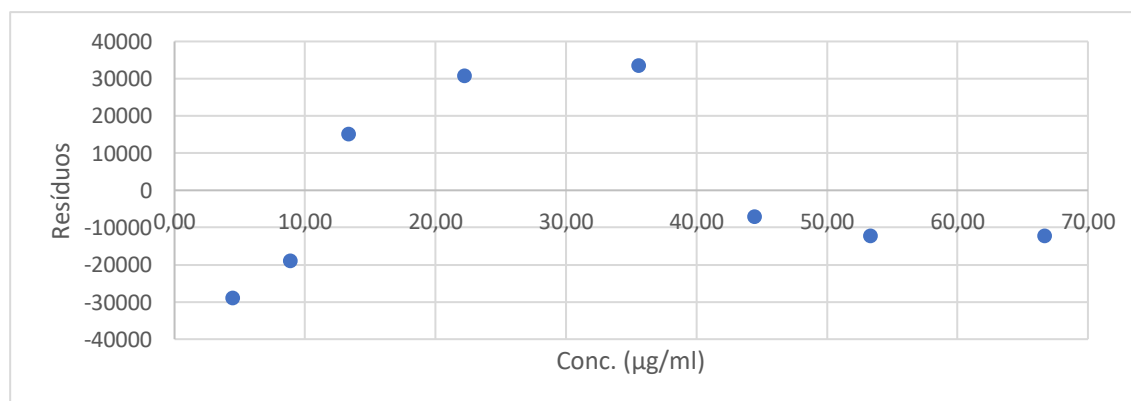


Figura 4.39 Distribuição dos Resíduos.

### Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5+2% Tween80®

Tabela 4.16 Resultados da Linearidade para o Meio de Dissolução Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5+2% Tween80®.

Solução	Concentração (%)	Concentração (µg/mL)	Área	RSD (%)
1	10,05	2,23	190761	1,15
2	20,11	4,47	413837	0,24
3	30,16	6,70	598399	0,37
4	50,27	11,17	1042805	0,23
5	80,44	17,87	1656030	0,15
6	100,55	22,34	2074986	0,23
7	120,65	26,81	2504677	0,22
8	150,82	33,51	3093242	0,65
<b>Interceção</b>			-9833	
<b>Declive</b>			93145	
<b>Coefficiente de Correlação (r)</b>			0,999	
<b>Coefficiente de Determinação (r<sup>2</sup>)</b>			0,999	
<b>Limites de Interceção no IC<sub>95%</sub></b>			<b>Inferior</b>	<b>Superior</b>
			-31391	11726

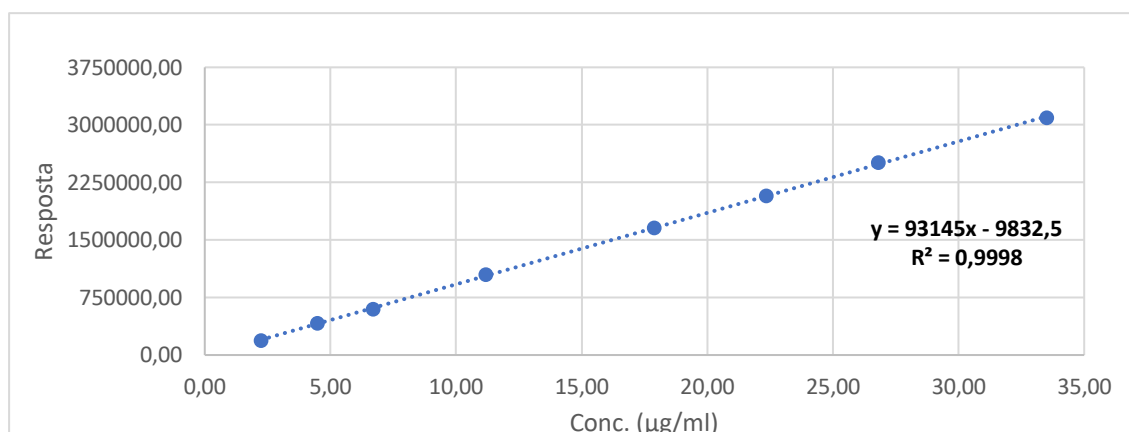


Figura 4.40 Reta de regressão linear para a substância X para o meio de dissolução Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5+2% Tween80®.

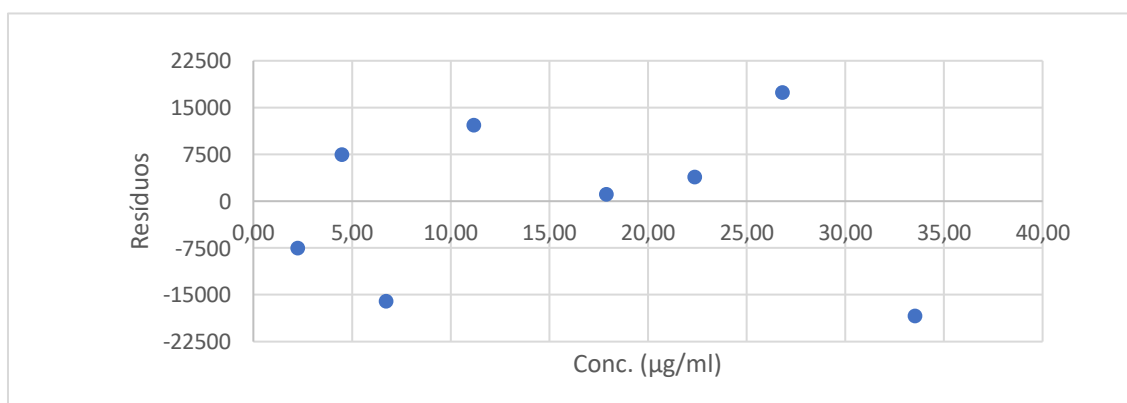


Figura 4.41 Distribuição dos Resíduos.

## USP Tampão Fosfato pH 6,8+3% Tween80®

Tabela 4.17 Resultados da Linearidade para o Meio de Dissolução USP Tampão Fosfato pH 6,8+3% Tween80®.

Solução	Concentração (%)	Concentração (µg/mL)	Área	RSD (%)
1	10,05	2,23	198018	0,65
2	20,11	4,47	402735	0,20
3	30,16	6,70	609161	0,11
4	50,27	11,17	1034509	0,22
5	80,44	17,87	1613814	0,11
6	100,55	22,34	2044349	0,13
7	120,65	26,81	2428481	0,72
8	150,82	33,51	3094973	0,43
<b>Interceção</b>			-8432	
<b>Declive</b>			91860	
<b>Coefficiente de Correlação (r)</b>			0,999	
<b>Coefficiente de Determinação (r<sup>2</sup>)</b>			0,999	
<b>Limites de Interceção no IC<sub>95%</sub></b>			<b>Inferior</b>	<b>Superior</b>
			-36549	19686

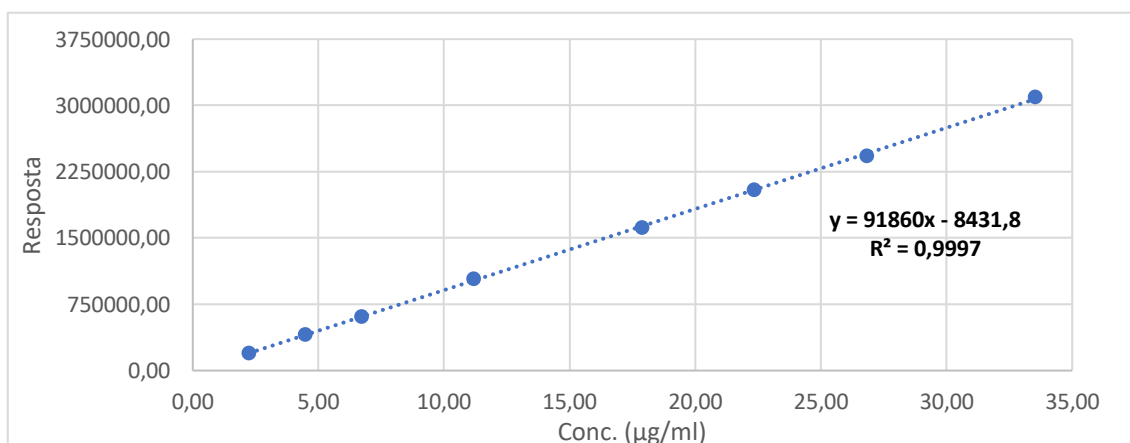


Figura 4.42 Reta de regressão linear para a substância X para o meio de dissolução USP Tampão Fosfato pH 6,8+3% Tween80®.

