



Filipa Alexandra Paulo Lindo

Licenciada em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica

Validação de Métodos Analíticos em HPLC e Estudo de Degradação Forçada de um Medicamento Injetável

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

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

Co-orientador: Prof. Dr. Mário Fernando José Eusébio,
Professor Auxiliar,
Faculdade de Ciências e Tecnologia, UNL

Júri:

Presidente: Prof. Dr. Pedro Miguel Calado Simões,
Professor Auxiliar com Agregação,
Faculdade de Ciências e Tecnologia, UNL

Arguente: Prof. Dra. Elvira Maria Mendes Sardão Monteiro Gaspar
Professor Auxiliar,
Faculdade de Ciências e Tecnologia, UNL

Setembro, 2019



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Validação de Métodos Analíticos em HPLC e Estudo de Degradação Forçada de um Medicamento Injetável

Copyright © Filipa Alexandra Paulo Lindo, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, e Tecnimede – Sociedade Técnico-Medicinal, S.A.

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

“The master has failed more times than the beginner has even tried.”

Stephen McCranie

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer à Tecnimede e, em especial, ao Dr. João Serra e à Eng^a Clarisse Penedo pela oportunidade de trabalhar e aprender convosco. O vosso profissionalismo, conhecimento e simpatia fazem-me sentir agora, após seis meses, mais preparada para iniciar nova etapa de crescimento, porque uma pessoa nunca pára de aprender.

Ao Professor Doutor Mário Eusébio pela atenção, notas e conselhos. Agradeço por manter os objetivos sempre o mais alto possíveis, embora muitas vezes chegar lá pareça missão impossível. Mas como diz, “isto num instante faz-se”. Ainda bem que o tempo não é relativo. Ainda, um agradecimento para a Faculdade de Ciências e Tecnologia, UNL, que fará para sempre parte da minha história.

À Dra Paula Relógio, que me orientou e ensinou muito mais do que o indispensável, por responder às minhas perguntas, incitar à autonomia e mostrar-me o que é ter dedicação. Obrigada por eliminares o “não consigo” do meu dicionário e o substituíres por “ainda não consegui”. À Sofia Sousa que, estando na mesma posição que eu, aprendeu e evoluiu ao meu lado, mas oferecendo sempre uma palavra amiga ou confortadora quando era necessária. A todos os outros colaboradores da Labor-Qualitas, com os quais eu trabalhei e almocei lado a lado, obrigada pela simpatia e pelo acolhimento. Fizeram a experiência tão mais agradável.

A quantidade não importa quando se procura qualidade. À Ana Isabel e à Raquel Serra, sinto que não há possibilidade de ter arranjado melhor, obrigada por toda a amizade, todas as manhãs, todas as tardes e todas as noites que passámos a rir ou a trabalhar, porque drama só aos outros é que cabe. A todos os outros que me acompanharam durante a licenciatura e o mestrado na FCT, saibam que lembrarei o carinho, simpatia e atenção que me deram. À Raquel e à Maria, se já passaram sete anos então é para sempre. Vocês são a força que me impele para a frente, me dá esperança e me faz continuar a crer e a querer. Não teria sido o mesmo sem vocês.

Ainda, à Joana, ao José e à Maria Irene pelo interesse, pelas palavras amigas e pela preocupação que me mostraram durante os últimos anos, e por todo o carinho que me dedicam. Por último, mas em primeiro no coração, à Laura e ao Gabriel, à minha mãe e ao meu pai, fizeram-me quem eu sou, ensinaram-me o que sei, viveram as minhas memórias comigo e são o que de mais precioso eu tenho. Obrigada.

Pais, já sei, agora tenho é que ganhar asas.

RESUMO

A indústria farmacêutica é extremamente regulamentada uma vez que o setor onde se enquadra implica elevada responsabilidade na saúde e bem-estar das pessoas. Assim, existem entidades como a Agência Europeia do Medicamento (EMA), a ICH (*International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) e as farmacopeias que definem e regulam os procedimentos e padrões de qualidade da indústria.

O objetivo final comum destas entidades é a garantia de produção de medicamentos seguros, eficazes e de qualidade. De forma a atingir este fim, um dos requisitos delineados pela ICH é a validação de métodos analíticos, isto é, a demonstração de que são adequados para a análise de certo produto e assegurando a confiança e reprodutibilidade dos dados que produzem.

O produto estudado neste trabalho é um medicamento injetável e procura-se a validação dos métodos analíticos de cromatografia líquida de alta eficiência para a identificação e quantificação do API e das suas impurezas. Os parâmetros avaliados para a validação, como definido pela ICH, são: especificidade, precisão, gama de validação, linearidade, exatidão e limite de deteção e de quantificação, quando aplicável. Adicionalmente, analisou-se a robustez do método e realizou-se a monitorização da estabilidade do medicamento, com vista a verificar a adequabilidade do método como indicador da estabilidade do produto acabado.

Os métodos analíticos de doseamento e de compostos relacionados provaram ser específicos – não foi detetada interferência nos picos do analito a quantificar, precisos, exatos – teor detetado entre 94,38% a 103,23% do teor real, e lineares – coeficientes de correlação entre 0,996 e 1,000, na gama de concentrações validada, cumprindo assim os critérios de aceitação.

A avaliação dos resultados do ensaio de robustez mostrou que a quantificação do doseamento da substância ativa bem como das impurezas A, B, C, D, E e F não são sensíveis a pequenas variações no fluxo, temperatura da coluna ou composição da fase móvel, tendo o maior desvio absoluto à quantificação em condições nominais sido de 3,45%. No entanto, a quantificação do isómero revelou interferência do pico de placebo em todas as alterações estudadas, apresentando um desvio mínimo absoluto de 9% quando a composição em orgânico da fase móvel era superior, e até eliminando a resolução do pico quando esta foi diminuída.

A monitorização da estabilidade revelou que o API degrada aproximadamente 30% quando exposto a 80°C e a hidrólise ácida durante 24 horas, causada pela instabilidade do API a elevadas temperaturas e pH ácido. Isto acontece de forma semelhante para amostras de substância ativa e de produto acabado, implicando que a forma farmacêutica não fornece proteção extra, mas que também não promove um maior grau de degradação. A principal impureza de degradação é a impureza C, que aumenta a sua concentração na amostra em ambas as condições de degradação mencionadas, em cerca de 25%.

Palavras-chave: validação, métodos analíticos, linearidade, robustez, monitorização da estabilidade, degradações forçadas, medicamento injetável.

ABSTRACT

The pharmaceutical industry is extremely regulated due to the responsibility linked to the sector where it operates: health and well-being of people. Because of this, there are entities such as European Medicines Agency (EMA), ICH (*International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) and the pharmacopeias that define and control the procedures and the quality standards of this industry.

Their common goal is to guarantee the quality, safety and efficacy of drugs. In order to do this, one guideline defined by ICH is the validation of analytical methods, meaning providing evidence that the method is adequate for its purpose and assuring reliability of the data obtained.

The product studied here is an injectable drug and the aim is to validate the analytical methods of high performance liquid chromatography for the quantification of the API and its impurities. The parameters tested are, as defined by ICH: specificity, precision, range, linearity, accuracy and limit of detection and quantification, if required. Furthermore, the robustness of the analytical methods was analysed and the study of the suitability of the method as stability indicator was performed, in order to understand the impurities profile when the product is submitted to forced degradation conditions.

The analytical methods assay and related compounds proved to be specific – there was no interference with the peak of the analyte detected, precise, accurate – content detected between 94,38% and 103,23% of the real value, and linear – correlation coefficients between 0,996 and 1,000, in the range validated.

The analysis of the robustness of the method proved the assay and impurities A, B, C, D, E and F to not be sensitive to slight variations of flow, column temperature or mobile phase composition. The major absolute deviation to the quantification of the sample in the original method was 3,45% of content detected. However, the enantiomer quantification in all the changes introduced saw serious interference by the placebo peak, where the minor absolute deviation of content detected obtained was 9% when organic composition of mobile phase was reduced. Complete elimination of peak resolution was observed by an increased organic composition of mobile phase.

Lastly, stability study under conditions of heat (80°C) and acidic hydrolysis, for 24 hours, resulted in API degradation of about 30% of sample content, due to the drug substance's instability at high temperatures and high pH values. This happened similarly for API and for finished product samples, meaning that the pharmaceutical form does not offer extra protection but also doesn't promote further degradation. The main degradation impurity is impurity C, due to the increase of about 25% of its content when samples are exposed to the conditions mentioned.

Keywords: validation, analytical method, linearity, robustness, stability study, forced degradation, injectable drug.

ÍNDICE DE CONTEÚDOS

1. ENQUADRAMENTO.....	1
1.1. A TECNIMEDE.....	1
1.2. MOTIVAÇÃO	2
2. ESTADO DA ARTE	5
2.1. A INDÚSTRIA FARMACÊUTICA.....	5
2.2. O MEDICAMENTO GENÉRICO	8
2.3. O EFEITO TERAPÊUTICO.....	10
2.4. DO FÁRMACO AO PRO-FÁRMACO	12
2.5. O PROCESSO DE PRODUÇÃO	15
3. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS EM HPLC	23
3.1. HPLC.....	24
3.2. PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO	37
4. MÉTODOS E MATERIAIS	49
4.1. MATERIAIS	51
4.2. MÉTODO ANALÍTICO.....	52
4.3. PROTOCOLO DE VALIDAÇÃO.....	52
4.4. CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO	60
4.5. PROTOCOLO PARA A MONITORIZAÇÃO DA ESTABILIDADE.....	61
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1. IDENTIFICAÇÃO E DOSEAMENTO	63
5.2. COMPOSTOS RELACIONADOS – TESTE 1.....	68
5.3. COMPOSTOS RELACIONADOS – TESTE 2.....	78
5.4. PUREZA ESTEREOQUÍMICA.....	85
5.5. MONITORIZAÇÃO DA ESTABILIDADE.....	89
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS DE TRABALHO FUTURO	95
BIBLIOGRAFIA.....	99
BIBLIOGRAFIA CONFIDENCIAL	104
ANEXO A - RESULTADOS DA VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS	
IDENTIFICAÇÃO E DOSEAMENTO.....	106
ANEXO B - RESULTADOS DA VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO COMPOSTOS	
RELACIONADOS – TESTE 1.....	115

<u>ANEXO C - RESULTADOS DA VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO COMPOSTOS</u>	
<u>RELACIONADOS – TESTE 2.....</u>	<u>142</u>
<u>ANEXO D - RESULTADOS DA VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PUREZA</u>	
<u>ESTEREOQUÍMICA.....</u>	<u>150</u>
<u>ANEXO E - RESULTADOS DA MONITORIZAÇÃO DA ESTABILIDADE</u>	<u>158</u>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Instalações da Labor Qualitas - Tecnimede.....	1
Figura 2 - Investimento necessário para cada fase do desenvolvimento de um novo medicamento, adaptado de [8].....	8
Figura 3 - Proteção da propriedade intelectual de um medicamento inovador por patentes e outros certificados de proteção complementares, adaptado de [9].....	8
Figura 4 - Duração e intensidade das componentes de CINV e fases sensíveis a tratamentos adaptada de [14].	10
Figura 5 - Timeline do desenvolvimento do tratamento para a CINV.	11
Figura 6 - Estrutura química da substância ativa.	12
Figura 7 - Estrutura química do pró-farmaco.	14
Figura 8 - Esquema do processo de produção do produto acabado em estudo.	18
Figura 9 – Liofilizador à escala laboratorial - vista da frente: monitor de controlo, prateleiras e condensador, adaptado de [29].	21
Figura 10 - Representação gráfica da evolução da temperatura e pressão do processo de liofilização adaptado de [32].....	22
Figura 11 – Típico sistema HPLC, adaptado de [37].....	25
Figura 12 - Capacidade higroscópica das colunas de fase reversa, adaptado de [40].	27
Figura 13 - Esquema figurativo das classes de isomerismo, adaptado de [53].	28
Figura 14 - Exemplo de cromatograma e definição de conceitos retirado de documentos internos da Tecnimede.....	31
Figura 15 - Fator de simetria retirado de documentos internos da Tecnimede.	32
Figura 16 - Razão sinal-ruído de um pico cromatográfico retirado de documentos internos da Tecnimede.....	33
Figura 17 - Precisão: variações analisadas por cada nível da precisão.	40
Figura 18 – a) Cromatograma da solução padrão (0.15 mg/ml) e b) Cromatograma da solução amostra do produto acabado (0.15 mg/ml).....	63
Figura 19 - Espectro de absorção do pico de API na solução padrão (em cima) e na solução amostra (em baixo).	64
Figura 20 – Cromatograma da amostra do produto acabado (1.5 mg/ml).	69

Figura 21 - Cromatograma da amostra do produto acabado (1.5 mg/ml) sobrecarregada com as impurezas A, B, D e F (0.003 mg/ml) e impureza C (0.015 mg/ml).....	70
Figura 22 - Estabilidade da impureza C na solução amostra: (a) tempo 0 e (b) 4 dias depois. .	76
Figura 23 - Cromatogramas da solução de impureza E ao limite de especificação: preparada à 6 meses em cima e tempo 0 em baixo.	78
Figura 24 - Regressão linear ao API para a linearidade do método analítico compostos relacionados teste 2 considerando os valores médios obtidos.	80
Figura 25 - Distribuição dos resíduos do método analítico compostos relacionados teste 2 considerando os valores médios obtidos.....	81
Figura 26 - Regressão linear ao API para a linearidade do método analítico compostos relacionados teste 2 considerando os valores individuais obtidos.	81
Figura 27 - Distribuição dos resíduos do método analítico compostos relacionados teste 2 considerando os valores individuais obtidos.	82
Figura 28 - Cromatograma da solução SST.	85
Figura 29 - Cromatograma da amostra de produto acabado (1.5 mg/ml).	85
Figura 30 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a oxidação – compostos relacionados teste 1.	92
Figura 31 - Cromatograma do diluente (ACN:H ₂ O, 1:1)	106
Figura 32 - Cromatograma da fase móvel.	106
Figura 33 - Cromatograma da solução de placebo.	106
Figura 34 - Cromatograma da solução padrão (0.15 mg/ml).	107
Figura 35 - Cromatograma da solução amostra do produto acabado (0.15 mg/ml).	107
Figura 36 - Cromatograma da solução de Impureza A (0.01 mg/ml).	107
Figura 37 - Cromatograma da solução de Impureza B (0.01 mg/ml).	108
Figura 38 - Cromatograma da solução de Impureza C (0.01 mg/ml).	108
Figura 39 - Cromatograma da solução de Impureza D (0.01 mg/ml).	108
Figura 40 - Cromatograma da solução de Impureza F (0.01 mg/ml).	109
Figura 41 - Cromatograma da amostra de produto acabado (C _{API} =0.15 mg/ml) sobrecarregada com as impurezas A, B, C, D e F (C=0.01 mg/ml).....	109
Figura 42 - Regressão linear para a linearidade do API no método analítico doseamento.....	111
Figura 43 - Distribuição dos resíduos para a regressão linear do API no método analítico doseamento.....	112

Figura 44 – Cromatograma do solvente (ACN:H ₂ O, 1:1).....	115
Figura 45 – Cromatograma da solução de placebo do produto acabado.	115
Figura 46 – Cromatograma da solução padrão (0.003 mg/ml).....	115
Figura 47 - Cromatograma da solução de Impureza A (0.003 mg/ml)	116
Figura 48 - Cromatograma da solução de Impureza B (0.003 mg/ml)	116
Figura 49 - Cromatograma da solução de Impureza C (0.015 mg/ml).....	116
Figura 50 - Cromatograma da solução de Impureza D (0.003 mg/ml)	117
Figura 51 - Cromatograma da solução de Impureza F (0.003 mg/ml)	117
Figura 52 - Regressão linear do API para a linearidade do método analítico compostos relacionados teste 1 – determinação das impurezas desconhecidas.	127
Figura 53 - Distribuição dos resíduos da linearidade do API do método analítico compostos relacionados teste 1.	128
Figura 54 - Regressão linear da Impureza A para a linearidade do método analítico compostos relacionados teste 1.	128
Figura 55 - Distribuição dos resíduos da linearidade da Impureza A do método analítico compostos relacionados teste 1.	129
Figura 56 - Regressão linear da Impureza B para a linearidade do método analítico compostos relacionados teste 1.	130
Figura 57 - Distribuição dos resíduos da linearidade da Impureza B do método analítico compostos relacionados teste 1.	131
Figura 58 - Regressão linear da Impureza C para a linearidade do método analítico compostos relacionados teste 1.	131
Figura 59- Distribuição dos resíduos da linearidade da Impureza C do método analítico compostos relacionados teste 1.	132
Figura 60 - Regressão linear da Impureza D para a linearidade do método analítico compostos relacionados teste 1.	133
Figura 61 - Distribuição dos resíduos da linearidade da Impureza D do método analítico compostos relacionados teste 1.	134
Figura 62 - Regressão linear da Impureza F para a linearidade do método analítico compostos relacionados teste 1.	134
Figura 63 - Distribuição dos resíduos da linearidade da Impureza D do método analítico compostos relacionados teste 1.	135
Figura 64 - Cromatograma do diluente (ACN:Tampão 0.1% H ₃ PO ₄ , 1:1)	142

Figura 65 - Cromatograma da solução de placebo do produto acabado.	142
Figura 66 - Cromatograma da solução padrão (0.003 mg/ml).	142
Figura 67 - Cromatograma da amostra do produto acabado 1.5 mg/ml)	143
Figura 68 - Cromatograma da solução de Impureza A (0.003 mg/ml).	143
Figura 69 - Cromatograma da solução de Impureza B (0.003 mg/ml).	143
Figura 70 - Cromatograma da solução de Impureza C (0.003 mg/ml).	144
Figura 71 - Cromatograma da solução de Impureza D (0.003 mg/ml).	144
Figura 72 - Cromatograma da solução de Impureza E (0.003 mg/ml).	144
Figura 73 - Cromatograma da solução de Impureza F (0.003 mg/ml).	145
Figura 74 - Cromatograma da amostra de produto acabado (C=1.5 mg/ml) sobrecarregada com Impureza E (C=0.003).	145
Figura 75 - Cromatograma do diluente (ACN:Tampão, 1:1).	150
Figura 76 - Cromatograma da fase móvel (volume de injeção igual a 0).	150
Figura 77 - Cromatograma da amostra de placebo do produto acabado.	150
Figura 78 - Cromatograma da solução padrão (0.0006 mg/ml).	151
Figura 79 - Cromatograma da solução de isômero à concentração do limite de especificação (0.0006 mg/ml).	151
Figura 80 - Regressão linear ao API para a linearidade do método analítico pureza estereoquímica.	154
Figura 81 - Distribuição dos resíduos do método analítico pureza estereoquímica.	155
Figura 82 - Cromatograma da amostra de API exposta a luz – doseamento.	158
Figura 83 - Cromatograma da amostra de API exposta ao calor – doseamento.	158
Figura 84 - Cromatograma da amostra de API exposta a hidrólise – doseamento.	158
Figura 85 - Cromatograma da amostra de API exposta a oxidação – doseamento.	159
Figura 86 - Cromatograma da amostra de API exposta a hidrólise ácida – doseamento.	159
Figura 87 - Cromatograma da amostra de API exposta a umidade – doseamento.	159
Figura 88 - Cromatograma da amostra de API exposta a luz – doseamento.	160
Figura 89 - Cromatograma da amostra de API exposta a hidrólise básica – doseamento.	160
Figura 90 - Cromatograma da amostra de produto acabado sem degradação – doseamento.	160
Figura 91 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a calor – doseamento. .	161

Figura 92 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a hidrolise – doseamento.	161
Figura 93 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a oxidação – doseamento.	161
Figura 94 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a hidrolise acida – doseamento.....	162
Figura 95 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a humidade – doseamento.	162
Figura 96 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a luz – doseamento.....	162
Figura 97 - Cromatograma da amostra de API sem degradação – compostos relacionados teste 1.....	163
Figura 98 - Cromatograma da amostra de API exposta a calor – compostos relacionados teste 1.	163
Figura 99 - Cromatograma da amostra de API exposta a hidrolise – compostos relacionados teste 1.....	163
Figura 100 - Cromatograma da amostra de API exposta a oxidação – compostos relacionados teste 1.....	164
Figura 101 - Cromatograma da amostra de API exposta a hidrolise acida – compostos relacionados teste 1.....	164
Figura 102 - Cromatograma da amostra de API exposta a humidade – compostos relacionados teste 1.....	164
Figura 103 - Cromatograma da amostra de API exposta a luz – compostos relacionados teste 1.	165
Figura 104 - Cromatograma da amostra de API exposta a hidrolise básica – compostos relacionados teste 1.....	165
Figura 105 - Cromatograma da amostra de produto acabado sem degradação – compostos relacionados teste 1.....	165
Figura 106 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a calor – compostos relacionados teste 1.....	166
Figura 107 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a hidrolise – compostos relacionados teste 1.....	166
Figura 108 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a hidrolise acida– compostos relacionados teste 1.....	166
Figura 109 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a humidade – compostos relacionados teste 1.....	167

Figura 110 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a luz – compostos relacionados teste 1.	167
Figura 111 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a hidrolise básica – compostos relacionados teste 1.	167
Figura 112 - Cromatograma da amostra de API sem degradação – compostos relacionados teste 2.....	168
Figura 113 - Cromatograma da amostra de API exposta a calor – compostos relacionados teste 2.....	168
Figura 114 - Cromatograma da amostra de API exposta a hidrolise – compostos relacionados teste 2.....	168
Figura 115 - Cromatograma da amostra de API exposta a oxidação – compostos relacionados teste 2.....	169
Figura 116 - Cromatograma da amostra de API exposta a hidrolise acida – compostos relacionados teste 2.	169
Figura 117 - Cromatograma da amostra de API exposta a humidade – compostos relacionados teste 2.....	169
Figura 118 - Cromatograma da amostra de API exposta a luz– compostos relacionados teste 2.	170
Figura 119 - Cromatograma da amostra de API exposta a hidrolise básica – compostos relacionados teste 2.	170
Figura 120 - Cromatograma da amostra de produto acabado sem degradação – compostos relacionados teste 2.	170
Figura 121 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a hidrolise – compostos relacionados teste 2.	171
Figura 122 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a oxidação – compostos relacionados teste 2.	171
Figura 123 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a hidrolise acida – compostos relacionados teste 2.	171
Figura 124 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a humidade – compostos relacionados teste 2.	172
Figura 125 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a luz – compostos relacionados teste 2.	172
Figura 126 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a hidrolise básica – compostos relacionados teste 2.	172
Figura 127 - Cromatograma da amostra de API sem degradação – pureza estereoquímica. .	173

Figura 128 - Cromatograma da amostra de API exposta a calor – pureza estereoquímica.	173
Figura 129 - Cromatograma da amostra de API exposta a hidrolise – pureza estereoquímica.	173
Figura 130 - Cromatograma da amostra de API exposta a oxidação– pureza estereoquímica.	174
Figura 131 - Cromatograma da amostra de API exposta a hidrolise acida – pureza estereoquímica.....	174
Figura 132 - Cromatograma da amostra de API exposta a humidade – pureza estereoquímica.	174
Figura 133 - Cromatograma da amostra de API exposta a luz – pureza estereoquímica.	175
Figura 134 - Cromatograma da amostra de API exposta a hidrolise básica – pureza estereoquímica.....	175
Figura 135 - Cromatograma da amostra de produto acabado sem degradação – pureza estereoquímica.....	175
Figura 136 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a calor – pureza estereoquímica.....	176
Figura 137 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a hidrolise – pureza estereoquímica.....	176
Figura 138 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a oxidação – pureza estereoquímica.....	176
Figura 139 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a hidrolise acida – pureza estereoquímica.....	177
Figura 140 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a humidade – pureza estereoquímica.....	177
Figura 141 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a luz – pureza estereoquímica.....	177
Figura 142 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a hidrolise básica – pureza estereoquímica.....	178

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Informação geral da matéria-prima: API na forma de sal.	15
Tabela 2 - Impurezas da matéria-prima de API.	16
Tabela 3 – Fases do ciclo de liofilização.	19
Tabela 4 - Composição qualificativa do produto acabado.	20
Tabela 5 - Tipo de cromatografia realizada por cada tipo de fase estacionária.	26
Tabela 6 - Casos de estudo realizados para validação de métodos analíticos do API e impureza C.	29
Tabela 7 - Limites dos parâmetros cromatográficos para obter adequabilidade do sistema.	33
Tabela 8 – RSD máximo permitido para a repetibilidade como parâmetro da adequabilidade. .	34
Tabela 9 - Critérios de Aceitação para a Repetibilidade.	35
Tabela 10 - Critérios de Aceitação para o Fator de Resposta.	36
Tabela 11 - Critérios de Aceitação para a estabilidade do padrão.	36
Tabela 12 – ICH Q3B(R2) para definir os limites de especificação de impurezas em medicamentos.	37
Tabela 13 – Especificações para os métodos analíticos de produto acabado.	37
Tabela 14 - Parâmetros a validar por tipo de ensaio analítico segundo a ICH.	38
Tabela 15 - Critérios de aceitação para a repetibilidade do método.	40
Tabela 16 - Critérios de aceitação para a precisão intermédia.	40
Tabela 17 - Critérios de aceitação para o limite de deteção.	41
Tabela 18 - Critérios de aceitação para o limite de quantificação.	41
Tabela 19 - Critérios de aceitação para gama de validação.	42
Tabela 20 - Critérios de aceitação para a linearidade.	42
Tabela 21 - Critérios de aceitação para a exatidão.	45
Tabela 22 - Critérios de aceitação para a estabilidade intra-diária.	45
Tabela 23 - Critérios de aceitação para a robustez do método.	46
Tabela 24 - Testes analíticos críticos para a análise do produto acabado.	49
Tabela 25 - Doseamento - preparação das soluções de linearidade.	54

Tabela 26 – Compostos relacionados teste 1 - preparação das soluções de linearidade para as impurezas desconhecidas, A, B, D e F.	55
Tabela 27 - Compostos relacionados teste 1 - preparação das soluções de linearidade para a impureza C.	55
Tabela 28 - Compostos relacionados teste 2 - preparação das soluções de linearidade.....	55
Tabela 29 – Pureza estereoquímica - preparação das soluções de linearidade.	56
Tabela 30 - Doseamento - preparação das soluções de exatidão.	56
Tabela 31 - Compostos relacionados testes 1 - soluções de exatidão para as impurezas A, B, D e F.	57
Tabela 32 - Compostos relacionados testes 1 - soluções de exatidão para a impureza C.	57
Tabela 33 - Compostos relacionados testes 1 - soluções de exatidão para as impurezas desconhecidas.	58
Tabela 34 - Compostos relacionados testes 2 - soluções de exatidão.	58
Tabela 35 – Pureza estereoquímica - soluções de exatidão.....	58
Tabela 36 - Alterações aos sistemas cromatográficos para análise da robustez.	59
Tabela 37 - Critérios de aceitação de cada parâmetro para validação analítica dos métodos identificação, doseamento e compostos relacionados.	60
Tabela 38 - Condições de stress para validação do método compostos relacionados - teste 1.	62
Tabela 39 - Adequabilidade do sistema para a validação do método analítico doseamento.	64
Tabela 40 – Resumo dos resultados da validação dos métodos analíticos Identificação e Doseamento.	65
Tabela 41 - Resultados da estabilidade intra-diária para o método analítico doseamento.	66
Tabela 42 - Primeiro set de análise da robustez do método analítico doseamento.	66
Tabela 43 - Segundo set de análise da robustez dos métodos doseamento e identificação.	66
Tabela 44 – Totalidade dos resultados da robustez do API no método analítico doseamento. .	67
Tabela 45 - Concentração ao limite de especificação de cada impureza.	68
Tabela 46 – Parâmetros cromatográficos do método analítico compostos relacionados teste 1.	68
Tabela 47 - Tempo de retenção de cada analito a quantificar no método analítico compostos relacionados teste 1.	69
Tabela 48 - Resumo dos resultados da precisão do método analítico compostos relacionados teste 1.....	71

Tabela 49 - Estimativa do limite de detecção para os compostos relacionados do método 2.	72
Tabela 50 - Limite de detecção e limite de quantificação das impurezas do método analítico compostos relacionados teste 1.	72
Tabela 51 - Resultados da gama de validação do método analítico compostos relacionados teste 1.....	73
Tabela 52 - Resultados da linearidade do método analítico compostos relacionados teste 1. ..	73
Tabela 53 - Resultados do RRF do método analítico compostos relacionados teste 1.....	75
Tabela 54 - Resultados da exatidão do método analítico compostos relacionados teste 1.	75
Tabela 55 - Resultados da estabilidade intradiária método analítico compostos relacionados teste 1.....	76
Tabela 56 - Resumo dos resultados obtidos para a robustez do método analítico compostos relacionados teste 1.	77
Tabela 57 - Tempo de retenção e RRT dos analitos do método de compostos relacionados teste 2.....	79
Tabela 58 - Resultados da precisão, LD, LOQ e gama de validação do método analítico compostos relacionados teste 2.	79
Tabela 59 - Resultados da linearidade do método analítico compostos relacionados teste 2. ...	80
Tabela 60 - Resultados do fator de resposta do método analítico compostos relacionados teste 2.....	82
Tabela 61 - Resultados da exatidão e da estabilidade intradiária da solução padrão do método analítico compostos relacionados teste 2.	83
Tabela 62 - Resultados da robustez do método analítico compostos relacionados teste 2 para a impureza E - Amostra de Produto Acabado.	83
Tabela 63 - Resumo dos resultados da validação do método analítico pureza estereoquímica.	86
Tabela 64 – Resultados da estabilidade intra-diária da validação do método analítico pureza estereoquímica.....	87
Tabela 65 - Resultados da robustez do método pureza estereoquímica - Amostra de Produto Acabado ($C_{API}=0,3$ mg/ml) sobrecarregada com isômero ($C_{isômero} = 0,0006$ mg/ml).....	87
Tabela 66 - Resultados médios dos dois ensaios da monitorização da estabilidade das amostras de API.....	90
Tabela 67 - Resultados médios dos dois ensaios da monitorização da estabilidade das amostras de produto acabado.	91

Tabela 68 - Resultados da adequabilidade do sistema do método analítico doseamento para o produto acabado.	109
Tabela 69 - Resultados da repetibilidade do sistema do método analítico doseamento para o produto acabado.	110
Tabela 70 - Resultados da repetibilidade do método do método analítico doseamento para o produto acabado.	110
Tabela 71 - Resultados da precisão intermédia do método analítico doseamento para o produto acabado.....	111
Tabela 72 - Dados da regressão linear do API no método analítico doseamento.	112
Tabela 73 - Resultados para a exatidão do API no método analítico doseamento.	113
Tabela 74 - Resultados para gama de validação do API no método analítico doseamento.....	113
Tabela 75 - Resultados para a estabilidade intradiária do API no método analítico doseamento – solução padrão a 5°C.....	113
Tabela 76 - Resultados para a estabilidade intradiária do API no método analítico doseamento – amostra de produto acabado a 5°C.	114
Tabela 77- Resultados para a estabilidade intradiária do API no método analítico doseamento – solução padrão a 20°C.....	114
Tabela 78 – Resultados da repetibilidade do sistema do método analítico compostos relacionados teste 1.	118
Tabela 79 – Resultados da repetibilidade do método do método analítico compostos relacionados teste 1 – Impureza A.	118
Tabela 80 - Resultados da repetibilidade do método do método analítico compostos relacionados teste 1 – Impureza B.	119
Tabela 81 - Resultados da repetibilidade do método do método analítico compostos relacionados teste 1 – Impureza C.	119
Tabela 82 - Resultados da repetibilidade do método do método analítico compostos relacionados teste 1 – Impureza D.	119
Tabela 83 - Resultados da repetibilidade do método do método analítico compostos relacionados teste 1 – Impureza F.	120
Tabela 84 - Resultados da repetibilidade do método do método analítico compostos relacionados teste 1 – Impurezas desconhecidas.	120
Tabela 85 - Resultados da precisão intermédia do método analítico compostos relacionados teste 1 – Impurezas desconhecidas.	121

Tabela 86 - Resultados da precisão intermédia do método analítico compostos relacionados teste 1 – Impureza A.....	121
Tabela 87 - Resultados da precisão intermédia do método analítico compostos relacionados teste 1 – Impureza B.....	122
Tabela 88 - Resultados da precisão intermédia do método analítico compostos relacionados teste 1 – Impureza C.....	122
Tabela 89 - Resultados da precisão intermédia do método analítico compostos relacionados teste 1 – Impureza D.....	123
Tabela 90 - Resultados da precisão intermédia do método analítico compostos relacionados teste 1 – Impureza F.....	123
Tabela 91 - Resultados do limite de deteção do método analítico compostos relacionados teste 1.....	124
Tabela 92 - Resultados do limite de quantificação do método analítico compostos relacionados teste 1.....	124
Tabela 93 - Resultados de gama de validação do método analítico compostos relacionados teste 1 – impurezas desconhecidas.....	125
Tabela 94 - Resultados de gama de validação do método analítico compostos relacionados teste 1 – Impureza A.....	125
Tabela 95 - Resultados de gama de validação do método analítico compostos relacionados teste 1 – Impureza B.....	125
Tabela 96 - Resultados de gama de validação do método analítico compostos relacionados teste 1 – Impureza C.....	126
Tabela 97 - Resultados de gama de validação do método analítico compostos relacionados teste 1 – Impureza D.....	126
Tabela 98 - Resultados de gama de validação do método analítico compostos relacionados teste 1 – Impureza F.....	126
Tabela 99 - Dados da regressão linear do API para a linearidade do método analítico compostos relacionados teste 1.....	127
Tabela 100 - Dados da regressão linear da Impureza A para a linearidade do método analítico compostos relacionados teste 1.....	129
Tabela 101 - Dados da regressão linear da Impureza B para a linearidade do método analítico compostos relacionados teste 1.....	130
Tabela 102 - Dados da regressão linear da Impureza C para a linearidade do método analítico compostos relacionados teste 1.....	132

Tabela 103 - Dados da regressão linear da Impureza D para a linearidade do método analítico compostos relacionados teste 1.	133
Tabela 104 - Dados da regressão linear da Impureza F para a linearidade do método analítico compostos relacionados teste 1.	135
Tabela 105 – Fatores de Resposta Relativos para cada impureza do método analítico compostos relacionados teste 1.	136
Tabela 106 - Resultados da exatidão para o API do método analítico compostos relacionados teste 1 para a determinação de impurezas desconhecidas.	136
Tabela 107 - Resultados da exatidão do método analítico compostos relacionados teste 1 para a determinação da Impureza A.	137
Tabela 108 - Resultados da exatidão do método analítico compostos relacionados teste 1 para a determinação da Impureza B.	137
Tabela 109 - Resultados da exatidão do método analítico compostos relacionados teste 1 para a determinação da Impureza C.	137
Tabela 110 - Resultados da exatidão do método analítico compostos relacionados teste 1 para a determinação da Impureza D.	138
Tabela 111 - Resultados da exatidão do método analítico compostos relacionados teste 1 para a determinação da Impureza F.	138
Tabela 112 - Estabilidade intradiária do API no método analítico compostos relacionados teste 1 – solução padrão a 5°C.	138
Tabela 113 - Estabilidade intradiária do API no método analítico compostos relacionados teste 1 – solução amostra a 5°C.	139
Tabela 114 - Parâmetros cromatográficos do ensaio robustez do método analítico compostos relacionados teste 1 – solução padrão ($C_{API} = 0,003$ mg/ml) sobrecarregada com impurezas A, B, D e F ($C=0,003$ mg/ml).	139
Tabela 115 - Parâmetros cromatográficos do ensaio robustez do método analítico compostos relacionados teste 1 – solução padrão ($C_{API} = 0,003$ mg/ml) sobrecarregada com impureza C ($C=0,015$ mg/ml).	140
Tabela 116 - Resultados da robustez do método analítico compostos relacionados teste 1 para a impureza A - Amostra de Produto Acabado sobrecarregada com impurezas A, B, D e F (0,003 mg/ml).	140
Tabela 117 - Resultados da robustez do método analítico compostos relacionados teste 1 para a impureza B - Amostra de Produto Acabado sobrecarregada com impurezas A, B, D e F (0,003 mg/ml).	140

Tabela 118 - Resultados da robustez do método analítico compostos relacionados teste 1 para a impureza C - Amostra de Produto Acabado sobrecarregada com impureza C (0,015 mg/ml)	141
Tabela 119 - Resultados da robustez do método analítico compostos relacionados teste 1 para a impureza D - Amostra de Produto Acabado sobrecarregada com impurezas A, B, D e F (0,003 mg/ml).....	141
Tabela 120 - Resultados da robustez do método analítico compostos relacionados teste 1 para a impureza F - Amostra de Produto Acabado sobrecarregada com impurezas A, B, D e F (0,003 mg/ml).....	141
Tabela 121 - Parâmetros cromatográficos do método analítico compostos relacionados teste 2.	145
Tabela 122 - Resultados da repetibilidade do sistema - compostos relacionados teste 2.	145
Tabela 123 - Resultados da repetibilidade do método - compostos relacionados teste 2.	146
Tabela 124 - Resultados da precisão intermédia do método analítico compostos relacionados teste 2.....	146
Tabela 125 - Estimativa prévia dos valores de DL do método analítico compostos relacionados teste 2.....	146
Tabela 126 - Resultados do limite de deteção do método analítico compostos relacionados teste 2.....	147
Tabela 127 - Estimativa prévia dos valores de LOQ do método analítico compostos relacionados teste 2.....	147
Tabela 128 - Resultados do limite de quantificação do método analítico compostos relacionados teste 2.....	147
Tabela 129 – Fator de Resposta Relativo da Impureza E - método analítico compostos relacionados teste 2.	148
Tabela 130 - Resultados da exatidão do método analítico compostos relacionados teste 2. ..	148
Tabela 131 - Resultados do gama de validação do método analítico compostos relacionados teste 2.....	148
Tabela 132 - Estabilidade intradiária da solução padrão a 5°C - compostos relacionados teste 2.	149
Tabela 133 - Parâmetros cromatográficos do ensaio robustez do método analítico compostos relacionados teste 2 – solução padrão (C _{API} = 0,003 mg/ml).	149
Tabela 134 - Parâmetros cromatográficos do método analítico pureza estereoquímica.	151
Tabela 135 - Resultados da repetibilidade do sistema do método analítico pureza estereoquímica.....	152

Tabela 136 - Resultados da repetibilidade do método do método analítico pureza estereoquímica.	152
Tabela 137 - Resultados da precisão intermédia do método analítico pureza estereoquímica.	152
Tabela 138 - Estimativa prévia dos valores de DL do método analítico pureza estereoquímica.	153
Tabela 139 - Resultados do limite de deteção do método analítico pureza estereoquímica. ...	153
Tabela 140 - Estimativa prévia dos valores de LOQ do método analítico pureza estereoquímica.	153
Tabela 141 - Resultados do limite de quantificação do método analítico pureza estereoquímica.	153
Tabela 142 - Dados da regressão linear ao API do método analítico pureza estereoquímica.	154
Tabela 143 - Fator de Resposta Relativo do Isómero - método analítico pureza estereoquímica.	155
Tabela 144 - Resultados da exatidão do método analítico pureza estereoquímica.	155
Tabela 145 - Resultados do gama de validação do método analítico pureza estereoquímica.	156
Tabela 146 – Estabilidade intra-diária da solução padrão a 5°C – pureza estereoquímica.	156
Tabela 147 - Parâmetros cromatográficos do ensaio robustez do método analítico pureza estereoquímica - solução padrão ($C_{API} = 0,0006$ mg/ml).....	157
Tabela 148 - Primeiro ensaio da monitorização da estabilidade - resultados das amostras de API.	179
Tabela 149 – Segundo ensaio da monitorização da estabilidade - resultados das amostras de API.....	180
Tabela 150 - Primeiro ensaio da monitorização da estabilidade - resultados das amostras de produto acabado.	181
Tabela 151 - Segundo ensaio da monitorização da estabilidade - resultados das amostras de produto acabado.	182

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN – Acetonitrilo

AIM – Autorização de Introdução no Mercado

API – *Active Principle Ingredient*

BPF – Boas Práticas de Fabrico

CN – Concentração Nominal

EMA – Agência Europeia do Medicamento

Eur. Ph. – *European Pharmacopeia*

FDA – *US Food and Drug Administration*

FR – Fator de Resposta

GMP – *Good Manufacturing Practice*

ICH – *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*

IND – *Investigational New Drug*

LD – Limite de Detecção

LE – Limite de especificação

LOQ – *Limit of Quantification*

MG – Medicamento Genérico

OMS – Organização Mundial de Saúde

RRF – *Relative Response Factor*

RT – *Retention Time*

Stereo – Método analítico para quantificação do enantiómero

TMD – Toma máxima diária

USP – *US Pharmacopeia*

VPF – Validação do Processo de Fabrico

1. ENQUADRAMENTO

1.1. A Tecnimede

O Grupo Tecnimede nasceu em 1980, em Portugal, formado por empresas de capital privado e 100% português. Esta empresa nasceu de uma vontade: a preservação da vida e saúde humanas, através do desenvolvimento e comercialização de produtos farmacêuticos, apostando fortemente na qualidade e inovação tecnológica. O portfólio da Tecnimede conta com mais de 100 produtos, tendo gerando mais de 2 500 Autorizações de Introdução no Mercado (AIM) a nível mundial.