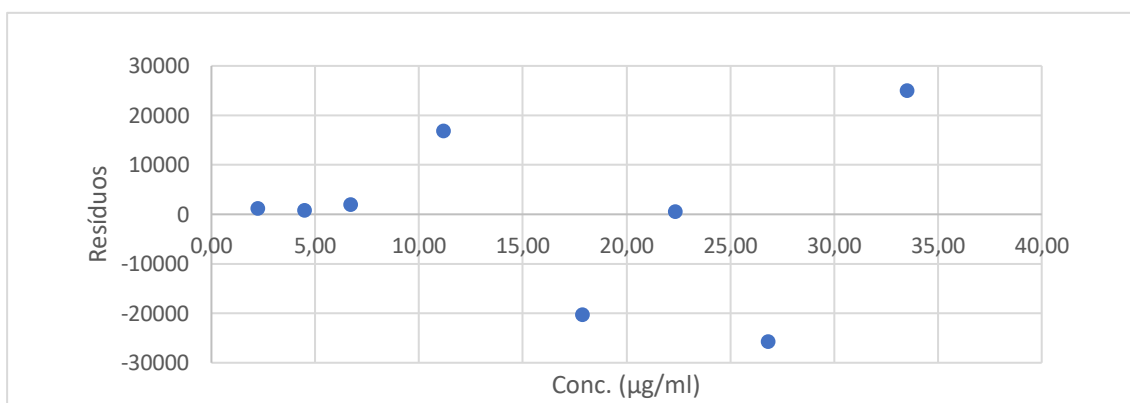


Figura 4.43 Distribuição dos Resíduos.

Após observação dos resultados experimentais, é possível verificar que o critério de aceitação para a linearidade é cumprido em todos os meios de dissolução da validação. Concluindo-se, assim, que este método é linear na gama de trabalho de 10% a 150%.

### Teste de *Mandel*

Para o parâmetro da linearidade, foi ainda realizado o teste de *Mandel* para demonstrar a adequabilidade da curva de linearidade a um ajuste linear comparativamente a um ajuste polinomial.

Na tabela seguinte podem ser observados os resultados determinados, deste teste, para as substâncias ativas em cada meio de dissolução.

Tabela 4.18 Resultados do *Teste de Mandel*.

Meio de Dissolução	Ativo	PG	F
HCl 0,1N	X	- 0,292	5,12
	Y	- 0,136	
Tampão Fosfato pH 4,5	Y	- 0,034	
Tampão Fosfato pH 6,8	Y	- 0,034	
Tampão Fosfato pH 4,5+2% Tween 80	X	- 0,077	
Tampão Fosfato pH 6,8+3% Tween 80	X	- 0,078	

Através dos valores obtidos, pode ser concluído que o ajuste polinomial não é significativamente melhor que o ajuste linear. Isto acontece, pois, o valor do teste (PG) é sempre inferior ao valor da distribuição de *Fisher*, para n-3 graus de liberdade, sendo este valor de 5,12. Deste modo, sempre que PG é inferior ao valor de F significa que a função de calibração é linear, como tal, conclui-se que um ajuste polinomial não é adequado pois não demonstra ter qualquer benefício relativamente ao modelo de correlação linear.

#### 4.4 Limite de Quantificação (*LoQ*)

O limite de quantificação foi determinado recorrendo aos dados obtidos na regressão linear, mais especificamente, o declive e o desvio padrão referentes à reta de linearidade de cada meio de dissolução. Através destes dados, aplicou-se a equação 2.7 e obteve-se o limite de quantificação de cada substância ativa no respetivo meio de dissolução.

Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 4.19.

Tabela 4.19 Limites de Quantificação dos Meios de Dissolução.

Meio de Dissolução	Ativo	Desvio Padrão	Declive	LoQ (µg/mL)	LoQ (%)
HCl 0,1N	X	1684	24644	<b>0,68</b>	<b>3,07</b>
	Y	4368	25506	<b>1,71</b>	<b>3,85</b>
Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5	Y	35425	100972	<b>3,50</b>	<b>7,89</b>
USP Tampão Fosfato pH 6,8	Y	15988	100159	<b>1,59</b>	<b>3,57</b>
Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5+2% Tween80 <sup>®</sup>	X	8810	93145	<b>0,94</b>	<b>4,23</b>
USP Tampão Fosfato pH 6,8+3% Tween80 <sup>®</sup>	X	11491	91860	<b>1,25</b>	<b>5,62</b>

Pela tabela 4.19 é possível constatar que nenhum dos limites determinados é igual ou superior a 10%, sendo todos os valores obtidos abaixo desta percentagem, ou seja, abaixo do primeiro ponto da reta de linearidade.

Na tabela 4.20, pode ser constatado que os valores obtidos para os limites de quantificação em todos os meios de dissolução situam-se abaixo dos 10% quando comparadas as concentrações dos mesmos com as concentrações das retas de linearidade.

Tabela 4.20 Limites de Quantificação e Concentração de 1º Ponto de Linearidade.

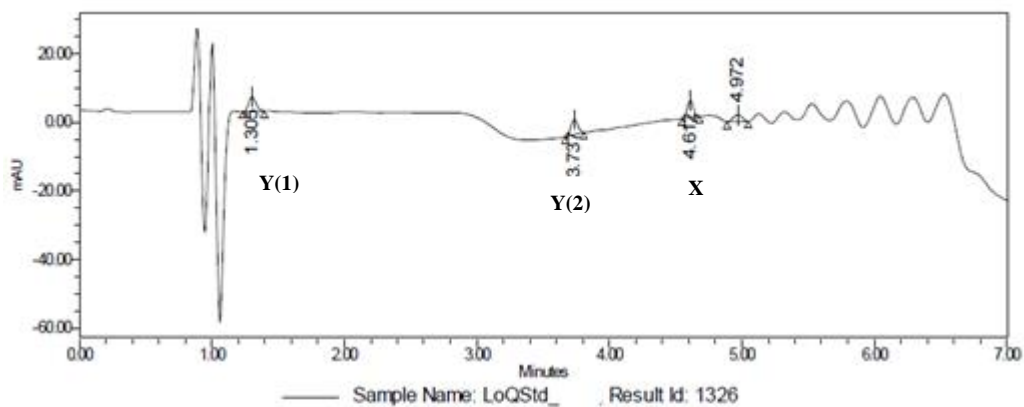
Meio de Dissolução	Ativo	LoQ (µg/mL)	Concentração de 1º Ponto (µg/mL)
HCl 0,1N	X	<b>0,68</b>	<b>2,22</b>
	Y	<b>1,71</b>	<b>4,43</b>
Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5	Y	<b>3,50</b>	<b>4,45</b>
USP Tampão Fosfato pH 6,8	Y	<b>1,59</b>	<b>4,44</b>
Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5+2% Tween80 <sup>®</sup>	X	<b>0,94</b>	<b>2,23</b>
USP Tampão Fosfato pH 6,8+3% Tween80 <sup>®</sup>	X	<b>1,25</b>	<b>2,23</b>

Para demonstrar a veracidade dos valores determinados para o limite de quantificação, foi realizada uma preparação de duas soluções à concentração do LoQ de cada uma das substâncias ativas no meio de controlo de qualidade. Na totalidade, foram realizadas 10 injeções de cada solução e na tabela 4.21 apresenta-se os valores obtidos em cada injeção.

Tabela 4.21 Valores de *LoQ* obtidos para as Substâncias Ativas.

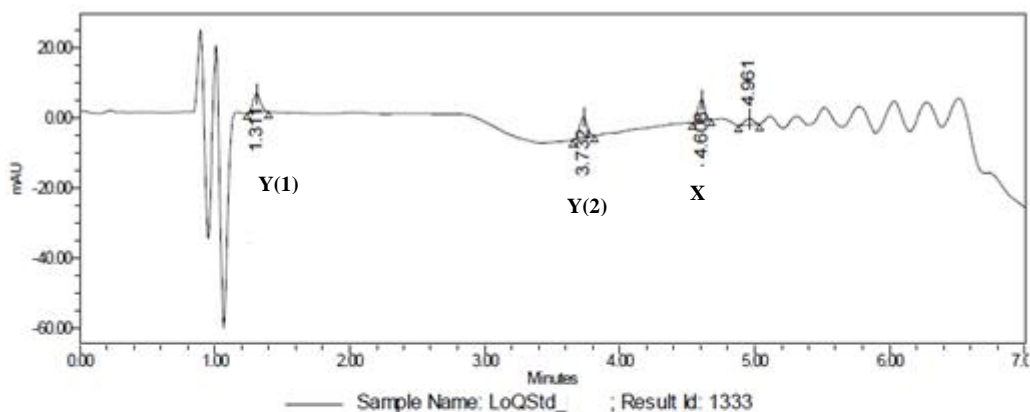
Injeção	<i>LoQ</i> (X)	<i>LoQ</i> (Y)
1	16256	42860
2	16651	42862
3	16404	42922
4	16216	42449
5	16236	44046
6	16503	42928
7	16048	43261
8	16329	42226
9	16485	42344
10	16459	41869
<b>Média</b>	<b>16359</b>	<b>42777</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>1,1</b>	<b>1,4</b>

Nos cromatogramas apresentados, de seguida, pode ser observada a quantificação tanto do *LoQ* da substância X como do *LoQ* da substância Y.



Component Results						
	Name	RT (min)	Area	% Area	Symmetry Factor	EP Plate Count
	Y(1)	1.305	16653	28.421	1.12	2456
	Y(2)	3.737	16187	27.625	0.98	22122
	X	4.612	16329	27.868	0.99	39232
4		4.972	9425	16.086	0.94	21001
	Sum		58593.6	100.0		

Figura 4.44 Cromatograma da Quantificação do *LoQ* da Substância X.



Component Results						
	Name	RT (min)	Area	% Area	Symmetry Factor	EP Plate Count
	Y(1)	1.311	21541	29.467	1.12	2470
	Y(2)	3.732	22505	30.786	0.99	21305
	X	4.608	21017	28.750	1.01	38791
4		4.961	8039	10.997	0.93	21562
Sum			73101.3	100.0		

Figura 4.45 Cromatograma da Quantificação do *LoQ* da Substância Y.

Seguidamente, tem-se a tabela 4.22 que compara o valor registado para a área de cada solução padrão preparada ao limite de quantificação com o seu valor esperado teoricamente. É necessário realçar que a área da substância Y é obtida pela soma das áreas dos seus dois constituintes.

Tabela 4.22 Resultados da Área do *LoQ*.

Ativo	Valor Teórico	Valor Experimental	RSD (%)	Desvio (%)
X	16347	16329	1,1	-0,1
Y	43968	44046	1,4	0,2

Com base na análise do valor teórico e do resultado experimental para cada substância ativa, pode ser observado que estes se apresentam na mesma ordem de grandeza, com um valor de desvio reduzido, o que demonstra também a exatidão do método para este nível de concentração.

Por fim, obteve-se os valores da razão sinal/ruído para as injeções das duas soluções preparadas à concentração do *LoQ* de cada uma das substâncias ativas. Na tabela 4.23 tem-se apresentados os resultados obtidos e pode ser concluído que estes estão de acordo com o expectável, ou seja, valores de razão igual ou superior a 10.

Tabela 4.23 Resultados da razão sinal/ruído do *LoQ*.

<b><i>LoQ</i> (Sinal/ Ruído)</b>			
	<b>Substância Ativa</b>		
<b>Injeção</b>	<b>X</b>	<b>Y(1)</b>	<b>Y(2)</b>
1	24,3	30,4	31,9
2	33,3	23,0	24,4
3	15,9	18,9	19,5
4	14,6	23,4	24,1
5	13,8	25,1	27,1
6	19,3	19,0	19,5
7	19,5	17,5	18,4
8	22,7	30,0	30,9
9	18,4	13,2	13,5
10	12,0	25,7	26,9
<b>Média</b>	19,4	22,6	23,6

#### 4.5 Limite de Detecção (*LoD*)

A determinação do limite de detecção depende dos resultados obtidos na regressão linear, assim como acontece no parâmetro anterior. Neste caso, a fórmula a aplicar encontra-se demonstrada na equação 2.8. Deste modo, obtém-se este parâmetro para as substâncias ativas de cada meio de dissolução.

Tabela 4.24 Limites de Detecção dos Meios de Dissolução.

<b>Meio de Dissolução</b>	<b>Ativo</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Declive</b>	<b><i>LoD</i> (µg/mL)</b>	<b><i>LoD</i> (%)</b>
HCl 0,1N	<b>X</b>	1684	24644	<b>0,20</b>	<b>0,92</b>
	<b>Y</b>	4368	25506	<b>0,51</b>	<b>1,15</b>
Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5	<b>Y</b>	35423	100972	<b>1,05</b>	<b>2,37</b>
USP Tampão Fosfato pH 6,8	<b>Y</b>	15988	100159	<b>0,48</b>	<b>1,08</b>
Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5+2% Tween80 <sup>®</sup>	<b>X</b>	8810	93145	<b>0,28</b>	<b>1,28</b>
USP Tampão Fosfato pH 6,8+3% Tween80 <sup>®</sup>	<b>X</b>	11491	91860	<b>0,38</b>	<b>1,69</b>

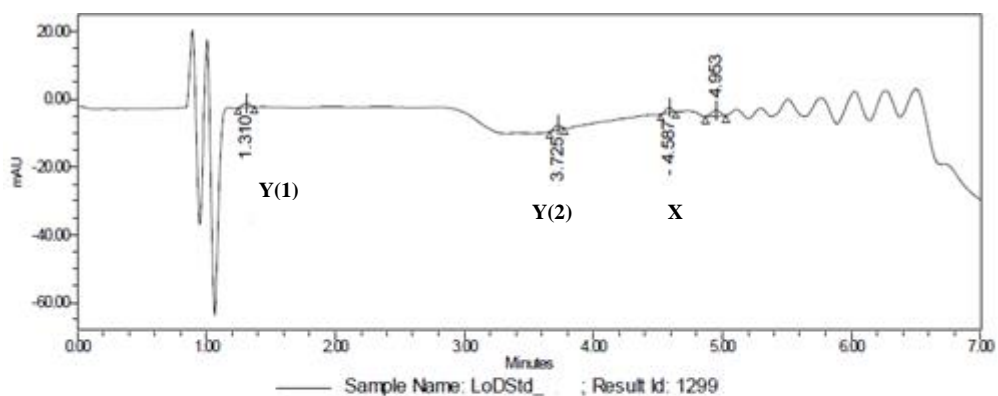
O limite de detecção representa a concentração mínima de substância ativa detetável.

De modo, a mostrar a fiabilidade dos valores determinados para o limite de detecção, foi realizada uma preparação de duas soluções amostra à concentração do *LoD* de cada uma das substâncias ativas no meio de controlo de qualidade, ou seja, meio HCl 0,1N. Na totalidade, foram realizadas 10 injeções de cada solução e na tabela 4.25 apresenta-se os valores obtidos em cada injeção.

Tabela 4.25 Valores de *LoD* obtidos para as Substâncias Ativas.

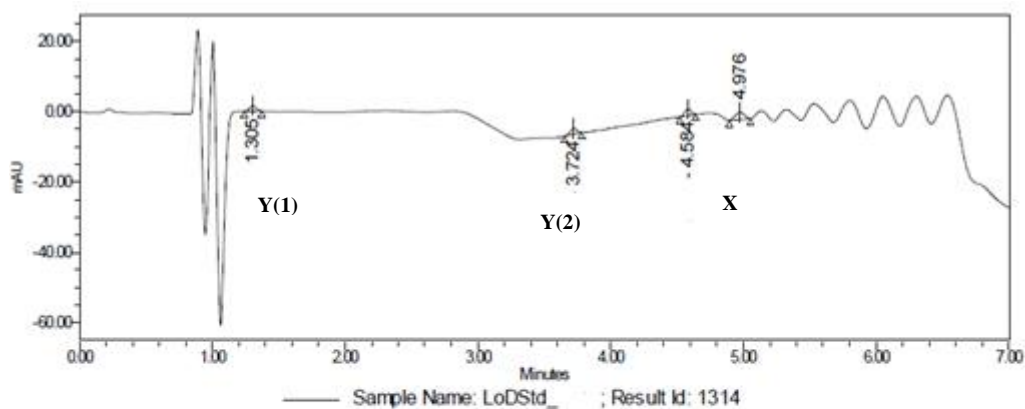
Injeção	<i>LoD</i> (X)	<i>LoD</i> (Y)
1	4956	10417
2	5062	11403
3	5651	11449
4	5273	11319
5	5544	11583
6	5439	11618
7	5284	11348
8	5121	11008
9	5194	10768
10	5139	11334
<b>Média</b>	<b>5266</b>	<b>11225</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>4,2</b>	<b>3,4</b>

Nos cromatogramas apresentados, de seguida, pode ser observada a quantificação tanto do *LoD* da substância X como do *LoD* da substância Y.