Sendo a internacionalização uma das linhas traçadas desde a fundação da empresa, a Tecnimede rapidamente se expandiu e alcançou outros mercados para além do português. Em 1999, expandiu a sua unidade de *marketing* e vendas para Marrocos, em 2009 cruzou a fronteira para Espanha, e hoje encontra-se diretamente também nos mercados italiano, brasileiro e colombiano. Indiretamente, através de parcerias locais, está presente em mais de 40 países para onde exporta os seus produtos: a quase totalidade dos países da União Europeia, bem como diversos países de África, América do Sul, América do Norte, Ásia e Médio Oriente.

Atuando há 39 anos, a Tecnimede tem neste momento várias filiais comerciais espalhadas pelo mundo – Tecnimede, Pentafarma, Farnoz, Tecnimede Maroc, Tecnimede España, Tecnigen, Atlantic Pharma e Altadis, três unidades produtivas – West Pharma, Atlantic Pharma e Atlas Pharma, e um centro de investigação e desenvolvimento – Labor Qualitas (Figura 1).



Figura 1 - Instalações da Labor Qualitas - Tecnimede.

As principais esferas de ação da Tecnimede são o desenvolvimento de medicamentos essencialmente similares (genéricos) e também de formas farmacêuticas distintas das já autorizadas para um determinado medicamento, a avaliação da eficácia, tolerabilidade e segurança da utilização combinada de fármacos, o estudo de novas indicações terapêuticas, entre outras [1].

Segundo Miguel Ruas, administrador na Tecnimede, os mercados principais da empresa em 2011 eram Portugal, Espanha, Alemanha, Itália e Marrocos, representando cerca de 27% da faturação do Grupo. Visionando sempre o crescimento, o objetivo para esse ano seria atingir os 50% no espaço de dois anos. Adicionalmente, o grande desafio da Tecnimede seria finalizar o desenvolvimento de três projetos que envolvem moléculas originais [2].

1.2. Motivação

A indústria farmacêutica é uma indústria extremamente regulamentada. Todo o ciclo de vida de um medicamento, desde o seu desenvolvimento inicial, até à sua produção, comercialização e fornecimento, é sujeito a requisitos fortemente delineados por entidades reguladoras como a FDA (*US Food and Drug Administration*), a EMA (Agência Europeia do Medicamento) e, em Portugal, pelo INFARMED (Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.).

Todo este protocolo é necessário devido ao setor onde se enquadra. Um medicamento não seguro ou que contenha na sua composição um composto capaz de produzir efeitos secundários graves ou cuja toxicidade é elevada teria um grande impacto na sociedade. Assim, a segurança e qualidade dos medicamentos que são libertados e comercializados para todos os pacientes e profissionais de saúde são o objetivo principal e comum destas entidades reguladoras, pelo que é muito importante que as empresas responsáveis pelo fabrico de um medicamento respeitem as suas políticas.

Adicionalmente, os ensaios analíticos realizados pelos profissionais nos laboratórios de desenvolvimento e análise de medicamentos são detalhados pela farmacopeia em vigor no espaço onde o trabalho está a ser elaborado (*US Pharmacopeia – USP and European Pharmacopeia – Ph. Eur.* são dois exemplos), eliminando a variabilidade entre empresas e conferindo um grau de confiança superior aos resultados.

No entanto, como definido pela ICH (*International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*), os ensaios analíticos realizados requerem, antes da sua utilização, um processo de validação, segundo a *guideline* Q2(R1). Esta validação tem como objetivo mostrar que o método analítico é o adequado para a análise completa do medicamento pretendido e assegurar a confiança e a reprodutibilidade dos resultados que produz.

O objetivo principal deste trabalho é a validação dos métodos analíticos para o controlo de qualidade de um medicamento cuja forma farmacêutica é pó para perfusão para injeção. Desdobrando este objetivo geral, podemos discriminar os objetivos mais específicos do trabalho que aqui é desenvolvido:

- Validação de método analítico para a quantificação da substância ativa - Doseamento;
- Validação de métodos analíticos para a quantificação das impurezas – Compostos Relacionados: Teste 1 e Teste 2;
- Validação de método analítico para a quantificação do isómero – Pureza Estereoquímica;
- Monitorização da estabilidade do produto sob condições de degradação forçada, no âmbito de validação do método analítico para quantificação de impurezas;

A estrutura deste documento está dividida em três grandes partes:

- Parte A: Introdução teórica ao trabalho que vai ser desenvolvido, compreende os capítulos 1 a 3;
- Parte B: Protocolo de validação e procedimentos para a realização da componente prática, capítulo 4;
- Parte C: Resultados obtidos, discussão destes e conclusões que daí advêm, capítulos 5 e 6 e anexos.

Por motivos de confidencialidade, o capítulo 2 deste trabalho e o subcapítulo 3.1.3. serão restritos.

2. ESTADO DA ARTE

2.1. A Indústria Farmacêutica

O setor do medicamento, do qual faz parte a indústria farmacêutica, é extremamente regulamentado. A União Europeia dispõe de um Sistema de Regulamentação do Medicamento, suportado por entidades reguladoras como a Agência Europeia do Medicamento (EMA) e a Comissão Europeia, em harmonia com a Organização Mundial de Saúde (OMS) [3].

Todos os medicamentos, inovadores ou genéricos, estão sujeitos a autorização previamente à sua comercialização. Uma das áreas de intervenção da EMA é a avaliação de pedidos e a emissão de AIMS para o espaço europeu. A nível nacional, o INFARMED tem como principal missão garantir que os produtos de saúde acessíveis aos cidadãos e profissionais de saúde são de qualidade, eficazes e seguros. É também da sua responsabilidade a aprovação de AIMS de medicamentos libertados no espaço português.

No entanto, não é só a introdução de um medicamento no mercado que é submetida a aprovação por entidades superiores à empresa responsável. Todo o ciclo de vida do medicamento, desde o desenvolvimento até à sua produção, rege-se segundo as farmacopeias e normas em vigor no espaço em que o medicamento é desenvolvido e/ou será libertado.

As farmacopeias são livros que visam assegurar o conhecimento técnico-científico e o respeito pelas boas práticas de fabrico dos seus especialistas. Sob a forma de monografias, as farmacopeias têm valor legal, e uma das suas *raison d'être* é delinear e estabelecer as normas, práticas e requisitos técnicos que os operadores devem respeitar, com vista ao controlo da qualidade e garantia da uniformidade das práticas laboratoriais. As farmacopeias estão em constante revisão e atualização por parte da sua Comissão [4]- [5].

A Farmacopeia Europeia (*Ph. Eur.*) é a referência científica da Europa, definindo o procedimento padrão para os 38 países onde é aplicável e para os mais de 100 países que a usam [5].

No entanto, cada país tem a sua farmacopeia, e com o intuito de harmonizar as divergências que surgiam entre procedimentos, surgiu a ICH (*International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*).

Esta iniciativa veio homogeneizar os aspetos científicos e técnicos do desenvolvimento de produtos farmacêuticos, em *guidelines* disponíveis e aplicáveis a nível mundial. Este novo estado de harmonização permite o uso mais racional de recursos humanos e a eliminação de impasses no procedimento global de aprovação, ao mesmo tempo que mantém os requisitos de qualidade, segurança e eficiência para a proteção da saúde do público.

Adicionalmente, foram desenvolvidas as Boas Práticas de Fabrico (BPF), ou Good Manufacturing Practice (GMP) em inglês, sustentando a garantia de excelência da qualidade pelo fabricante dos produtos farmacêuticos. As BPF são princípios estabelecidos pela OMS que devem estar presentes não apenas durante o fabrico, mas em todo o processo de desenvolvimento do medicamento. Assim, os colaboradores são devidamente qualificados, os documentos e resultados são rastreáveis, os padrões de higiene são elevados, os resultados fora do critério são gravados e investigados, e são realizadas, com frequência, inspeções e auditorias às instalações, equipamentos e propriedade intelectual das empresas da indústria farmacêutica.

2.1.1. *O desenvolvimento de novos medicamentos*

Sob autoridade das entidades reguladoras mencionadas, os estágios de conceção e desenvolvimento de novos medicamentos podem ser resumidos da seguinte forma [6]- [7]:

1) Desenvolvimento inicial

Tendo uma doença em vista, parte-se em busca de uma molécula, como uma proteína ou um gene, que esteja diretamente relacionada com a doença em questão. Uma vez confirmada esta ligação, determinam-se as características físicas e químicas do medicamento que possibilitam o ataque à referida proteína ou gene, provocando uma ação biológica.

2) Estudos Pré-clínicos

O próximo passo envolve estudos pré-clínicos em duas frentes: *in vitro* e *in vivo*, sendo que nesta fase os testes *in vivo* estão restringidos a modelos animais e outras culturas de células. Nesta fase, a recolha de dados foca-se principalmente na segurança do medicamento, medida em termos de toxicidade (possíveis efeitos sobre a capacidade reprodutora e a saúde da prole, por exemplo), embora a eficácia esteja já a ser estabelecida.

Desta forma, reduz-se a lista de potenciais moléculas para uma, aquela com maior promessa, e submete-se uma aplicação para *Investigational New Drug* (IND), onde a entidade reguladora indicada irá rever os estudos realizados. Caso seja aprovado o IND, o medicamento poderá seguir para a próxima fase de desenvolvimento, e iniciam-se os 20 anos de proteções por patente e outros certificados do novo medicamento.

3) Estudos Clínicos

Discriminados em três fases, os estudos clínicos são feitos em voluntários, para avaliar a segurança e toxicidade do medicamento em pessoas jovens e saudáveis (fase 1), os efeitos e a dose correta do medicamento em pessoas com o distúrbio-alvo (fase 2) e a eficácia e os efeitos colaterais da droga, de forma muito detalhada, num grupo muito maior de pessoas com o distúrbio-alvo (fase 3).

4) Aprovação

Caso os resultados dos estudos clínicos revelem um medicamento eficaz e seguro, o próximo passo é a submissão de um pedido de aprovação à entidade reguladora no espaço de libertação do medicamento, por entrega de um relatório do qual constará os resultados de todos os estudos, desde a primeira fase do desenvolvimento do medicamento.

De 4000 medicamentos em fase de desenvolvimento, em média apenas 5 são estudados em humanos, e destes somente 1 chega a ser aprovado e comercializado.

5) Pós-comercialização ou Fase 4

Mesmo após a aprovação e comercialização do medicamento, há ainda procedimentos a considerar. A monitorização do medicamento e dos pacientes continua a ser realizada, através da recolha de dados do consumo e de qualquer reação adversa adicional que se revele nesta altura. Estas informações devem ser comunicadas ao órgão competente a devido tempo.

Os fatores de foco central no desenvolvimento de um medicamento são:

- Seletividade – a sua capacidade de atingir apenas o alvo desejável, sem desvios ou efeitos noutros sistemas do corpo;
- Eficácia – a capacidade de provocar o efeito terapêutico desejado;
- Afinidade – a sua capacidade de permanecer fixo ao alvo;
- Segurança – indiretamente relacionada com a seletividade, o medicamento é tanto mais seguro quanto menos os seus efeitos colaterais ou ações noutros sistemas do corpo humano;
- Estabilidade em tecidos e fluídos corporais, não degradando nestas condições durante o seu período de ação.

Um estudo desenvolvido pela Apifarma revelou que o desenvolvimento de um novo fármaco pode levar, desde a sua descoberta até à sua comercialização, em média, 12/13 anos e que, em 2012, acarretou custos de cerca de 1,172 milhões de euros, dos quais 57,6% foram destinados apenas à fase dos ensaios clínicos (Figura 2) [8].

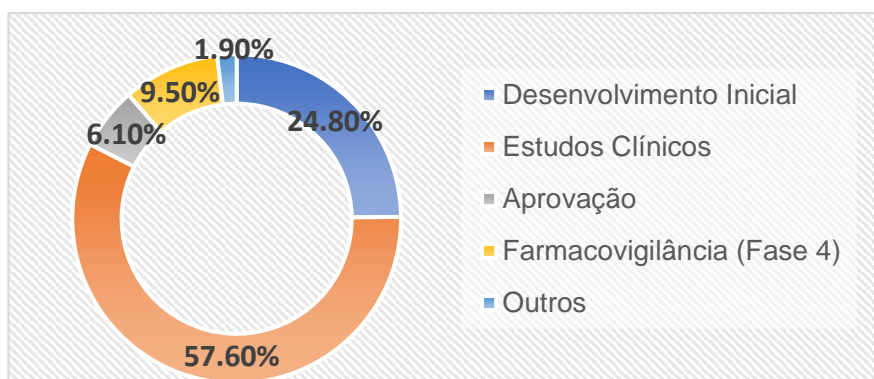


Figura 2 - Investimento necessário para cada fase do desenvolvimento de um novo medicamento, adaptado de [8].

Oferecendo uma oportunidade ao fabricante do medicamento inovador de recuperar o investimento, é-lhe conferido um período longo de proteção, que se inicia na data da primeira autorização do medicamento. As patentes protegem a propriedade intelectual das inovações e a duração concedida na Europa é de 20 anos. De acordo com a figura abaixo (Figura 3 adaptado de [9]), são concedidos ainda dois outros certificados de proteção complementares: a exclusividade de dados, o que significa que durante 8 anos qualquer pedido de AIM de um medicamento genérico (MG) não se pode basear na sua documentação clínica e pré-clínica; e a exclusividade de mercado, que proíbe a comercialização de outro medicamento durante 10 anos.

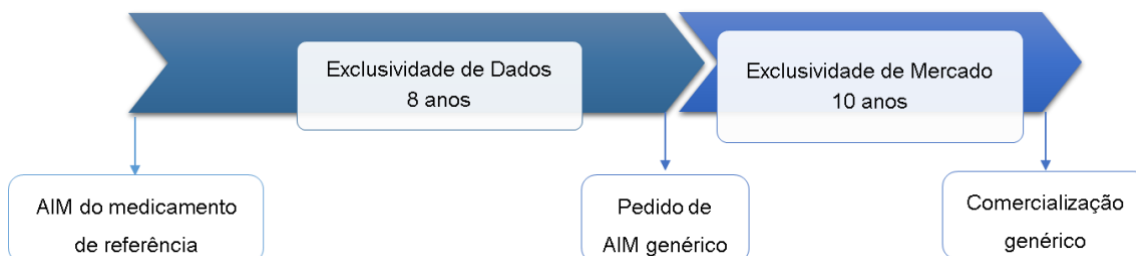


Figura 3 - Proteção da propriedade intelectual de um medicamento inovador por patentes e outros certificados de proteção complementares, adaptado de [9].

2.2. O medicamento genérico

Os medicamentos essencialmente similares ou genéricos são definidos no Decreto-Lei 291/98 como “medicamentos com a mesma composição qualitativa e quantitativa em substâncias ativas, sob a mesma forma farmacêutica, e para os quais, sempre que necessário, foi demonstrada a bioequivalência com o medicamento de referência através de estudos de biodisponibilidade adequados” [10]. Por outras palavras, o medicamento genérico (MG) tem a mesma substância ativa, forma farmacêutica, dose e indicação terapêutica que o medicamento inovador, atuando no organismo humano da mesma forma.

Segundo consta do mesmo Decreto-Lei, uma das formas de identificação de medicamentos genéricos é pela denominação comum da(s) substância(s) ativa(s) seguida da dosagem e da forma farmacêutica.

Ao contrário das AIMs para medicamentos inovadores, um pedido de AIM para um MG não é obrigado a conter informação dos ensaios pré-clínicos e clínicos. Estes relatórios geralmente incluem dados farmacêuticos químicos e os resultados de estudos de bioequivalência, que demonstram a similaridade do medicamento genérico ao medicamento de referência [9].

Assim, o processo de desenvolvimento de um medicamento genérico torna-se claramente mais simples que o do medicamento original, tendo uma abordagem muito mais econômica e menos demorada. O processo de aprovação de um medicamento genérico leva geralmente entre 2 a 4 anos e é imposto pela legislação um preço pelo menos 50% mais baixo relativamente ao medicamento de referência desde o momento que o MG chega ao mercado [11].

Porém, embora mais barato para o consumidor final, o medicamento genérico está sujeito às mesmas exigências, em todas as fases de desenvolvimento, fabrico, controlo de qualidade e condições de fornecimento, devendo cumprir os mesmos requisitos e padrões de eficácia, segurança e qualidade que o medicamento inovador revelou. Para além disso, todos os medicamentos, inovadores ou genéricos, são fabricados em instalações inspecionadas periodicamente pelas autoridades e que cumprem as normas legais em vigor.

Assim sendo, para aprovação de um medicamento genérico, a empresa terá que provar, sempre em contraste com o medicamento de referência, que [12]:

- O medicamento genérico é equivalente do ponto de vista farmacêutico, isto é, apresenta bioequivalência e tem as mesmas indicações clínicas.
- O produtor é capaz de produzir o medicamento corretamente e de forma consistente, cumprindo os requisitos de identidade, dosagem, pureza e qualidade.
- O princípio ativo é o mesmo, e a dose correta deste atinge o local-alvo do corpo onde tem o efeito terapêutico, com a mesma forma de administração.
- Os ingredientes inativos são seguros e o medicamento não se degrada com o tempo.
- A embalagem onde é armazenado é a apropriada.
- O nome do API é o mesmo e qualquer patente e/ou proteção de exclusividade estão expiradas.

Algumas diferenças entre o medicamento genérico e o inovador são os ingredientes inativos e a tecnologia usada para a sua produção. Para o medicamento genérico, não é um requisito a manutenção dos excipientes, pelo que estes são selecionados durante o processo de desenvolvimento com vista em produzir o medicamento mais eficiente, estável e seguro. Estas diferenças resultam, por exemplo, em variações na cor, tamanho e forma do medicamento [13].

3. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS EM HPLC

Durante o período de desenvolvimento do medicamento, é necessário também o desenvolvimento do Procedimento Analítico, onde são descritos os métodos analíticos para a análise do produto e que será usado pelo controlo de qualidade numa fase posterior. O controlo de qualidade inclui a validação do processo de fabrico (VPF) e o estudo da estabilidade do produto acabado.

Os métodos analíticos têm um papel importante na identificação e quantificação de impurezas, permitindo quantificar e monitorizar os teores de compostos e garantir que se mantêm em níveis limitados pelos respetivos critérios de aceitação, ao longo de todo o período de validade do medicamento, informação esta que é essencial para a avaliação da toxicidade do medicamento. Para além disso, permitem compreender a estabilidade química e física do medicamento e têm impacto na decisão da dosagem.

O Procedimento Analítico é um protocolo que inclui todos e quaisquer testes necessários para analisar todas as características físicas, físico-químicas e microbiológicas adequadas para o produto em questão, e deve descrever em detalhe os passos necessários para a realização de casa ensaio. Juntamente, em anexo, é elaborado um documento de especificações, com os critérios de aceitação do produto para cada ensaio.

No entanto, e segundo os requisitos da *Eur. Ph.*, assim como a ICH (*guideline* Q2R1), é necessária e importante a validação destes métodos [33]. A sua importância reside na garantia de que o método realmente faz o que foi desenhado para fazer, assegurando a confiança e reprodutibilidade dos dados que produz, independentemente do operador/laboratório onde estão a ser realizados.

Assim, a validação é o processo em que se prova, por meio de estudos conduzidos experimentalmente, que o método analítico é preciso, específico, exato e linear na gama de concentração que está a ser validada. De forma geral, é necessária a validação de vários métodos, específicos para cada composto que se quer analisar no produto, uma vez que estes reagem de forma diferente às características do método.

Algumas das análises que constam dos Procedimentos Analíticos de um produto são testes que já foram validados pelas farmacopeias, tendo já sido testados e usados em vários laboratórios, pelo que é prescindível a sua validação (partindo do princípio que são realizados

conforme as respectivas monografias). Alguns exemplos são: pH, densidade, partículas visíveis e subvisíveis e a osmolalidade.

Existem 3 tipos de métodos analíticos que requerem validação, segundo a *guideline* Q2(R1) da ICH [33]:

- Testes de identificação – têm o propósito de garantir a identificação de um analito na amostra. Regra geral, faz-se pela comparação de uma propriedade da amostra com a de um padrão de referência;
- Testes para determinar o conteúdo em impurezas – permite a obtenção do perfil de impurezas da amostra e a quantificação destas para verificar os seus limites de especificação – ensaio de compostos relacionados;
- Testes de doseamento – são uma análise quantitativa do componente de maior importância da amostra, o princípio ativo.

Estes métodos podem ser realizados de variadas formas, sendo os mais comuns a cromatografia e a espectrofotometria, casos onde a propriedade da amostra avaliada são o cromatograma e o espectro de absorção, respetivamente.

3.1. HPLC

A cromatografia é uma técnica de separação onde os componentes de uma amostra são distribuídos entre duas fases: uma fase móvel e uma fase estacionária. Existem vários tipos de cromatografia e a separação pode ser feita com base num variado espectro de características ou propriedades, como a absorção, o tamanho ou massa das partículas, troca iónica, etc. A fase móvel pode ser líquida ou gasosa e a fase estacionária pode ser sólida ou líquida suportada num sólido ou num gel [34]- [35].

As três grandes classes da cromatografia são a cromatografia líquida, a cromatografia gasosa e a cromatografia de fluidos supercríticos. Especificamente para a HPLC, a fase móvel é um líquido que atravessa continuamente a fase estacionária/enchimento, um sólido. A cromatografia líquida pode ainda ser classificada conforme o tipo de separação que ocorre: esta pode ser alcançada por partição, adsorção, troca iónica, exclusão por tamanho ou interações estereoquímicas, dependendo do tipo de fase estacionária utilizada.

A separação acontece devido à interação seletiva que ocorre entre as moléculas da amostra e as duas fases: as suas diferenças estruturais concedem-lhes diferentes graus de afinidade com cada uma das fases, o que resulta em diferentes velocidades de eluição, potenciado desta forma a separação dos diferentes componentes de uma amostra. Sistematizando, o componente com a maior afinidade à fase estacionária será o último a eluir da coluna, enquanto a molécula que estabelece maior afinidade com a fase móvel terá a maior velocidade de eluição.

Ambas as fases móvel e estacionária, assim como as dimensões da coluna, são altamente responsáveis pelo estabelecimento dessas relações de afinidade e são por essa razão selecionadas especificamente para a amostra que se quer analisar, com vista nos componentes que se querem separar.

3.1.1. O sistema de HPLC

Um sistema típico de HPLC é composto pelo seguinte conjunto de equipamentos [36]:

- Bomba e sistema de gradiente – o sistema de bombas entrega a fase móvel até à coluna, mantendo um fluxo constante ou respeitando um determinado programa de fluxo variável. Se necessário também, o sistema de bombas permite a mistura e o controlo da composição de diferentes fases móveis de forma a cumprir o programa de gradiente.
- Unidade de injeção – responsável pela recolha da amostra, no volume correto, e pela sua injeção no topo da coluna.
- Coluna cromatográfica – há todo um leque de escolha para o enchimento da coluna, que dependerá grandemente da propriedade que diferencia os compostos a separar.
- Detetor – os mais comuns em cromatografia líquida são os detetores no espectro de radiação do ultravioleta (UV) e visível (DAD). Deteta, contra a fase móvel, cada componente que elui da coluna separadamente e tem capacidade para recolher informação a vários comprimentos de onda simultaneamente, permitindo obter, paralelamente ao cromatograma, um espectro de absorção para cada pico que deteta e possibilitando a análise da sua pureza. O detetor PDA permite fazer, para cada ponto de recolha de dados, o varrimento do comprimento de onda, possibilitando a análise de pureza por obtenção de um espectro de absorção para cada ponto do pico cromatográfico.
- Aquisição e processamento de dados – programa informático que permite a coleção e análise dos dados recolhidos pelo detetor.

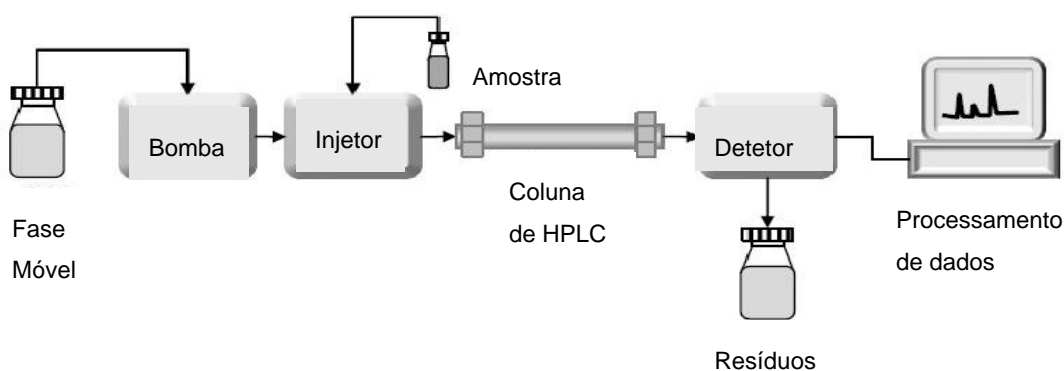


Figura 11 – Típico sistema HPLC, adaptado de [37].

3.1.2. A coluna cromatográfica

Uma vez que é na coluna cromatográfica que ocorre a separação, o enchimento desta está intrinsecamente relacionado com o tipo de separação desejada, pelo que a sua seleção é de elevada importância no desenvolvimento do método analítico.

Exceto quando a monografia especifica outro tipo de material, as colunas usadas são feitas de aço inoxidável. Relativamente à fase estacionária, segundo a monografia 2.2.29 da Farmacopeia Europeia [38], os tipos de enchimentos que podem ser usados na cromatografia líquida estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 - Tipo de cromatografia realizada por cada tipo de fase estacionária.

TIPO DE ENCHIMENTO	CROMATOGRAFIA
Sílica ou alumina	Fase Normal
Polímeros, sílica ou grafite porosa	Fase normal e Reversa
Resinas ou polímeros com grupos ácidos ou básicos	Troca iónica
Sílica porosa ou polímeros	Exclusão de partículas
Proteínas, entre outros	Quiral (separação de enantiómeros)

A cromatografia de partição é uma técnica que separa um analito com base na sua distribuição preferencial pela fase móvel líquida ou pela fase estacionária. Esta preferência deve-se principalmente à solubilidade do analito e é medida pelo coeficiente de distribuição, característico de cada composto.

Existem dois tipos de cromatografia líquida que podem ser definidos pela polaridade das suas fases. Na cromatografia de **fase normal** a fase estacionária é polar e a fase móvel não polar, pelo que os compostos mais polares ficam retidos na fase estacionária polar por mais tempo que os compostos não polares, promovendo desta forma a separação.

Já na cromatografia de **fase reversa**, a fase estacionária é menos polar que a fase móvel, pelo que os compostos mais polares serão os primeiros a eluir da coluna. Normalmente, a fase móvel escolhida é maioritariamente composta por água, devido ao seu baixo custo. Este tipo de cromatografia separa moléculas polares e não-polares, e também ácidos e bases fracos com a adição de fases móveis tamponadas para controlar a sua ionização [39].

Assim, para uma amostra separada em cromatografia de fase normal, a ordem de eluição de analitos é do menos polar para o mais polar, e em cromatografia de fase reversa aconteceria exatamente o contrário. No entanto, a polaridade da fase móvel deve ser bem definida, baixa polaridade na fase normal e elevada polaridade na fase reversa, de forma a permitir a separação eficiente dos compostos da amostra.

Na cromatografia líquida de fase reversa, uma fase móvel 100% água (polar) repele os compostos hidrofóbicos para a fase estacionária, aumentando o seu tempo de eluição. Posto isto, a fase móvel da cromatografia de fase reversa é desenvolvida para ser uma mistura de solução aquosa com orgânico, o que torna a fase móvel menos polar e permite a eluição mais rápida dos analitos. Tipicamente, na cromatografia moderna são utilizados água, acetonitrilo, metanol e tetrahidrofurano para a composição da fase móvel.

Uma coluna típica de fase reversa é composta por uma fase estacionária hidrofóbica quimicamente ligada à superfície de sílica. Na Figura 12 estão mencionadas as colunas de fase reversa utilizadas, representadas pelo tipo de ligando presente nas partículas de sílica do enchimento, por exemplo C₁₈ é um hidrocarboneto com 18 carbonos. Existem vários tipos de colunas que variam em graus de hidrofobicidade: quanto mais hidrofóbica a fase estacionária, maior a sua capacidade de retenção de compostos não-polares (Figura 12).

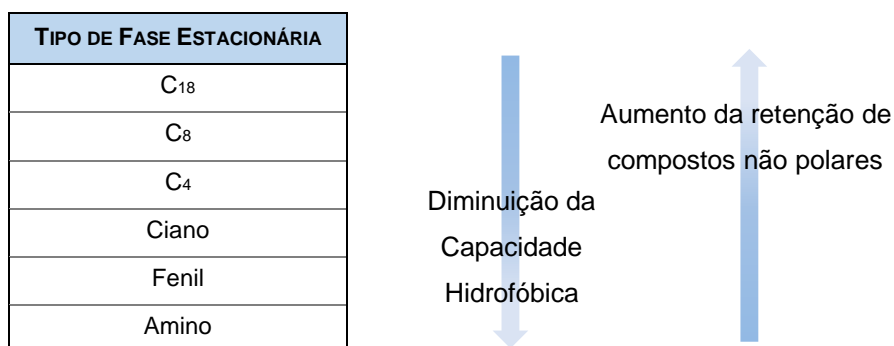


Figura 12 - Capacidade higroscópica das colunas de fase reversa, adaptado de [40].

A coluna de fase reversa C₁₈ é a mais hidrofóbica. Isto implica que, nos cromatogramas obtidos das análises às amostras, os primeiros picos a aparecer serão de compostos hidrofílicos e os compostos hidrofóbicos, mais retidos pela fase estacionária não polar, serão os últimos a eluir. Estas colunas têm uma gama de pH que varia entre 2,0 e 8,0.

No entanto, a sílica tem algumas desvantagens, como a gama restrita de pH e a produção de picos desformatados. Paralelamente, o enchimento de colunas em polímero também não é ótimo: pouca eficiência, força mecânica fraca e ordem de eluição dos compostos imprevisível, razões pelas quais a sua utilização nunca antegiu as proporções da sílica. Assim, a Waters (empresa de tecnologia laboratorial) desenvolveu uma tecnologia de partículas híbridas que junta os dois materiais para ultrapassar as suas desvantagens e formar um novo enchimento que oferece alta eficiência e força mecânica, maior superfície de contacto, com obtenção de picos mais definidos e que é mais versátil em gama de pH. [41]

Existem casos em que a separação de dois compostos é mais complexa. Uma fórmula química pode representar dois compostos que diferem na sua estrutura molecular – isomerismo. O isomerismo pode ser dividido em duas grandes classes: isómeros constitucionais e estereoisómeros (Figura 13). Os primeiros são compostos que, tendo a mesma fórmula química, as ligações que estabelecem entre os átomos estão organizadas de forma diferente. A classe

dos estereoisômeros engloba aqueles compostos que, mantendo as ligações estabelecidas pelos átomos, têm orientação espacial diferente.

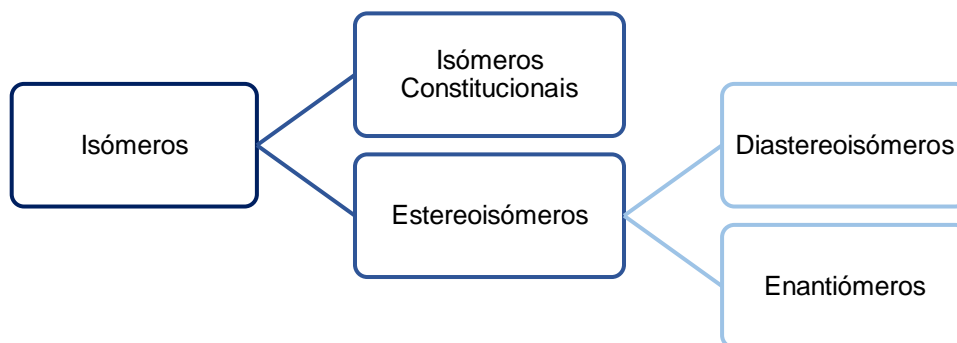


Figura 13 - Esquema figurativo das classes de isomerismo, adaptado de [53].

Dentro destes isômeros, é possível especificar ainda mais o tipo de isomerismo estabelecido entre duas moléculas de acordo com a relação estabelecida entre elas, ou a ausência desta. Mais especificamente, os enantiômeros são estereoisômeros onde duas moléculas são a “imagem no espelho” uma da outra.

Os isômeros têm características físicas muito semelhantes, diferindo na orientação da sua rotação na presença de luz, a sua atividade biológica e na interação que estabelecem com outras moléculas quirais [42]. Assim, é necessário o uso de uma coluna que tem afinidade seletiva com apenas um dos isômeros, possibilitando a sua separação, conforme mencionado na Tabela 15. O exemplo de uma coluna quiral é a Chiral AGP, com uma fase estacionária composta por proteínas, onde AGP significa α_1 -acid glycoprotein.

Por motivos de confidencialidade, o subcapítulo 3.1.3. *Casos de Estudo* será retirado.

3.1.4. Os parâmetros cromatográficos

A separação por cromatografia líquida produz um cromatograma, isto é, a separação é representada graficamente através de picos que correspondem aos componentes separados. Cromatogramas ideais apresentam-se com o aspeto de curvas gaussianas. O processamento destes dados para gerar resultados e possibilitar a quantificação dos componentes da amostra faz-se pela determinação de parâmetros cromatográficos. No entanto, é importante definir antes alguns conceitos (representados na Figura 14 a Figura 16) [46]- [47]:

- Tempo de retenção (t_R) e volume de retenção (V_R) – tempo necessário para a eluição de um componente da amostra. Pode determinar-se o tempo de retenção a partir do volume de retenção e do fluxo (F):

$$F = \frac{V_R}{t_R} \text{ (eq. 1)}$$

- Tempo e Volume Hold-up (t_M e V_M) – tempo ou volume necessário para a eluição de um composto que não interage com a coluna e elui em primeiro lugar.
- Pico – resposta do detetor à presença de um componente. Pode ser definido pela sua área, pela altura (h) e largura a 50% da altura ($W_{h/2}$) ou pela altura (h) e largura do pico entre os pontos de inflexão da curva.