Component Results						
	Name	RT (min)	Area	% Area	Symmetry Factor	EP Plate Count
	Y(1)	1.310	4552	19.961	1.01	2606
	Y(2)	3.725	4715	20.674	0.87	22909
	X	4.587	4956	21.733	0.88	39178
	4	4.953	8582	37.632	0.92	20602
	Sum		22804.8	100.0		

Figura 4.46 Cromatograma da Quantificação do *LoD* da Substância X.



Component Results						
	Name	RT (min)	Area	% Area	Symmetry Factor	EP Plate Count
	Y(1)	1.305	5760	20.892	1.05	2532
	Y(2)	3.724	5858	21.250	0.88	22405
	X	4.584	6163	22.357	0.90	38978
		4.976	9787	35.501	0.95	20026
	Sum		27567.6	100.0		

Figura 4.47 Cromatograma da Quantificação do *LoD* da Substância Y.

Seguidamente, tem-se uma tabela 4.26 que compara o valor adquirido para a área de cada limite de detecção com o seu valor esperado teoricamente. É necessário realçar que a área da substância Y é obtida pela soma das áreas dos seus dois constituintes.

Tabela 4.26 Resultados da Área do *LoD*.

Ativo	Valor Teórico	Valor Experimental	RSD (%)	Desvio (%)
X	4808	4956	4,2	3,1
Y	13113	11618	3,4	-11,4

Com base na análise do valor teórico e do resultado experimental para cada substância ativa, pode ser observado que estes se apresentam na mesma ordem de grandeza, com um valor de desvio reduzido, o que demonstra também a exatidão do método para este nível de concentração.

Por fim, obteve-se os valores da razão sinal/ruído para as injeções das duas soluções preparadas à concentração do *LoD* de cada uma das substâncias ativas. Na tabela 4.27 tem-se apresentados os resultados obtidos e pode ser concluído que estes estão de acordo com o expectável, ou seja, valores de razão igual ou superior a 3.

Tabela 4.27 Resultados da razão sinal/ruído do *LoD*.

<b><i>LoD</i> (Sinal/Ruído)</b>			
	<b>Substância Ativa</b>		
<b>Injeções</b>	<b>X</b>	<b>Y(1)</b>	<b>Y(2)</b>
1	7,3	6,8	6,6
2	4,9	7,1	7,7
3	9,1	6,1	6,4
4	5,9	6,1	5,9
5	7,4	6,6	6,8
6	6,1	5,0	5,6
7	6,9	5,4	5,7
8	5,6	6,9	6,8
9	7,3	5,8	5,8
10	4,5	4,8	5,2
<b>Média</b>	6,5	6,1	6,2

#### 4.6 Precisão

Para avaliar se o método é preciso, este parâmetro foi avaliado em três vertentes diferentes, sendo estas: repetibilidade do sistema; repetibilidade do método e precisão intermédia.

##### Repetibilidade do sistema

A repetibilidade do sistema foi determinada através de seis injeções consecutivas da mesma solução padrão.

O seu critério de aceitação baseia-se no desvio padrão relativo (RSD) ser inferior ou igual a 2,0%.

Nas tabelas seguintes são apresentados os resultados experimentais para cada meio de dissolução.

Tabela 4.28 Resultados da Repetibilidade do Sistema da substância X no meio HCl 0,1N.

<b>Meio de Dissolução - HCl 0,1N</b>			
	<b>Injeção</b>	<b>Área</b>	<b>Tempo de retenção (min)</b>
<b>Substância X</b>	<b>1</b>	549466	4,18
	<b>2</b>	548405	4,17
	<b>3</b>	549539	4,18
	<b>4</b>	549572	4,17
	<b>5</b>	550232	4,17
	<b>6</b>	550050	4,18
<b>Média</b>		549544	4,18
<b>RSD (%)</b>		<b>0,12</b>	<b>0,12</b>

Tabela 4.29 Resultados da Repetibilidade do Sistema da substância Y no meio HCl 0,1N.

<b>Meio de Dissolução - HCl 0,1N</b>			
	<b>Injeção</b>	<b>Área</b>	<b>Tempo de retenção (min)</b>
<b>Substância Y</b>	<b>1</b>	1133744	1,34 e 3,37
	<b>2</b>	1134770	1,35 e 3,36
	<b>3</b>	1135124	1,35 e 3,37
	<b>4</b>	1136070	1,34 e 3,36
	<b>5</b>	1136750	1,35 e 3,36
	<b>6</b>	1137906	1,35 e 3,37
<b>Média</b>		1135727	1,35 e 3,37
<b>RSD (%)</b>		<b>0,13</b>	<b>0,38 e 0,16</b>

Tabela 4.30 Resultados da Repetibilidade do Sistema da substância Y no meio Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5.

<b>Meio de Dissolução – Tampão Fosfato pH 4,5</b>			
	<b>Injeção</b>	<b>Área</b>	<b>Tempo de retenção (min)</b>
<b>Substância Y</b>	<b>1</b>	4549547	1,39 e 3,95
	<b>2</b>	4559679	1,39 e 3,95
	<b>3</b>	4544405	1,39 e 3,94
	<b>4</b>	4552170	1,39 e 3,95
	<b>5</b>	4538938	1,39 e 3,95
	<b>6</b>	4566185	1,37 e 3,94
<b>Média</b>		4551821	1,39 e 3,95
<b>RSD (%)</b>		<b>0,22</b>	<b>0,59 e 0,13</b>

Tabela 4.31 Resultados da Repetibilidade do Sistema da substância Y no meio USP Tampão Fosfato pH 6,8.

<b>Meio de Dissolução – Tampão Fosfato pH 6,8</b>			
	<b>Injeção</b>	<b>Área</b>	<b>Tempo de retenção (min)</b>
<b>Substância Y</b>	<b>1</b>	4475348	1,39 e 3,95
	<b>2</b>	4443812	1,38 e 3,93
	<b>3</b>	4463970	1,39 e 3,93
	<b>4</b>	4480687	1,39 e 3,95
	<b>5</b>	4478369	1,39 e 3,95
	<b>6</b>	4469444	1,39 e 3,95
<b>Média</b>		4468605	1,39 e 3,94
<b>RSD (%)</b>		<b>0,30</b>	<b>0,29 e 0,26</b>

Tabela 4.32 Resultados da Repetibilidade do Sistema da substância X no meio Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5+2% Tween80®.

<b>Meio de Dissolução – Tampão Fosfato pH 4,5 + 2% Tween 80</b>			
	<b>Injeção</b>	<b>Área</b>	<b>Tempo de retenção (min)</b>
<b>Substância X</b>	<b>1</b>	2111014	4,67
	<b>2</b>	2102326	4,68
	<b>3</b>	2109995	4,68
	<b>4</b>	2109401	4,68
	<b>5</b>	2106966	4,66
	<b>6</b>	2110077	4,67
<b>Média</b>		2108297	4,67
<b>RSD (%)</b>		<b>0,15</b>	<b>0,17</b>

Tabela 4.33 Resultados da Repetibilidade do Sistema da substância X no meio USP Tampão Fosfato pH 6,8+3% Tween80®.

<b>Meio de Dissolução – Tampão Fosfato pH 6,8 + 3% Tween 80</b>			
	<b>Injeção</b>	<b>Área</b>	<b>Tempo de retenção (min)</b>
<b>Substância X</b>	<b>1</b>	2153572,00	4,59
	<b>2</b>	2132690,00	4,59
	<b>3</b>	2123625,00	4,60
	<b>4</b>	2105756,00	4,60
	<b>5</b>	2112405,00	4,60
	<b>6</b>	2104847,00	4,61
<b>Média</b>		2122149,17	4,60
<b>RSD (%)</b>		<b>0,89</b>	<b>0,16</b>

É possível verificar pelos resultados obtidos, que estes estão dentro do critério de aceitação pois o desvio padrão relativo é sempre inferior a 2,0%.

### **Repetibilidade do Método**

A repetibilidade do ensaio foi determinada através da preparação de seis amostras à concentração de trabalho.

O seu critério de aceitação baseia-se no desvio padrão relativo (RSD) ser inferior ou igual a 2,0%.

Nas tabelas seguintes são apresentados os resultados experimentais para cada meio de dissolução.

Tabela 4.34 Resultados de Repetibilidade de Ensaio para Substância X em HCl 0,1N.

<b>Meio de Dissolução – HCl 0,1N</b>		
	<b>Amostra</b>	<b>Dissolução (%)</b>
<b>Substância X</b>	<b>1</b>	100
	<b>2</b>	100
	<b>3</b>	100
	<b>4</b>	102
	<b>5</b>	100
	<b>6</b>	101
<b>Média</b>		100
<b>RSD (%)</b>		<b>0,82</b>

Tabela 4.35 Resultados de Repetibilidade de Ensaio para Substância Y em HCl 0,1N.

<b>Meio de Dissolução – HCl 0,1N</b>		
	<b>Amostra</b>	<b>Dissolução (%)</b>
<b>Substância Y</b>	<b>1</b>	100
	<b>2</b>	99
	<b>3</b>	100
	<b>4</b>	99
	<b>5</b>	99
	<b>6</b>	99
<b>Média</b>		99
<b>RSD (%)</b>		<b>0,35</b>

Tabela 4.36 Resultados de Repetibilidade de Ensaio para Substância Y em Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5.

<b>Meio de Dissolução – Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5</b>		
	<b>Amostra</b>	<b>Dissolução (%)</b>
<b>Substância Y</b>	<b>1</b>	94
	<b>2</b>	94
	<b>3</b>	94
	<b>4</b>	94
	<b>5</b>	95
	<b>6</b>	95
<b>Média</b>		94
<b>RSD (%)</b>		<b>0,43</b>

Tabela 4.37 Resultados de Repetibilidade de Ensaio para Substância Y em USP Tampão Fosfato pH 6,8.

<b>Meio de Dissolução – USP Tampão Fosfato pH 6,8</b>		
	<b>Amostra</b>	<b>Dissolução (%)</b>
<b>Substância Y</b>	<b>1</b>	91
	<b>2</b>	91
	<b>3</b>	91
	<b>4</b>	91
	<b>5</b>	90
	<b>6</b>	91
<b>Média</b>		91
<b>RSD (%)</b>		<b>0,31</b>

Tabela 4.38 Resultados de Repetibilidade de Ensaio para Substância X em Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5+2% Tween80®.

<b>Meio de Dissolução – Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5+2% Tween80®</b>		
	<b>Amostra</b>	<b>Dissolução (%)</b>
<b>Substância X</b>	<b>1</b>	96
	<b>2</b>	96
	<b>3</b>	96
	<b>4</b>	98
	<b>5</b>	96
	<b>6</b>	96
<b>Média</b>		96
<b>RSD (%)</b>		<b>0,84</b>

Tabela 4.39 Resultados de Repetibilidade de Ensaio para Substância X em USP Tampão Fosfato pH 6,8+3% Tween80®.

<b>Meio de Dissolução – USP Tampão Fosfato pH 6,8+3% Tween80®</b>		
	<b>Amostra</b>	<b>Dissolução (%)</b>
<b>Substância X</b>	<b>1</b>	76
	<b>2</b>	76
	<b>3</b>	76
	<b>4</b>	76
	<b>5</b>	76
	<b>6</b>	76
<b>Média</b>		<b>76</b>
<b>RSD (%)</b>		<b>0,21</b>

Conclui-se que os resultados obtidos cumprem o critério de aceitação estabelecido.

## Precisão Intermédia

Com o intuito de confirmar a precisão intermédia, foi realizado um ensaio de dissolução por um segundo analista. Esta análise foi realizada não só num dia diferente como também em equipamentos diferentes.

O seu critério de aceitação baseia-se no desvio padrão relativo (RSD), da seguinte forma:

- Inferior ou igual a 2,5%, num total de doze determinações.

Nas tabelas seguintes são apresentados os resultados experimentalmente obtidos para cada meio de dissolução.

Tabela 4.40 Resultados da Precisão Intermédia no meio HCl 0,1N.

<b>Meio de Dissolução - HCl 0,1N (Substância X)</b>	
<b>Dissolução (%)</b>	
<b>Analista 1</b>	<b>Analista 2</b>
99	101
101	101
101	102
100	103
101	101
101	100
<b>Média das 12 determinações (%)</b>	
101	
<b>RSD das 12 determinações (%)</b>	
0,96	

Tabela 4.41 Resultados da Precisão Intermédia no meio HCl 0,1N.

<b>Meio de Dissolução - HCl 0,1N (Substância Y)</b>	
<b>Dissolução (%)</b>	
<b>Analista 1</b>	<b>Analista 2</b>
100	101
99	98
97	100
97	99
97	98
97	101
<b>Média das 12 determinações (%)</b>	
99	
<b>RSD das 12 determinações (%)</b>	
1,47	

Tabela 4.42 Resultados da Precisão Intermédia no Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5.

<b>Meio de Dissolução - Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5 (Substância Y)</b>	
<b>Dissolução (%)</b>	
<b>Analista 1</b>	<b>Analista 2</b>
94	97
97	99
96	99
95	100
96	100
98	101
<b>Média das 12 determinações (%)</b>	
98	
<b>RSD das 12 determinações (%)</b>	
2,28	

Tabela 4.43 Resultados da Precisão Intermédia no USP Tampão Fosfato pH 6,8.

<b>Meio de Dissolução - USP Tampão Fosfato pH 6,8 (Substância Y)</b>	
<b>Dissolução (%)</b>	
<b>Analista 1</b>	<b>Analista 2</b>
97	92
91	95
91	90
94	93
92	92
93	93
<b>Média das 12 determinações (%)</b>	
93	
<b>RSD das 12 determinações (%)</b>	
1,96	

Tabela 4.44 Resultados da Precisão Intermédia no Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5+2%Tween80®.

<b>Meio de Dissolução – Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5+2%Tween80® (Substância X)</b>	
<b>Dissolução (%)</b>	
<b>Analista 1</b>	<b>Analista 2</b>
96	96
96	99
95	98
96	96
96	98
97	97
<b>Média da 12 determinações (%)</b>	
97	
<b>RSD das 12 determinações (%)</b>	
1,14	

Tabela 4.45 Resultados da Precisão Intermédia no meio USP Tampão Fosfato pH 6,8+3%Tween80®.

<b>Meio de Dissolução – USP Tampão Fosfato pH 6,8+3%Tween80® (Substância X)</b>	
<b>Dissolução (%)</b>	
<b>Analista 1</b>	<b>Analista 2</b>
77	76
76	77
76	76
75	77
77	78
77	78
<b>Média das 12 determinações (%)</b>	
77	
<b>RSD das 12 determinações (%)</b>	
1,20	

Os resultados obtidos para a precisão intermédia cumprem os critérios de aceitação.

Uma vez que, em todos os três níveis considerados para a precisão, os critérios de aceitação foram cumpridos, para todos os meios de dissolução, conclui-se que o método é preciso.

#### 4.7 Exatidão

Para determinar a exatidão do método foram preparados três níveis de concentração de substância ativa em soluções de placebo, e em triplicado. Tendo em conta que a gama de trabalho a validar é de 10% a 150%, esta foi analisada em três níveis concentração, sendo estes: 50%, 100% e 150% da concentração de trabalho.

Este parâmetro tem como critério de aceitação a percentagem de recuperação de ativo, que, segundo o mesmo, deve estar entre o intervalo de 95% a 105%.

Nas tabelas seguintes são apresentados os resultados experimentalmente obtidos para cada meio de dissolução.

Tabela 4.46 Resultados de Exatidão no meio HCl 0,1N.

<b>Meio de Dissolução - HCl 0,1N (Substância X)</b>				
<b>Nível Concentração</b>		<b>50%</b>	<b>100%</b>	<b>150%</b>
<b>Recuperação (%)</b>	<b>A1</b>	97	99	99
	<b>A2</b>	98	99	99
	<b>A3</b>	98	100	99
<b>9 Determinações</b>				
<b>Média (%)</b>	<b>99</b>			
<b>SD (%)</b>	<b>0,76</b>			
<b>RSD (%)</b>	<b>0,77</b>			

Tabela 4.47 Resultados de Exatidão no meio HCl 0,1N.

<b>Meio de Dissolução - HCl 0,1N (Substância Y)</b>				
<b>Nível Concentração</b>		<b>50%</b>	<b>100%</b>	<b>150%</b>
<b>Recuperação (%)</b>	<b>A1</b>	97	98	97
	<b>A2</b>	97	98	97
	<b>A3</b>	97	97	97
<b>9 Determinações</b>				
<b>Média (%)</b>		<b>97</b>		
<b>SD (%)</b>		<b>0,26</b>		
<b>RSD (%)</b>		<b>0,26</b>		

Tabela 4.48 Resultados de Exatidão no meio Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5.