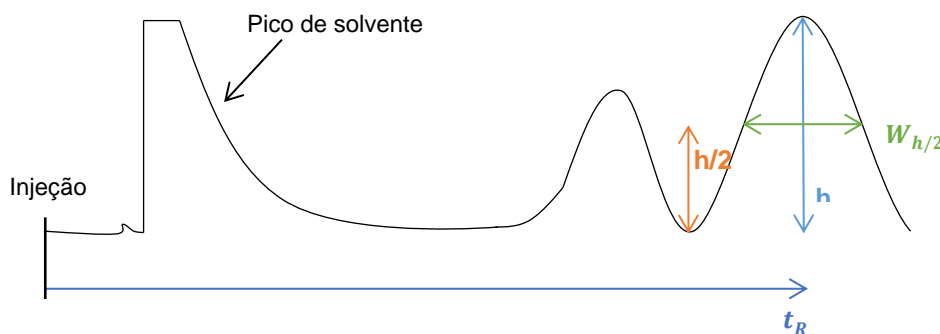


Figura 14 - Exemplo de cromatograma e definição de conceitos retirado de documentos internos da Technimed.

Tendo em consideração estes conceitos, é possível a determinação dos parâmetros cromatográficos, segundo as monografias da USP e da Farmacopeia Europeia:

Resolução (R) – mede o grau de separação entre dois picos que foi alcançado pelo método analítico, expresso em unidade de volume, tempo ou comprimento do cromatograma:

$$R = \frac{1.18 (t_{R2} - t_{R1})}{W_{h1} + W_{h2}} \text{ (eq. 2)}$$

Fator de Retenção (k) – mede o grau de afinidade de um composto com a fase estacionária relativamente à fase móvel, isto é, estabelece uma relação entre a quantidade de analito que eluí e a quantidade retida. Depende da constante de distribuição característica do

soluto. Em termos cromatográficos, o fator de retenção de um composto pode ser determinado da seguinte forma:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \text{ (eq. 3)}$$

Número de pratos teóricos – indicador da eficiência de todo o sistema na separação dos componentes da amostra, depende do comprimento da coluna e segundo a Farmacopeia Europeia pode ser calculado através da equação:

$$N = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_h} \right)^2 \text{ (eq. 4)}$$

Fator de Simetria (As) – medida da dispersão do pico relativamente ao seu centro, determina o desvio do formato do pico quando comparado com a forma da curva gaussiana. É determinado a 5% da altura do pico, segundo a equação:

$$k = \frac{W_{0.05}}{2d} \text{ (eq. 5)}$$

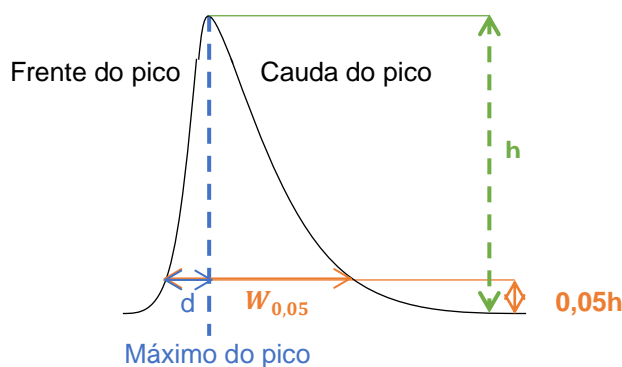


Figura 15 - Fator de simetria retirado de documentos internos da Tecnimede.

Onde $W_{0.05}$ é a largura do pico a 5% de altura e d é a distância da linha vertical no ponto máximo do pico ao ponto a 5% de altura da frente do pico.

Tempo de Retenção Relativo (trr) – tempo de retenção de um composto relativo ao tempo de retenção de um outro composto do qual foi separado:

$$trr = \frac{t_{Ri}}{t_R} \text{ (eq. 6)}$$

Razão Sinal-Ruído (S/N) – o ruído define-se como as flutuações na linha de base de um cromatograma quando não há deteção de um composto da amostra, influenciando assim a precisão da quantificação.

$$S/N = \frac{2H}{h} \text{ (eq. 7)}$$

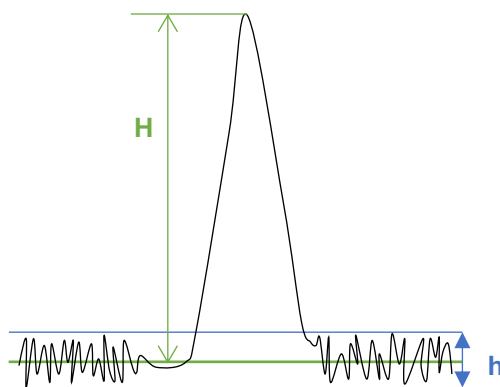


Figura 16 - Razão sinal-ruído de um pico cromatográfico retirado de documentos internos da Tecnimede.

3.1.5. Adequabilidade do Sistema

Alguns fatores que afetam o comportamento cromatográfico e contribuem para a adequabilidade do sistema são as propriedades da fase móvel (composição, força iônica, pH, temperatura), os parâmetros do sistema, como a temperatura, pressão, pH e fluxo, as características do enchimento.

Posto isto, antes da realização de qualquer análise num sistema cromatográfico, é imperativa a avaliação da **adequabilidade do sistema** de forma a demonstrar que este, como um todo, está realmente apto para a análise das amostras. Os parâmetros anteriormente mencionados têm um papel importante nesta análise. Segundo a USP e a Eur. Ph., para demonstrar a adequabilidade do sistema, os parâmetros cromatográficos devem estar conformes com os limites mencionados na Tabela 7 ao longo de todo o procedimento.

Para além destes requisitos, temos ainda a determinação do desvio padrão relativo (RSD – *relative standard deviation*) entre as respostas de várias injeções de uma mesma solução padrão para avaliar a repetibilidade do sistema.

Os padrões primários são matéria prima, ou seja, o analito em concentrações conhecidas e verificadas, fornecidos pelas farmacopeias e outras empresas. No entanto, estes padrões são caros e nem sempre estão disponíveis. Sabendo que a adequabilidade de um sistema tem que ser provada no início de cada ensaio, é fácil perceber que os gastos em padrão primário para a preparação de soluções padrão rapidamente se tornariam incontroláveis.

Tabela 7 - Limites dos parâmetros cromatográficos para obter adequabilidade do sistema.

PARÂMETROS	USP	EUR. PH.
Número de pratos teóricos	$N > 2000$	
Resolução	$R > 2$	0,8 – 1,5
Fator de Simetria	$A_s < 2$	

A solução padrão é então preparada a partir de padrões secundários. O padrão secundário é analisado anualmente contra o padrão primário para garantir conformidade de identificação e doseamento. Para além do papel que têm na adequabilidade do sistema, estas soluções são utilizadas para quantificação de API ou impurezas, nos ensaios em que a quantificação é o objetivo.

Neste parâmetro, ambas as farmacopeias concordam que deve ser estabelecido um valor máximo permitido para o RSD. O número de replicados e os limites para o RSD variam consoante o tipo de ensaio e devem ser confirmados em cada método analítico.

Assim, temos para o ensaio de doseamento:

$$RSD_{max} (\%) = \frac{K B \sqrt{n}}{t_{90\%;n-1}} \text{ (eq. 8)}$$

onde K – Constante que representa a RSD para B igual a 1 e 6 injeções

B – Limite superior descrito na monografia individual menos 100%

n – Número de injeções de solução padrão realizadas

$t_{90\%; n-1}$ – análise t student ao nível de probabilidade de 90% com n-1 graus de liberdade

Daqui, resulta a Tabela 8.

Já para o ensaio de compostos relacionados, o RSD determinado não deve ser superior a 5% para mostrar adequabilidade do sistema, a não ser que de outra forma especificado no método analítico (*Eur. Ph*).

Tabela 8 – RSD máximo permitido para a repetibilidade como parâmetro da adequabilidade.

PARÂMETROS	NÚMERO DE INJEÇÕES			
	3	4	5	6
B (%)	RSD máximo permitido			
2.0	0.41	0.59	0.73	0.85
2.5	0.52	0.74	0.92	1.06
3.0	0.62	0.89	1.10	1.27
5.0	1.04	1.48	1.83	2.12

No entanto, se todos estes testes tivessem que ser realizados sempre que se procedesse à análise de um conjunto de amostras, não haveria tempo para de facto injetar e analisar as amostras. Desta forma, tanto a USP como a Ph. Eur. não definem um conjunto inquestionável de regras e procedimentos a cumprir, para além da determinação do RSD. Cabe ao analista ou ao responsável pelo desenvolvimento do método determinar uma combinação de testes que indicarão com o maior grau de confiança se o método está a proceder de forma adequada. [48]

Para os métodos analíticos que serão validados neste trabalho foi definido:

Repetibilidade – são feitas 6 injeções da solução padrão e aplicadas as equações seguintes às respostas obtidas:

$$\text{Standard deviation (SD)} = \sqrt{\frac{(A_1+x)^2 + (A_2+x)^2 + \dots + (A_n+x)^2}{n-1}} \quad (\text{eq. 9})$$

$$\text{RSD} = \frac{\text{SD}}{X} \times 100 \quad (\text{eq. 10})$$

A_1, A_2, \dots, A_n – Respostas individuais da amostra (área do pico, teor do analito na amostra ou recuperação do analito)

X – Resposta média da amostra

n – Número de respostas

Tabela 9 - Critérios de Aceitação para a Repetibilidade.

CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO PARA A REPETIBILIDADE DO SISTEMA	RSD (%)
Doseamento	≤ 2%
Compostos Relacionados	≤ 5%

Fator de Resposta (FR): Quando o objetivo do ensaio é a quantificação, a preparação da solução padrão contra a qual as amostras irão ser quantificadas deve ser preparada em duplicado. A análise cromatográfica de contraste entre estas duas amostras permite garantir a correta preparação do padrão, atribuindo aos resultados um maior grau de confiança. O fator a determinar para esta verificação é o fator de resposta (FR) que terá critérios para verificação da adequabilidade do sistema:

$$Cp = \frac{Pp \cdot Pt}{Fd} * 100 \quad (\text{eq. 11})$$

$$FR = \frac{Rc}{Rt} \times \frac{Cpt}{Cpc} \quad (\text{eq. 12})$$

Cp – Concentração do padrão, µg/ml

Pp – Toma do Padrão, mg

Pt – Potência do Padrão tal qual, em decimais

Fd – Fator de diluição, ml

Rc – Resposta média (área do pico) do padrão de controlo

Rt – Resposta média (área do pico) do padrão de trabalho

Cpt – Concentração do padrão de trabalho, µg/ml

Cpc – Concentração do padrão de controlo, µg/ml

Os critérios de aceitação do fator de resposta para cada ensaio encontram-se na tabela seguinte:

Tabela 10 - Critérios de Aceitação para o Fator de Resposta.

CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO PARA O FATOR DE RESPOSTA	FR
Doseamento	0,98 a 1,02
Compostos Relacionados	0,95 a 1,05

A **estabilidade do padrão** (StdC – *Standard Compliance*) é regularmente verificada ao longo do ensaio, entre análise de amostras, e tem especial importância em métodos analíticos de quantificação. Deve cumprir os critérios de aceitação apresentados na Tabela 11 para ser possível dar continuidade ao ensaio:

$$StdC = \frac{Rt (tx)}{Rt (t0)} \quad (eq. 13)$$

Rt (t0) – Resposta da amostra (área do pico) no tempo zero

Rt (tx) – Resposta da amostra (área do pico) no tempo de avaliação

Tabela 11 - Critérios de Aceitação para a estabilidade do padrão.

CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO PARA A ESTABILIDADE DO PADRÃO	STDC
Doseamento	0,97 a 1,03
Compostos Relacionados	0,90 a 1,10

Para além destes parâmetros, são verificados os valores de fator de simetria, o número de pratos teóricos e a resolução obtidas para os picos ao longo da realização do ensaio, para verificação da manutenção da adequabilidade do sistema.

Durante a validação dos métodos analíticos, vai ser avaliada a composição do produto acabado e também esta está sujeita a limites de especificação. Para o ensaio de identificação e de doseamento, estes são definidos no método analítico (Tabela 13).

Para além do princípio ativo e dos excipientes, já vimos que o produto acabado é composto por impurezas. Na indústria farmacêutica, estes compostos podem ser impurezas de síntese ou impurezas de degradação e são usualmente tratados por 'compostos relacionados'.

A especificação para os compostos relacionados foi definida conforme a *guideline* Q3B(2R) da ICH ([49]) para as impurezas conhecidas – *qualification threshold*, e impurezas desconhecidas – *identification threshold*. Na figura abaixo podemos ver os critérios delineados.

Para determinação do *identification threshold*, e sabendo que a toma máxima diária (TMD) do produto acabado é de 150 mg, igual à sua dose de administração diária, 2 mg representam 1,33%. Uma vez que este valor é superior a 0,2%, o limite de especificação para as impurezas desconhecidas fica definido como sendo 0,2% da concentração nominal. Adicionalmente, se for considerada a dose em API sal (245,3 mg), obtém-se 0,8%, o que resulta na mesma decisão.

Tabela 12 – ICH Q3B(R2) para definir os limites de especificação de impurezas em medicamentos.

IDENTIFICATION THRESHOLD	
Dose Máxima Diária	<i>Threshold</i>
> 10 mg – 2 g	0,2% ou 2 mg TMD
QUANTIFICATION THRESHOLD	
Dose Máxima Diária	<i>Threshold</i>
> 2 g	0,2% ou 3 mg TMD

Relativamente às impurezas conhecidas, sendo o *qualification threshold* superior ao *identification threshold*, o limite de especificação para as impurezas conhecidas é também 0,2% da concentração nominal.

Tabela 13 – Especificações para os métodos analíticos de produto acabado.

ENSAIO		ESPECIFICAÇÃO
Identificação da Substância	HPLC - UV	O tempo de retenção do pico de API (maior pico) no cromatograma da solução amostra deve coincidir com o tempo de retenção obtido na solução padrão.
Identificação da Substância	HPLC-DAD	O espectro de absorção do pico de API no ensaio de doseamento deve ser igual na solução padrão e na solução amostra.
Doseamento	HPLC	95,0 – 105,0 %
Compostos Relacionados	HPLC	Impureza A ≤ 0,2 %
		Impureza B ≤ 0,2 %
		Impureza C ≤ 1,0 %
		Impureza D ≤ 0,2 %
		Impureza E ≤ 0,2 %
		Impureza F ≤ 0,2 %
		Impurezas Desconhecidas ≤ 0,2 %
Pureza Estereoquímica	HPLC	Isómero ≤ 0,2 %

3.2. Parâmetros de validação

Segundo a *guideline* Q2(R1) da ICH [33], os parâmetros a serem considerados para a validação de um método analítico estão assinalados com um “+” na Tabela 14.

Tabela 14 - Parâmetros a validar por tipo de ensaio analítico segundo a ICH.

PARÂMETRO	DOSEAMENTO	COMPOSTOS RELACIONADOS
Precisão	+	+
Especificidade	+	+
Limite de Detecção	-	+
Limite de Quantificação	-	+
Linearidade	+	+
Exatidão	+	+
Gama de Validação	+	+

No entanto, esta *guideline* não deve ser analisada como uma lista de parâmetros obrigatórios, mas sim como uma base informativa para o desenvolvimento do protocolo de validação. A decisão final cabe ao responsável de desenvolver o método, de o desenhar da forma que mais se adequa para o produto que se vai analisar. Desta forma, o protocolo de validação para a análise do produto acabado inclui não só os parâmetros mencionados acima, como também a robustez e a estabilidade intra-diária.

Como já mencionado, os métodos analíticos a validar serão cromatografias líquidas de alta eficiência, pelo que a resposta gerada pela análise da amostra é um cromatograma. É a análise deste cromatograma que irá ser processado e avaliado de forma a validar ou não o método. Os critérios de aceitação são específicos de cada método analítico.

De seguida, são discutidos individualmente cada um dos parâmetros de validação [50]-[51].

3.2.1. Especificidade

O objetivo deste parâmetro é garantir que a quantificação da resposta do analito é possível, distinguindo-a das respostas de outros compostos presentes no produto que se espera que apareçam.

A especificidade é demonstrada pela resolução entre os picos de dois compostos. Caso a resolução seja superior a 1.0 então o sistema cromatográfico está apto para a separação dos compostos da amostra.

3.2.1. Precisão – Repetibilidade do Sistema

Tal como já mencionado em 3.1.5 Adequabilidade do Sistema, a repetibilidade é um parâmetro importante na verificação da adequabilidade do sistema previamente à análise. Em termos de validação de método analítico, expressa a precisão do sistema sobre as mesmas condições operacionais durante um curto espaço de tempo.

Mede a variabilidade inerente ao sistema: capacidade da bomba manter o fluxo constante e alimentar ao sistema fase móvel nas proporções corretas (caso seja uma eluição em

gradiente), volume de amostra recolhido pelo injetor, separação na coluna, a deteção e a integração dos picos do cromatograma.

É analisada pela execução de 6 injeções consecutivas a 100% da concentração de trabalho. O resultado é expresso em RSD e os critérios de aceitação já foram mencionados na Tabela 9.

3.2.2. Precisão – Repetibilidade do Método

A repetibilidade do método considera (para além da repetibilidade do sistema) o erro humano e/ou variabilidade que é inevitável ao analista na preparação das amostras: a pesagem de analito e a diluição.

São preparadas, da mesma forma, 6 amostras independentes e injetadas em sequência. É feita a quantificação destas em contraste com uma solução padrão do analito que está a ser analisado e verificado o RSD entre os resultados.

Para determinar a composição de um analito na amostra aplicam-se as seguintes equações:

Teor percentual do analito na amostra (T%):

$$Prec = \frac{Ra}{Rp} \times \frac{Pp \times Pt}{Fdp} \times Fda \quad (\text{eq. 14})$$

$$T(\%) = \frac{Prec}{Pad \times PtA} \times 100 \quad (\text{eq. 15})$$

Prec – Peso recuperado (mg)

Ra – Resposta média obtida para o analito na amostra

Rp – Resposta média obtida para o padrão

Pp – Toma do Padrão, mg

Pt – Potência do Padrão tal qual, em decimais

Fda – Fator de diluição da amostra, ml

Fdp – Fator de diluição do padrão, ml

Pad – Peso adicionado de analito, mg

PtA – Potência da amostra tal qual, em decimais

Caso o analito a quantificar seja uma impureza, deve-se ter em conta o respetivo RRF (*relative response factor*), pelo que ficamos:

$$T(\%) = \frac{Ra}{Rp} \times \frac{Pp \times Pt}{Fdp} \times \frac{Fda}{Pad \times PtA} \times 100 \times \frac{1}{RRF} \quad (\text{eq. 16})$$

Tabela 15 - Critérios de aceitação para a repetibilidade do método.

CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO PARA A REPETIBILIDADE DO MÉTODO	RSD (%)
Doseamento	≤ 2,0
Compostos Relacionados	≤ 10,0

3.2.3. Precisão – Precisão Intermédia

A precisão intermédia é obtida pela variação de todo um outro conjunto de factores e o impacto que pode causar na análise. Consiste na repetição do ensaio da repetibilidade do método, realizado por outro analista, que prepara as amostras, as soluções padrão e as fases móveis, em dias diferentes, e, preferivelmente, em equipamentos de HPLC diferentes, se disponível – variabilidade intra-laboratorial.

É considerada a variabilidade do sistema a longo prazo, e visa a verificação de que o método irá produzir os mesmos resultados quando o desenvolvimento e validação do método acabarem.

Da mesma forma, é determinada a composição da amostra no analito para o segundo analista e os critérios de aceitação são os seguintes:

Tabela 16 - Critérios de aceitação para a precisão intermédia.

CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO PARA A PRECISÃO INTERMÉDIA	DOSEAMENTO	COMPOSTOS RELACIONADOS
RSD entre Teor (%) das amostras obtido pelo Analista 2	≤ 2,0%	≤ 10,0%
Diferença absoluta entre os valores médios de Teor (%) dos 2 analistas	≤ 2,5	≤ 10,0%
RSD entre Teor (%) das amostras dos analistas 1 e 2	--	≤ 15%

A Figura 17 apresenta as variações que cada uma das precisões considera.

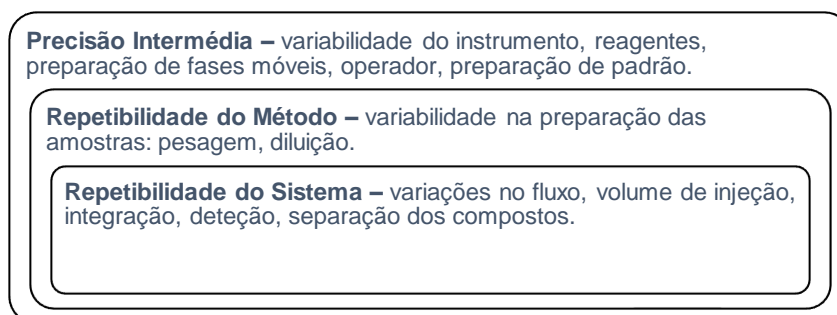


Figura 17 - Precisão: variações analisadas por cada nível da precisão.

3.2.4. Limite de Detecção (LD)

O limite de detecção defini-se como a concentração mais baixa possível para que um analito na amostra possa ser detetado, mas não necessariamente quantificado. Várias abordagens diferentes são possíveis para a determinação deste parâmetro. Porém, aquela aqui adoptada tem por base o sinal-ruído.

O ICH define aceitável um S/N de 2-3:1 para a determinação do LD. É verificado o sinal-ruído gerado pelo pico do analito presente na amostra 100% do seu limite de especificação e, assumindo uma linearidade entre a concentração e o S/N, estima-se qual a concentração da solução a preparar.

Por fim, é necessário provar repetibilidade do sistema a esta concentração para ser possível validar o LD, pelo que poderá ser necessário a realização de ajustes à concentração.

Tabela 17 - Critérios de aceitação para o limite de detecção.

CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO PARA O LD	S/N	RSD (%)
Compostos Relacionados	2-3:1	≤ 20%

3.2.5. Limite de Quantificação (LOQ)

O limite de quantificação é a concentração mínima de analito na amostra que permite a sua quantificação com precisão e exatidão.

Segundo o ICH, para uma determinação de LOQ com base no sinal-ruído, um valor tipicamente aceitável para este é de 10:1. A abordagem para a validação é a mesma: assumindo uma relação linear entre a concentração do analito e o S/N gerado pelo seu pico, estima-se a concentração que irá resultar em S/N igual a 10 com base no valor de S/N obtido para a concentração de 100%..

Tal como para o LD, repetibilidade deve ser demonstrada a esta concentração e, adicionalmente, a quantificação do analito deve ser exata.

Tabela 18 - Critérios de aceitação para o limite de quantificação.

CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO PARA O LOQ	S/N	RSD (%)
Compostos Relacionados	10:1	≤ 10%

3.2.6. Gama de validação

A gama de validação é o intervalo entre a concentração mais baixa e a concentração mais alta, inclusivé, no qual se irá demonstrar que o método é preciso, exato, linear e específico.

A ICH define a gama de concentração mínima entre os níveis 80 – 120% da concentração nominal para ensaios de doseamento e, para impurezas, desde o *reporting limit* até aos 120%

do limite de especificação. Nos métodos analíticos a serem validados neste trabalho foram definidas as gamas mais abrangentes de 50 – 150% da concentração nominal para o doseamento e de LOQ – 150% do limite de especificação para os compostos relacionados.

Este parâmetro é analisado pela preparação de 6 amostras dos níveis baixo e alto da linearidade e os critérios de aceitação para o RSD entre as áreas dos picos obtidas são:

Tabela 19 - Critérios de aceitação para gama de validação.

CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO PARA A GAMA DE VALIDAÇÃO	Gama	RSD (%) DO NÍVEL BAIXO	RSD (%) DO NÍVEL ALTO
Doseamento	50 – 150% da CN*	≤2%	≤2%
Compostos Relacionados	QL – 150% do LE	≤10%	≤5%

*CN – Concentração nominal.

3.2.7. Linearidade

No parâmetro da linearidade são analisadas amostras a concentrações diferentes do limite de especificação de forma a estabelecer a relação entre a resposta do sistema (área do pico) e a concentração da amostra.

A gama de concentrações de trabalho em que o método está a ser validado (LOQ-150% do limite de especificação) deve provar-se linear, isto é, o método deve ser capaz de identificar um aumento na concentração da amostra e reproduzir um aumento proporcional na área do pico que é detetado.

A linearidade pode ser demonstrada diretamente em amostras do produto acabado ou em amostras simuladas, usando pelo menos 5 concentrações dentro da gama de trabalho, com injeções em triplicado.

Assim, é aplicada uma regressão linear aos resultados obtidos e feita uma análise aos resíduos e ambos devem respeitar os seguintes critérios de aceitação:

Tabela 20 - Critérios de aceitação para a linearidade.

CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO PARA A LINEARIEDADE	r_2	RESÍDUOS
Doseamento	≥ 0,999	Aleatoriamente distribuídos
Compostos Relacionados	≥ 0,99	em torno de 0

Para além dos critérios de especificação na tabela acima, podem ser determinados outros aspetos da linearidade:

- Os limites da interceção no eixo do Y determinados a um intervalo de confiança a 95%, devem conter o valor 0. Teoricamente, a interceção da reta linear no eixo das abcissas deveria ser nula, isto é, concentração nula corresponderia a

ausência de pico. Porém, esta é uma situação praticamente impossível uma vez que haverá sempre a presença de ruído na detecção.

- Fator de Resposta – para cada nível da linearidade determina-se a resposta independente da concentração:

$$\text{Fator de Resposta} = \frac{\text{Área média do pico à concentração } X (Y(X_i))}{\text{Concentração } X (X_i)} \quad (\text{eq. 17})$$

O valor ideal do declive é aproximado do fator de resposta médio entre todos os níveis, pois implicaria uma interceção no eixo Y igual a 0.

- O valor absoluto da interceção no eixo dos Y – quando comparado com o valor da resposta a 100%, este valor não deve ser significativo, indicando um desvio pequeno à reta ideal.
- Pode ainda avaliar-se a dispersão dos resíduos determinando o seu valor percentual relativamente à resposta obtida para o nível de 100% da linearidade.

Estes últimos fatores não invalidam o método caso este não cumpra com os seus critérios, são apenas de carácter informativo.

A linearidade deve ser mostrada tanto para o API, como para os compostos relacionados do método. Se a impureza degradar em solução ou não estiver disponível o padrão de referência desta, deve ser realizada a linearidade do método analítico para a gama de concentração da impureza utilizando como analito o API.

3.2.8. Fator de Resposta Relativo

Para validação dos métodos analíticos é definido um comprimento de onda à qual é feita a leitura das respostas das amostras pelo detetor do equipamento. No entanto, cada composto químico têm um espectro de absorção característico e absorve de forma diferente a determinado comprimento de onda.

Enquanto for possível a quantificação de cada analito com o seu padrão de referência, esta diferença não apresenta qualquer problema. No entanto, uma vez findo o processo de validação (e por vezes até durante o mesmo), os padrões de referência das impurezas deixam de estar disponíveis. Isto quer dizer que, para análises futuras ao produto, é necessária a quantificação dos compostos relacionados contra o padrão de referência do API. Este padrão estará sempre disponível porque se trata de uma amostra de matéria-prima usada na produção que é padronizada internamente pelo laboratório.

Assim, torna-se importante determinar a diferença entre a absorção do API e de cada um dos compostos relacionados ao comprimento de onda do método analítico. Isto é, a mesma concentração em API e em, por exemplo, Impureza A, é detetada ao comprimento de onda definido e gerados picos com diferenças significativas nas áreas. O fator de resposta relativo (RRF) mede essa diferença.

Pode ser determinado de várias formas:

- Tendo em conta toda a gama de concentração da linearidade, determina-se a razão entre o declive da regressão linear obtida para a impureza e o declive do API:

$$RRF = \frac{\text{Declive Impureza}}{\text{Declive API}} \quad (\text{eq. 18})$$

ou ainda, pelo fator de resposta determinado segundo a equação 17 para cada nível da linearidade:

$$RRF = \frac{\text{fator de resposta médio Impureza}}{\text{fator de resposta médio API}} \quad (\text{eq. 19})$$

- Para o caso em que a linearidade da impureza não é possível determinar utilizando a impureza, o RRF pode ser determinado apenas ao nível 100% do seu limite de especificação. Calcula-se para este nível o fator de resposta segundo a equação 17 para a impureza e para o API e de seguida já é possível determinar o fator de resposta relativo:

$$RRF = \frac{\text{Fator de resposta da Impureza}}{\text{Fator de Resposta do API}} \quad (\text{eq. 20})$$

3.2.9. Exatidão

A exatidão do método expressa a proximidade entre os resultados obtidos experimentalmente e o seu valor teórico. Deve ser comprovada para a totalidade da gama de concentrações que está a ser validada.

A sua determinação pode ser realizada pela preparação de um conjunto de amostras simuladas: prepara-se a matriz (placebo) do produto e faz-se a sobrecarga com o analito em estudo (API ou impureza) a uma concentração conhecida. O resultado é expresso em teor de analito recuperado na amostra e RSD destes resultados entre cada amostra do mesmo nível.

Para o parâmetro da exatidão dos compostos relacionados, é necessário quantificar os teores de impurezas existentes na amostra (sem sobrecarga), pelo que é preparada uma amostra ao nível 0%. Assim, a determinação do teor ou recuperação do analito na amostra é determinada segundo as equações 14,15 e 16, mas deve ser corrigida com a contaminação aferida:

$$P_{cor}(\%) = Prec - \left[\frac{P_{amost} \times Cont(\%)}{100} \right] \quad (\text{eq. 21})$$

P_{cor} – Peso recuperado corrigido com a contaminação da amostra, mg

$Cont(\%)$ – Contaminação da amostra em analito, %, determinado conforme a equação 7 pela análise de uma amostra sem sobrecarga de impurezas.

Tabela 21 - Critérios de aceitação para a exatidão.

CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO PARA A EXATIDÃO	RECUPERAÇÃO (%) DE ANALITO NA AMOSTRA	RSD (%) ENTRE TEOR DAS AMOSTRAS
Doseamento	98% – 102%	≤ 2%
Compostos Relacionados	Níveis 100% e 150%: 90% – 110% Níveis LOQ e 50%: 85% – 115%	≤ 10%

3.2.10. Estabilidade Intra-diária

Antes da realização da análise das amostras, é necessária a verificação da adequabilidade do sistema, como vimos anteriormente. Por vezes, esta fase do ensaio analítico leva algumas horas por si só. Para além disso, a exatidão e a linearidade, por exemplo, são ensaios que necessitam da análise ininterrupta de muitas amostras, e por isso passam muitas horas entre a sua preparação e a sua análise.

A estabilidade intra-diária da solução padrão é feita pela sua injeção a diferentes intervalos de tempo após a sua preparação, e podem ser estudadas diferentes condições de armazenamento. Este estudo tem como objetivo entender durante quanto tempo o padrão permanece estável e apto para ser utilizado na quantificação de amostras.

É também informativo o estudo da estabilidade intra-diária das amostras: permite a análise do perfil de impurezas da amostra e como este evolui ao longo do tempo. Casos há em que estarão presentes impurezas que degradam e aí é necessário especificar no método que a preparação das amostras deve ser feita imediatamente antes da análise.

Como critério de aceitação aplicam-se as regras da estabilidade do padrão (página 36) e pode ainda ser determinado o desvio relativo da área do pico num determinado tempo após a preparação relativamente à área obtida no tempo inicial (t_0):

$$\text{Desvio relativo (\%)} = \frac{A_{t=x} - A_{t=0}}{A_{t=0}} \times 100 \quad (\text{eq. 22})$$

$A_{t=x}$ – área do pico obtida x horas após a preparação da solução

$A_{t=0}$ – área do pico obtida imediatamente após a preparação da solução.

Na tabela abaixo estão definidos os critérios para estabilidade intra-diária, segundo o método analítico:

Tabela 22 - Critérios de aceitação para a estabilidade intra-diária.

CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO PARA A ESTABILIDADE INTRA-DIÁRIA	DESVIO RELATIVO (%)
Doseamento	≤3%
Compostos Relacionados	≤5%

3.2.11. Robustez

A robustez é avaliada para estudar a sensibilidade de um método a ligeiras variações nas condições cromatográficas. A principal razão para realizar esta análise é perceber como o erro associado ao equipamento (gradiente, temperatura da coluna, fluxo) e o erro humano (preparação das fases móveis) podem ter impacto nas respostas que o sistema produz.

Para isto, faz-se a análise de amostras no sistema cromatográfico original e, sequencialmente, em sistema cromatográfico com ligeiras alterações. O tratamento de dados consiste na quantificação das amostras e comparação com os resultados obtidos para cada uma das alterações efetuadas com os resultados obtidos no método nominal.

As variações ao método analítico normalmente consideradas são a temperatura da coluna, o caudal, a composição e o pH da fase móvel e a utilização de uma coluna semelhante.

Tabela 23 - Critérios de aceitação para a robustez do método.

CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO PARA A ROBUSTEZ	DESVIO RELATIVO (%)
Doseamento	≤3%
Compostos Relacionados	≤5%

Ajustes que consistem níveis aceitáveis sem representarem alterações no método são:

- Composição do solvente em menor quantidade na fase móvel pode ser ajustado em $\pm 30\%$ relativos ou $\pm 2\%$ absolutos (dependendo de qual o maior). Outros componentes não devem ser alterados mais do que 10% em termos absolutos;
- O pH do componente aquoso da fase móvel pode variar $\pm 0,2\%$;
- Variações nas dimensões da coluna cromatográfica em $\pm 70\%$ comprimento, $\pm 25\%$ de diâmetro interno e -50% do tamanho da partícula (não é permitido aumento);
- Aumento ou diminuição do caudal até 50%;
- Aumento ou diminuição da temperatura da coluna até 10%, a um máximo de 60°C.

3.2.12. Monitorização da Estabilidade

A monitorização da estabilidade consiste em submeter amostras de placebo, matéria-prima (API) e de produto acabado a condições de degradação extremas e a sua posterior análise para monitorização da sua estabilidade. As condições de degradação consideradas são além de qualquer possível armazenamento irresponsável ou descuidado do produto, analisando as degradações mais extremas, de forma a estudar os piores casos possíveis.

O estudo da estabilidade é importante para avaliar a habilidade do método para quantificar o analito na presença dos seus produtos de degradação. A estabilidade de um medicamento é

uma função das condições de armazenamento, das propriedades químicas do API, da matriz e as condições de estabilidade do acondicionamento primário.

No âmbito da validação do método analítico de compostos relacionados teste 1, que identifica e quantifica as impurezas A, B, C, D, F e impurezas desconhecidas, o objetivo da monitorização da estabilidade é verificar a adequabilidade do método analítico para a identificação e quantificação de impurezas que aparecem na degradação do medicamento. São consideradas condições, indicadas pelo fornecedor da matéria-prima, responsáveis pela degradação de 10 a 30% do princípio ativo. Os outros ensaios analíticos são realizados para caráter informativo e para efeitos do balanço de massa.

Adicionalmente, esta análise é um indicador da estabilidade do produto acabado, previamente ao estudo de estabilidade para três lotes de escala industrial requeridos para a submissão do projeto a uma AIM. Os resultados indicarão a adequabilidade do método como indicador de estabilidade do produto em análise.

4. MÉTODOS E MATERIAIS

O presente protocolo descreve os procedimentos para a validação dos testes considerados críticos para a análise do produto acabado e que estão sujeitos a validação. Foram tidos em consideração os aspetos referidos no tópico *Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology* da ICH.

A Tabela 24 enumera os testes analíticos para análise do produto, discriminando os documentos de referência e a necessidade (ou não) da realização de validação analítica.

Tabela 24 - Testes analíticos críticos para a análise do produto acabado.

TESTE	DOCUMENTO DE REFERÊNCIA	JUSTIFICAÇÃO
Descrição/Aparência	Método Interno: Visual	Métodos visuais não requerem validação analítica
pH	Ph. Eur. 2.2.3. USP <791>	Métodos da farmacopeia não requerem validação analítica
Osmolalidade	Ph. Eur. 2.2.35. USP <785>	Métodos da farmacopeia não requerem validação analítica
Tempo de Reconstituição	Método Interno: Visual	Métodos visuais não requerem validação analítica
Clareza e Grau de Opalescência	Ph. Eur. 2.2.1.	Métodos da farmacopeia não requerem validação analítica
Determinação do teor em água	Ph. Eur. 2.5.12. USP <921>	Validação analítica deve ser realizada.
Uniformidade de Massa	Ph. Eur. 2.9.5.	Métodos da farmacopeia não requerem validação analítica

Continuação Tabela 23 - Testes analíticos críticos para a análise do produto acabado.

TESTE	DOCUMENTO DE REFERÊNCIA	JUSTIFICAÇÃO
Uniformidade de Dosagem	Ph. Eur. 2.9.40. USP <905>	Este método baseia-se no conteúdo de API e massa individual do produto. Uma vez que o teste de Doseamento irá ser validado, não há necessidade de validação deste método.
Identification (API) HPLC-UV HPLC-DAD	Ph. Eur. 2.2.29. USP <621>	Validação analítica deve ser realizada.
Doseamento	Ph. Eur. 2.2.29. USP <621>	Validação analítica deve ser realizada.
Compostos Relacionados	Ph. Eur. 2.2.29. USP <621>	Validação analítica deve ser realizada.
Pureza Estereoquímica	Ph. Eur. 2.2.29. USP <621>	Validação analítica deve ser realizada.
Contaminação de partículas: Partículas sub-visíveis	Ph. Eur. 2.9.19. (Test 1.A) USP <788>	Métodos da farmacopeia não requerem validação analítica
Contaminação de partículas: Partículas visíveis	Ph. Eur. 2.2.20. USP <790>	Métodos da farmacopeia não requerem validação analítica
Esterilidade**	Ph. Eur. 2.6.1. USP <71>	Validação analítica deve ser realizada.
Endotoxinas Bacteriais**	Ph. Eur. 2.6.14. USP <85>	Validação analítica deve ser realizada.

*Validação do ensaio para determinação do teor em água do produto acabado não está compreendido por este trabalho.

**Ensaio pertencentes a outro departamento da Labor-Qualitas, pelo que não serão considerados para validação neste trabalho.

Os métodos analíticos que irão ser validados neste trabalho para a análise do produto acabado são então os seguintes:

- Identificação
- Doseamento

- Compostos Relacionados Teste 1 – para a quantificação de impurezas desconhecidas e impurezas A, B, C, D e F
- Compostos Relacionados Teste 2 – para a quantificação da impureza E
- Pureza Estereoquímica para quantificação do isômero

dos quais os últimos três são testes de quantificação de impurezas do produto. O tipo de análise realizada nestes métodos é a cromatografia líquida de alta eficiência (*HPLC – high performance liquid chromatography*), definidos durante o desenvolvimento do método analítico.

4.1. Materiais

4.1.1. Substâncias de Referência

- Padrão Referência de API
- Padrão de referência da Impureza A
- Padrão de referência da Impureza B
- Padrão de referência da Impureza C
- Padrão de referência da Impureza D
- Padrão de referência da Impureza E
- Padrão de referência da Impureza F
- Padrão de Referência do Enantiômero

4.1.2. Produto e Placebo

- Lote teste de produto acabado
- Lote teste de placebo
- Lote de API

4.1.3. Reagentes

- Acetonitrilo grade HPLC (ACN)
- Metanol grade HPLC (MeOH)
- Hidrogenofosfato dipotássico (K_2HPO_4)
- Ácido ortofosfórico 85% (H_3PO_4)
- Água purificada
- Hidróxido de Sódio (NaOH)
- Ácido Clorídrico 37% (HCl)
- Peróxido de Hidrogénio 35% (H_2O_2)

4.1.4. Equipamento

- HPLC UV-DAD, Waters, Modelo Alliance 2695, Detetor PDA 1998
- Balança Analítica

- Medidor de pH
- Micropipetas
- Suntest
- Excicador
- Estufa

4.1.5. Colunas

- Para os métodos analíticos doseamento e compostos relacionados teste 1 e teste 2: coluna cromatográfica L1 segundo classificação de enchimentos da USP, 4,6x250mm, 5 µm
- Para o método analítico pureza estereoquímica: coluna cromatográfica L41 segundo classificação de enchimentos da USP, 4,0x150mm, 5 µm

4.2. Método Analítico

Por motivos de confidencialidade, não se encontram aqui discriminados os sistemas cromatográficos ou o procedimento de cada método analítico a validar. No entanto, estes têm fluxo e temperatura da coluna e *autosampler* definidos, fases móveis de composição aquoso/orgânico, eluição em gradiente para compostos relacionados teste 1 e teste 2, e eluição isocrática para doseamento e pureza estereoquímica.

4.3. Protocolo de Validação

De seguida estão descritos os passos gerais a que se deve proceder para a análise de cada parâmetro do processo de validação de um método analítico. Paralelamente e quando necessário, são feitas considerações do procedimento a ter para um método analítico em específico.

Considerações gerais:

- Cada solução (padrão e amostra) deve ser preparada segundo o método analítico que está a ser validado. Preencher o volume com o respetivo diluente e, caso o volume seja para preencher com solução placebo, preparar esta com o diluente correto.
- Quando se fala em sobrecarregar solução com impurezas, entenda-se as impurezas que o método quantifica, por exemplo, compostos relacionados – teste 2 quantifica somente a impureza E (exceto para a especificidade, onde é necessária a preparação de soluções de todas as impurezas do produto).
- Para a validação do método analítico doseamento, não considerar, quando é referida, a adição ou preparação de soluções de impurezas (exceto, novamente, para a especificidade).

4.3.1. Adequabilidade do Sistema

Preparou-se a solução padrão em duplicado.

Procedimento: Injetou-se 6 vezes consecutivas a solução padrão 1 e 3 vezes consecutivas a solução padrão 2.

4.3.2. Especificidade

Prepararam-se as seguintes soluções:

- Diluente
- Solução padrão
- Solução amostra
- Solução placebo
- Soluções individuais de compostos relacionados
- Solução amostra sobrecarregada
- Solução SST e Solução de Isómero no limite de especificação (para a pureza estereoquímica)

Procedimento: Injetou-se cada solução pelos menos 1 vez.

- ⊕ As soluções de impurezas individuais foram preparadas à concentração do limite de especificação respetivo. Para o ensaio de doseamento, prepararam-se à concentração de 0,01 mg/ml.

4.3.3. Repetibilidade do Sistema

Prepararam-se as seguintes soluções:

- Solução padrão
- Solução de cada impureza no seu limite de especificação

Procedimento: Injetou-se 6 vezes consecutivas cada solução.

4.3.4. Repetibilidade do Método

Doseamento: Reconstituiu-se 1 *vial* de placebo em 5 ml de água, transferiu-se o conteúdo para balão volumétrico de 100 ml. Pesou-se de forma exata 245,32 mg de API para o balão e dissolveu-se completamente com diluente. Completou-se o volume com diluente e filtrou-se alíquota. Transferiu-se 2 ml da solução filtrada e diluiu-se para balão volumétrico de 20 ml com diluente. Foram preparadas 6 amostras independentes.

Quantificou-se contra solução padrão.

$C_{API} \approx 0,15 \text{ mg/ml}$

Compostos Relacionados: Preparou-se a solução do nível 100% do limite de especificação como descrito em 4.3.10 *Exatidão*.

Procedimento: Injetou-se 6 vezes consecutivas cada solução.

4.3.5. *Precisão Intermédia*

Um segundo analista procedeu como descrito em 4.3.4 Repetibilidade do Método.

4.3.6. *Limite de Detecção*

O limite de deteção foi determinado usando a abordagem sinal-ruído. Para a determinação do limite de deteção, um S/N entre 2-3:1 é normalmente considerado aceitável. Prepararam-se soluções a diferentes concentrações baixas de API e de cada impureza.

Procedimento: Injetou-se 6 vezes consecutivas cada solução.

4.3.7. *Limite de Quantificação*

O limite de quantificação foi determinado usando a abordagem sinal-ruído. Para a determinação do limite de quantificação, um S/N entre 10:1 é normalmente considerado aceitável. Prepararam-se soluções a diferentes concentrações baixas de API e de cada impureza.

Procedimento: Injetou-se 6 vezes consecutivas cada solução.

4.3.8. *Linearidade*

Doseamento:

Solução Stock de API: Pesou-se 122,65 mg de Padrão de Referência de API para balão volumétrico de 100 ml. Aferiu-se com diluente. Transferiu-se o volume correto, segundo a Tabela 25, para um balão de 20 ml e aferiu-se com diluente.

Tabela 25 - Doseamento - preparação das soluções de linearidade.

NÍVEL	% CONCENTRAÇÃO NOMINAL	VOLUME STOCK SOL. API (ML)	API (MG/ML)
1	50	2,0	0,0750
2	75	3,0	0,1125
3	100	4,0	0,1500
4	125	5,0	0,1875
5	150	6,0	0,2250

Compostos Relacionados: Prepararam-se soluções stock de cada uma das impurezas A, B, C, D e F à concentração 0,3 mg/ml.

Para as impurezas desconhecidas e para a impureza E, preparou-se uma solução stock de API a 0,15 mg/ml para cada uma.

Para a pureza estereoquímica, preparou-se uma solução stock de API a 0,006 mg/ml.

Foram preparadas as soluções de linearidade conforme as tabelas abaixo, para as impurezas A, B, D e F e API, para a impureza C, para compostos relacionados teste 2 e para o ensaio da pureza estereoquímica:

Tabela 26 – Compostos relacionados teste 1 - preparação das soluções de linearidade para as impurezas desconhecidas, A, B, D e F.

% LE	VOLUME STOCK SOL. IMPUREZAS (ML)	VOLUME STOCK SOL. API (ML)	VOLUME FINAL (ML)	CONCENTRAÇÃO IMPUREZAS (MG/ML)	CONCENTRAÇÃO API (MG/ML)
10 (QL A+B)	0,020	0,04	20	0,00030	--
15 (QL D+F+API)	0,030	0,06	20	0,00045	0,00045
50	0,100	0,20	20	0,00150	0,00150
75	0,150	0,30	20	0,00225	0,00225
100	0,200	0,40	20	0,00300	0,00300
125	0,250	0,50	20	0,00375	0,00375
150	0,300	0,60	20	0,00450	0,00450

Tabela 27 - Compostos relacionados teste 1 - preparação das soluções de linearidade para a impureza C.

% LE	VOLUME SOL. STOCK IMP. C (ML)	VOLUME FINAL (ML)	CONCENTRAÇÃO IMPUREZAS (MG/ML)
5 (QL)	0,025	10	0,00075
50	0,250	10	0,00750
75	0,375	10	0,01125
100	0,500	10	0,01500
125	0,625	10	0,01875
150	0,750	10	0,02250

Tabela 28 - Compostos relacionados teste 2 - preparação das soluções de linearidade.

% LE	VOLUME SOL. STOCK API (ML)	VOLUME FINAL (ML)	CONCENTRAÇÃO API (MG/ML)
25 (QL)	0,1	20	0,00075
50	0,2	20	0,00150
75	0,3	20	0,00225
100	0,4	20	0,00300
125	0,5	20	0,00375
150	0,6	20	0,00450

Tabela 29 – Pureza estereoquímica - preparação das soluções de linearidade.

% LE	VOLUME SOL. STOCK API (ML)	VOLUME FINAL (ML)	CONCENTRAÇÃO API (MG/ML)
50 (LQ)	1,0	20	0,00030
75	1,5	20	0,00045
100	2,0	20	0,00060
125	2,5	20	0,00075
150	3,0	20	0,00090

Procedimento: Injetou-se cada solução em triplicado.

4.3.9. Fator de Resposta Relativo

Confirmar o RRF determinado pelos declives das linearidades para as impurezas A, B, C, D e F.

Uma vez que a linearidade para a impureza E e isómero foram realizadas utilizando como analito o API, confirmar o RRF através da repetibilidade do sistema a concentrações correspondentes ao limite de concentração de cada um.

Procedimento: Injetou-se 6 vezes consecutivas cada solução.

4.3.10. Exatidão

Doseamento: Pesou-se de forma exata as quantidades de API descritas na Tabela 30 para cada balão volumétrico de 100 ml com o conteúdo de 1 *vial* de placebo. Dissolveu-se completamente com diluente. Completou-se o volume com diluente e filtrou-se alíquota.

Transferiu-se 2 ml da solução filtrada e diluiu-se para balão volumétrico de 20 ml com solução placebo. Foram preparadas 3 amostras independentes para cada nível. Quantificou-se contra solução padrão.

Tabela 30 - Doseamento - preparação das soluções de exatidão.

NÍVEL (% CN*)	API (MG)	PLACEBO (MG)**	VOLUME FINAL (ML)	DILUIÇÃO (ML)	API (MG/ML)
0	--	455,4	100	2/20	--
50	122,66	455,4	100	2/20	0,075
100	245,32	455,4	100	2/20	0,150
150	367,98	455,4	100	2/20	0,225

*CN – Concentração nominal

**Quantidade teórica de placebo presente em 1 *vial*.

Impurezas conhecidas A, B, D e F: Prepararam-se soluções stock de impurezas à concentração 0,3 mg/ml. Reconstituíram-se 5 *vials* de placebo para balão de 500 ml e aferiu-se com diluente.

Para cada um dos níveis da Tabela 31, pesou-se a quantidade respetiva de API e transferiu-se o volume correto de cada solução stock impureza para o balão volumétrico. Completou-se o volume com solução placebo.

Preparou-se cada nível em triplicado e quantificou-se contra uma solução padrão com cada impureza no seu limite de concentração.

Tabela 31 - Compostos relacionados testes 1 - soluções de exatidão para as impurezas A, B, D e F.

NÍVEL (% LE*)	API (MG) **	VOLUME DAS SOL. STOCK DE IMP. (ML)	VOLUME FINAL (ML)	CONCENTRAÇÃO API (MG/ML)	CONCENTRAÇÃO DE IMPUREZA (MG/ML)
0	49,06	--	20	1,5	--
10 (A+B QL)	49,06	0,020	20	1,5	0,00030
15 (D+F QL)		0,030			0,00045
50	49,06	0,100	20	1,5	0,00150
100	49,06	0,200	20	1,5	0,00300
150	49,06	0,300	20	1,5	0,00450

*LE – Limite de Especificação

**Quantidade necessária de API para obter concentração nominal 1,5 mg/ml em API ácido livre.

Impureza Conhecida C: Prepararam-se solução stock de impureza C à concentração 0,3 mg/ml. Reconstituíram-se 5 *vials* de placebo para balão de 500 ml e aferiu-se com diluente.

Procedeu-se da mesma forma que para as impurezas conhecidas A, B, D e F, respeitando as quantidades descritas na Tabela 32.

Tabela 32 - Compostos relacionados testes 1 - soluções de exatidão para a impureza C.

NÍVEL (% LE)	API (MG)	VOLUME DA SOLUÇÃO STOCK DE IMP. C (ML)	VOLUME FINAL (ML)	CONCENTRAÇÃO API (MG/ML)	CONCENTRAÇÃO DE IMPUREZA (MG/ML)
0	24,53	--	10	1,5	--
5 (QL)	24,53	0,025	10	1,5	0,00075
50	24,53	0,250	10	1,5	0,00750
100	24,53	0,500	10	1,5	0,01500
150	24,53	0,750	10	1,5	0,02250

Impurezas Desconhecidas: Reconstituíram-se 5 *vials* de placebo para balão de 500 ml e aferiu-se com diluente. Preparou-se a solução stock de API: 24,53 mg de Padrão de Referência de API para balão volumétrico de 100 ml. Aferiu-se com diluente. $C_{API} \approx 0,15$ mg/ml

Para cada um dos níveis da Tabela 33, transferiu-se o volume correto de solução stock de API para o balão volumétrico. Completou-se o volume com solução placebo.

Preparou-se cada nível em triplicado e quantificou-se contra uma solução padrão.

Tabela 33 - Compostos relacionados testes 1 - soluções de exatidão para as impurezas desconhecidas.

NÍVEL (% LE)	VOLUME SOL. STOCK API (MG)	VOLUME FINAL (ML)	CONCENTRAÇÃO API (MG/ML)
0	--	20	--
15 (QL)	0,060	20	0,00045
50	0,200	20	0,00150
100	0,400	20	0,00300
150	0,600	20	0,00450

Impureza E: Procedeu-se da mesma forma para o método analítico compostos relacionados – teste 2, preparando as soluções de exatidão da Tabela 34, a partir da solução stock de API ($C_{API} \approx 0,15$ mg/ml).

Tabela 34 - Compostos relacionados testes 2 - soluções de exatidão.

NÍVEL (% LE)	VOLUME SOL. STOCK API (MG)	VOLUME FINAL (ML)	CONCENTRAÇÃO API (MG/ML)
0	--	20	--
25 (QL)	0,100	20	0,00075
50	0,200	20	0,00150
100	0,400	20	0,00300
150	0,600	20	0,00450

Pureza estereoquímica: Preparou-se, da mesma forma, a solução placebo.

Preparou-se a solução stock de API: pesou-se 24,53 mg de Padrão de Referência de API para balão volumétrico de 25 ml. Adicionou-se cerca de 10-15 ml de diluente e mexeu-se bem até dissolver completamente. Perfez-se o volume com diluente. Diluiu-se 1 ml desta solução em balão de 20 ml com diluente.

Preparou-se cada nível em triplicado conforme a Tabela 35 e quantificou-se contra uma solução padrão.

Tabela 35 – Pureza estereoquímica - soluções de exatidão.

NÍVEL (% LE)	VOLUME SOL. STOCK API (MG)	VOLUME FINAL (ML)	CONCENTRAÇÃO API (MG/ML)
0	--	50	--
50 (QL)	0,5	50	0,0003
100	1,0	50	0,0006
150	1,5	50	0,0009

Procedimento: Injetou-se cada solução em triplicado.

4.3.11. Gama de validação

Prepararam-se as soluções de nível alto e nível baixo da linearidade (50%/LOQ e 150%).

Procedimento: Injectou-se 6 vezes consecutivas cada solução.

4.3.12. Estabilidade Intra-diária

Foram preparadas a solução padrão e a solução amostra sobrecarregada com impurezas no seu limite de especificação.

Procedimento: Injetaram-se ambas as soluções a intervalos regulares.

4.3.13. Robustez

Compostos Relacionados teste 1: Preparar solução padrão, uma solução amostra de controlo e 3 soluções amostra sobrecarregadas com impurezas no seu limite de especificação.

Para doseamento e compostos relacionados teste 2 foram preparadas duas amostras de produto acabado sem sobrecarga.

Procedimento: Analisaram-se ambas as soluções em método analítico com uma alteração ao sistema cromatográfico, segundo a Tabela 36.

Tabela 36 - Alterações aos sistemas cromatográficos para análise da robustez.

PARÂMETRO	MÉTODO	ALTERAÇÕES PROPOSTAS	
pH da Fase Móvel	Doseamento	-5%	+5%
	Stereo	-5%	+5%
Fluxo	Doseamento	-15%	+15%
	CRs 1	-10%	+10%
	CRs 2	-10%	+10%
	Stereo	-35%	+35%
Composição em orgânico da Fase Móvel	Doseamento	-5%	+5%
	CRs 2	+20%	
	Stereo	-8%	+8%
Temperatura da coluna	Doseamento	-15%	+15%
	CRs 1	-15%	+15%
	CRs 2	-15%	+15%
	Stereo	-5%	+5%

4.4. Critérios de aceitação

Na Tabela 37 abaixo encontram-se os critérios de aceitação de cada parâmetro que validam o método analítico, assim como discrimina quais os parâmetros a avaliar para cada método analítico.

Tabela 37 - Critérios de aceitação de cada parâmetro para validação analítica dos métodos identificação, doseamento e compostos relacionados.

PARÂMETRO	ITENS A AVALIAR	CRITÉRIO DE ACEITAÇÃO	
		DOSEAMENTO / IDENTIFICAÇÃO	CRs
Adequabilidade do Sistema	Número de Pratos teórico Fator de Simetria RSD	RSD \leq 2,0% Fator de Resposta: 0,98-1,02	--
Especificidade	Picos cromatográficos Tempo de Retenção Pureza do pico	Não devem ser detetados picos a interir com os picos das substâncias a ser quantificadas.	
Repetibilidade do Sistema	RSD entre áreas dos picos	RSD \leq 2,0%	RSD \leq 5,0%
Repetibilidade do Método	Analista 1: RSD dos conteúdos entre amostras	Pelo Analista 1: RSD \leq 2,0%	Pelo Analista 1: RSD \leq 10,0%
Precisão Intermédia	RSD dos conteúdos entre amostras e entre analistas. Diferença absoluta do resultado médio entre analistas.	Pelo Analista 2: RSD \leq 2,0% Diferença absoluta entre resultado médio dos 2 analistas \leq 2,5%	Pelo Analista 2: RSD \leq 10,0% RSD \leq 15% entre analistas Diferença absoluta entre resultado médio dos 2 analistas \leq 10%
Limite de Detecção	S/N RSD entre áreas dos picos	--	S/N = 3:1 RSD \leq 20%
Limite de Quantificação	S/N RSD entre áreas dos picos	--	S/N = 10:1 RSD \leq 10%
Linearidade	Coeficiente de correlação (r_2) Distribuição dos resíduos	$r_2 \geq$ 0,999 Distribuição aleatória dos resíduos	$r_2 \geq$ 0,99 Distribuição aleatória dos resíduos
Fator de Resposta Relativo (RRF)	Declive da reressão linear ou Área média da resposta	--	RRF no intervalo 0,8-1,2, deve ser considerado igual a 1.

Continuação da Tabela 36 - Critérios de aceitação de cada parâmetro para validação analítica dos métodos identificação, doseamento e compostos relacionados.

PARÂMETRO	ITENS A AVALIAR	CRITÉRIO DE ACEITAÇÃO	
		DOSEAMENTO / IDENTIFICAÇÃO	CR
Exatidão	% Teor Recuperado Médio RSD das % teor recuperado entre amostras	98,0% - 102,0%	Níveis 100 e 150%: 90% - 110% Níveis LOQ e 50%: 85% - 115%
Gama de validação	RSD das áreas do pico	RSD ≤ 2,0%	Para o nível baixo: RSD ≤ 10% Para o nível alto: RSD ≤ 5%
Estabilidade Intradiária	Diferença em % da área do pico relativamente à área inicial	Diferença em % da área do pico relativamente à área inicial ≤ 3%	Diferença em % da área do pico relativamente à área inicial ≤ 5% Perfil de compostos relacionados deve ser semelhante
Robustez	Número de Pratos teórico Fator de Simetria RSD das áreas Conteúdo em API	Diferença absoluta do método original RSD ≤ 3%	RRT e RSD das áreas dos picos não devem diferir significativamente do método original. O perfil dos CRs deve permanecer similar.

4.5. Protocolo para a Monitorização da Estabilidade

A tabela abaixo descreve todas as condições de *stress* às quais amostras de **API, placebo e produto acabado (DP – drug product)** devem ser submetidas, com o objetivo de avaliar a capacidade do método como indicador de estabilidade. Adicionalmente, todas as amostras foram analisadas em termos de descrição e compostos relacionados – teste 1, teste 2 e pureza estereoquímica. As amostras foram pesadas antes e depois da exposição às condições de *stress*.

O objetivo de degradação é de 5 a 25%, embora degradações fora deste intervalo possam ser aceites com justificação.

Tabela 38 - Condições de stress para validação do método compostos relacionados - teste 1.

EXPOSIÇÃO	CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	CICLO DE EXPOSIÇÃO
Luz	500 W/m ²	12 horas
Calor	80°C	24 horas
Humidade	>85% HR	7 dias
Hidrólise	Água	24 horas à temperatura ambiente
Hidrólise Ácida	0,1 M HCl	24 horas à temperatura ambiente
Hidrólise Básica	0,1 M NaOH	24 horas à temperatura ambiente
Oxidação	3% H ₂ O ₂	24 horas à temperatura ambiente

Para as condições de stress luz, calor e humidade, as amostras foram preparadas como descrito:

- API: 2g de Padrão de Referência uniformemente distribuídas em caixa de tara previamente pesada.
- Placebo: 8 *vials* fechados para a luz, 10 *vials* abertos para o calor e a humidade.
- DP: Placebo: 8 *vials* fechados para a luz, 10 *vials* abertos para o calor e a humidade.

Para as condições hidrólise, hidrólise ácida, hidrólise básica e oxidação, as amostras foram preparadas da seguinte forma:

- API: 245,3 mg de Padrão de Referência em balão volumétrico com 10 ml de solução mencionada na coluna Condições Experimentais.
- Placebo: Reconstituiu-se 1 *vial* em 5 ml de solução mencionada na coluna Condições Experimentais e transferiu-se para balão volumétrico de 100 ml. Adicionou-se mais 5 ml de solução.
- DP: Reconstituiu-se 1 *vial* em 5 ml de solução mencionada na coluna Condições Experimentais e transferiu-se para balão volumétrico de 100 ml. Adicionou-se mais 5 ml de solução.
- Branco: 10 ml de solução mencionada na coluna Condições Experimentais.

No final da exposição às condições de degradação, as amostras tratadas com ácido e base foram neutralizadas com uma quantidade equivalente de NaOH e HCl, respetivamente. Após acondicionamento à temperatura ambiente, as amostras degradadas foram preparadas conforme o método analítico para cada ensaio (exceto pelos devidos ajustamentos de volume de forma a manter a concentração analítica nominal).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Identificação e Doseamento

Em primeiro lugar, foi realizada a identificação do API no medicamento. Procedendo segundo o método analítico do doseamento, prepararam-se as soluções padrão e amostra. Comparou-se o tempo de retenção e o espectro de absorção entre os comprimentos de onda 200 e 300 nm do pico de API na amostra e na solução padrão.

Em baixo, a Figura 18 contém parte dos cromatogramas destas duas soluções e podemos verificar que o tempo de retenção do API na solução (4,295 minutos) é muito próximo do tempo de retenção na solução padrão (4,277 minutos).

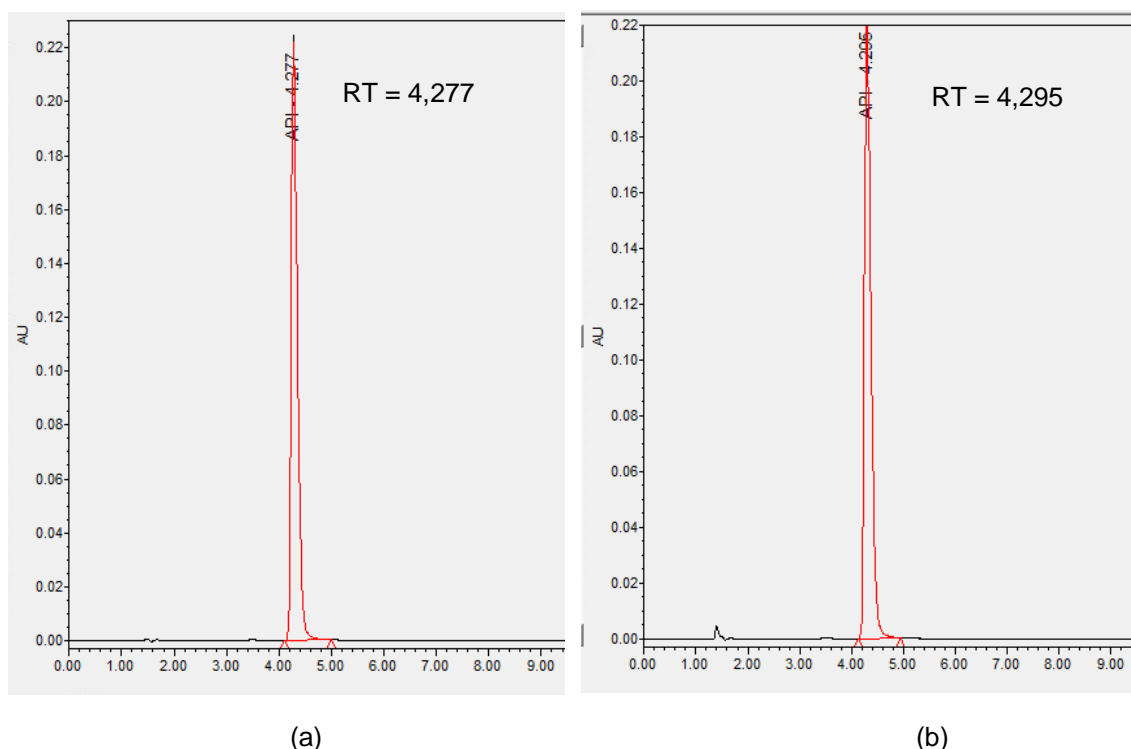


Figura 18 – a) Cromatograma da solução padrão (0.15 mg/ml) e b) Cromatograma da solução amostra do produto acabado (0.15 mg/ml).

A análise da Figura 19 permite perceber que os espectros de absorção têm um aspeto também muito semelhante. Assim, podemos concluir que o teste de identificação tem resultado

positivo: o API presente nas duas soluções tem o mesmo tempo de retenção e espectro de absorção, pelo que é a mesma molécula.

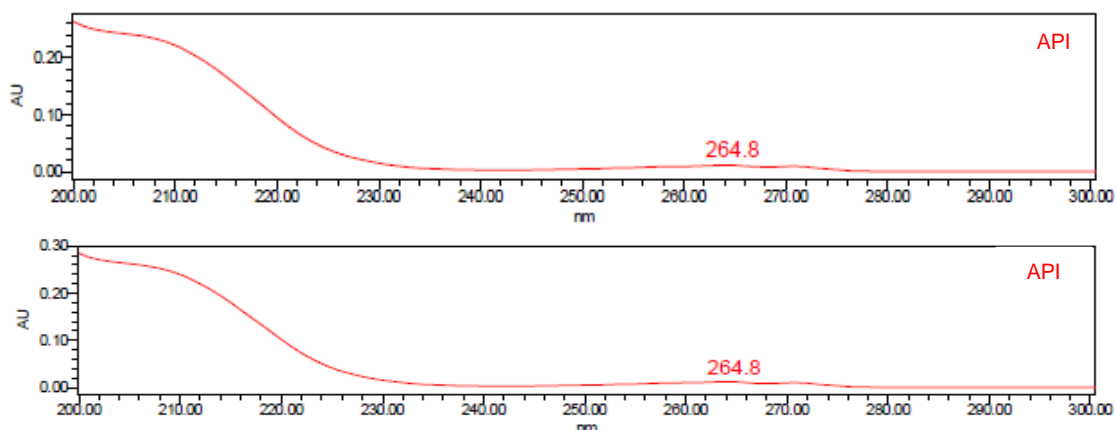


Figura 19 - Espectro de absorção do pico de API na solução padrão (em cima) e na solução amostra (em baixo).

De seguida, procedeu-se à validação do método analítico doseamento. Em primeira instância, fez-se a verificação da adequabilidade do sistema (Tabela 39). O fator de resposta entre as duas soluções padrão preparadas foi de 1,00, indicando que foram, de facto, bem preparadas e que estavam em condições óptimas para utilizar para quantificação. O número de pratos teóricos, a repetibilidade da área e o fator de assimetria do pico de API nas seis injeções efetuadas provaram estar dentro dos limites, pelo que se concluiu que o sistema era adequado.

Tabela 39 - Adequabilidade do sistema para a validação do método analítico doseamento.

PARÂMETRO	CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO	RESULTADOS DA VALIDAÇÃO	RESULTADOS
Adequabilidade do Sistema	Fator de Resposta: 0,98-1,02 N > 2000 0,8 < T < 1,5 RSD áreas ≤ 2,0%	Fator de Resposta = 1,00 N = 6070 T = 1,49 %RSD = 1,09%	Conforme. Tabela 68

A Tabela 40 compreende o resumo dos resultados obtidos para os parâmetros da validação do método analítico doseamento, verificando a conformidade destes com os critérios de aceitação de cada (tabelas com os resultados discriminados encontram-se em anexo).

O método de doseamento provou ser específico, preciso, linear e exato na gama de concentração 50% a 150% da concentração nominal (0,15 mg/ml) – ver Anexo A.

Tabela 40 – Resumo dos resultados da validação dos métodos analíticos Identificação e Doseamento.

PARÂMETRO	CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO	RESULTADOS DA VALIDAÇÃO	RESULTADOS
Especificidade	Não devem ser detetados picos a interferir com os picos das substâncias a ser quantificadas.	Pico de API é puro na amostra e na solução amostra sobrecarregada. Tempo de Retenção = 4,3 min	Conforme. Figura 31 a Figura 41
Repetibilidade do Sistema	RSD áreas $\leq 2,0\%$	RSD = 0,63%	Conforme. Tabela 69
Repetibilidade do Método	Pelo Analista 1: RSD conteúdo $\leq 2,0\%$	RSD set 1 = 0,39%	Conforme. Tabela 70
Precisão Intermédia	Pelo Analista 2: RSD $\leq 2,0\%$ Diferença absoluta entre resultado médio dos 2 analistas $\leq 2,5\%$	RSD set 2 = 0,12% RSD entre sets = 0,93%	Conforme. Tabela 71
Linearidade	$r_2 \geq 0,999$ Distribuição aleatória dos resíduos	- $r_2 = 1,000$ - resíduos distribuídos aleatoriamente - %Y interceção = 1,13% - % RSD $\leq 2,0$	Conforme. Figura 42 Figura 43 Tabela 72
Exatidão	98,0% - 102,0%	Conforme para cada resultado individual nos 3 níveis de concentração (50%, 100% e 150%).	Tabela 73
Gama de validação	RSD $\leq 2,0\%$	0,075 a 0,223 mg/ml. RSD (nível baixo) = 0,23% RSD (nível alto) = 0,18%	Conforme. Tabela 74

A avaliação da estabilidade intra-diária da amostra de solução padrão mostrou que permanecia estável durante pelo menos 68 horas se acondicionada a 5°C e pelo menos 72 horas à temperatura ambiente, segundo a Tabela 41. Uma vez que no doseamento a concentração de trabalho é elevada, seria necessário um grau de degradação do API relativamente grande para que se obtivesse variação significativa no resultado do doseamento, degradação esta que não ocorre no tempo que foi estudado. Assim, a solução padrão mantém-se adequada para quantificação durante 68 horas e a solução amostra produz os mesmos resultados até 72 horas após a sua preparação, se acondicionada a 5°C.

Tabela 41 - Resultados da estabilidade intra-diária para o método analítico doseamento.

PARÂMETRO	CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO	RESULTADOS DA VALIDAÇÃO	RESULTADOS
Estabilidade Intradiária	Diferença em % da área do pico relativamente à área inicial $\leq 3\%$	Solução padrão: estável durante 68 horas a 5°C e 72 horas à temperatura ambiente. Desvio individual/max = 2,06% (20°C) Desvio individual/max = 1,89% (5°C) Solução amostra: estável durante 68 horas a 5°C. Desvio individual/max = 2,57%	Conforme. Tabela 75 Tabela 76 Tabela 77

Por último, analisou-se a sensibilidade do método analítico a alterações no sistema cromatográfico e os resultados apresentam-se na Tabela 42 e Tabela 43 abaixo. A quantificação de cada amostra foi realizada contra solução padrão que se preparou em duplicado e para a qual se provou adequabilidade. O desvio absoluto é a diferença entre o teor de API recuperado nas condições nominais e nas condições alteradas.

Tabela 42 - Primeiro set de análise da robustez do método analítico doseamento.

CONDIÇÃO	% API (MÉDIA)	%RSD	DESVIO ABSOLUTO (%) ÀS CONDIÇÕES NOMINAIS
Condições Nominais	101.94	0.15	--
Temperatura da coluna -15%	102.02	0.37	0.08
Temperatura da coluna +15%	102.43	0.27	0.49
Fluxo -15%	102.37	0.38	0.44
Fluxo +15%	102.88	0.61	0.94
Composição em orgânico da FM -5%	103.14	0.36	1.20
Composição em orgânico da FM +5%	101.96	0.44	0.03
Resultado Médio = 102.39%			
RSD = 0.54%			

Tabela 43 - Segundo set de análise da robustez dos métodos doseamento e identificação.

CONDIÇÃO	% API (MÉDIA)	%RSD	DESVIO % ABSOLUTO ÀS CONDIÇÕES NOMINAIS
Condições Nominais	100.58	0.49	--
pH FM -5%	101.43	0.12	0.85
pH FM +5%	101.99	0.17	1.41
Resultado Médio = 102.39%			
RSD = 0.54%			

Analisando os desvios absolutos às condições nominais, foi verificado que o maior desvio apresentado é de 1,41%, correspondente ao aumento de 5% do pH da fase móvel. Posto isto, conclui-se que o método analítico de doseamento tem maior sensibilidade ao pH da fase móvel, embora ainda seja muito inferior ao critério de aceitação de 3%.

A Tabela 44 considera os resultados dos dois sets anteriores para determinação da média do teor recuperado (102,07%) e RSD entre estes (0,75%) para todas as amostras analisadas.

Tabela 44 – Totalidade dos resultados da robustez do API no método analítico doseamento.

ANÁLISE GLOBAL DO TESTE DE ROBUSTEZ	
Teor médio em API (%)	102.07
SD	0.76
RSD (%)	0.75
Número de amostras	30

Uma vez que o RSD entre os resultados é mínimo, podemos concluir que o método de doseamento não é sensível a pequenas alterações em temperatura da coluna, fluxo, pH e composição em orgânico da fase móvel, uma vez que não há variação significativa entre os teores de API recuperados para as amostras analisadas nessas condições relativamente às suas quantificações no método nominal (sem alterações).

5.2. Compostos Relacionados – Teste 1

Tendo em conta os limites de especificação para as impurezas definidos na Tabela 13, e sabendo que a concentração nominal da amostra segundo o método analítico de compostos relacionados teste 1 é de 1,5 mg/ml, podemos determinar a concentração a 100% deste limite na Tabela 45.

Para a impureza C, a qual foi intensamente estudada e considerada segura, como sabemos, sendo ela própria um API já aprovado para libertação e comercialização de medicamento, e a sua toxicidade não é uma preocupação, o limite de especificação desta não está sujeito aos *guidelines* da ICH e, portanto, foi definido um limite superior para a sua concentração no produto acabado.

Tabela 45 - Concentração ao limite de especificação de cada impureza.

SUBSTÂNCIA	LIMITE DE ESPECIFICAÇÃO (% DA CN)	CONCENTRAÇÃO AO LE
Impurezas Desconhecidas	0,2%	0,003 mg/ml
Impureza A	0,2%	0,003 mg/ml
Impureza B	0,2%	0,003 mg/ml
Impureza C	1,0%	0,015 mg/ml
Impureza D	0,2%	0,003 mg/ml
Impureza F	0,2%	0,003 mg/ml

A adequabilidade do sistema foi verificada determinando o número de pratos teóricos e o fator de assimetria médios obtidos para o pico de cada uma das impurezas e do API ao seu limite de especificação, valores estes referidos na Tabela 46. A eficiência da coluna e a simetria do pico ficam assim dentro dos valores esperados.