<b>Meio de Dissolução – Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5 (Substância Y)</b>				
<b>Nível Concentração</b>		<b>50%</b>	<b>100%</b>	<b>150%</b>
<b>Recuperação (%)</b>	<b>A1</b>	99	100	96
	<b>A2</b>	99	98	99
	<b>A3</b>	99	100	99
<b>9 Determinações</b>				
<b>Média (%)</b>		<b>99</b>		
<b>SD (%)</b>		<b>1,03</b>		
<b>RSD (%)</b>		<b>1,04</b>		

Tabela 4.49 Resultados de Exatidão no meio USP Tampão Fosfato pH 6,8.

<b>Meio de Dissolução – USP Tampão Fosfato pH 6,8 (Substância Y)</b>				
<b>Nível Concentração</b>		<b>50%</b>	<b>100%</b>	<b>150%</b>
<b>Recuperação (%)</b>	<b>A1</b>	101	98	97
	<b>A2</b>	102	99	97
	<b>A3</b>	98	97	97
<b>9 Determinações</b>				
<b>Média (%)</b>		<b>98</b>		
<b>SD (%)</b>		<b>1,88</b>		
<b>RSD (%)</b>		<b>1,91</b>		

Tabela 4.50 Resultados de Exatidão no meio Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5+2% Tween80®.

<b>Meio de Dissolução – Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5+2% Tween80® (Substância X)</b>				
<b>Nível Concentração</b>		<b>50%</b>	<b>100%</b>	<b>150%</b>
<b>Recuperação (%)</b>	<b>A1</b>	98	100	101
	<b>A2</b>	102	101	101
	<b>A3</b>	101	101	101
<b>9 Determinações</b>				
<b>Média (%)</b>		<b>100</b>		
<b>SD (%)</b>		<b>1,23</b>		
<b>RSD (%)</b>		<b>1,22</b>		

Tabela 4.51 Resultados de Exatidão meio USP Tampão Fosfato pH 6,8+3% Tween80®.

<b>Meio de Dissolução – USP Tampão Fosfato pH 6,8+3% Tween80® (Substância X)</b>				
<b>Nível Concentração</b>		<b>50%</b>	<b>100%</b>	<b>150%</b>
<b>Recuperação (%)</b>	<b>A1</b>	100	100	102
	<b>A2</b>	100	102	101
	<b>A3</b>	99	102	101
<b>9 Determinações</b>				
<b>Média (%)</b>		<b>101</b>		
<b>SD (%)</b>		<b>1,20</b>		
<b>RSD (%)</b>		<b>1,19</b>		

Pela observação dos resultados obtidos para a exatidão das substâncias ativas nos meios de dissolução, pode-se constatar que a percentagem de recuperação de ativo se encontra sempre dentro do intervalo estipulado, de acordo com o critério de aceitação. Deste modo, conclui-se que este método é exato.

### **Interferência do filtro**

Aquando da validação da exatidão do método, efetuou-se também a análise de interferência do filtro *Whatman* N°2. Esta avaliação foi realizada com a solução padrão à concentração de trabalho, cuja resposta analítica foi avaliada com e sem filtração.

O critério de aceitação refere que a interferência do filtro não pode ser superior a 2%.

Nas tabelas seguintes são apresentados os resultados obtidos para cada meio de dissolução.

Tabela 4.52 Interferência do Filtro em meio HCl 0,1N.

<b>Meio de Dissolução - HCl 0,1N (Substância X)</b>		
	<b>Solução Padrão (sem filtração)</b>	<b>Solução Padrão (com filtração)</b>
<b>Área</b>	2136054	2129729
	2091205	2082507
	2095626	2115550
<b>Média</b>	2107628	2109262
<b>RSD (%)</b>	1,17	1,15
<b>Fator Comparativo</b>	1,00	
<b>Interferência</b>	<b>0 %</b>	

Tabela 4.53 Interferência do Filtro em meio HCl 0,1N.

<b>Meio de Dissolução - HCl 0,1N (Substância Y)</b>		
	<b>Solução Padrão (sem filtração)</b>	<b>Solução Padrão (com filtração)</b>
<b>Areas</b>	4467794	4436342
	4470086	4444439
	4463969	4447527
<b>Média</b>	4467283	4442769
<b>RSD (%)</b>	0,07	0,13
<b>Fator Comparativo</b>	1,01	
<b>Interferência</b>	<b>1%</b>	

Tabela 4.54 Interferência do Filtro meio Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5.

<b>Meio de Dissolução – Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5 (Substância Y)</b>		
	<b>Solução Padrão (sem filtração)</b>	<b>Solução Padrão (com filtração)</b>
<b>Áreas</b>	4556032	4505712
	4529345	4497723
	4549337	4503382
<b>Média</b>	4544905	4502272
<b>RSD (%)</b>	0,31	0,09
<b>Fator Comparativo</b>	1,01	
<b>Interferência</b>	<b>1%</b>	

Tabela 4.55 Interferência do Filtro em meio USP Tampão Fosfato pH 6,8.

<b>Meio de Dissolução – USP Tampão Fosfato pH 6,8 (Substância Y)</b>		
	<b>Solução Padrão (sem filtração)</b>	<b>Solução Padrão (com filtração)</b>
<b>Áreas</b>	4842471	4727840
	4804016	4704001
	4824606	4722265
<b>Média</b>	4823698	4718035
<b>RSD (%)</b>	0,4	0,26
<b>Fator Comparativo</b>	1,02	
<b>Interferência</b>	<b>2%</b>	

Tabela 4.56 Interferência do Filtro em meio Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5+2% Tween80®.

<b>Meio de Dissolução – Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5+2% Tween80® (Substância X)</b>		
	<b>Solução Padrão (sem filtração)</b>	<b>Solução Padrão (com filtração)</b>
<b>Áreas</b>	2073721	2066308
	2083088	2054694
	2082597	2049932
<b>Média</b>	2079802	2056978
<b>RSD (%)</b>	0,25	0,41
<b>Fator Comparativo</b>	1,01	
<b>Interferência</b>	<b>1%</b>	

Tabela 4.57 Interferência do Filtro em meio USP Tampão Fosfato pH 6,8+3% Tween80®.

<b>Meio de Dissolução – USP Tampão Fosfato pH 6,8+3% Tween80® (Substância X)</b>		
	<b>Solução Padrão (sem filtração)</b>	<b>Solução Padrão (com filtração)</b>
<b>Áreas</b>	2071135	2072692
	2074220	2063345
	2071824	2063188
<b>Média</b>	2072393	2066408
<b>RSD (%)</b>	0,08	0,26
<b>Fator Comparativo</b>	1.00	
<b>Interferência</b>	<b>0%</b>	

De acordo com os resultados obtidos, pode ser observado que nenhum resultado excede a percentagem de 2% de interferência do filtro. Assim sendo, conclui-se que o filtro *Whatman* N°2 é adequado para a filtração de solução amostra do ensaio de dissolução de comprimidos revestidos X+Y (20mg+40mg), não produzindo interferência significativa na resposta analítica de qualquer dos analitos.

#### 4.8 Robustez

O parâmetro da robustez foi analisado recorrendo a seis soluções amostra, resultantes da dissolução da substância ativa no meio de dissolução de controlo de qualidade (HCl 0.1N)

Relativamente às amostras, estas foram analisadas tanto pelo método original como por métodos em que foram realizadas ligeiras alterações aos parâmetros deste (comprimento de onda, temperatura da coluna, fluxo e gradiente). Ao realizar-se estas modificações é expectável observar-se a sua influência no sistema de HPLC.

O critério de aceitação deste parâmetro define que o desvio não poder ser maior que 5% relativamente aos resultados obtidos com as condições experimentais do método original.

Foi, ainda, realizada uma avaliação da estabilidade intra-diária da solução padrão e solução amostra pela variação da percentagem de resposta obtida ao longo do tempo em todos os meios de dissolução. Tendo como critério de aceitação que o seu desvio padrão relativo não pode ser superior de 3%.

Nas tabelas seguintes são apresentados os resultados obtidos tanto para a robustez, no meio de dissolução HCl 0,1N, como para a estabilidade intra-diária, em todos os meios de dissolução.

Tabela 4.58 Resultados de robustez para substância X no meio HCl 0,1N.