Tabela 46 – Parâmetros cromatográficos do método analítico compostos relacionados teste 1.

SUBSTÂNCIA	N	T
API	87647	1.15
Impureza A	363624	1.11
Impureza B	104557	1.21
Impureza C	281954	1.04
Impureza D	79199	1.20
Impureza F	165112	1.00

Para o método analítico de quantificação das impurezas A, B, C, D, F e desconhecidas foi estudou-se o perfil das impurezas e verificou-se a resolução para cada um dos seus picos na amostra.

A Figura 44 e a Figura 45 (Anexo B) permitem verificar que o diluente e o placebo (assim como o grandiente) não apresentam picos que interfiram com a quantificação de qualquer um dos compostos que este método quantifica.

A amostra de produto acabado (Figura 20) permite identificar a presença das impurezas C e F, sem que tenha sido feita sobrecarga. Para além destas, verifica-se a presença de uma impureza desconhecida ao tempo de retenção 26,405 minutos, os outros picos detetados no cromatograma abaixo são variações provocadas pelo gradiente, tendo sido desnecessariamente integrados pelo programa.

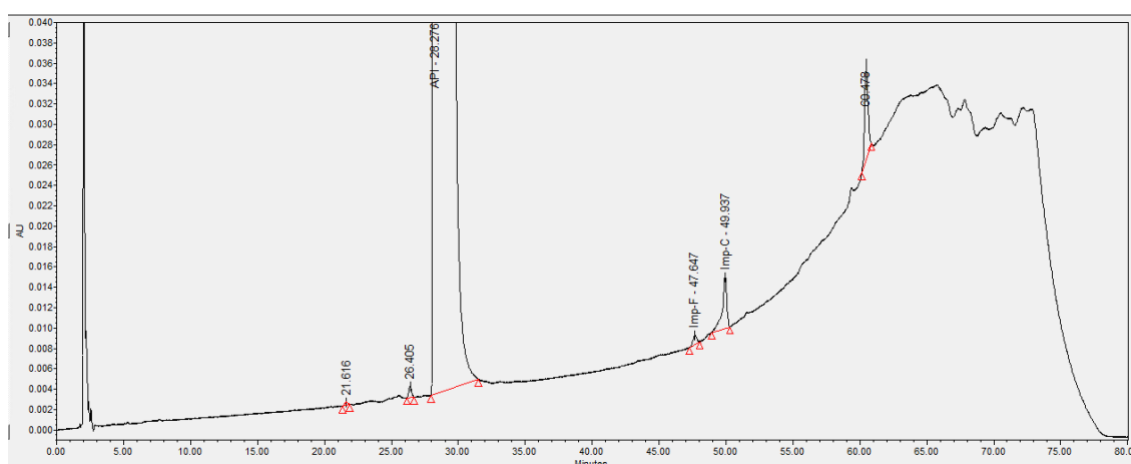


Figura 20 – Cromatograma da amostra do produto acabado (1.5 mg/ml).

As soluções de cada impureza e da solução padrão (Anexo B, Figura 47 a Figura 51 e Figura 44, repetivamente) permitem determinar o tempo de retenção característico de cada um destes compostos:

Tabela 47 - Tempo de retenção de cada analito a quantificar no método analítico compostos relacionados teste 1.

SUBSTÂNCIA	RT (MINUTOS)	RRT
API	27,931	--
Impureza Desconhecida	26,405	0,95
Impureza A	52,737	1,89
Impureza B	37,855	1,36
Impureza C	50,055	1,79
Impureza D	32,032	1,15
Impureza F	47,602	1,70

É importante analisar a especificidade também em amostras que contenham a maior concentração possível de cada analito (concentração nominal para o API e limite de especificação para as impurezas), uma vez que quanto maior o pico, mais larga será a sua base, diminuindo a proximidade com os picos adjacentes. Se se mostrar resolução no pior caso possível, então haverá também resolução quando a concentração for menor.

Por isso, preparou-se e injetou-se a amostra sobrecarregada com as impurezas A, B, C, D e F no seu limite de especificação (Figura 21): existe resolução entre cada um dos analitos e não se revelam picos que interfiram com a sua quantificação.

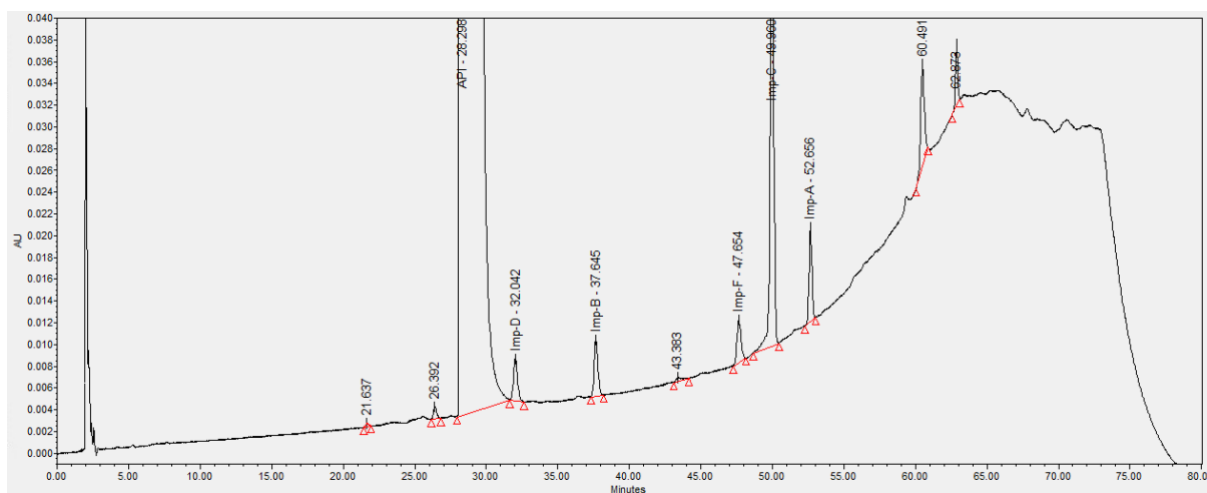


Figura 21 - Cromatograma da amostra do produto acabado (1.5 mg/ml) sobrecarregada com as impurezas A, B, D e F (0.003 mg/ml) e impureza C (0.015 mg/ml).

A precisão foi determinada para cada uma das impurezas, e para o API para a determinação da precisão para impurezas desconhecidas. Os resultados obtidos encontram-se resumidos na Tabela 48. Respeitando todos os critérios de aceitação, o método provou ser preciso para as impurezas A, B, C, D e F, assim como para o API a concentração do limite de especificação das impurezas desconhecidas.

O limite de detecção e o limite de quantificação das impurezas foram determinados segundo a abordagem sinal-ruído. Determinou-se o sinal-ruído médio obtido por 6 injeções de uma solução de analito à concentração do limite de especificação (para a impureza F só foi tido em conta a pureza do padrão após a preparação, pelo que a concentração da solução é 2,0 µg/ml ao invés de 3,0 µg/ml) (Tabela 49). Considerando uma relação linear entre a concentração e o sinal-ruído, estimou-se a concentração que resultaria num sinal-ruído de 3. Agiu-se de forma semelhante para o limite de quantificação, estimando a concentração correspondente a um sinal-ruído igual a 10.

Tabela 48 - Resumo dos resultados da precisão do método analítico compostos relacionados teste 1.

PARÂMETRO	CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO	RESULTADOS DA VALIDAÇÃO	TABELA DE RESULTADOS
Repetibilidade do Sistema	RSD ≤ 5,0%	RSD _{API} = 0,93% RSD _{IMP A} = 0,94% RSD _{IMP B} = 1,16% RSD _{IMP C} = 0,39% RSD _{IMP D} = 0,75% RSD _{IMP F} = 1,21%	Conforme. Tabela 78
Repetibilidade do Método	Pelo Analista 1: RSD ≤ 10,0%	Set 1: RSD _{API} = 1,18% RSD _{IMP A} = 1,49% RSD _{IMP B} = 1,58% RSD _{IMP C} = 1,07% RSD _{IMP D} = 0,49% RSD _{IMP F} = 0,78%	Conforme. Tabela 79 Tabela 80 Tabela 81 Tabela 82 Tabela 83 Tabela 84
Precisão Intermédia	Pelo Analista 2: RSD ≤ 10,0% RSD ≤ 15% entre analistas Diferença absoluta entre resultado médio dos 2 analistas ≤ 10%	Set 2: RSD _{API} = 1,23% RSD _{IMP A} = 1,49% RSD _{IMP B} = 1,99% RSD _{IMP C} = 1,07% RSD _{IMP D} = 0,50% RSD _{IMP F} = 3,24% Entre sets: RSD _{API} = 3,67% RSD _{IMP A} = 3,52% RSD _{IMP B} = 3,03% RSD _{IMP C} = 4,24% RSD _{IMP D} = 4,49% RSD _{IMP F} = 4,36% Diferença absoluta entre resultado médio dos 2 analistas ≤ 10%.	Conforme. Tabela 85 Tabela 86 Tabela 87 Tabela 88 Tabela 89 Tabela 90

O RSD obtido entre os dois sets diferentes para a avaliação da precisão intermédia é, tal como se esperava, superior ao RSD obtido para cada set individual e também para a repetibilidade do sistema. Isto deve-se porque na precisão intermédia há mais fatores que estão a ser considerados: o colaborador, os reagentes, o equipamento, pelo que resulta numa maior variabilidade entre os resultados obtidos.

Muito embora as soluções às concentrações estimadas apresentem o sinal-ruído desejado, é necessário provar repetibilidade do sistema para os limites de deteção e de quantificação, pelo que, posteriormente, foram feitos ajustes à concentração até que a deteção

fosse consistente, isto é, RSD inferior a 20% para o LE e 10% para o LOQ. Na Tabela 50 estão discriminados estes limites para cada uma das impurezas quantificadas por este método analítico.

Tabela 49 - Estimativa do limite de detecção para os compostos relacionados do método 2.

SUBSTÂNCIA	CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO 100% LE	S/N A CONCENTRAÇÃO 100% LE	CONCENTRAÇÃO A S/N = 3	CONCENTRAÇÃO A S/N = 10
API	3,0 µg/ml	280	0,03 µg/ml	0,11 µg/ml
Impureza A	3,0 µg/ml	575	0,02 µg/ml	0,05 µg/ml
Impureza B	3,0 µg/ml	339	0,03 µg/ml	0,09 µg/ml
Impureza C	15,0 mg/ml	1622	0,03 µg/ml	0,09 µg/ml
Impureza D	3,0 µg/ml	318	0,03 µg/ml	0,09 µg/ml
Impureza F	2,0 µg/ml	188	0,03 µg/ml	0,11 µg/ml

Tabela 50 - Limite de detecção e limite de quantificação das impurezas do método analítico compostos relacionados teste 1.

PARÂMETRO	CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO	RESULTADOS DA VALIDAÇÃO	TABELA DE RESULTADOS
Limite de Detecção	S/N = 3:1 RSD ≤ 20%	(10%) RSD _{API} = 7,21% (5%) RSD _{IMP A} = 7,81% (5%) RSD _{IMP B} = 9,85% (2%) RSD _{IMP C} = 5,80% (10%) RSD _{IMP D} = 8,02% (10%) RSD _{IMP F} = 10,81%	Conforme. Tabela 91
Limite de Quantificação	S/N = 10:1 RSD ≤ 10%	(15%) RSD _{API} = 4,26% (10%) RSD _{IMP A} = 3,22% (10%) RSD _{IMP B} = 8,07% (5%) RSD _{IMP C} = 1,41% (15%) RSD _{IMP D} = 6,21% (15%) RSD _{IMP F} = 7,03	Conforme. Tabela 92

A gama de validação foi analisada para os níveis LOQ e 150% relativamente ao limite de especificação para cada impureza A, B, C, D e F e impurezas desconhecidas (determinados com o API), provando-se a repetibilidade para ambos os níveis na Tabela 51 (os resultados discriminados encontram-se no anexo B).

Tabela 51 - Resultados da gama de validação do método analítico compostos relacionados teste 1.

PARÂMETRO	CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO	RESULTADOS DA VALIDAÇÃO	TABELA DE RESULTADOS
Gama de validação	Para o nível baixo: RSD ≤ 10% Para o nível alto: RSD ≤ 5%	0,45 a 4,50 µg/ml para o API e impurezas D e F. 0,30 a 4,50 µg/ml para impurezas A e B. 0,75 a 22,50 µg/ml para impureza C.	Conforme. Tabela 93 a Tabela 98

O método mostrou-se linear para a gama de concentração validada: coeficiente de correlação superior a 0,99 e resíduos aleatoriamente distribuídos em torno do 0 para todos os compostos estudados (Anexo B, Tabela 99 a Tabela 104 e Figura 52 a Figura 63). Na Tabela 52 resumem-se os pontos críticos deste parâmetro. Comparando os coeficientes de correlação obtidos, a impureza C revelou ser aquela que obtém respostas mais linearmente correlacionadas com a concentração da sua solução (r_2 igual a 1,000).

Tabela 52 - Resultados da linearidade do método analítico compostos relacionados teste 1.

SUBSTÂNCIA	r_2	DECLIVE	ORDENADA NA ORIGEM (Y)	RESPOSTA MÉDIA AO NÍVEL 100% (AU)	IC _{95%}	%Y RELATIVAMENTE À RESPOSTA A 100%
Impurezas Desconhecidas	0,997	37049	-7804	102598	-16542 a 933	7,6%
Impureza A	0,997	46953	-8697	130429	-19091 a 1697	6,7%
Impureza B	0,996	32062	920	99392	-6928 a 8768	0,9%
Impureza C	1,000	39517	-5732	590465	-17903 a 6439	1,0%
Impureza D	0,998	32717	-6189	91116	-12647 a 269	6,8%
Impureza F	0,998	26485	-6637	71948	-11497 a -1777	9,2%

Os desvios das ordenadas na origem da regressão linear (Y) ao valor nulo devem-se à constante presença de ruído na deteção da amostra, sendo que o valor nulo, muito embora intuitivo e teórico, não seja uma realidade comum na prática, e não se obteve nenhum para as linearidades dos compostos relacionados teste 1.

As respostas médias à concentração 100% do LE para as impurezas A, B, D e F e impurezas desconhecidas correspondem à mesma concentração de impureza em solução (têm o mesmo LE). No entanto, a área do pico de impureza F a esta concentração diferencia-se

bastante das outras pois é mais baixa. Isto quer dizer que, embora a sua ordenada na origem esteja na mesma ordem de grandeza que a das outras impurezas, quando comparada com a área média do pico no LE obtém-se o valor de 9,2%, relativamente mais elevado que o valor obtido para as restantes impurezas mencionadas. Em contraste, a ordenada na origem mais próxima do 0 obteve-se para a linearidade da impureza B ($Y=920$).

No entanto, o intervalo de confiança a 95% é um fator mais intuitivo para avaliar este parâmetro. Para as impurezas A, B, C e D este intervalo inclui o valor 0, e apenas para a impureza F não acontece. Não coincidentemente, a impureza F também obteve o maior desvio da ordenada na origem ao valor nulo. Isto vem confirmar que, realmente, a linearidade da impureza F é aquela onde a regressão linear mais se afasta do valor teórico para a ordenada na origem. No entanto, este resultado não invalida a validação do método analítico de compostos relacionados teste 1 uma vez que não pertence aos critérios de aceitação.

Na Tabela 53 encontram-se os resultados obtidos para o fator de resposta relativo de cada impureza, determinados a partir dos declives das regressões lineares segundo a equação 18 (página 44). Como já vimos alguns indicadores na linearidade, nem todas as impurezas geram picos com a mesma área para concentrações iguais. A impureza F tinha uma resposta a 100% muito mais baixa que o API enquanto a resposta da impureza A era relativamente superior. Assim, tal como seria de esperar, esta discrepância vai se fazer notar na determinação dos fatores de resposta relativos.

As impurezas A e F têm um RRF de 1,3 e 0,7, respetivamente. Isto quer dizer que uma mesma concentração de impureza F e API gera um pico de impureza F 30% inferior ao pico de API. Estando fora do intervalo de aceitação, estes valores terão que ser considerados para a sua quantificação contra uma solução padrão de API.

Já para as impurezas B, C e D, o RRF é muito próximo de 1, pelo que a mesma concentração destas impurezas revela um pico com área semelhante à área do pico de API. Poder-se-á considerar o valor de 1, como indicado na Farmacopeia Europeia [46].

Contudo, como vimos no capítulo 3, há mais do que uma forma para determinar o fator de resposta relativo. Para além do quociente entre os declives das regressões lineares já mencionado, podem ainda determinar-se com base no fator de resposta médio obtido também durante o estudo da linearidade ou, quando este não é possível, o fator de resposta obtido apenas para o nível de 100% que é estudado, por exemplo, durante a repetibilidade do sistema. A Tabela 53 compara os valores de RRF determinados para as impurezas deste método destas 3 formas.

Numa rápida análise da Tabela 53 entende-se que as diferentes abordagens não produzem grandes diferenças nos resultados obtidos. Para as impurezas B, C e D a conclusão continuaria a ser a adopção do valor de RRF igual a 1.

Tabela 53 - Resultados do RRF do método analítico compostos relacionados teste 1.

SUBSTÂNCIA	DECLIVE	100% LE	RF MEDIO LINEARIDADE
Impureza A	1,3	1,3	1,2
Impureza B	0,9	0,9	0,9
Impureza C	1,1	1,2	1,2
Impureza D	0,9	0,9	0,9
Impureza F	0,7	0,5	0,7

Para as impurezas A e F os RRF obtidos seriam ligeiramente díspares. A determinação do RRF apenas à concentração de 100% do limite de especificação é menos verdadeira, isto porque, numa análise futura, as impurezas não estarão presentes na amostra a esta concentração. Considerando os fatores de resposta ou os declives da linearidade abrangerá toda a gama de validação, pelo que o RRF obtido será mais fidedigno. Assim, para a impureza A, o RRF varia entre 1,2 e 1,3 e para a impureza F mantém-se o valor 0,7.

O método provou ser exato para a gama de concentração validada, e os resultados obtidos encontram-se na Tabela 53. As soluções analisadas foram amostras simuladas sobrecarregadas com as impurezas no seu limite de especificação. Tal como referido anteriormente, a amostra de produto acabado contém as impurezas C e F, pelo que foi necessária a preparação de uma amostra não sobrecarregada para determinar o teor pré-existente destas impurezas na amostra. Este teor determinado (0,08% em impureza C e 0,06% em impureza F) foi considerado na sua quantificação nas amostras sobrecarregadas para uma análise mais exata.

Tabela 54 - Resultados da exatidão do método analítico compostos relacionados teste 1.

PARÂMETRO	CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO	RESULTADOS DA VALIDAÇÃO	TABELA DE RESULTADOS
Exatidão	Níveis 100 e 150%: 90% - 110% Níveis LOQ e 50%: 85% - 115% RSD entre amostras ≤ 10%	Para $n=12$ amostras: Rec. $API = 98,96\%$ Rec. $IMP A = 99,48\%$ Rec. $IMP B = 100,02\%$ Rec. $IMP C = 100,18\%$ Rec. $IMP D = 101,29\%$ Rec. $IMP F = 103,23\%$	Conforme. Tabela 106 Tabela 107 Tabela 108 Tabela 109 Tabela 110 Tabela 111

Os resultados médios obtidos variam entre 98,96% a 103,23%. Estes valores estão muito próximos do 100% e revelam uma exatidão excelente do método. No entanto, em termos de critérios de avaliação, é aos valores de recuperação de cada amostra individual a que estes de

que devem aplicar. No anexo B, na Tabela 106 a Tabela 111, podemos ver que para todas as amostras o método analítico provou ser exato.

Para a impureza C, o método revelou ser mais difícil de provar exato. Sendo esta a impureza com menor limite de quantificação, a pipetagem de um volume tão pequeno de solução *stock* de impureza C para 3 amostras independentes ao nível do LOQ resultou em amostras que, mesmo tendo o teor de impureza C dentro do critério de aceitação, o RSD entre amostras era superior a 10%. Foi necessário repetir a preparação e avaliação deste nível para a exatidão varias vezes até obter RSD dentro de especificação.

O estudo à estabilidade intra-diária revelou que a solução padrão mantém-se estável durante pelo menos 51 horas e a solução amostra durante pelo menos 44 horas (Tabela 53). No entanto, é necessário ter em atenção a instabilidade do produto acabado em solução. Como vemos na Figura 22, a altura do pico de impureza C aumenta na amostra 4 dias após ter sido preparada. A quantificação não deve, por isso, ser feita após a estabilidade validada da amostra pois induz em erro.

Tabela 55 - Resultados da estabilidade intradiária método analítico compostos relacionados teste 1.

PARÂMETRO	CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO	RESULTADOS DA VALIDAÇÃO	TABELA DE RESULTADOS
Estabilidade Intradiaária	Diferença em % da área do pico relativamente à área inicial $\leq 5\%$ Perfil de compostos relacionados deve ser semelhante	Solução padrão estável durante 51 horas a 5°C. Desvio individual/max = 1,11% Solução Amostra estável durante 44 horas a 5°C. Desvio individual/max = 2,04%	Conforme. Tabela 112 e Tabela 113

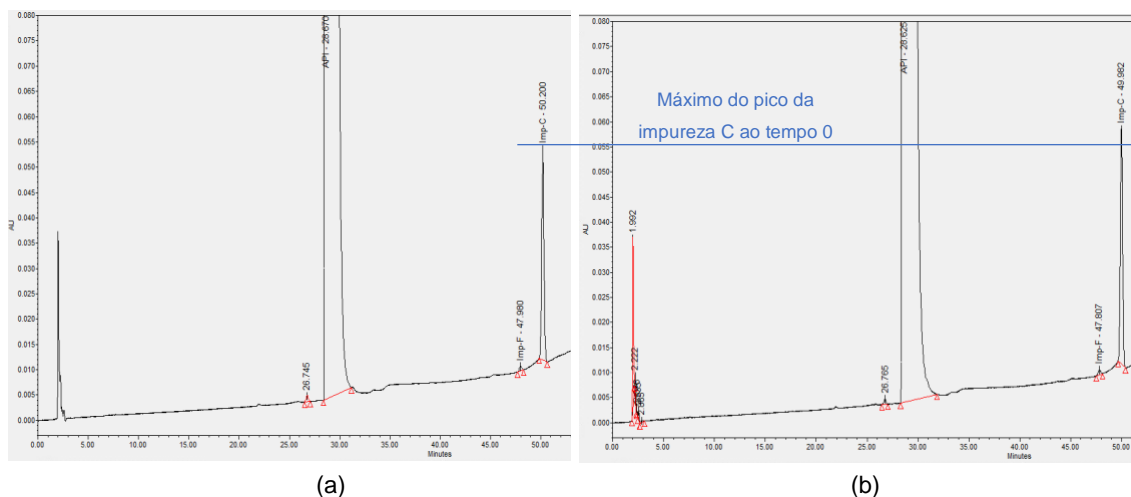


Figura 22 - Estabilidade da impureza C na solução amostra: (a) tempo 0 e (b) 4 dias depois.

De seguida, realizou-se a análise da robustez do método para as impurezas A, B, C e D. As amostras foram preparadas e analisadas no método nominal e, posteriormente, foram

analisadas novamente assumindo uma variação ao fluxo e à temperatura da coluna. Os resultados encontram-se na Tabela 56 (resultados primários no anexo B, Tabela 114 a Tabela 120).

Analisando estas tabelas e comparando os valores dos desvios absolutos da quantificação em sistema alterado com a quantificação no sistema nominal, é possível identificar que a maior sensibilidade do sistema é à temperatura da coluna. A variação do fluxo, embora altere o tempo de retenção dos picos (maior fluxo, menor tempo de retenção), não altera significativamente a quantificação das impurezas.

Para as impurezas A, B e C o maior desvio é provocado pelo aumento da temperatura da coluna, enquanto que para as impurezas D e F é a sua diminuição que resulta em maior diferença na quantificação.

Tabela 56 - Resumo dos resultados obtidos para a robustez do método analítico compostos relacionados teste 1.

CONDIÇÃO	DESVIO ABSOLUTO DO TEOR RECUPERADO ÀS CONDIÇÕES NOMINAIS (%)				
	IMPUREZA A	IMPUREZA B	IMPUREZA C	IMPUREZA D	IMPUREZA F
Condições Nominais	--	--	--	--	--
Fluxo -10%	1.40%	0.75%	-0.47%	0.35%	-0.63%
Fluxo +10%	1.00%	-0.12%	-0.01%	-2.10%	0.51%
Temperatura da coluna -15%	0.60%	0.09%	-0.84%	3.45%	-1.43%
Temperatura da coluna +15%	-2.25%	1.49%	2.00%	0.57%	0.92%
RSD entre todas as amostras	2.71%	1.52%	1.30%	2.07%	1.23%

Já o RSD entre os resultados das amostras de cada impureza para todas as condições diz-nos que a variação na quantificação das amostras não é sensível a pequenas alterações no sistema cromatográfico. Concluindo, o método mostrou ser robusto para as condições testadas.

5.3. Compostos Relacionados – Teste 2

A validação dos compostos relacionados teste 2, que é específico para a quantificação da impureza E, iniciou-se pela avaliação da estabilidade da impureza E em solução.

Comparou-se uma solução de impureza E ao limite de especificação analisada imediatamente após preparação com uma solução de impureza E que já estava preparada há 6 meses. Os cromatogramas estão apresentados na Figura 23 e é claramente visível a degradação da impureza E quando esta está em solução. Foi necessária esta consideração durante a validação do método analítico compostos relacionados teste 2, pelo que a solução de impureza E apenas foi utilizada para a determinação da repetibilidade do sistema e do fator de resposta. Os outros parâmetros foram estudados com soluções de API à concentração do limite de especificação da impureza E.

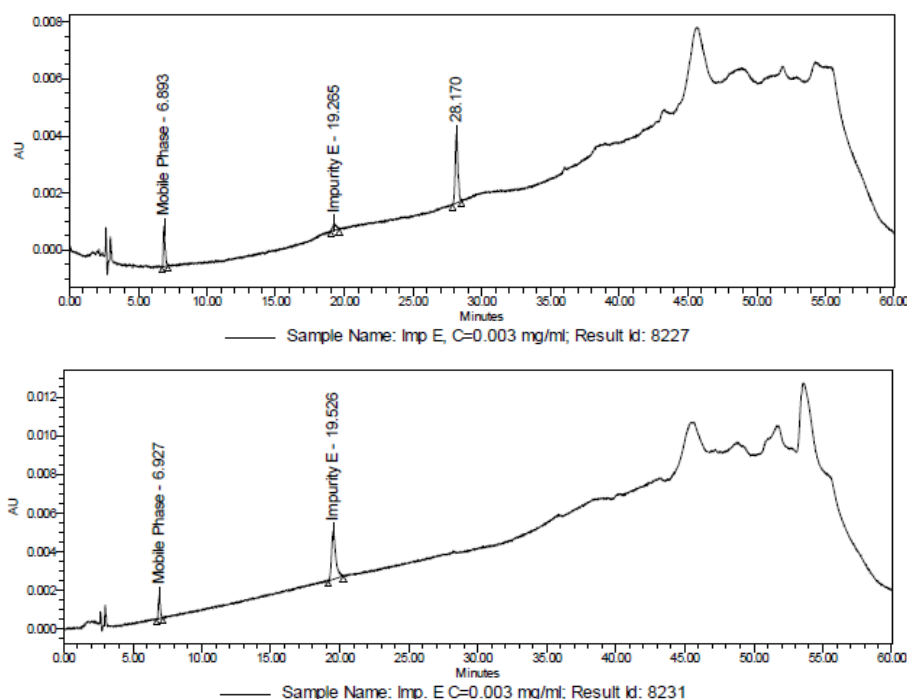


Figura 23 - Cromatogramas da solução de impureza E ao limite de especificação: preparada à 6 meses em cima e tempo 0 em baixo.

Seguindo para a análise da especificidade, garantiu-se resolução entre os picos de API e de impureza E e a ausência de outros picos (diluyente, placebo) que pudessem interferir com a quantificação da impureza E (anexo C, Figura 64 a Figura 74). Adicionalmente, determinou-se os tempos de retenção destes compostos na Tabela 57.

Tabela 57 - Tempo de retenção e RRT dos analitos do método de compostos relacionados teste 2.

SUBSTÂNCIA	RT (MINUTOS)	RRT
API	22,574	--
Impureza E	19,526	0,86

A precisão do método analítico para a quantificação da impureza E foi provada pela análise da repetibilidade do sistema, repetibilidade do método e precisão intermédia. Os resultados são apresentados na Tabela 58 e estão conforme os critérios de aceitação.

Da mesma forma que procedido para compostos relacionados teste 1, determinou-se o limite de deteção e o limite de quantificação segundo a abordagem sinal-ruído. Novamente, para obter repetibilidade do sistema segundo os critérios de aceitação foram necessários ajustes à concentração. Desta forma, obteve-se um limite de deteção de 12,5% e limite de quantificação de 25%, relativamente ao limite de especificação.

A gama de validação analisada para a impureza E foi 25% a 150% da concentração ao limite de especificação, para os quais foi provada repetibilidade do sistema.

Tabela 58 - Resultados da precisão, LD, LOQ e gama de validação do método analítico compostos relacionados teste 2.

PARÂMETRO	CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO	RESULTADOS DA VALIDAÇÃO	TABELA DE RESULTADOS
Repetibilidade do Sistema	RSD \leq 5,0%	RSD _{API} = 0,74% RSD _{IIMP E} = 1,26%	Conforme. Tabela 122
Repetibilidade do Método	Pelo Analista 1: RSD \leq 10,0%	RSD = 1,67%	Conforme. Tabela 123
Precisão Intermédia	Pelo Analista 2: RSD \leq 10,0% RSD \leq 15% entre analistas Diferença absoluta entre resultado médio dos 2 analistas \leq 10%	Set 2: RSD = 1,67% Entre sets: RSD = 2,37% Diferença absoluta entre resultado médio dos 2 analistas = 2,27%	Conforme. Tabela 124
Limite de Deteção	S/N = 3:1 RSD \leq 20%	DL = 12,5% (LE) RSD = 5,36%	Conforme. Tabela 125, Tabela 126
Limite de Quantificação	S/N = 10:1 RSD \leq 10%	LOQ = 25% (LE) RSD = 7,76%	Conforme. Tabela 127, Tabela 128
Gama de validação	Para o nível baixo: RSD \leq 10% Para o nível alto: RSD \leq 5%	RSD (nível baixo) = 7,76% RSD (nível alto) = 1,38%	Conforme. Tabela 131

De seguida, procedeu-se à análise da linearidade do método na gama de validação. Na Tabela 59 encontram-se os resultados médios obtidos para cada nível de concentração e a Figura

24 é a representação gráfica destes valores, onde podemos claramente observar a relação linear entre a concentração da solução em API e a área do pico ($r^2 = 0,998$).

À semelhança da linearidade para os compostos relacionados teste 1, a ordenada na origem não é 0. No entanto, é um valor muito pequeno (3%) quando comparado com a resposta a 100% da concentração (42805). Para além disso, o valor 0 pertence ao intervalo de confiança pelo que podemos justificar este desvio pela presença de ruído na deteção.

Sendo a relação entre a concentração e a área do pico linear, se a ordenada na origem fosse nula, então o declive corresponderia ao fator de resposta (equação 17 da página 43). Comparando os fatores de resposta determinados para cada nível da linearidade, constata-se que, de facto, estes valores são muito próximos do declive da regressão linear, mas não exatamente iguais devido ao desvio da ordenada na origem ao 0.

Tabela 59 - Resultados da linearidade do método analítico compostos relacionados teste 2.

NÍVEL CONCENTRAÇÃO (%)	CONCENTRAÇÃO DE API ($\mu\text{g}/\text{ML}$)	ÁREA MÉDIA (AU)	RSD (%)	FATOR DE RESPOSTA
25 (LOQ)	0.75	8960	9.57	11982
50	1.50	20024	5.11	13389
75	2.24	29546	2.07	13171
100	2.99	42805	2.50	14311
125	3.74	52230	1.83	13970
150	4.49	61599	1.59	13729

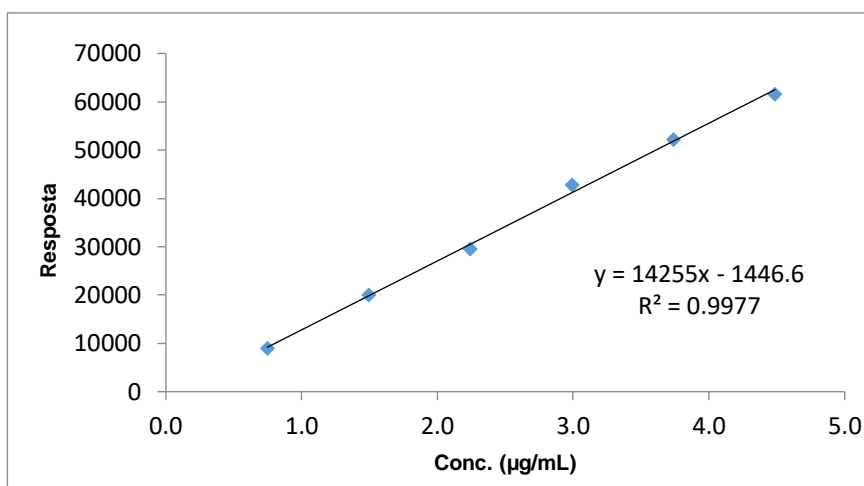


Figura 24 - Regressão linear ao API para a linearidade do método analítico compostos relacionados teste 2 considerando os valores médios obtidos.

Na Figura 25 estão representados os resíduos, que se observam estarem aleatoriamente dispersos em torno do 0. Estes encontram-se no intervalo $]-2000,2000[$, que é um valor

significativamente baixo quando comparado com a resposta obtida para o nível 100%, provando que os valores obtidos na experiência não derivam muito do valor teórico determinado pela regressão linear. Posto isto, fica provada a linearidade do método analítico compostos relacionados teste 2.

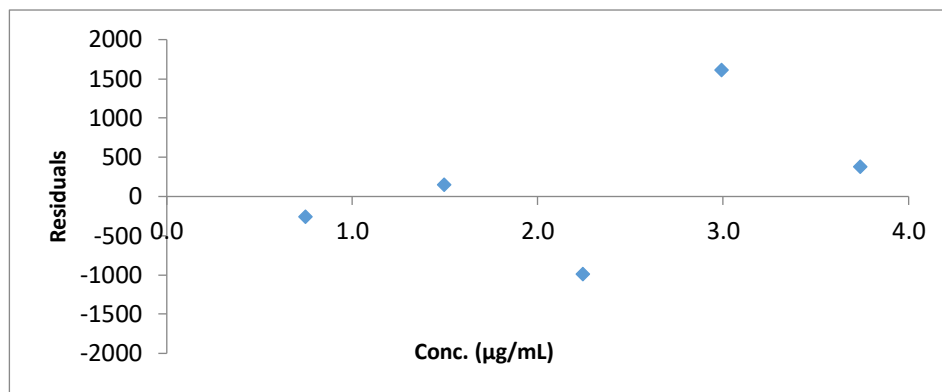


Figura 25 - Distribuição dos resíduos do método analítico compostos relacionados teste 2 considerando os valores médios obtidos.

No entanto, esta abordagem elimina a variabilidade do sistema. Para a linearidade, preparou-se uma solução para cada nível e injetou-se 3 vezes e, assim, é possível um tratamento dos dados primários obtidos diferente. Em vez de considerar os valores médios das respostas obtidas para cada nível, o gráfico área vs concentração e a dispersão dos resíduos podem ser representados tendo em conta as respostas individuais obtidas para as 3 injeções feitas de cada nível da linearidade. Em resultado obtém-se os gráficos representados na Figura 26 e Figura 27.

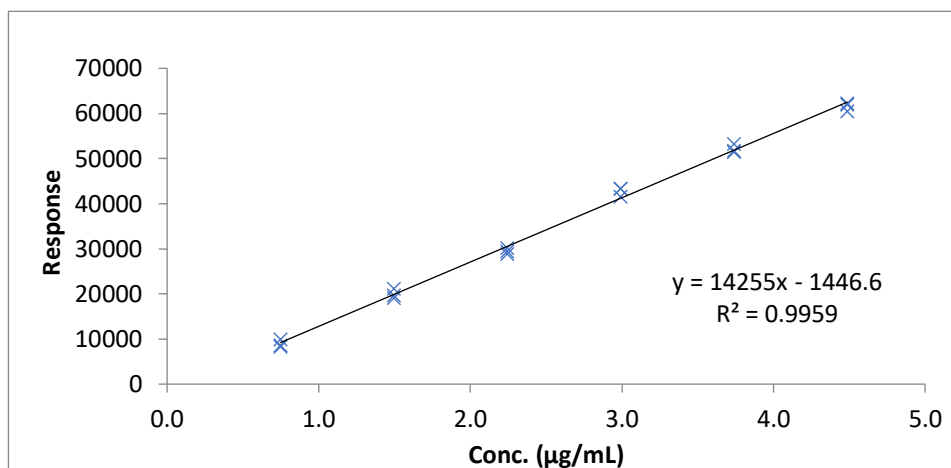


Figura 26 - Regressão linear ao API para a linearidade do método analítico compostos relacionados teste 2 considerando os valores individuais obtidos.

Esta abordagem acrescenta à análise a variabilidade do sistema na leitura da mesma amostra. Como se pode observar, neste caso, esta análise não tem grande impacto nos resultados, uma vez que o declive e a ordenada na origem se mantêm e o coeficiente de

correlação apenas diminui para 0,996, resultados que não mudariam a validação do método analítico. Esta situação vem corroborar a validação da repetibilidade do sistema: foi provado que a variabilidade do sistema não impactava os resultados significativamente uma vez que o RSD entre a resposta de 6 injeções de uma mesma solução se revelou abaixo do critério de aceitação.

Já na dispersão dos resíduos, este tratamento de dados permite, de uma forma imediata e ilustrativa, observar a variabilidade do sistema. O intervalo dos valores dos resíduos é agora maior,]-3000,3000[, uma vez que já não estamos a considerar os valores médios das respostas.

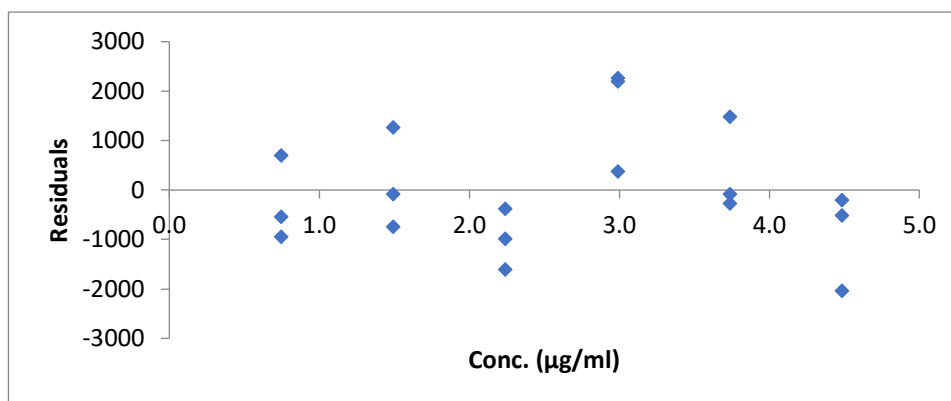


Figura 27 - Distribuição dos resíduos do método analítico compostos relacionados teste 2 considerando os valores individuais obtidos.

Este estudo só prova que o método é linear para as concentrações da gama de validação. Esta é a gama de concentrações que irá ser analisada ao longo da vida do medicamento, desde a menor concentração possível de quantificar de forma precisa e exata até 150% do limite de especificação é o intervalo em que a concentração da impureza E no produto acabado se espera encontrar. Para além deste intervalo, o produto estaria fora de especificação e a sua libertação não seria aprovada.

De seguida, determinou-se o fator de resposta relativo para a impureza E. Uma vez que não foi possível a realização da linearidade da impureza E, este foi determinado a partir do fator de resposta apenas para o nível de concentração 100% do limite de especificação (equação 20 da página 44). O resultado obtido foi de 0,98 e, estando dentro do intervalo 0,8-1,0 pode ser considerado o valor de 1, como indicado na monografia 2.2.46. da farmacopeia europeia.

Tabela 60 - Resultados do fator de resposta do método analítico compostos relacionados teste 2.

PARÂMETRO	CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO	RESULTADOS DA VALIDAÇÃO	TABELA DE RESULTADOS
Fator de Resposta Relativo	RRF no intervalo 0,8-1,2 deve ser considerado igual a 1.	RRF _{IMP E} = 0,98	Tabela 129

A Tabela 61 contém os resultados obtidos para a análise da exatidão e da estabilidade intra-diária da solução padrão a 5°C. O método provou ser exato na gama de validação e a amostra padrão é estável durante pelo menos 26 horas em condições refrigeradas.

Tabela 61 - Resultados da exatidão e da estabilidade intradiária da solução padrão do método analítico compostos relacionados teste 2.

PARÂMETRO	CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO	RESULTADOS DA VALIDAÇÃO	TABELA DE RESULTADOS
Exatidão	Níveis 100 e 150%: 90% - 110% Níveis LOQ e 50%: 85% - 115%	Para $n=12$ amostras: Rec. $API = 91,38\%$	Conforme. Tabela 130
Estabilidade Intradiaária	Diferença em % da área do pico relativamente à área inicial $\leq 5\%$ Perfil de compostos relacionados deve ser semelhante	Solução padrão estável durante 26 horas a 5°C. Desvio $individual/max = -5\%$	Conforme. Tabela 132
Robustez	RRT e RSD das áreas dos picos não devem diferir significativamente do método original. O perfil dos CRs deve permanecer similar.	Para a Impureza E: Desvio $individual/max = 0,01\%$ RSD $individual/max = 8,18\%$ RSD $Total\ sets = 5,62\%$	Conforme. Tabela 133 Tabela 62

Por último, fez-se a análise da robustez do método. As condições cromatográficas estudadas foram o fluxo, a temperatura da coluna e a composição da fase móvel em orgânico. Os resultados na Tabela 62 mostram que este método não tem sensibilidade a nenhuma destas variações, tendo sido obtido um desvio absoluto máximo relativamente à quantificação no método nominal de 0,01% para a diminuição do fluxo.

Tabela 62 - Resultados da robustez do método analítico compostos relacionados teste 2 para a impureza E - Amostra de Produto Acabado.

CONDIÇÃO	% IMPUREZA E (MÉDIA)	%RSD	RRT	DESVIO % ÀS CONDIÇÕES NOMINAIS
Condições Nominais	0.060%	8.18%	0.90	--
Fluxo -10%	0.065%	3.24%	0.90	0.01%
Fluxo +10%	0.061%	0.00%	0.90	0.00%
Temperatura da coluna -15%	0.058%	3.69%	0.89	0.00%
Temperatura da coluna +15%	0.058%	4.88%	0.90	0.00%
Composição em orgânico FM +20%	0.059%	0.00%	0.89	0.00%
Resultado Médio = 0.06%				
RSD = 5.62%				

O aumento do fluxo significa a mais rápida eluição dos compostos e para mostrar robustez no método o perfil de impurezas deve manter-se semelhante, isto é, o tempo de retenção relativo

e a resolução dos picos devem mostrar-se inalterados, significando a mesma qualidade de separação que aquela obtida para o método original. Como podemos ver na tabela, o RRT entre os picos de impureza E e de API manteve-se constante. Posto isto, podemos concluir que o método analítico mostrou ser robusto para as alterações introduzidas.

5.4. Pureza Stereoquímica

Tal como analisado em 3 Validação de Métodos Analíticos em HPLC, a separação de compostos enantioméricos requer uma abordagem especializada, pelo que foi utilizada, neste método analítico, uma coluna quiral pertencente à classe L41 segundo a classificação de enchimentos da USP (dimensões da coluna: 4,0x150mm, diâmetro do poro: 5 µm).

O método analítico de pureza stereoquímica tem como objetivo promover a separação do API do seu enantiómero e permitir a quantificação do último no produto acabado.

Em primeiro lugar, verificou-se que o método separa, de facto, estes compostos pela injeção de um padrão de referência de enantiómero que, na realidade, se trata de uma mistura racémica dos dois compostos (Figura 28). Esta amostra foi preparada para conter o enantiómero na sua concentração do limite de especificação e API na concentração nominal, de forma a estudar a resolução entre os picos no pior caso possível – quanto maior a concentração, mais larga a base do pico, diminuído a distância entre picos vizinhos e, com ela, a resolução entre eles. O tempo de retenção relativo do isómero é de 0,89 e a resolução é de 1,5.

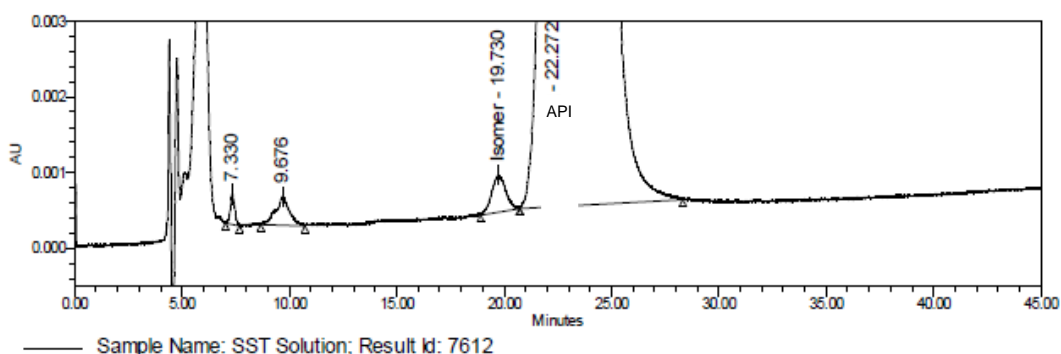


Figura 28 - Cromatograma da solução SST.

A análise uma amostra de produto acabado (Figura 29) permitiu verificar que esta não contém o isómero na sua composição.

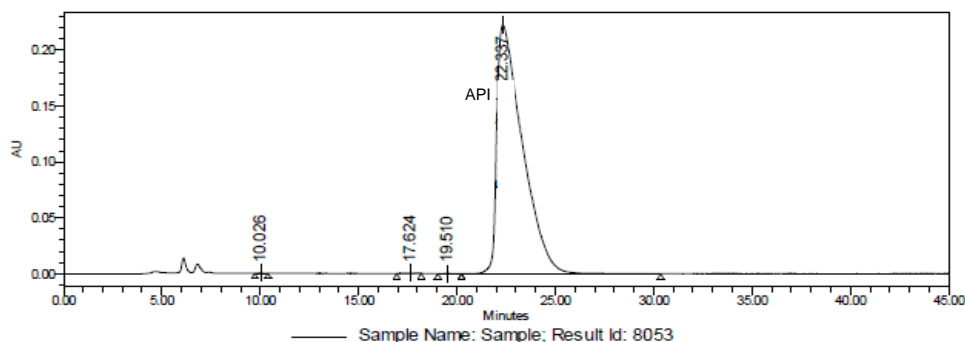


Figura 29 - Cromatograma da amostra de produto acabado (1.5 mg/ml).

Foram também estudados os cromatogramas de diluente, fase móvel, solução padrão e placebo (anexo D, Figura 75 a Figura 79) para provar a especificidade do método.

Devido à pouca e difícil disponibilidade deste padrão de referência de enantiómero, a validação deste método analítico será realizada utilizando o API como analito, excepto para o estudo dos parâmetros de repetibilidade do sistema e do fator de resposta relativo.

A Tabela 63 resume os resultados obtidos dos parâmetros analisados para a validação. O método analítico provou ser específico, preciso, linear e exato na gama de concentração 50% a 150% do limite de especificação do enantiómero (0,2% da concentração nominal).

O limite de deteção é de 12,5% e o limite de quantificação de 50% do limite de especificação do isómero, uma vez que foram as concentrações mais baixas onde foi possível provar a repetibilidade do sistema.

Tabela 63 - Resumo dos resultados da validação do método analítico pureza estereoquímica.

PARÂMETRO	CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO	RESULTADOS DA VALIDAÇÃO	TABELA DE RESULTADOS
Repetibilidade do Sistema	RSD \leq 5,0%	RSD _{API} = 1,80% RSD _{Isómero} = 1,87%	Conforme. Tabela 135
Repetibilidade do Método	Pelo Analista 1: RSD \leq 10,0%	RSD = 2,40%	Conforme. Tabela 136
Precisão Intermédia	Pelo Analista 2: RSD \leq 10,0% RSD \leq 15% entre analistas Diferença absoluta entre resultado médio dos 2 analistas \leq 10%	Set 2: RSD = 9,17% Entre sets: RSD = 7,45% Diferença absoluta entre resultado médio dos 2 analistas = 6,58%	Conforme. Tabela 137
Limite de Deteção	S/N = 3:1 RSD \leq 20%	DL = 12,5% RSD = 2,96%	Tabela 138 Tabela 139
Limite de Quantificação	S/N = 10:1 RSD \leq 10%	LOQ = 50% RSD = 2,66%	Tabela 140 Tabela 141
Linearidade	$r_2 \geq$ 0,99 Distribuição aleatória dos resíduos	- $r_2 =$ 0,999 - resíduos distribuídos aleatoriamente	Conforme. Tabela 142 Figura 80 Figura 81
Fator de Resposta Relativo	RRF no intervalo 0,8-1,2 deve ser considerado igual a 1.	RRF _{Isómero} = 0,83	Tabela 143
Exatidão	Níveis 100 e 150%: 90% - 110% Níveis LOQ e 50%: 85% - 115%	Para $n=9$ amostras: Rec. _{API} = 94,38%	Conforme. Tabela 144

Gama de validação	Para o nível baixo: RSD \leq 10% Para o nível alto: RSD \leq 5%	RSD (nível baixo) = 2,66% RSD (nível alto) = 2,60%	Conforme. Tabela 145
-------------------	--	---	-------------------------

O fator de resposta relativo obtido para o enantiómero foi de 0,83, o que significa que em análises futuras onde este vai ser quantificado contra um padrão de API pode ser assumido o valor de 1.

Adicionalmente, foi estudada a estabilidade intra-diária da solução padrão quando acondicionada a 5°C. Nestas condições, provou estar apta para padrão de quantificação durante pelo menos 90 horas (anexo D, Tabela 146).

Tabela 64 – Resultados da estabilidade intra-diária da validação do método analítico pureza estereoquímica.

PARÂMETRO	CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO	RESULTADOS DA VALIDAÇÃO	TABELA DE RESULTADOS
Estabilidade Intradária	Diferença em % da área do pico relativamente à área inicial \leq 5% Perfil de compostos relacionados deve ser semelhante	Solução padrão estável durante 90 horas a 5°C. Desvio individual/max = 4,9% Conforme.	Tabela 146

Por último, realizou-se o teste de robustez ao método alterando os parâmetros fluxo, temperatura da coluna, composição da fase móvel em orgânico e pH da fase móvel.

Na Tabela 65 apresentam-se os resultados obtidos. Em primeiro lugar, verifica-se que o teor recuperado de enantiómero nas amostras analisadas em condições normais e no método analítico alterado varia significativamente.

Tabela 65 - Resultados da robustez do método pureza estereoquímica - Amostra de Produto Acabado ($C_{API} = 0,3 \text{ mg/ml}$) sobrecarregada com isómero ($C_{isómero} = 0,0006 \text{ mg/ml}$)

CONDIÇÃO	% ENANTIÓMERO (MÉDIA)	%RSD	DESVIO RELATIVO % ÀS CONDIÇÕES NOMINAIS
Condições Nominais	0.11	4.56	-
Fluxo -35%	0.15	4.29	+36%
Fluxo +35%	0.09	0.77	-18%
Temperatura da coluna -5%	0.09	3.33	-18%
Temperatura da coluna +5%	0.03	2.05	-73%
Composição em orgânico da FM -8%	Não foi observada resolução entre picos de Isómero e API.		
Composição em orgânico da FM +8%	0.12	0.00	+9%
pH FM -5%	0.13	6.38	+18%
pH FM +5%	0.04	16.53	-64%
Resultado Médio = 0.10%			
RSD = 42.47%			

O aumento da composição em orgânico é a alteração introduzida ao método que tem menor impacto na quantificação do enantiómero na amostra, com um aumento de 9% no teor recuperado relativamente à quantificação no método original.

De seguida, o aumento do fluxo, a diminuição da temperatura da coluna e a diminuição do pH da fase móvel resultam num erro de cerca de 18% na quantificação do pico de enantiómero na amostra.

No entanto, o aumento da composição em orgânico da fase móvel teve como consequência a não separação dos picos de API e seu enantiómero, uma vez que estes se sobrepunham e a resolução entre eles foi inferior a 1.

No geral, a variação de qualquer condição do sistema cromatográfico original interfere com a quantificação do enantiómero. As diferenças visíveis na Tabela 65, para todas as alterações estudadas, devem-se à perturbação causada pela presença do pico de placebo entre os picos de enantiómero e API.

Por conseguinte, este método analítico provou ser muito sensível a alterações do sistema cromatográfico definido e validado.

5.5. Monitorização da Estabilidade

A monitorização da estabilidade foi realizada em amostras de produto acabado e, adicionalmente, em amostras de API e de placebo, para determinar a origem da degradação.

Para as amostras de API submetidas a degradação provocada pela luz, humidade e calor, foi necessário ter em conta o ganho ou perda de massa que ocorreu durante a exposição a estas condições. Por exemplo, para as amostras expostas a 85% de humidade relativa, o API foi pesado antes e depois e essa diferença foi considerada durante a sua pesagem para a preparação das amostras. Como absorveu humidade, foi necessário pesar uma quantidade superior de API para retirar a dose de API ácido livre desejada.

O anexo E contém os cromatogramas de todas as condições de degradação estudadas para as amostras de API e de produto acabado (Figura 82 a Figura 142). A quantificação de todas as impurezas presentes nos cromatogramas permitiu construir as tabelas do anexo E (Tabela 148 a Tabela 151) e realizar o balanço de massa resumido na Tabela 66 para o API e na Tabela 67 para o produto acabado.

O doseamento e os compostos relacionados teste 1 foram analisados em dois sets de amostras diferentes, pelo que os valores encontrados nas tabelas abaixo são, para estes compostos, o valor médio das duas análises. A impureza E e o isómero foram analisados apenas num set de amostras. Por lapso, a amostra do produto acabado degradada em condições de calor não foi analisada pelo sistema, pelo que o seu valor está ausente na tabela e não foi contabilizado no balanço de massa.

As amostras de placebo revelaram que este não degrada significativamente ou a pouca degradação visível não se dá na zona do cromatograma onde ocorre a quantificação das impurezas. O placebo, composto por moléculas mais pequenas, sai junto à frente de solvente, nos primeiros minutos após a injeção da amostra. A degradação que se vê nos cromatogramas, então, provém do API ou das impurezas deste.

O balanço de massa foi feito somando o doseamento com o teor em cada analito identificado pelo sistema nos métodos analíticos para a quantificação de impurezas.

Em primeiro lugar, analisemos a estabilidade das amostras de API. Na Tabela 66 observamos a alteração à composição da amostra consoante as condições de degradação à qual foi exposta. Podemos verificar que não só o API é degradado (doseamento) como também as impurezas F e E sofrem diminuição na sua concentração relativamente à amostra que não foi exposta a condições de *stress*. Para todos estes três compostos a maior degradação foi causada pela exposição ao calor.

Relativamente à degradação do API, é visível na tabela que as exposições ao calor, à hidrólise ácida e à oxidação resultaram na diminuição significativa do teor de API na amostra. Sob 80°C, 24 horas depois a amostra só continha 65% do API presente inicialmente, sendo que

a impureza C aumentou em 33%. A diferença reside na variabilidade das amostras e do sistema, revelado pelo desvio de 8% ao balanço de massa inicial, uma vez que as restantes impurezas não aumentaram significativamente.

Tabela 66 - Resultados médios dos dois ensaios da monitorização da estabilidade das amostras de API.

TEOR (%)	SEM DEGRADAÇÃO	LUZ	CALOR	HIDRÓLISE	HIDRÓLISE ÁCIDA	HIDRÓLISE BÁSICA	OXIDAÇÃO	HUMIDADE
Impureza C	0,221%	0,462%	33,452%	0,313%	22,985%	0,267%	0,402%	0,469%
Impureza D	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,106%	n.d.
Impureza F	0,049%	0,042%	0,035%	0,049%	0,041%	0,043%	0,045%	0,049%
Impureza E	0,089%	0,090%	0,051%	0,082%	0,037%	0,072%	0,089%	0,079%
Isómero	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Imp. Desc.	0,033%	0,079%	0,295%	0,082%	2,254%	0,030%	9,808%	0,054%
Total Imp.	0,391%	0,673%	33,833%	0,526%	25,316%	0,411%	10,449%	0,650%
Doseamento	107,42%	100,89%	65,89%	104,70%	76,39%	102,71%	85,05%	106,54%
Bal. Massa	107,8%	101,6%	99,7%	105,2%	101,7%	103,1%	95,5%	107,2%
Desvio	--	-6,5%	-8,1%	-2,6%	-6,1%	-4,7%	-12,3%	-0,6%

Quando foi exposta a hidrólise ácida durante 24 horas, a amostra reagiu de forma semelhante. O doseamento revelou teor em API de apenas 76% e a impureza C foi novamente aquela cuja concentração aumentou bastante. Para ambas estas condições, estes resultados seriam de esperar pois sabemos que o API é mais estável a temperaturas baixas e em pH alcalino, razão pela qual não se observa degradação significativa na amostra exposta à hidrólise básica.

Relativamente à impureza C, o seu teor na amostra subiu em todas as condições testadas, tendo sido o maior aumento observado quando a amostra foi exposta ao calor e à hidrólise básica. Este é um resultado direto da degradação do API a estas condições: o API degrada maioritariamente em impureza C.

Já na oxidação, o doseamento de API 24 horas depois é de 85%, mas a degradação foi maioritariamente em impurezas desconhecidas, cujo teor na amostra aumentou em quase 10%.

O impureza D, que não está presente na amostra “as is”, aparece apenas quando esta é submetida a hidrólise básica. Também na hidrólise básica foi observado o maior aumento da concentração em impurezas desconhecidas.

Analisando a evolução do teor da amostra de API em impurezas F e E, estas mantêm-se constantes ou então degradam, pelo que não se tratam de impurezas de degradação.

Por último, o isómero não foi detetado em nenhuma das amostras de API expostas às condições de degradação estudadas.

A monitorização da estabilidade do API realizada neste trabalho tem três erros associados. Em primeiro lugar, quando o API é exposto à luz, calor e humidade, a degradação pode não ser uniforme devido à distribuição do pó na caixa de tara. Quando se faz a pesagem para a preparação das amostras, a quantidade pesada para duas amostras diferentes pode não conter o mesmo grau de degradação, havendo assim divergência entre amostras.

Em segundo lugar, não foi contabilizada a pureza em base anidra do API para a sua quantificação, ignorando assim a composição em água inerente à matéria-prima.

Por último, as amostras foram analisadas nos métodos analíticos de produto acabado e não nos métodos analíticos especificamente desenhados e validados para a quantificação de compostos na matéria-prima.

O conjunto destes incorre num erro de quantificação capaz de justificar o elevado doseamento e, conseqüentemente, elevado balanço de massa que foram obtidos.

No entanto, é importante a monitorização da estabilidade do API para comparar com a degradação do produto acabado e tirar conclusões sobre a estabilidade.

Na Tabela 67 encontra-se o balanço de massa realizado para os resultados obtidos da monitorização da estabilidade do produto acabado.

Em primeiro lugar, observamos que o balanço de massa se encontra dentro do critério de aceitação do doseamento para produto acabado: 95% - 105% (Tabela 13). A maior diferença ao balanço de massa da amostra sem degradação foi a hidrólise básica, para o qual se obteve um total de 95,69%, que ainda se encontra dentro do intervalo mencionado.

Tabela 67 - Resultados médios dos dois ensaios da monitorização da estabilidade das amostras de produto acabado.

TEOR (%)	SEM DEGRADAÇÃO	LUZ	CALOR	HIDRÓLISE	HIDRÓLISE ÁCIDA	HIDRÓLISE BÁSICA	OXIDAÇÃO	HUMIDADE
Impureza C	0,237%	0,301%	25,672%	0,300%	24,118%	0,306%	0,366%	0,406%
Impureza D	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,016%	n.d.
Impureza F	0,051%	0,046%	0,046%	0,046%	0,037%	0,048%	0,045%	0,052%
Impureza E	0,092%	0,088%	--	0,092%	0,037%	0,078%	0,081%	0,081%
Isómero	n.d.	0,162%	0,139%	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Imp. Desc.	0,030%	0,032%	0,756%	0,033%	2,273%	0,044%	10,389%	0,099%
Total Imp.	0,410%	0,466%	26,474%	0,470%	26,465%	0,475%	10,921%	0,638%
Doseamento	104,3%	103,0%	74,0%	103,9%	75,3%	101,4%	84,8%	102,3%
Bal. Massa	104,7%	103,7%	100,6%	104,4%	101,8%	101,8%	95,7%	102,9%
Desvio	--	-1,0%	-4,0%	-0,3%	-2,90%	-2,9%	-9,0%	-1,8%

Tal como para o API, a impureza C é uma impureza de degradação que aparece em todas as condições introduzidas ao produto acabado, sendo o calor e a hidrólise ácida aquelas que

induzem mais o seu crescimento. Para o calor, podemos verificar que há um acréscimo de cerca de 25% no teor em impureza C na amostra, enquanto o doseamento de API diminui 30%. 0,8% degradaram em impurezas desconhecidas e isómero e os restantes 4% devem-se à precisão do método analítico, razão pela qual é estabelecido um intervalo de doseamento aceitável (que podemos ver no desvio absoluto ao balanço de massa inicial).

A degradação do API relativamente à amostra “as is” quando exposta à hidrólise em ácido clorídrico é semelhante ao que acontece quando exposta ao calor. Cerca de 30% do API degrada, há um crescimento em impureza C de 24%, mas repare-se que ocorre também degradação das impurezas E e F, não se detetou a presença de isómero e o crescimento em impurezas desconhecidas foi superior quando comparado com a degradação induzida pelo calor.

De forma semelhante àquilo que se verificou na degradação da substância ativa, as impurezas E e F não são impurezas de degradação, dado que o seu teor mantêm-se ou então diminui quando a amostra exposta a condições de degradação forçada.

De entre as outras condições testadas, aquela que sobressai é a degradação por oxidação. A degradação é principalmente do API (cerca de 20%) em impurezas desconhecidas, embora as impurezas F e E também degradem e o teor em impureza C na amostra aumente ligeiramente. A oxidação provoca então o aparecimento de um leque de impurezas desconhecidas superior a qualquer outra degradação estudada perceptível também quando analisando o cromatograma da amostra (Figura 30). No entanto, e como é visível no cromatograma em baixo, estas não interferem com a quantificação dos analitos. Adicionalmente, pode-se observar no cromatograma o pico de degradação do placebo (tempo de retenção de 3 minutos).

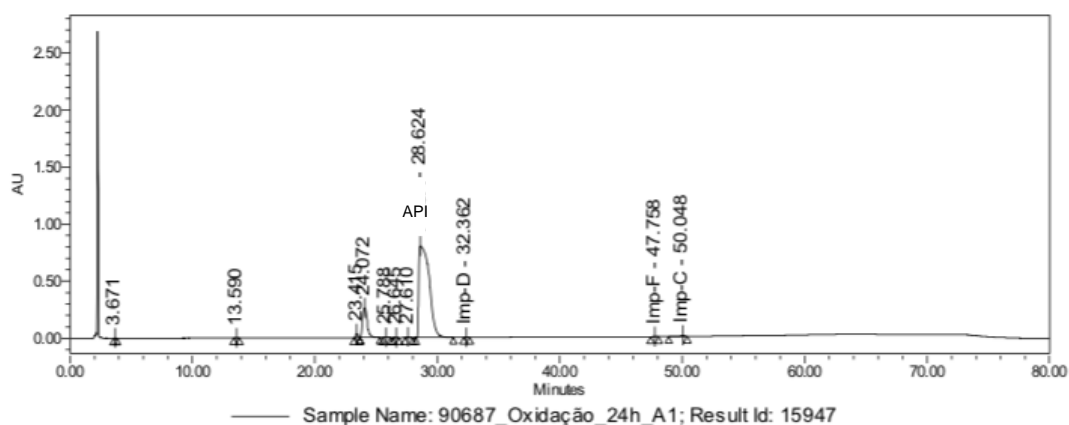


Figura 30 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a oxidação – compostos relacionados teste 1.

Comparando os resultados da exposição da amostra de API e de produto acabado às condições de hidrólise e de humidade, verifica-se que são ligeiramente diferentes, mas em ambos há crescimento de teor em impureza C e o doseamento obtido é muito próximo. Embora a degradação da amostra seja então semelhante, deve-se ter em conta que o tempo de

exposição à hidrólise é de 24 horas enquanto que para a humidade são 7 dias. Daqui podemos concluir que o contacto direto com a água induz maior grau de degradação na amostra, tal como seria de esperar.

Tomando atenção agora ao isómero, pode ver-se que este só surge na amostra de produto acabado quando esta é exposta ao calor e à luz. Uma vez que, durante a exposição à luz no equipamento Suntest, a temperatura na câmara aumenta, é uma possibilidade que o aparecimento de isómero nesta amostra tenha origem no calor.

Desta forma, o método analítico para a quantificação da impureza estereoquímica que foi validado terá de ser considerado em todas as análises de produto acabado enquanto este for libertado para comercialização. Caso o isómero não fosse detetado em condição alguma, o método deixaria de constar no procedimento analítico, uma vez que este analito não está presente no produto acabado nem no pior caso possível de degradação.

Para o estudo da estabilidade do produto acabado, é clara uma variabilidade entre os resultados – balanço de massa. Uma vez que se trata de um medicamento injetável, a preparação de cada amostra faz-se a partir de um *vial* de produto acabado individual, ao contrário do que se faz, por exemplo, em comprimidos, onde se considera uma amostra média de produto. Este modo de proceder adiciona à análise a variabilidade do processo de produção, especificamente o enchimento dos *vials*.

Assim, podemos detetar a semelhança que existe entre as degradações que ocorrem na amostra de API e na amostra de produto acabado. As condições que provocam maior degradação são as mesmas e, adicionalmente, o grau de degradação do API é muito semelhante entre as duas formas farmacêuticas.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS DE TRABALHO FUTURO

Em primeiro lugar, a identificação permitiu confirmar a identidade do API presente no produto acabado como sendo o desejado por comparação do seu tempo de retenção e espectro de absorção nesta amostra e numa solução de padrão de referência. No método analítico de doseamento, o tempo de retenção do API é de 4,3 minutos.

De seguida, são importantes algumas considerações a ter durante o procedimento. De forma a obter uma quantificação verdadeira da amostra, nos métodos analíticos de quantificação de compostos relacionados de produto acabado devem constar avisos para a quantificação das impurezas C e E, respetivamente. A impureza C porque é uma impureza de degradação quando o API é submetido a temperaturas elevadas e pH ácido e a impureza E uma vez que degrada quando está em solução, pelo que a análise deve ser realizada imediatamente após a preparação das amostras.

Para o doseamento, a gama de concentrações validada foi de 50% a 150% da concentração nominal do método. Nesta gama de validação, provou-se repetibilidade do sistema (RSD=0,63%), repetibilidade do método (RSD=0,39%), precisão intermédia (RSD entre sets=0,93%), linearidade ($r_2=1,000$) e exatidão (recuperação entre 100,85% e 101,51%) dos resultados reproduzidos pelo método.

A repetibilidade obtida para as impurezas aumenta com a variabilidade associada, isto é, o maior RSD é obtido para a precisão do sistema, que o considera o maior número de pontos de origem de variabilidade. Isto pode ser observado para a análise da precisão de todas as impurezas estudadas.

Para as impurezas A e F obteve-se um fator de resposta relativo de 1,3 e 0,7, respetivamente, pelo que estes valores devem ser considerados quando, na análise de produto acabado para validação do processo de fabrico, estudo de estabilidade e libertação de lotes forem quantificadas contra solução padrão de API. No entanto, a impureza A não foi detetada em nenhuma amostra de API ou de produto acabado analisada, inclusive não se trata de uma impureza de degradação, como foi visto no estudo de monitorização da estabilidade, pelo que

não se espera a sua presença em qualquer análise futura. Para as restantes impurezas e isómero admite-se o valor de 1, conforme esclarecido na farmacopeia europeia.

Os limites de deteção e de quantificação revelaram-se diferentes para cada impureza, incluído as impurezas A, B, C, D e F que são quantificadas pelo mesmo método. As impurezas D e F e impurezas desconhecidas precisam de estar presentes numa amostra de produto acabado à concentração de 15% do limite de especificação e as impurezas A e B a apenas 10% para que a sua quantificação seja possível de realizar de forma precisa e exata. Já a impureza C tem limite de quantificação de apenas 5%.

Para as impurezas E e o enantiómero, os limites de quantificação validados foram 25% e 50% do limite de especificação, respetivamente. Superiores quando comparados com os limites de quantificação obtidos para as restantes impurezas, os métodos analíticos só provaram repetibilidade do sistema a esta concentração.

A gama de validação para as impurezas foi de LOQ a 150% e mostrou ser específica, precisa, exata e linear (r_2 entre 0,996 e 1,000).

A linearidade é um parâmetro que pode ser abordado de várias formas diferentes e onde há mais liberdade, para o responsável do desenvolvimento do método analítico, de definir quais os parâmetros críticos e os seus critérios de aceitação para a validação do método. Internamente, a Tecnimede decidiu a abordagem aqui tomada mas, como foi analisado para o caso de estudo compostos relacionados teste 2, outras são possíveis. Neste caso, os resultados obtidos não alteram o resultado de validação do método analítico, uma vez que o declive (14255) e a ordenada na origem (-1446,6) se mantiveram iguais, embora tenham permitido uma análise mais extensa do sistema cromatográfico. A análise realizada considerando os valores médios das respostas obteve uma regressão linear com coeficiente de correlação de 0,998 enquanto para os valores individuais foi ligeiramente mais baixo: 0,996.

O estudo dos parâmetros de validação permite concluir que os métodos analíticos de doseamento, compostos relacionados teste 1 e teste 2 e pureza estereoquímica provaram ser específicos, precisos, exatos e lineares para quantificar o API, as impurezas A, B, C, D e F e o isómero do produto acabado estudado neste trabalho.

De forma complementar, foi feito o estudo da robustez dos métodos analíticos. Foram analisadas alterações ao fluxo, temperatura da coluna e composição da fase móvel do sistema cromatográfico. O doseamento e os compostos relacionados teste 1 e teste 2 provaram não ser sensíveis às alterações introduzidas, obtendo-se quantificações de analitos muito semelhantes em todos os sistemas cromatográficos considerados.

No entanto, o mesmo não se observou para o método analítico de quantificação do enantiómeros do API. Qualquer alteração introduzida ao método analítico provocou interferência na quantificação de enantiómero, uma vez que a resolução do seu pico diminuiu. Isto foi originado pela presença do pico de placebo entre os picos de enantiómero e de API, resultado em

diferenças no teor detetado de +36%, -64% e -73% relativamente ao teor determinado na amostra analisada com o método original, para a diminuição do fluxo, aumento do pH da fase móvel e aumento da temperatura da coluna, respetivamente.

O pior caso estudado foi a diminuição do teor em orgânico da fase móvel, que eliminou a resolução entre os picos destes dois compostos, saindo sobrepostos. Com isto podemos concluir que o método é extremamente sensível e os pontos críticos são o fluxo, a temperatura da coluna e a composição em orgânico e o pH da fase móvel, pelo que é necessário colocar a nota de atenção no procedimento analítico: a preparação das fases móveis e o método instrumental para a análise desta impureza devem ser feitas com especial cuidado a estes parâmetros.

A grande diferença de um método analítico de um medicamento injetável para um medicamento de administração oral, por exemplo, é o procedimento a ter e a percursão que este tem nos resultados. Quando se manipulam comprimidos, a prática seria considerar uma amostra média a partir da qual se preparam as amostras, por trituração e mistura de um grupo representativo do produto. Quando não se considera esta amostra média, como foi o caso neste trabalho, principalmente devido à elevada higroscopicidade do produto acabado, os resultados estão sujeitos a qualquer variabilidade que possa existir entre cada *vial*, derivado do processo de produção.

Durante o estudo da monitorização da estabilidade, as maiores degradações de API verificadas ocorreram na exposição de uma amostra de produto acabado ou substância ativa ao calor e a hidrólise ácida, onde cerca de 30% do API se degrada, principalmente em impureza C e em impurezas desconhecidas. Estes resultados eram esperados devido à instabilidade do API a pH ácidos e temperaturas elevadas.

Foi demonstrado que a concentração de impureza C aumenta, 33% na amostra de API e em cerca de 25% na amostra de produto acabado, quando submetidas a condições extremas de calor. Quando na presença de pH muito baixos, o teor em impureza C, devido à degradação do API, cresce cerca de 22% e 24% na amostra de substância ativa e produto acabado, respetivamente.

A oxidação foi a outra condição de *stress* que se destacou, uma vez que provocou a degradação de cerca de 20% do API presente em ambas as amostras de substância ativa e de produto acabado. O resultado desta degradação, semelhante em ambas as amostras, vê-se maioritariamente no aumento de cerca de 10% do teor em impurezas desconhecidas e no aparecimento da impureza D. Não havendo diferença significativa na presença das restantes impurezas conhecidas, a diferença (os restantes 10% do balaço de massa) deve-se à variabilidade inerente ao sistema na análise das amostras e do processo no enchimento dos *vials*.

As impurezas F e E não são impurezas de degradação, uma vez o seu teor na amostra não aumentou em nenhuma das condições de *stress* que foram estudadas. Pelo contrário, estas

impurezas degradam e, similarmente ao API, as condições mais sensíveis são a elevada temperatura e o pH ácido, para ambos a substância ativa e o produto acabado.

O estudo da monitorização da estabilidade mostrou similaridade na forma como as amostras de API e de produto acabado degradam, implicando que a forma farmacêutica do produto acabado não fornece proteção extra ou confere estabilidade ao API, mas que também não promove um maior grau de degradação.

Adicionalmente, podemos concluir que os métodos analíticos de doseamento e compostos relacionados aqui estudados para a análise do medicamento injetável em estudo são válidos como indicadores de estabilidade: são capazes de detetar diminuição no doseamento e aumento nas impurezas e obter um balanço de massa coerente.

Este trabalho pode ser completado estudando outros fatores que esclareceriam dúvidas e erros que aqui surgiram.

Em primeiro lugar, o estudo da robustez do método analítico para a quantificação do enantiómero pode ser feito considerando variações do sistema cromatográfico menos significativas, isto é, não tão distantes do parâmetro original, de forma a verificar o grau de sensibilidade do método aos pontos críticos.