Condições Alteradas	Média (%) (A1 – A6)	SD (%)	RSD (%)	Desvio de Amostra (%)	Resultado ( <i>t-Student</i> )
Método Original	101	2,91	2,88	---	Equivalência Estatística
Comprimento de onda = 223 nm	101	2,62	2,59	- 0,04	Equivalência Estatística
Comprimento de onda = 227 nm	102	2,20	2,15	1,15	Equivalência Estatística
Temperatura de coluna = 35°C	104	2,99	2,87	3,11	Equivalência Estatística
Temperatura de coluna = 45°C	104	3,06	2,94	2,86	Equivalência Estatística
Diminuição de Fluxo (- 2mL/min)	106	2,61	2,46	5,21	Diferença estatisticamente significativa
Aumento de Fluxo (+ 2mL/min)	103	2,91	2,83	1,62	Equivalência Estatística
Aumento de Eluente B (+ 2%)	104	3,09	2,97	2,87	Equivalência Estatística
Aumento de Eluente A (+ 2%)	105	3,46	3,30	3,84	Equivalência Estatística
<b>Média (%)</b>	103				
<b>SD (%)</b>	3,15				
<b>RSD (%)</b>	3,04				

Tabela 4.59 Resultados de robustez para substância Y no meio HCl 0,1N.

Condições Alteradas	Média (%) (A1 – A6)	SD (%)	RSD (%)	Desvio de Amostra (%)	Resultado ( <i>t-Student</i> )
Método Original	97	2,61	2,70	---	Equivalência Estatística
Comprimento de onda = 223 nm	97	2,89	2,97	0,60	Equivalência Estatística
Comprimento de onda = 227 nm	96	2,59	2,68	- 0,23	Equivalência Estatística
Temperatura de coluna = 35°C	96	2,70	2,80	- 0,23	Equivalência Estatística
Temperatura de coluna = 45°C	96	2,73	2,83	- 0,35	Equivalência Estatística
Diminuição de Fluxo (- 2mL/min)	96	2,59	2,70	- 0,63	Equivalência Estatística
Aumento de Fluxo (+ 2mL/min)	96	2,64	2,75	- 0,57	Equivalência Estatística
Aumento de Eluente B (+ 2%)	95	2,74	2,87	- 1,34	Equivalência Estatística
Aumento de Eluente A (+ 2%)	96	2,59	2,71	- 0,96	Equivalência Estatística
<b>Média (%)</b>	96				
<b>SD (%)</b>	2,52				
<b>RSD (%)</b>	2,62				

Tabela 4.60 Resultados da estabilidade intra-diária no meio HCl 0,1N.

Meio de Dissolução – HCl 0,1N (Substância X)			
Tempo (h)	Desvio relativo (%)		
	Solução padrão	Amostra 5	Amostra 6
0.0	0,00	0,00	0,00
1.5	- 0,84	---	---
24	1,82	0,72	- 0,67
25.5	- 0,10	---	---
48	1,09	3,25	2,10
49.5	0,22	---	---

Tabela 4.61 Resultados da estabilidade intra-diária no meio HCl 0,1N.

<b>Meio de Dissolução – HCl 0,1N (Substância Y)</b>			
Tempo (h)	Desvio relativo (%)		
	Solução padrão	Amostra 5	Amostra 6
0.0	0,00	0,00	0,00
1.5	0,16	---	---
24	0,64	- 0,87	- 0,08
25.5	0,43	---	---
48	0,38	-1,67	-1,04
49.5	0,61	---	---

Tabela 4.62 Resultados da estabilidade intra-diária no meio Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5.

<b>Meio de Dissolução – Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5 (Substância Y)</b>			
Tempo (h)	Desvio relativo (%)		
	Solução padrão	Amostra 1	Amostra 3
0.0	0,00	0,00	0,00
1.5	- 0,45	---	---
24	- 1,14	- 0,53	1,21
25.5	- 1,02	---	---
48	1,67	2,51	1,68
49.5	1,46	---	---

Tabela 4.63 Resultados da estabilidade intra-diária no meio USP Tampão Fosfato pH 6,8.

<b>Meio de Dissolução – USP Tampão Fosfato pH 6,8 (Substância Y)</b>			
Tempo (h)	Desvio relativo (%)		
	Solução padrão	Amostra 1	Amostra 3
0.0	0,00	0,00	0,00
1.5	0,04	---	---
24	0,32	- 0,07	- 0,02
25.5	- 0,23	---	---
48	2,82	2,44	2,69
49.5	2,23	---	---

Tabela 4.64 Resultados da estabilidade intra-diária no meio Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5+2%Tween80®.

<b>Meio de Dissolução – Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5+2%Tween80® (Substância X)</b>			
Tempo (h)	Desvio relativo (%)		
	Solução padrão	Amostra 2	Amostra 6
0.0	0,00	0,00	0,00
1.5	- 0,17	---	---
24	1,66	0,93	1,36
25.5	2,07	---	---
48	2,33	0,79	1,21
49.5	0,25	---	---

Tabela 4.65 Resultados da estabilidade intra-diária no meio USP Tampão Fosfato pH 6,8+3%Tween80®.

<b>Meio de Dissolução – USP Tampão Fosfato pH 6,8+3%Tween80® (Substância X)</b>			
Tempo (h)	Desvio relativo (%)		
	Solução padrão	Amostra 2	Amostra 6
0.0	0,00	0,00	0,00
1.5	1,88	---	---
24	2,91	0,60	0,39
25.5	1,91	---	---
48	0,82	1,48	0,33
49.5	1,76	---	---

Através dos resultados obtidos para as diversas alterações feitas ao método, pode-se verificar que a quantificação da substância ativa Y decorre de forma similar ao método original, uma vez que, todos os novos métodos criados com alterações foram considerados, pela *t-Student*, como estatisticamente equivalentes ao método de referência. Além disto, o desvio de amostra não ultrapassa, em nenhum dos casos, os 5%. Cumprindo, assim, o critério de aceitação.

Relativamente à substância ativa X, pela avaliação *t-Student*, esta demonstra uma diferença estatisticamente significativa relativamente ao método original, quando neste se diminui o fluxo em 0,2mL/min. Isto acontece, pois, a conclusão dada por esta avaliação é baseada no desvio da amostra que, neste caso, é superior a 5%, sendo de 5,21%, no entanto, o facto de ser apenas um aumento de 0,21%, faz com que em termos de arredondamento, este seja por défice, sendo o resultado final de 5%. Deste modo, não é considerado superior ao valor do critério de aceitação da validação de método, fazendo com que este seja cumprido.

Analisando os valores registados para a estabilidade da solução padrão e solução amostra, nos diferentes meios de dissolução, pode ser concluído que todos os resultados obtidos cumprem o critério de aceitação, ou seja, é confirmada a estabilidade das soluções.

Finalmente, com base nos resultados anteriormente demonstrados, pode ser concluído que este método é robusto face às variações testadas para os parâmetros de fluxo, composição de fase móvel, comprimento de onda e temperatura de coluna.

## 5 CAPÍTULO V – CONCLUSÃO E PROPOSTA DE TRABALHO FUTURO

### Conclusão

Na validação deste método analítico, foram avaliados os seguintes parâmetros, tais como: especificidade; linearidade; limite de quantificação (*LoQ*); limite de detecção (*LoD*); precisão; exatidão e robustez.

Após análise dos resultados obtidos para os diversos parâmetros validados foi possível constatar que, para todos estes foram registados valores que cumprem os critérios de aceitação na gama de trabalho compreendida entre o intervalo de 10% a 150% da concentração de trabalho (Substância ativa X =22,22 µg/mL; Substância ativa Y=44,44 µg/mL)

Relativamente à coluna de cromatografia utilizada nesta validação, conclui-se que esta demonstrou ser adequada para a separação dos picos cromatográficos dos analitos X e Y no ensaio de dissolução.

Conclui-se, portanto, que se encontra validado o método analítico com quantificação por HPLC, para o ensaio de dissolução nos meios - HCl 0,1N; Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5; USP Tampão Fosfato pH 6,8; Ph. Eur. Tampão Fosfato pH 4,5+2% Tween80<sup>®</sup> e USP Tampão Fosfato pH 6,8+3% Tween80<sup>®</sup>.

### Proposta de Trabalho Futuro

Com o intuito de otimizar este método analítico, futuramente, a sugestão é da implementação do mesmo usando a técnica analítica de UPLC. Ou seja, sugere-se que se faça uma validação do método analítico num sistema de quantificação UPLC [20].

A UPLC, cromatografia líquida de ultra eficiência, é uma técnica recente que dá um novo sentido à cromatografia líquida, uma vez que, esta se baseia na melhoria de, principalmente, três áreas: velocidade, resolução e sensibilidade [20].