Para todos os métodos analíticos, pode ainda ser estudada a separação promovida por uma outra coluna que não a indicada no método, que seja equivalente segundo a listagem de enchimentos de colunas da USP e até estudando pequenas variações nas suas dimensões. A sensibilidade das impurezas dos compostos relacionados teste 1 ao pH da fase móvel não foi aqui estudado, mas representa um fator interessante para o estudo da robustez.

Por último, um ensaio de discriminação pode ser realizado para detetar a interferência que a impureza E e o isómero têm no doseamento, uma vez que o seus tempos de retenção neste método analítico são o mesmo que o tempo de retenção do API. Dado que sabemos que o produto acabado não contém o enantiómero na sua composição, este não é crítico. No entanto, a amostra contém, de facto, a impureza E e seria importante perceber se este está a impactar de alguma forma o doseamento do produto acabado.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Tecnimede, “Grupo Tecnimede,” [Online]. Available: <https://www.tecnimede.com>. [Accessed 29 Março 2019].
- [2] Global Find, “Tecnimede Na Rota Da Investigação,” *Portugal Global*, vol. 39, no. Empresas, pp. 16-17, Novembro 2011.
- [3] J. Conceição, J.R. Pita, M. Estanqueiro, J.S. Lobo, “As farmacopeias portuguesas e saúde pública,” in *Acta Farmacêutica Portuguesa*, 2014, pp. 47-65.
- [4] Serviço Nacional de Saúde, “Infarmed - Apresentação,” [Online]. Available: <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/apresentacao>. [Accessed Abril 2019].
- [5] European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare, “Council of Europe - Background and Mission,” [Online]. Available: <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-background-50.html>. [Accessed Abril 2019].
- [6] MSD, “Concepção e desenvolvimento de medicamentos,” [Online]. Available: <https://www.msmanuals.com/pt-pt/casa/medicamentos/considerações-gerais-sobre-medicamentos/concepção-e-desenvolvimento-de-medicamentos>. [Accessed Abril 2019].
- [7] Sean Williams, on The Motley Fool, “The Drug Development Process: 9 Steps From the Laboratory to Your Medicine Cabinet,” 3 Janeiro 2015. [Online]. Available: <https://www.fool.com/investing/general/2015/01/03/the-drug-development-process-9-steps-from-the-labo.aspx>. [Accessed Abr 2019].
- [8] Apifarma, “Quanto custa desenvolver um medicamento,” 22 Fevereiro 2016. [Online]. Available: <https://www.apifarma.pt/salaimprensa/Infografias/Paginas/Quanto-custa-desenvolver-um-medicamento.aspx>. [Accessed Abril 2019].
- [9] R. Minas, “Regulamentação Farmacêutica na garantia da qualidade, eficácia e segurança dos medicamentos genéricos,” Colégio de Especialidade de Assuntos Regulamentares, Ordem dos Farmacêuticos, Setembro 2004.

- [10] Ministério da Saúde, “Decreto-Lei nº291/98, páginas 4812-4813,” 17 Setembro 1998. [Online]. Available: <https://data.dre.pt/eli/decllei/291/1998/09/17/p/dre/pt/html>.
- [11] Infarmed - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P., Outubro 2015. [Online].
Available:
http://www.infarmed.pt/documents/15786/1410451/MG_Maxima_Confianca_Outubro_2015.pdf/065d93db-311b-4bab-81e7-f0d8813624ab. [Accessed Abril 2019].
- [12] U. S. Food & Drug Administration (FDA), “What's involved in reviewing and approving generic drug applications?,” [Online]. Available: <https://www.fda.gov/drugs/generic-drugs/what-approval-process-generic-drugs>. [Accessed Abril 2019].
- [13] Farmacias Portuguesas, “O que é um medicamento genérico?,” [Online]. Available: <https://www.farmaciasportuguesas.pt/menu-principal/bem-estar/o-que-e-um-medicamento-generico.html>. [Accessed Abril 2019].
- [16] Susana Garcia-Recio and Pedro Gascón, “Biological and Pharmacological Aspects of the NK1-Receptor,” *BioMed Research International*, Abril 2015.
- [18] M. A. Ibrahim and C. V. Preuss., “Antiemetic Neurokinin-1 Receptor Blockers,” Janeiro 2019. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470394/>.
- [20] Jennifer Le, MSD Manual, “Drug Bioavailability,” Maio 2019. [Online].
Available: <https://www.msdmanuals.com/professional/clinical-pharmacology/pharmacokinetics/drug-bioavailability>. [Accessed Setembro 2019].
- [21] Merck Millipore, “Meglumine Active Pharmaceutical Ingredient - Meglumine - A Counterion in API Grade,” [Online].
Available: <http://www.merckmillipore.com/PT/en/products/small-molecule-pharmaceuticals/api-synthesis/salt-screening/meglumine/t9ub.qB.pzwAAAFANOIkiQpx,nav?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F>. [Accessed Agosto 2019].

- [22] European Medicines Agency (EMA), "Assessment Report for Ivemed," London, UK, 2008.
- [28] Raymond C Rowe, Paul J Sheskey and Siân C Owen., Handbook of Pharmaceutical Excipients, Fifth Edition, London: Pharmaceutical Press, Publications division of the Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, 2006.
- [29] SP Scientific, "Upgraded Virtis AdVantage Plus Laboratory Benchtop Freeze Dryer," 22 Julho 2011. [Online].
Available:
https://www.spscientific.com/News/Upgraded_Virtis_AdVantage_Plus_Laboratory_Benchtop_Freeze_Dryer/. [Accessed Julho 2019].
- [30] Bisht Deepak, Dr. Zeenat Iqbal, Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Jamia Hamdard, New Delhi – 110062, India., "Lyophilization - Process and Optimization for Pharmaceuticals," *International Journal of Drug Regulatory Affairs*, Vols. 2321 - 6794, pp. 30-40, 2015.
- [31] John Barley, SP Scientific., "Basic Principles of Freeze Drying," [Online]. Available: <https://www.spscientific.com/freeze-drying-lyophilization-basics/>. [Accessed Julho 2019].
- [32] Pierre Verlhac, ResearchGate, "Étude et optimisation des cycles de lyophilisation d'une souche probiotique modèle," Março 2019. [Online]. Available: https://www.researchgate.net/figure/Representation-de-levolution-de-la-temperature-produit-la-temperature-detagere-et-de_fig7_332406694. [Accessed Julho 2019].
- [33] ICH Harmonised Tripartite Guideline, "Validation of Analytical procedures: Text and Methodology Q2(R1)," 2005 Novembro.
- [34] "United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 41-NF 36). Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention; 2016.," 2019. [Online]. Available: <https://login.usp.org/cas/login?service=http%3A%2F%2Fonline.uspnf.com%2Fcas%2Flogin>. [Accessed Agosto 2019].

- [35] Coucil of Europe, *European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 9th Edition*, Janeiro 2017.
- [36] Waters The Science of What's Possible, "How Does High Performance Liquid Chromatography Work?," [Online].
Available: https://www.waters.com/waters/en_US/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?locale=en_US&cid=10049055. [Accessed Junho 2019].
- [37] Laboratory Info, "High Performance Liquid Chromatography (HPLC): Principle, Types, Instrumentation and Applications," 2019 Janeiro 2019. [Online]. Available: <https://laboratoryinfo.com/hplc/>. [Accessed Setembro 2019].
- [38] Council of Europe, "2.2.29. Liquid Chromatography," in *European Pharmacopeia 9.6*, 2019, pp. 5822-5823.
- [39] www.chromacademy.com, "Reversed Phase Chromatography," [Online]. [Accessed 2019].
- [40] Crawford Scientific, LC&GC's CHROMacademy, "Reversed Phase Chromatography," [Online]. Available: www.chromacademy.com. [Accessed Agosto 2019].
- [41] Waters - The Science of What's Possible, "Continuing the Legacy of HPLC Column Performance," 2014-16. [Online].
Available: <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720003995en.pdf>. [Accessed 2019].
- [42] Merck, "Chiral Chromatography Frequently Asked Questions," [Online]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytical/chiral-chromatography/faq.html>. [Accessed Agosto 2019].
- [46] Council of Europe, "2.2.46. Chromatographic Separation Techniques," in *European Pharmacopeia 9.2*, 2019, pp. 4286-4293.
- [47] "<621> Chromatography," in *USP 37*, pp. 1-7.
- [48] John W. Dolan, BASi Northwest Laboratory, McMinnville, Oregon, USA., "System Suitability," vol. 17(6)328–332, no. LC Troubleshooting - GC Europe, pp. 2-4, 2004.

- [49] ICH Harmonised Tripartite Guideline, "Impurities in New Drug Products Q3B(R2)," 2006 Junho.
- [50] "Validation of Analytical Methods - Strategies & Significance," *International Journal of Research and Development in Pharmacy and Life Sciences*, vol. 4, no. 3, pp. 1489-1497, 2015.
- [51] Shabir, Ghulam A., "Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the ICH," *Journal of Chromatography A*, vol. 987, pp. 57-66, 2003.
- [52] "Validation of Analytical Methods - Strategies & Importance," *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol. 2, no. 3, pp. 18-22, 2010.
- [53] Ana M. Lobo, M. Manuela A. Pereira e Ana Lourenço, *Química Orgânica A*, Monte da Caparica: Faculdade de Ciências e Tecnologia Universidade Nova de Lisboa, Departamento de Química, 2011.

ANEXO A - Resultados da validação dos métodos analíticos

Identificação e Doseamento

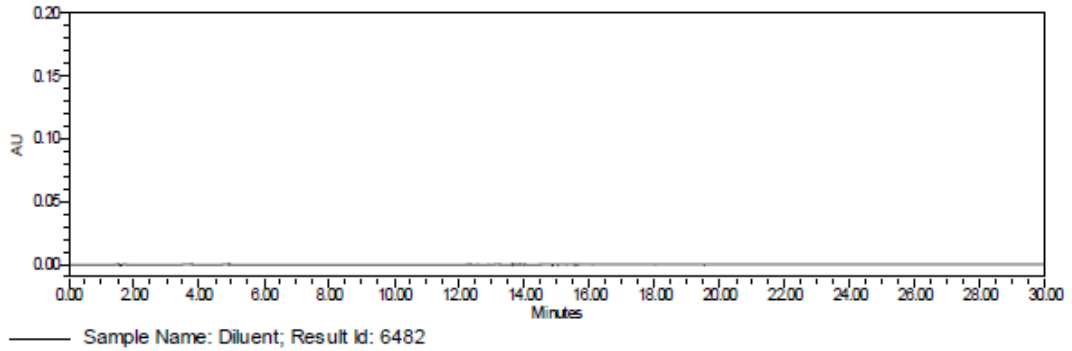


Figura 31 - Cromatograma do diluente (ACN:H₂O, 1:1)

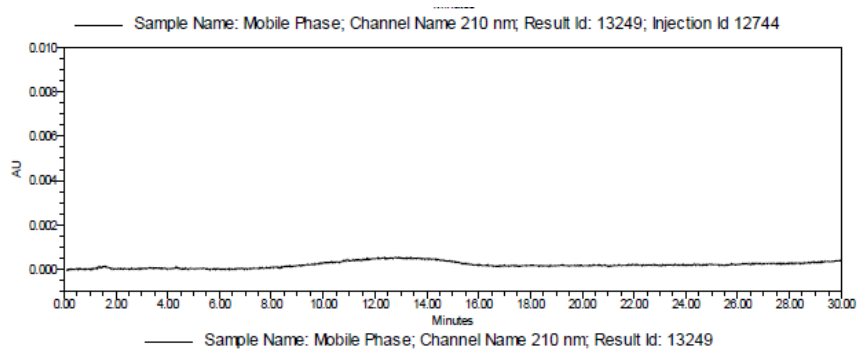


Figura 32 - Cromatograma da fase móvel.

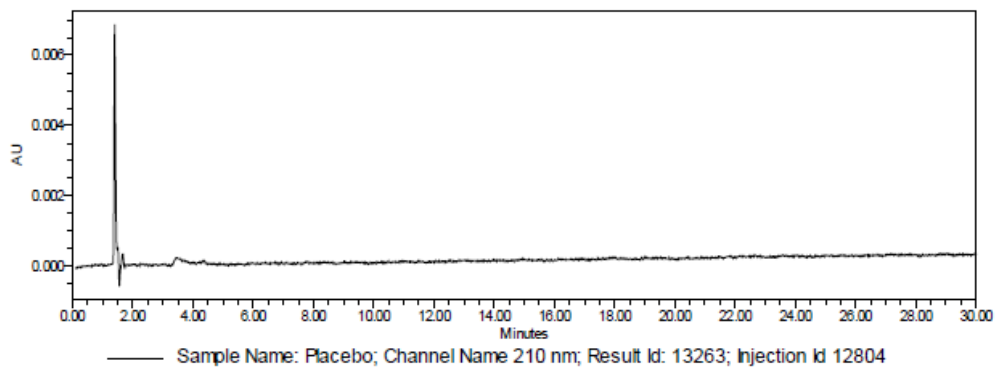


Figura 33 - Cromatograma da solução de placebo.

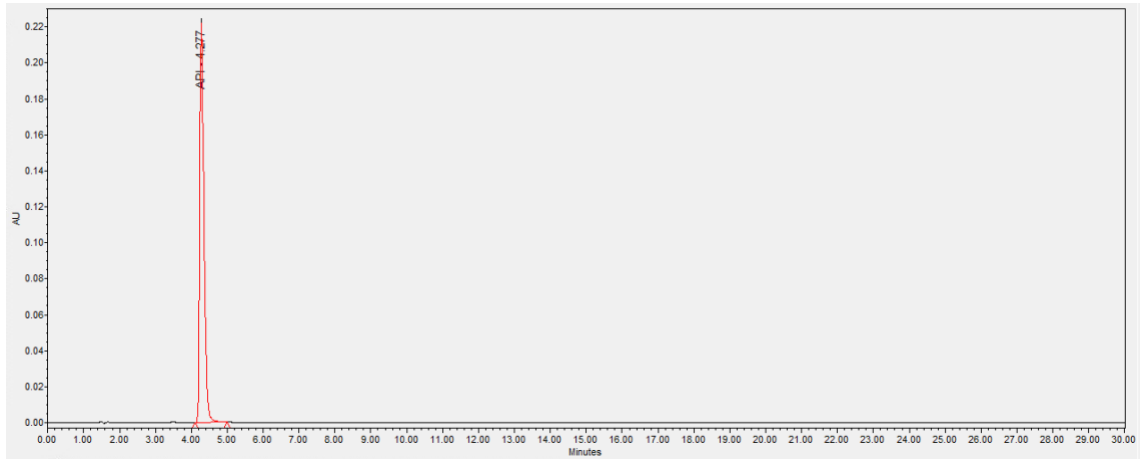


Figura 34 - Cromatograma da solução padrão (0.15 mg/ml).

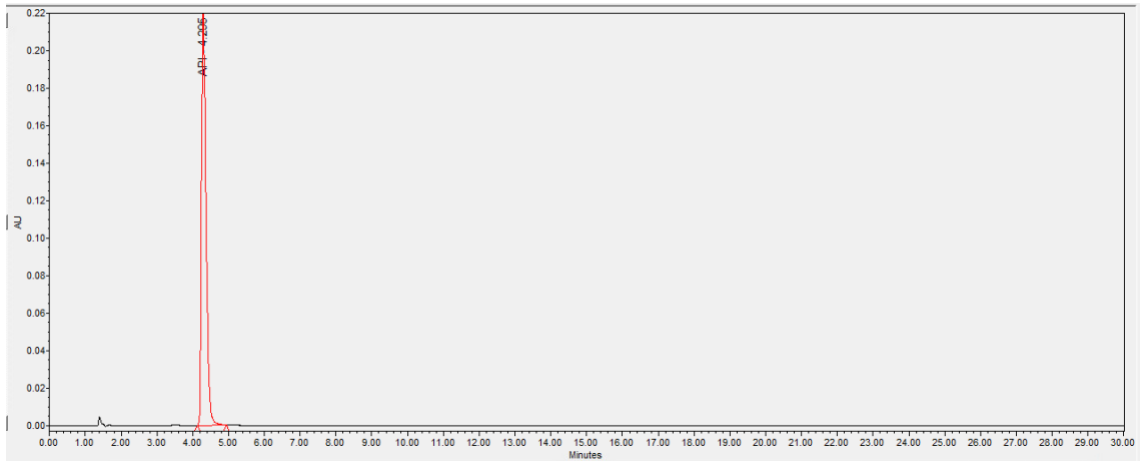


Figura 35 - Cromatograma da solução amostra do produto acabado (0.15 mg/ml).

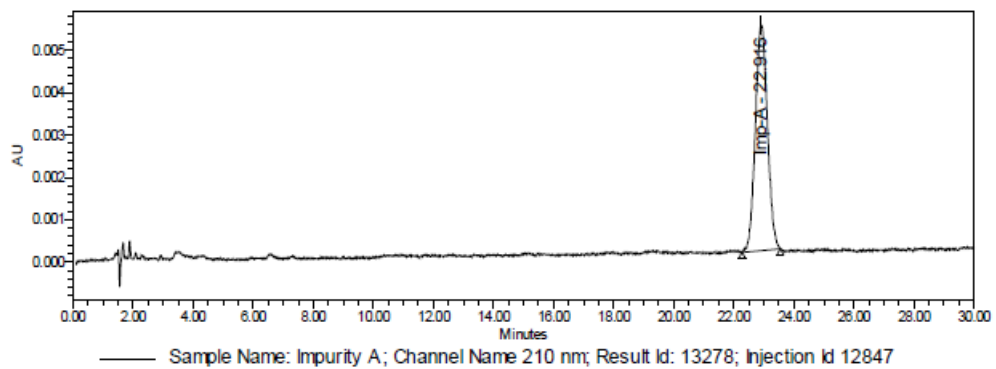


Figura 36 - Cromatograma da solução de Impureza A (0.01 mg/ml).

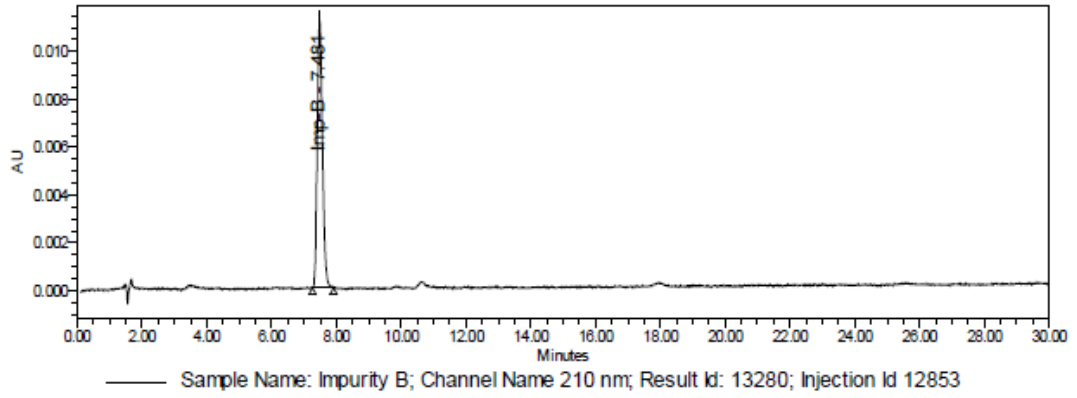


Figura 37 - Cromatograma da solução de Impureza B (0.01 mg/ml).

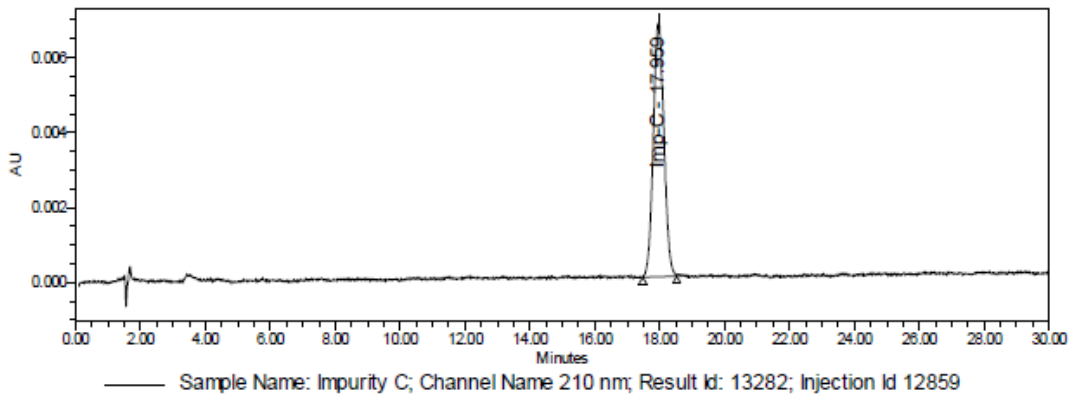


Figura 38 - Cromatograma da solução de Impureza C (0.01 mg/ml).

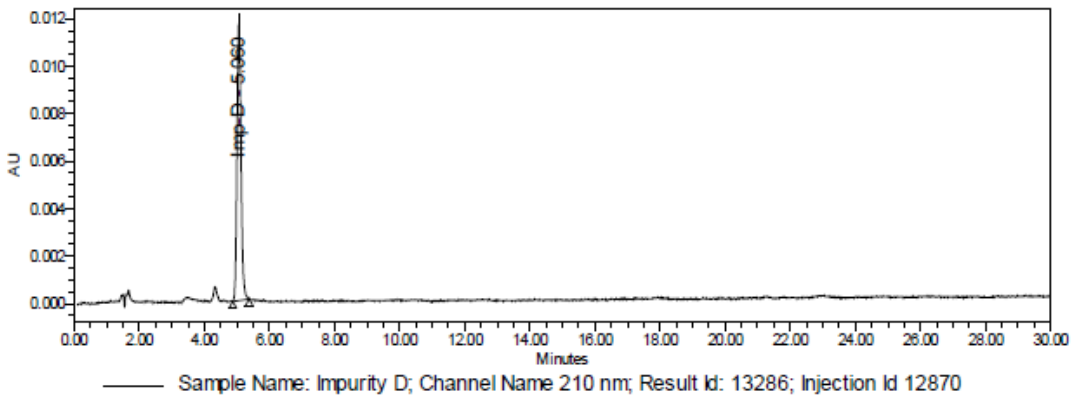


Figura 39 - Cromatograma da solução de Impureza D (0.01 mg/ml).

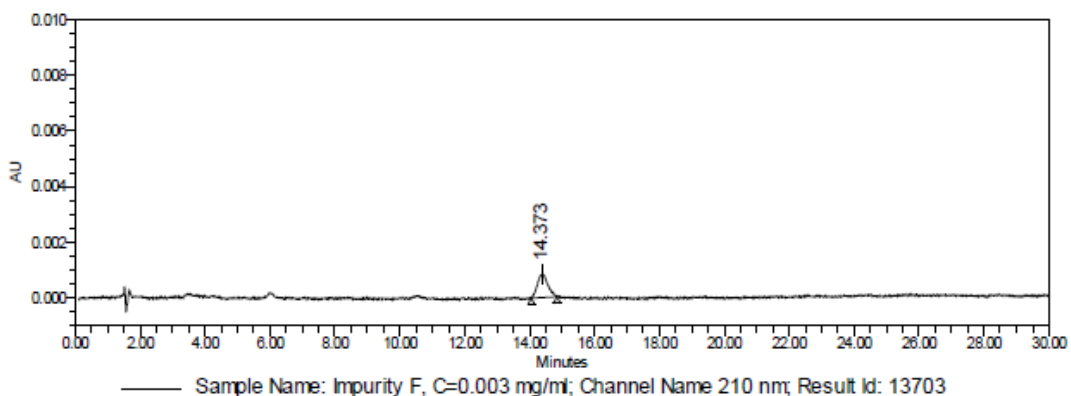


Figura 40 - Cromatograma da solução de Impureza F (0.01 mg/ml).

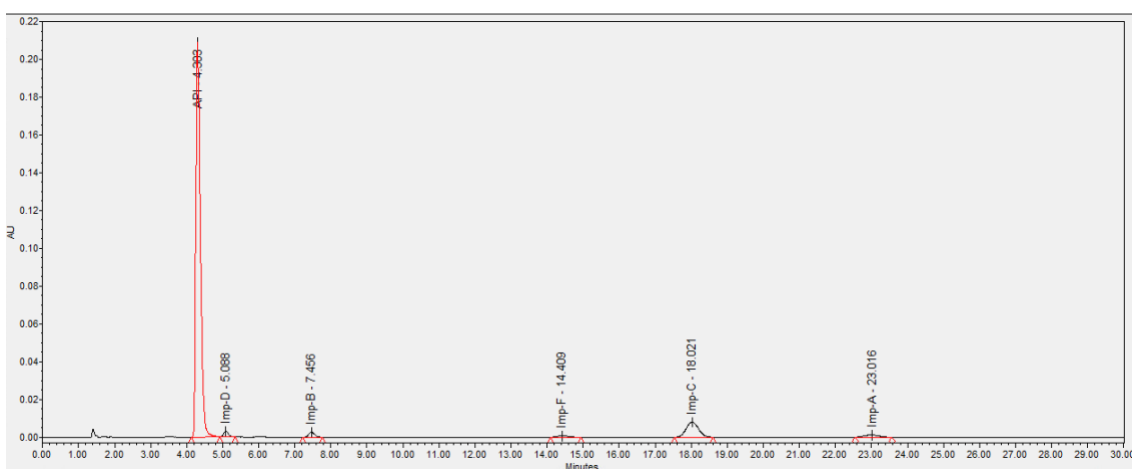


Figura 41 - Cromatograma da amostra de produto acabado ($C_{API} = 0.15 \text{ mg/ml}$) sobrecarregada com as impurezas A, B, C, D e F ($C = 0.01 \text{ mg/ml}$).

Tabela 68 - Resultados da adequabilidade do sistema do método analítico doseamento para o produto acabado.

Solução Padrão 1	Área do Pico de API (AU)	Pratos Teóricos	Fator de Simetria
1	1910380	6169	1,53
2	1939226	6093	1,50
3	1934591	6074	1,50
4	1971294	6034	1,48
5	1952701	6023	1,45
6	1957983	6026	1,48
Média	1944362.5	6070	1,49
SD	21246.32	--	--
RSD (%)	1.09	--	--
Solução Padrão 2	Área do pico (AU)	Fator de Resposta = 1.00	
1	1938075		
2	1940223		
3	1942079		

Tabela 69 - Resultados da repetibilidade do sistema do método analítico doseamento para o produto acabado.

Injeção	API	
	Tempo de Retenção (min)	Área do Pico (AU)
1	4.189	1919889
2	4.188	1951862
3	4.191	1937818
4	4.188	1926305
5	4.189	1926033
6	4.187	1942849
Média	4.19	1934126
SD	0.00	12113.17
RSD (%)	0.03	0.63

Tabela 70 - Resultados da repetibilidade do método do método analítico doseamento para o produto acabado.

Injeção	API Doseamento (%)
1	100.10
2	101.09
3	100.56
4	100.07
5	100.43
6	100.72
Média	100.50
RSD (%)	0.39
Intervalo de Confiança 95%	100.05 100.94

Tabela 71 - Resultados da precisão intermédia do método analítico doseamento para o produto acabado.

API Doseamento (%)	
Analista 1	Analista 2
100.10	101.33
101.09	99.40
100.56	99.07
100.07	98.29
100.43	100.41
100.72	98.97
Média	
100.50	99.56
RSD (%)	
0.39	1.12
Intervalo de Confiança 95%	
100.05% - 100.94%	98.31% - 100.83%
Média (n = 12)	
100.03 %	
RSD (%) n = 12	
0.93%	
Intervalo de Confiança 95%	
99.41% - 100.65%	

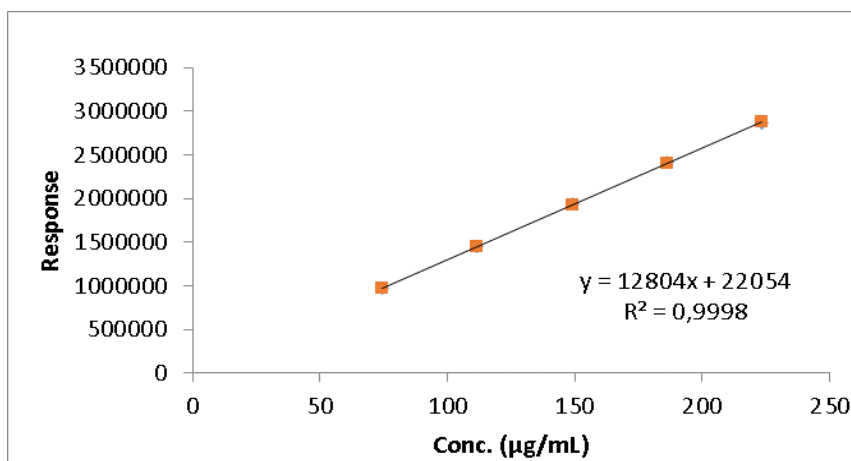


Figura 42 - Regressão linear para a linearidade do API no método analítico doseamento.

Tabela 72 - Dados da regressão linear do API no método analítico doseamento.

Concentração Nível (%)	API Concentração (µg/ml)	API Área do Pico (AU)	Área Média (AU)	RSD (%)
49.65	74.47	962087	972652	1.04
		982151		
		973719		
74.47	111.70	1436288	1443549	0.44
		1446513		
		1447846		
99.29	148.94	1949928	1944649	0.29
		1945218		
		1938802		
124.11	186.17	2389685	2412595	0.84
		2427670		
		2420431		
148.94	223.41	2848992	2871898	0.70
		2886566		
		2880136		
Slope	12804.1819	r	1,000	
Interceção	22053.7333	r²	1,000	
Interceção – IC 95%		-32399.89 – 76507.36		
% Y interceção relativamente a 100% Concentração resposta			1.13%	
2% de 100% Concentração resposta			38893	

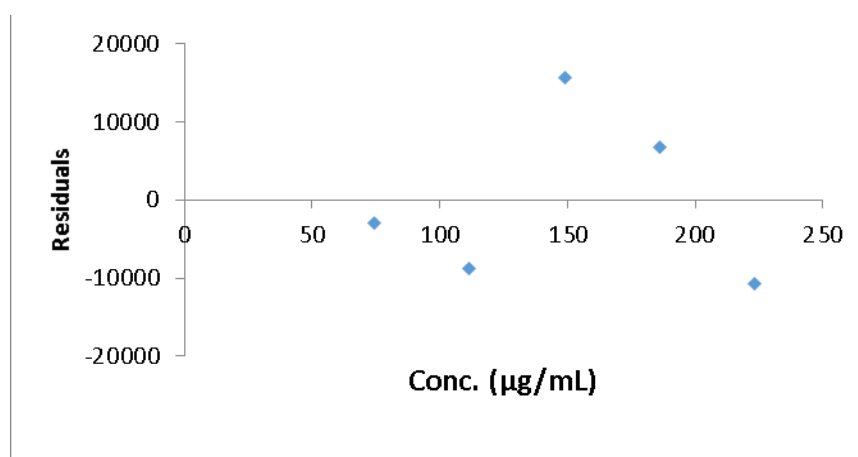


Figura 43 - Distribuição dos resíduos para a regressão linear do API no método analítico doseamento.

Tabela 73 - Resultados para a exatidão do API no método analítico doseamento.

Concentração Nível	% Recuperação		
	50%	100%	150%
A1	101.25	101.78	101.81
A2	100.78	102.08	101.16
A3	100.53	101.95	101.55
Média	100.85	101.94	101.51
SD	0.36	0.15	0.33
RSD (%)	0.36	0.15	0.32
Média (n = 9)	101.43		
SD	0.54		
RSD (%)	0.53		

Tabela 74 - Resultados para gama de validação do API no método analítico doseamento.

Injeção	API Área do Pico (AU)	
	Baixo Nível (74.5 µg/ml)	Alto Nível (223.4 µg/ml)
1	978400	2872313
2	973229	2873915
3	973503	2878034
4	971909	2875027
5	974016	2867255
6	972845	2864136
Média	973984	2871780
SD	2276.2	5165.4
RSD (%)	0.23	0.18

Tabela 75 - Resultados para a estabilidade intradiária do API no método analítico doseamento – solução padrão a 5°C.

Tempo (horas)	(5°C)	
	Área Média (AU)	Deviation percentage
0	1915956	--
4	1931010	0.79
7	1931430	0.81
9	1937694	1.13
17	1912258	-0.19
26	1930560	0.76
34	1938457	1.17
42	1943262	1.43
51	1941158	1.32
60	1953376	1.95
68	1955434	2.06

Tabela 76 - Resultados para a estabilidade intradiária do API no método analítico doseamento – amostra de produto acabado a 5°C.

Temperatura ambiente (20°C)		
Tempo (horas)	Área Média (AU)	Desvio percentual
0	1826058	--
5	1851698	1.40
23	1847937	1.20
32	1860546	1.89
48	1834322	0.45
56	1845983	1.09
72	1832278	0.34

Tabela 77- Resultados para a estabilidade intradiária do API no método analítico doseamento – solução padrão a 20°C.

(5°C)			
Tempo (horas)	Média Doseamento (%)	Desvio percentual absoluto	Desvio percentual relativo
0	100.9	--	--
4	102.4	1.44	1.41
6	102.4	1.47	1.44
9	102.2	1.23	1.21
17	102.2	1.33	1.30
26	102.4	1.53	1.49
34	102.8	1.87	1.82
42	103.2	2.24	2.17
51	103.2	2.30	2.23
60	103.6	2.66	2.57
68	103.5	2.62	2.53

ANEXO B - Resultados da validação do método analítico Compostos

Relacionados – Teste 1

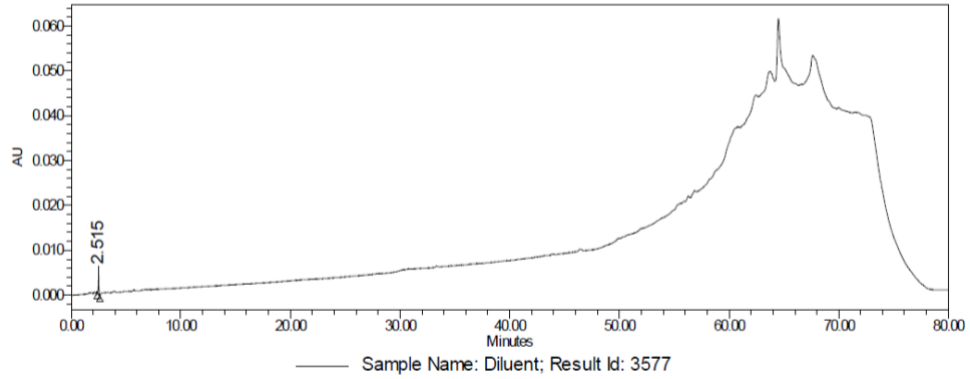


Figura 44 – Cromatograma do solvente (ACN:H2O, 1:1)

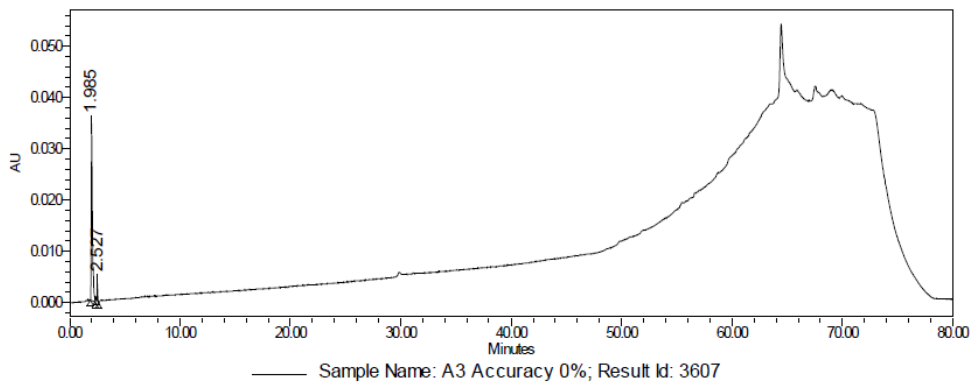


Figura 45 – Cromatograma da solução de placebo do produto acabado.

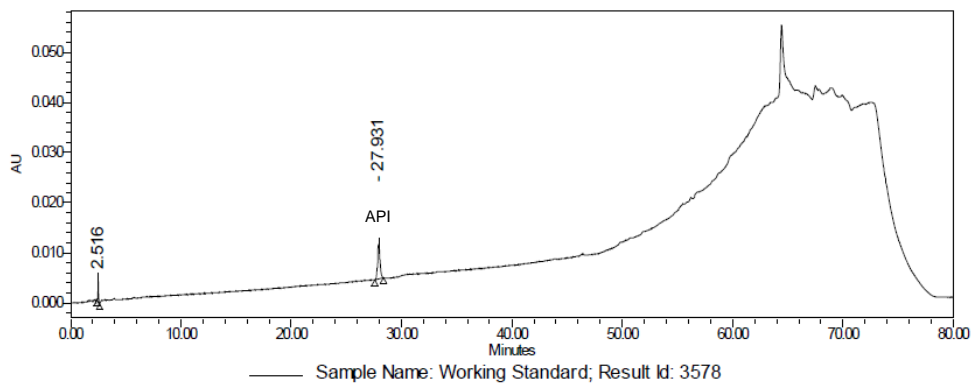


Figura 46 – Cromatograma da solução padrão (0.003 mg/ml).