Os princípios de fundamentação da UPLC são os mesmos da HPLC, tendo como principais diferenças as colunas cromatográficas utilizadas, que são de dimensões reduzidas (5-10 cm de comprimento e diâmetros internos de 1-2,1 mm) e com enchimento de partículas de fase estacionária inferiores a 2 µm. Sendo que isto, juntamente, com as elevadas velocidades lineares de fase móvel não só aumentam a resolução e a sensibilidade como também diminuem o tempo de análise. No entanto, gera-se um aumento significativo na pressão cromatográfica, deste modo, tem-se em vista um equipamento capaz de operar a altas pressões, até 1000 bar [34].

Relativamente às desvantagens, estas direcionam-se para mais elevado custo de equipamento e também para a vida das colunas, pois a mais elevada pressão de trabalho pode fazer com que a vida das mesmas fique mais reduzida [20].

Contudo as vantagens superam claramente as desvantagens pelo que a aplicação desta técnica na indústria farmacêutica é crescente. No caso da validação apresentada neste trabalho, a implementação desta técnica seria vantajosa devido aos seus principais ganhos tanto a nível de tempo (análise cromatográfica mais rápida) como a nível económico e ecológico (redução de volume necessário de solventes orgânicos, muito dispendiosos). Deste modo, a transição do método analítico de quantificação em HPLC para UPLC seria benéfico tanto a nível tecnológico como a nível do ambiente. Seria conseguido, deste modo, uma otimização do método analítico validado, com ganhos económicos e ambientais assinaláveis.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] The United States Pharmacopeia and National Formulary USP 41 - NF 36 <711> (2016), *Dissolution*, Volume 4, pág. 6459-6468.
- [2] European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) <2.9.3> (2016), *Dissolution test for solid dosage forms*, Edição 9.0, pág. 302.
- [3] International Conference On Harmonisation (1994), *Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology*, ICH Harmonised Tripartite Guideline.
- [4] World Health Organization (2007), *Quality assurance of pharmaceuticals: a compendium of guidelines and related materials*, Good manufacturing practices and inspection, Volume 2, Edição 2, pág. 16-19.
- [5] Grupo Tecnimede (2018), *Manual de Acolhimento do Labor Qualitas* (documento interno do Grupo Tecnimede).
- [6] Center for Drug Evaluation and Research (CDER) (1994), *Reviewer Guidance' Validation of Chromatographic Methods*, pág. 1-2.
- [7] Grupo Tecnimede (*Sobre; História; Missão e Valores*), <http://www.tecnimede.com/> (consultado em 20 de Julho de 2018).
- [8] Thammana, Mukthi (2016) *A Review on High Performance Liquid Chromatography (HPLC)*, Journal of Pharmaceutical Analysis, Department of Pharmacy, Vignan Institute of Pharmaceutical Technology, Volume 5 (Nº2), pág. 22-28.
- [9] Cass, Quezia B.; Degani, Ana luiza G.; Vieira, Paulo C (1998) *Cromatografia: um breve ensaio*, Atualidades em Química, Nº7, pág. 21-25.
- [10] Portal Laboratórios Virtuais de Processos Químicos (*Fundamentos*), [http://labvirtual.eq.uc.pt/siteJoomla/index.php?option=com\\_content&task=view&id=103&Itemid=](http://labvirtual.eq.uc.pt/siteJoomla/index.php?option=com_content&task=view&id=103&Itemid=) (consultado em 25 de Junho de 2018).
- [11] Cheriyeath, Susha, *High Performance Liquide Chromatography (HPLC)*, News Medical Life Sciences, [https://www.news-medical.net/life-sciences/High-Performance-Liquid-Chromatography-\(HPLC\)-\(Portuguese\).aspx](https://www.news-medical.net/life-sciences/High-Performance-Liquid-Chromatography-(HPLC)-(Portuguese).aspx) (consultado em 8 de Julho de 2018).
- [12] LaboratoryInfo, *High Performance Liquid Chromatography (HPLC) : Principle, Types, Instrumentation and Applications*, <https://laboratoryinfo.com/hplc/> (consultado em 12 de Julho de 2018).
- [13] Analytical Chemistry, *Types of HPLC*, [http://hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC\\_Book/Introduction/int\\_typs.html](http://hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC_Book/Introduction/int_typs.html) (consultado em 13 de Julho de 2018).
- [14] Farmacognosia, *Cromatografia Normal e Reversa*, <http://www.farmacognosiaws.no.comunidades.net/cromatografia-normal-e-reversa> (consultado em 15 de Julho de 2018).
- [15] Waters, *How Does High Performance Liquid Chromatography Work*, [http://www.waters.com/waters/pt\\_PT/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=pt\\_PT](http://www.waters.com/waters/pt_PT/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=pt_PT) (consultado em 30 de Junho de 2018).

- [16] Swartz, Michael (2010), *HPLC Detectors: A Brief Review*, Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, Volume 33 (Nº 9-12), pág. 1130-1150.
- [17] Dong, Michael W. (2013) *The essence of Modern HPLC: Advantages, Limitation, Fundamentals, and Opportunities*, LCGC North America, Volume 31 (Nº6), pág. 472-479.
- [18] Smith, Claire, *Disadvantages and Advantages of an HPLC*, Sciencing. Disponível em <https://sciencing.com/disadvantages-advantages-hplc-5911530.html> (consultado em 15 de Julho de 2018).
- [19] Study Read, *HPLC Applications / In Diagnosis, Research & Industry*, <https://www.studyread.com/application-hplc-pharmaceutical-industry/> (consultado em 19 de Julho de 2018).
- [20] Taleuzzaman, M.; Ali, S.; Gilani, S.J.; Iman, S.S.; Hafeez, A. (2015) *Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) – A Review*, Journal of Analytical and Pharmaceutical Chemistry, Volume 2 (Nº6).
- [21] Huber, Ludwig (2010), *Validation of Analytical Methods*, Agilent Technologies, Publicação número 5990-5140EN.
- [22] McPolin, Oona (2009), *Validation of analytical methods for pharmaceutical analysis*, Mourn Training Services, pág. 10-12.
- [23] Inkemia Brasil, *Cromatograma típico para cálculo de parâmetros cromatográficos*, <https://inkemiabrasil.com/2016/09/20/cromatografia-liquida-de-alta-eficiencia-parte-1/> (consultado em 11 de Setembro de 2018).
- [24] SHIMADZU, *Theoretical Plate Number and Symmetry Factor*, [https://www.shimadzu.com/an/hplc/support/lib/lectalk/theoretical\\_plate.html](https://www.shimadzu.com/an/hplc/support/lib/lectalk/theoretical_plate.html) (consultado a 11 de Setembro de 2018).
- [25] Ribani M., Bottoli C. B. G., Collins C. H., Jardim I. C. S. F., Melo L.F.C. (2004) *Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos*, Química Nova, Volume 27 (Nº5), pág. 771-780.
- [26] Guia Relacre Nº 13 (2000), *Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*, Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal, Edição 1, pág. 5-16.
- [27] Shrivastava A, Gupta VB. (2011) *Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods*, Chronicles of Young Scientists, Volume 2 (Nº1), pág. 21-25.
- [28] Anand, OM; Conner, Dale P.; Davit, Barbara M.; Yu, Lawrence X. (2011) *Dissolution Testing for Generic Drugs: An FDA Perspective*, Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists, Volume 13 (Nº3).
- [29] Infarmed & Ministério da Saúde, *Ensaio de Farmacotecnia*, [http://www.infarmed.pt/pt/noticias\\_eventos/eventos/ev\\_11\\_10\\_2004/apresentacoes/Tarde/Ricardo\\_Davidson.pdf](http://www.infarmed.pt/pt/noticias_eventos/eventos/ev_11_10_2004/apresentacoes/Tarde/Ricardo_Davidson.pdf) (consultado em 19 de Julho de 2018).
- [30] ANVISA (2018) *Guia de dissolução aplicável a medicamentos genéricos, novos e similares*, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Guia Nº14, Edição 1, pág. 11-17.
- [31] Gomensoro, *Testes de Dissolução*, <http://gomensoro.pt/produtos/erweka-testes-de-dissolucao/> (consultado em 25 de Julho de 2018).
- [32] Qureshi, Saeed (2009) *Drug Dissolution Testing: Selecting a Dissolution Medium for Solid Oral Products*, American Pharmaceutical Review, Volume 12 (Nº1), pág. 2-5.

[33] The United States Pharmacopeia and National Formulary USP 41 - NF 36 <1092> (2018), *The Dissolution Procedure: Development and Validation*, Volume 5, pág.7178-7205.

[34] Jardim, Isabel Cristina Sales Fintes; Maldaner, Liane (2012) *UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimento e desafios recentes*, Scientia Chromatographica, Volume 4 (Nº3), pág. 197-207.