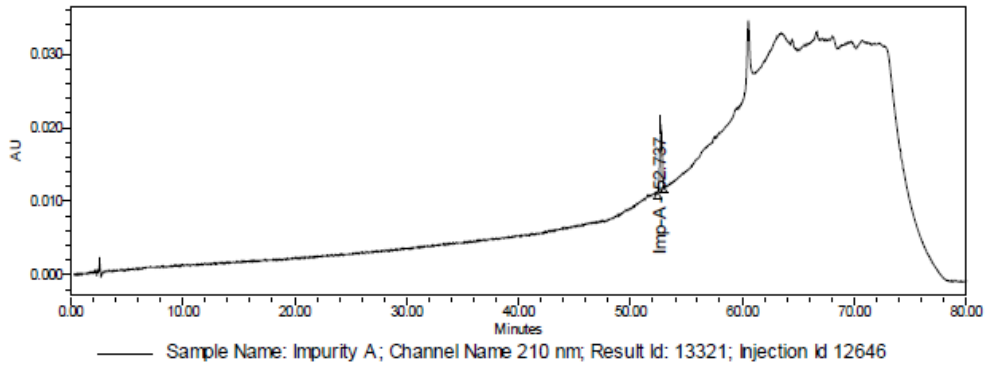


Figura 47 - Cromatograma da solução de Impureza A (0.003 mg/ml)

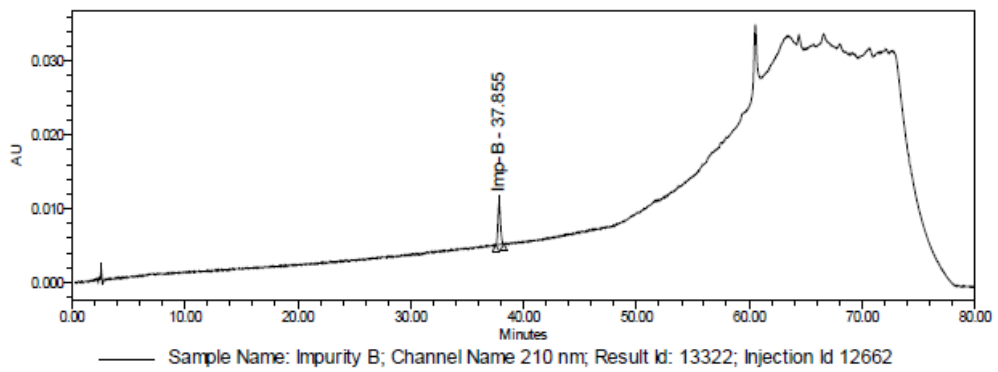


Figura 48 - Cromatograma da solução de Impureza B (0.003 mg/ml)

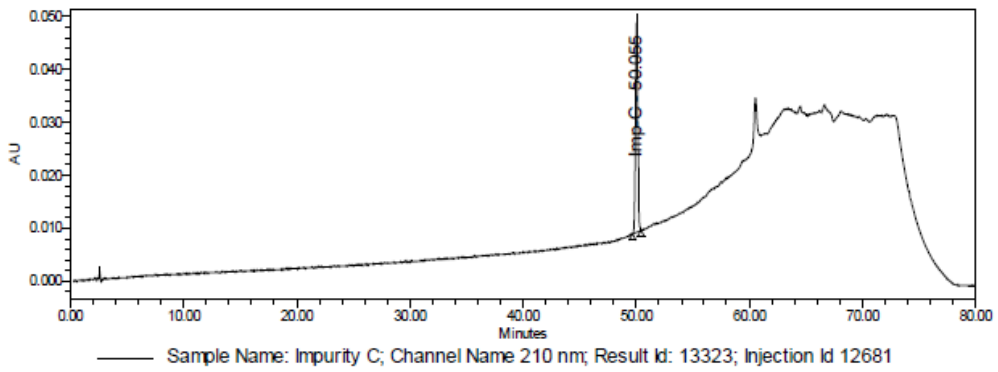


Figura 49 - Cromatograma da solução de Impureza C (0.015 mg/ml).

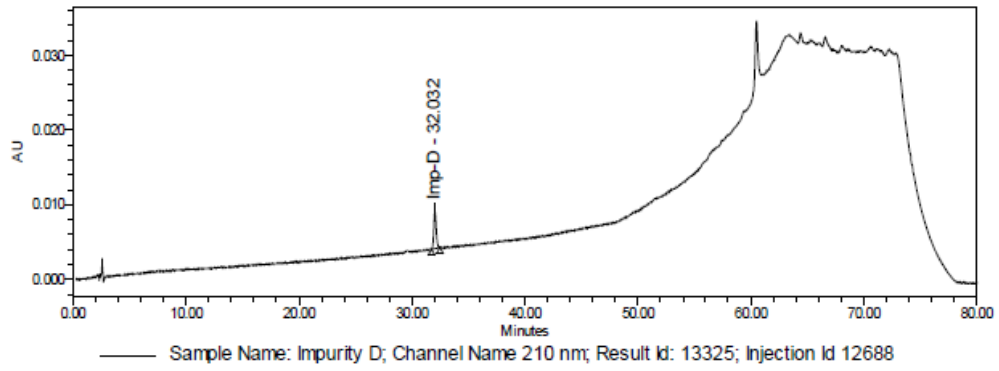


Figura 50 - Cromatograma da solução de Impureza D (0.003 mg/ml)

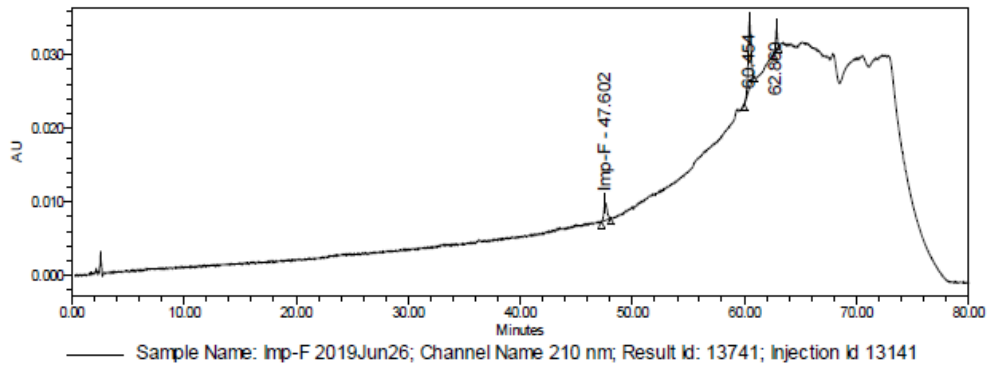


Figura 51 - Cromatograma da solução de Impureza F (0.003 mg/ml)

Tabela 78 – Resultados da repetibilidade do sistema do método analítico compostos relacionados teste 1.

Injeção	API		Impureza A		Impureza B	
	Tempo de Retenção (min)	Área do Pico	Tempo de Retenção (min)	Área do Pico	Tempo de Retenção (min)	Área do Pico
1	30.155	103005	52.611	132074	37.885	96213
2	30.145	102741	52.603	130862	37.852	96293
3	30.164	104138	52.615	132715	37.834	97947
4	30.167	103217	52.615	130711	37.836	95026
5	30.174	102096	52.626	130915	37.81	95138
6	30.193	101356	52.638	129157	37.809	97019
Média	30.17	102759	52.62	131072	37.84	96273
SD	0.02	957.10	0.01	1230.43	0.03	1114,09
RSD (%)	0.05	0.93	0.02	0.94	0.08	1.16
Injeção	Impureza C		Impureza D		Impureza F	
	Tempo de Retenção (min)	Área do Pico	Tempo de Retenção (min)	Área do Pico	Tempo de Retenção (min)	Área do Pico
1	50.143	589991	32.654	91515	48.242	51391
2	50.967	593617	32.647	91182	48.235	49936
3	50.99	594520	32.665	92343	48.222	50781
4	50.978	592092	32.666	91276	48.005	50159
5	50.977	595902	32.676	90213	48.034	50673
6	50.992	595881	32.691	91208	48.065	51415
Média	50.84	593667	32.67	91290	48.13	50726
SD	0.34	2307.41	0.02	683.80	0.11	611.29
RSD (%)	0.67	0.39	0.05	0.75	0.23	1.21

Tabela 79 – Resultados da repetibilidade do método do método analítico compostos relacionados teste 1 – Impureza A.

Amostra No.	Área (AU)	Impureza A Recuperação (%)
1	131844	98.78
2	135751	101.71
3	137694	103.17
4	136288	102.11
5	134558	100.82
6	134198	100.55
	Média	101.19
	SD	1.51
	RSD (%)	1.49

Tabela 80 - Resultados da repetibilidade do método do método analítico compostos relacionados teste 1 – Impureza B.

Amostra No.	Área (AU)	Impureza B Recuperação (%)
1	100190	99.17
2	103322	102.27
3	101489	100.45
4	100704	99.68
5	104446	103.38
6	101822	100.78
	Média	100.95
	SD	1.59
	RSD (%)	1.58

Tabela 81 - Resultados da repetibilidade do método do método analítico compostos relacionados teste 1 – Impureza C.

Amostra No.	Área (AU)	Impureza C Recuperação (%)
1	646738	101.07
2	647561	101.18
3	655420	102.55
4	649089	101.47
5	646086	100.93
6	662159	103.69
	Média	101.82
	SD	1.09
	RSD (%)	1.07

Tabela 82 - Resultados da repetibilidade do método do método analítico compostos relacionados teste 1 – Impureza D.

Amostra No.	Área (AU)	Impureza D Recuperação (%)
1	89914	93.14
2	90939	94.21
3	89940	93.17
4	89885	93.11
5	89986	93.22
6	89683	92.90
	Média	93.29
	SD	0.46
	RSD (%)	0.49

Tabela 83 - Resultados da repetibilidade do método do método analítico compostos relacionados teste 1 – Impureza F.

Amostra No.	Área (AU)	Impureza F Recuperação (%)
1	99788	104.23
2	101236	106.06
3	100410	105.19
4	99464	103.78
5	100671	105.29
6	100133	104.63
	Média	104.86
	SD	0.82
	RSD (%)	0.78

Tabela 84 - Resultados da repetibilidade do método do método analítico compostos relacionados teste 1 – Impurezas desconhecidas.

Amostra No.	Área (AU)	API (%)
1	97886	95.06
2	100157	97.26
3	99241	96.37
4	101140	98.22
5	98802	95.95
6	100301	97.40
	Média	94.80
	SD	1.12
	RSD (%)	1.18

Tabela 85 - Resultados da precisão intermédia do método analítico compostos relacionados teste 1 – Impurezas desconhecidas.

Amostra No.	Set 1		Set 2	
	Área (AU)	(%)	Área (AU)	(%)
1	97886	93.2	99857	90.3
2	100157	95.3	98913	89.1
3	99241	94.5	97164	87.6
4	101140	96.3	97933	88.2
5	98802	94.1	97168	87.6
6	100301	95.5	99174	89.4
	Média	94.80	Média	88.68
	SD	1.12	SD	1.09
	RSD (%)	1.18	RSD (%)	1.23
	Média (2 sets)		91.74	
	SD		3.36	
	RSD (%)		3.67	

Tabela 86 - Resultados da precisão intermédia do método analítico compostos relacionados teste 1 – Impureza A.

Amostra No.	Set 1		Set 2	
	Área (AU)	(%)	Área (AU)	(%)
1	131844	98.8	87724	103.0
2	135751	101.7	87244	102.4
3	137694	103.2	92587	108.7
4	136288	102.1	89110	104.6
5	134558	100.8	93249	109.4
6	134198	100.6	93561	109.8
	Média	101.19	Média	106.30
	SD	1.51	SD	3.38
	RSD (%)	1.49	RSD (%)	3.18
	Média (2 sets)		103.74	
	SD		3.65	
	RSD (%)		3.52	

Tabela 87 - Resultados da precisão intermédia do método analítico compostos relacionados teste 1 – Impureza B.

Amostra No.	Set 1		Set 2	
	Área (AU)	(%)	Área (AU)	(%)
1	100190	99.2	88981	94.0
2	103322	102.3	92048	97.3
3	101489	100.5	92313	97.5
4	100704	99.7	88502	93.5
5	104446	103.4	92291	97.5
6	101822	100.8	92291	97.5
	Média	100.96	Média	96.23
	SD	1.59	SD	1.92
	RSD (%)	1.58	RSD (%)	1.99
	Média (2 sets)		98.59	
	SD		2.99	
	RSD (%)		3.03	

Tabela 88 - Resultados da precisão intermédia do método analítico compostos relacionados teste 1 – Impureza C.

Amostra No.	Set 1		Set 2	
	Área (AU)	(%)	Área (AU)	(%)
1	646738	101.1	649697	93.6
2	647561	101.2	642018	92.3
3	655420	102.6	659293	95.3
4	649089	101.5	653682	94.3
5	646086	100.9	655492	94.6
6	662159	103.7	654323	94.4
	Média	101.82	Média	94.09
	SD	1.09	SD	1.01
	RSD (%)	1.07	RSD (%)	1.07
	Média (2 sets)		97.95	
	SD		4.16	
	RSD (%)		4.24	

Tabela 89 - Resultados da precisão intermédia do método analítico compostos relacionados teste 1 – Impureza D.

Amostra No.	Set 1		Set 2	
	Área (AU)	(%)	Área (AU)	(%)
1	89914	93.1	58625	101.2
2	90939	94.2		
3	89940	93.2	56580	97.7
4	89885	93.1	60573	104.6
5	89986	93.2	58990	101.8
6	89683	92.9	57750	99.7
	Média	93.29	Média	100.98
	SD	0.46	SD	2.56
	RSD (%)	0.50	RSD (%)	2.53
	Média (2 sets)		96.79	
	SD		4.34	
	RSD (%)		4.49	

Tabela 90 - Resultados da precisão intermédia do método analítico compostos relacionados teste 1 – Impureza F.

Amostra No.	Set 1		Set 2	
	Área (AU)	(%)	Área (AU)	(%)
1	99788	104.2	79081	109.1
2	101236	106.1	80432	111.8
3	100410	105.2	80451	111.8
4	99464	103.8	81655	114.2
5	100671	105.3	79260	109.5
6	100133	104.6	83967	119.0
	Média	104.86	Média	112.55
	SD	0.82	SD	3.65
	RSD (%)	0.78	RSD (%)	3.24
	Média (2 sets)		108.71	
	SD		4.74	
	RSD (%)		4.36	

Tabela 91 - Resultados do limite de detecção do método analítico compostos relacionados teste 1.

Injeção no.	API 0,30 µg/ml	Impureza A 0,15 µg/ml	Impureza B 0,15 µg/ml	Impureza C 0,30 µg/ml	Impureza D 0,30 µg/ml	Impureza F 0,30 µg/ml
	Área do Pico (AU)	Área do Pico (AU)	Área do Pico (AU)	Área do Pico (AU)	Área do Pico (AU)	Área do Pico (AU)
1	8589	3583	3497	12793	7540	4911
2	9256	4309	3117	14518	6916	4564
3	9728	4362	3932	13009	6231	5320
4	7877	4217	3039	14049	6083	4934
5	8871	4507	3178	12698	6613	4732
6	8575	4393	3464	12816	6417	6090
Média	8816	4229	3371	13314	6633	5092
SD	635.56	330.37	332.03	772.24	531.77	550.29
RSD (%)	7.21	7.81	9.85	5.80	8.02	10.81
Média S/N	36	29	9	36	29	23

Tabela 92 - Resultados do limite de quantificação do método analítico compostos relacionados teste 1.

Injeção no.	API 0,45 µg/ml	Impureza A 0,30 µg/ml	Impureza B 0,30 µg/ml	Impureza C 0,75 µg/ml	Impureza D 0,45 µg/ml	Impureza F 0,45 µg/ml
	Área do Pico (AU)	Área do Pico (AU)	Área do Pico (AU)	Área do Pico (AU)	Área do Pico (AU)	Área do Pico (AU)
1	14699	9751	7668	28901	10930	8269
2	13692	9883	7969	28682	10349	7889
3	13511	10224	7989	29668	10736	8831
4	13135	9331	7960	29685	11716	9469
5	13893	9675	7101	29482	10702	8342
6	14478	9485	6502	29325	9703	7974
Média	13901	9725	7532	29291	10689	8462
SD	592.00	313.04	607.97	414.24	663.77	594.70
RSD (%)	4.26	3.22	8.07	1.41	6.21	7.03
Média S/N	50	57	34	67	38	32

Tabela 93 - Resultados de gama de validação do método analítico compostos relacionados teste 1 – impurezas desconhecidas.

Injeção	API Área do Pico (AU)	
	Baixo Nível (0,45 µg/ml)	Alto Nível (4,57 µg/ml)
1	14699	165364
2	13692	165328
3	13511	164560
4	13135	164930
5	13893	163656
6	14478	159904
Média	13901	163957
SD	592.00	2082.64
RSD (%)	4.26	1.27

Tabela 94 - Resultados de gama de validação do método analítico compostos relacionados teste 1 – Impureza A.

Injeção	Impureza A Área do Pico (AU)	
	Baixo Nível (0,30 µg/ml)	Alto Nível (4,51 µg/ml)
1	9751	207866
2	9883	207129
3	10224	206598
4	9331	207271
5	9675	205903
6	9485	201376
Média	9724.83	206024.83
SD	313.04	2371.37
RSD (%)	3.22	1.15

Tabela 95 - Resultados de gama de validação do método analítico compostos relacionados teste 1 – Impureza B.

Injeção	Impureza B Área do Pico (AU)	
	Baixo Nível (0,30 µg/ml)	Alto Nível (4,51 µg/ml)
1	7668	140583
2	7969	142937
3	7989	144223
4	7960	143315
5	7101	143517
6	6502	146137
Média	7532	143452
SD	607.97	1806.82
RSD (%)	8.07	1.26

Tabela 96 - Resultados de gama de validação do método analítico compostos relacionados teste 1 – Impureza C.

Injeção	Impureza C Área do Pico (AU)	
	Baixo Nível (0,75 µg/ml)	Alto Nível (22,70 µg/ml)
1	28901	895687
2	28682	894381
3	29668	894800
4	29685	895743
5	29482	896049
6	29325	895145
Média	29291	895301
SD	414.24	636.49
RSD (%)	1.41	0.07

Tabela 97 - Resultados de gama de validação do método analítico compostos relacionados teste 1 – Impureza D.

Injeção	Impureza D Área do Pico (AU)	
	Baixo Nível (0,46 µg/ml)	Alto Nível (4,51 µg/ml)
1	10930	143194
2	10349	143300
3	10736	141570
4	11716	143463
5	10702	141886
6	9703	137884
Média	10689	141883
SD	663.77	2112.49
RSD (%)	6.21	1.49

Tabela 98 - Resultados de gama de validação do método analítico compostos relacionados teste 1 – Impureza F.

Injeção	Impureza F Área do Pico (AU)	
	Baixo Nível (0,42 µg/ml)	Alto Nível (4,50 µg/ml)
1	8269	115865
2	7889	114015
3	8831	114321
4	9469	115612
5	8342	114254
6	7974	111785
Média	8462	114309
SD	594.70	1454.59
RSD (%)	7.03	1.27

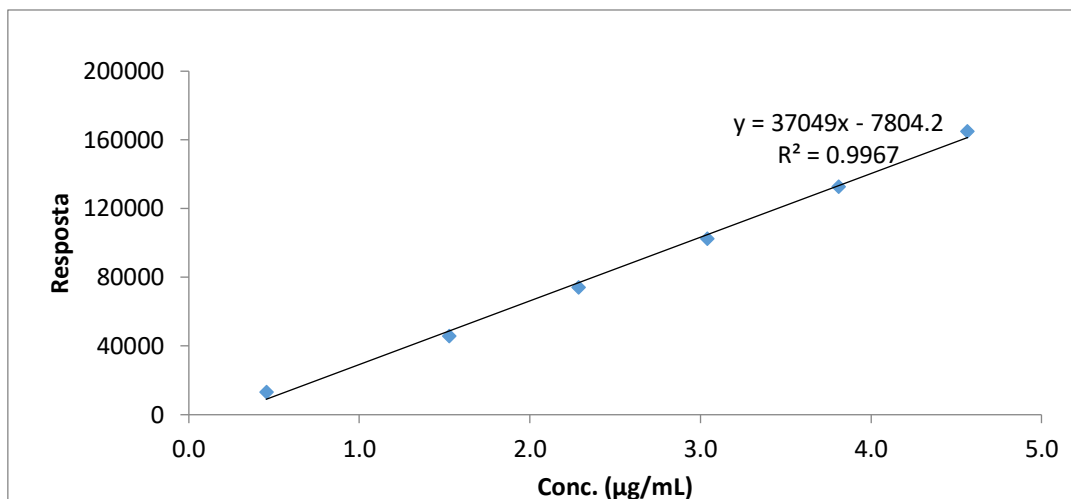


Figura 52 - Regressão linear do API para a linearidade do método analítico compostos relacionados teste 1 – determinação das impurezas desconhecidas.

Tabela 99 - Dados da regressão linear do API para a linearidade do método analítico compostos relacionados teste 1.

Concentração Nível (%)	API Concentração (µg/ml)	API Área do Pico (AU)	Área Média (AU)	RSD (%)	Fator de Resposta (RF)
0.03 (LOQ)	0.45	13306 13678 13017	13334	2.49	29397
0.10	1.53	46312 46185 45867	46121	0.50	30203
0.15	2.28	73382 74470 74631	74161	0.92	32484
0.20	3.04	101471 103201 103121	102598	0.95	33761
0.25	3.81	127178 134234 136826	132746	3.76	34842
0.30	4.57	165364 165328 164560	165084	0.28	36156
Slope	37048.91		Média RF		32807
Interceção	-7804.15				
r	0.997		SD		2637.12
r²	0.997		RSD (%)		8.04

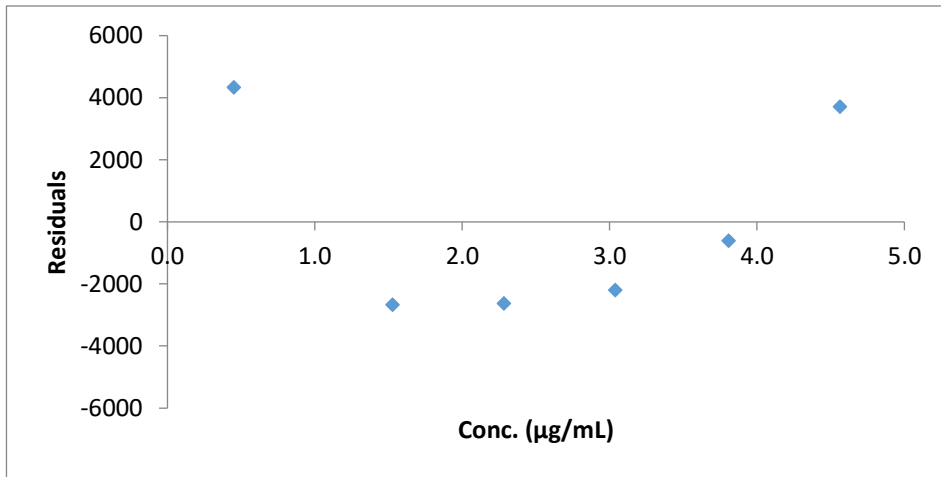


Figura 53 - Distribuição dos resíduos da linearidade do API do método analítico compostos relacionados teste 1.

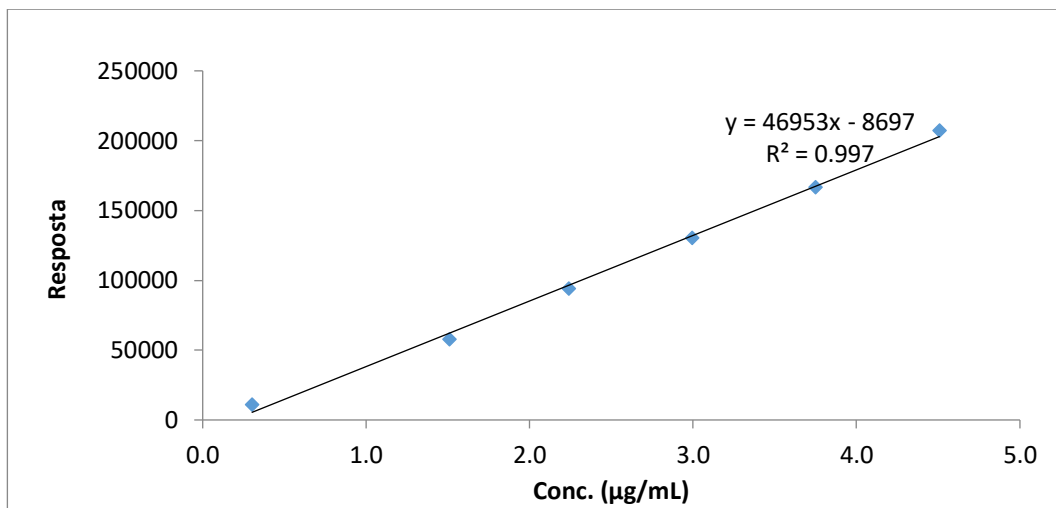


Figura 54 - Regressão linear da Impureza A para a linearidade do método analítico compostos relacionados teste 1.

Tabela 100 - Dados da regressão linear da Impureza A para a linearidade do método analítico compostos relacionados teste 1.

Concentração Nível (%)	Impureza A Concentração (µg/ml)	Impureza A Área do Pico (AU)	Área Média (AU)	RSD (%)	Fator de Resposta (RF)
0.02 (LOQ)	0.30	10773 11004 10734	10837	1.35	35871
0.10	1.51	57426 57836 58005	57756	0.52	38235
0.15	2.24	92509 94312 94724	93878	1.26	41884
0.20	3.00	129062 130551 131674	130429	1.00	43536
0.25	3.75	159799 168303 171244	166449	1.37	44372
0.30	4.50	207866 207129 206598	207198	0.31	45978
Slope	46952.60		Média RF	SD	3868.06
Intercepção	-8696.97				
r	0.999		RSD (%)	9.29	
r²	0.997				

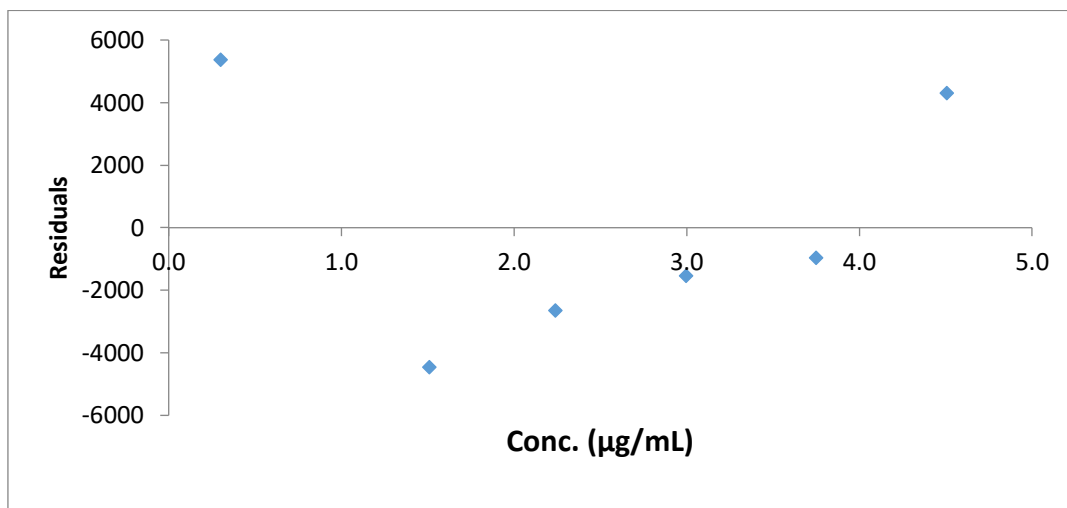


Figura 55 - Distribuição dos resíduos da linearidade da Impureza A do método analítico compostos relacionados teste 1.

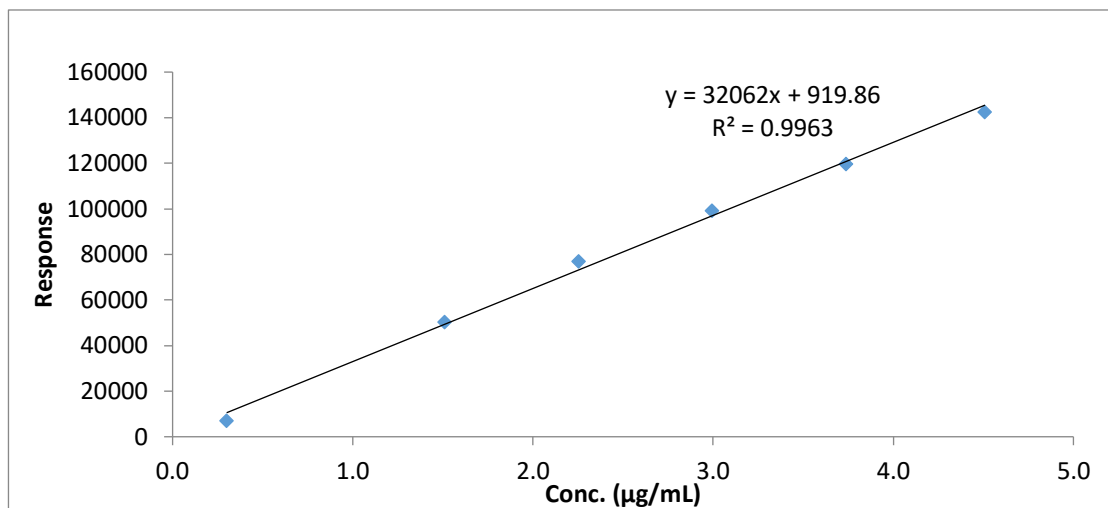


Figura 56 - Regressão linear da Impureza B para a linearidade do método analítico compostos relacionados teste 1.

Tabela 101 - Dados da regressão linear da Impureza B para a linearidade do método analítico compostos relacionados teste 1.

Nível Concentração (%)	Concentração Impureza b (µg/ml)	Área do Pico Impureza B (AU)	Área Média (AU)	RSD (%)	Fator de Resposta (RF)
0.02	0.30	7236 7211 6793	7080	3.52	23420
0.10	1.51	50162 50798 50288	50416	0.67	33355
0.15	2.25	76634 76766 77931	77110	0.93	34218
0.20	3.00	100510 98836 98829	99392	0.97	33180
0.25	3.74	121124 119252 118826	119734	1.02	32035
0.30	4.51	140583 142937 144223	142581	1.29	31635
Declive	32062.3649		Média RF		31307
Interceção	919.86				
r	0.998		SD		3975.21
r²	0.996		RSD (%)		12.70

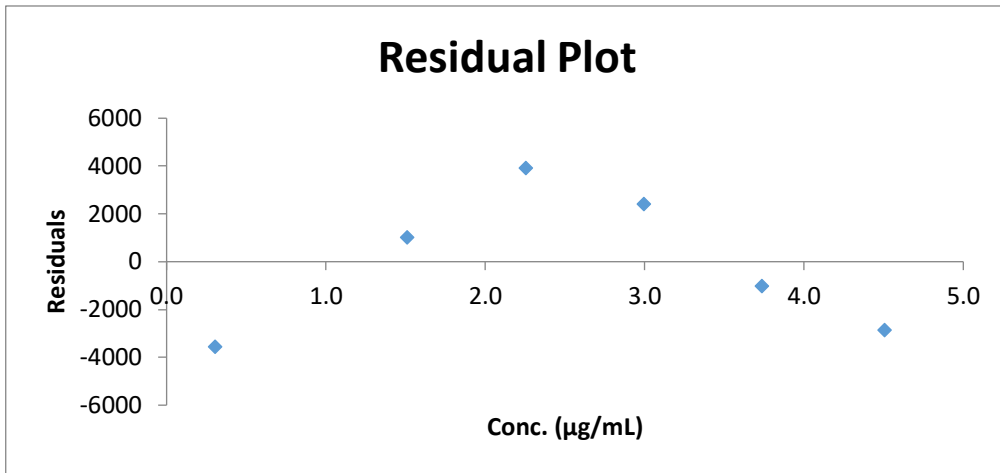


Figura 57 - Distribuição dos resíduos da linearidade da Impureza B do método analítico compostos relacionados teste 1.

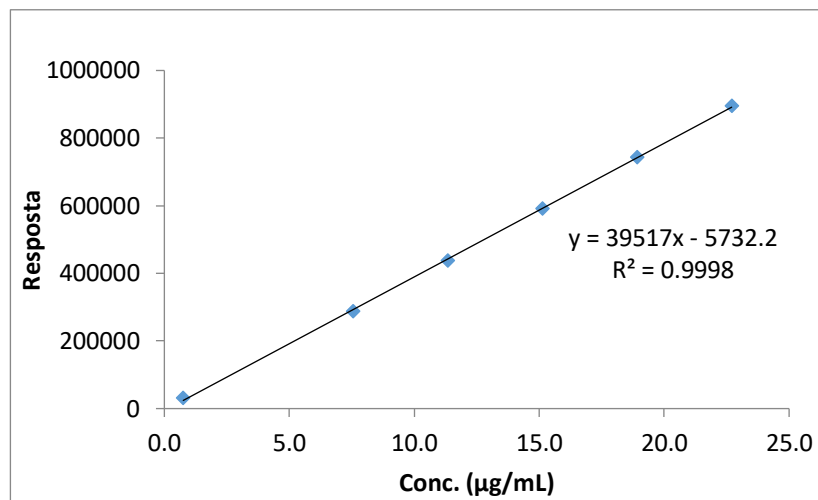


Figura 58 - Regressão linear da Impureza C para a linearidade do método analítico compostos relacionados teste 1.

Tabela 102 - Dados da regressão linear da Impureza C para a linearidade do método analítico compostos relacionados teste 1.

Concentração Nível (%)	Impureza C Concentração (µg/ml)	Impureza C Área do Pico (AU)	Área Média (AU)	RSD (%)	Fator de Resposta (RF)
0.05 (LOQ)	0.76	29885 30589 31222	30565	2.19	40391
0.50	0.57	289590 286527 288935	288351	0.56	38104
0.76	11.35	436791 438428 437752	437657	0.19	38556
1.00	15.13	590073 590814 590507	590465	0.06	39014
1.26	18.92	744687 742648 744552	743962	0.15	39324
1.51	22.70	895687 894381 894800	894956	0.07	39421
Slope	39517.33		Média RF	SD	788.28
Interceção	-5732.18				
r	1.000		RSD (%)		2.01
r²	1.000				

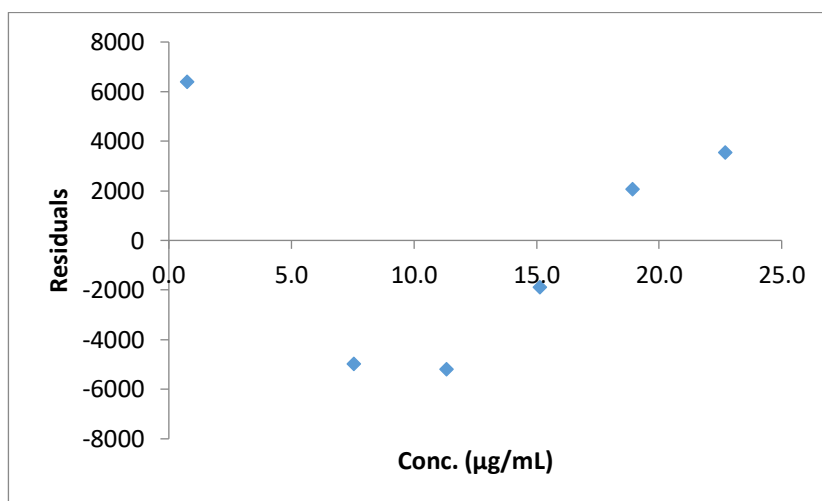


Figura 59- Distribuição dos resíduos da linearidade da Impureza C do método analítico compostos relacionados teste 1.

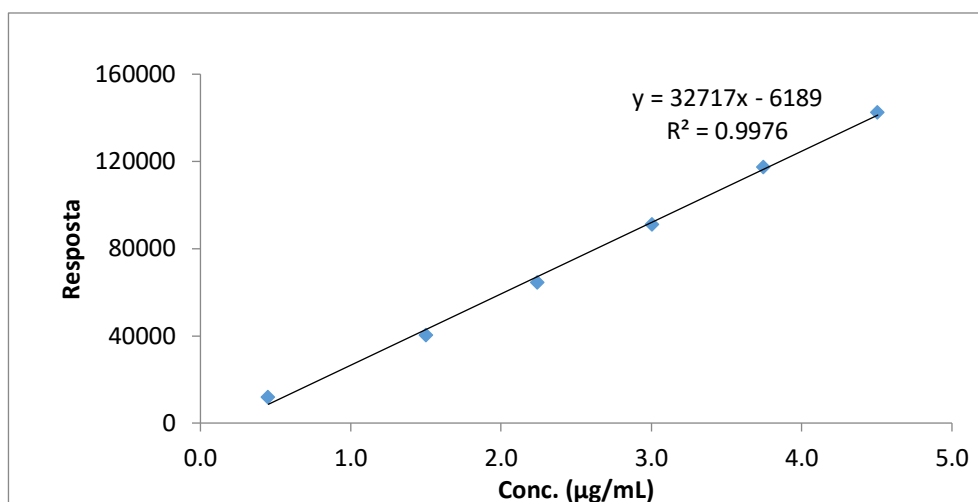


Figura 60 - Regressão linear da Impureza D para a linearidade do método analítico compostos relacionados teste 1.

Tabela 103 - Dados da regressão linear da Impureza D para a linearidade do método analítico compostos relacionados teste 1.

Concentração Nível (%)	Impureza D Concentração (µg/ml)	Impureza D Área do Pico (AU)	Área Média (AU)	RSD (%)	Fator de Resposta (RF)
0.03 (LOQ)	0.45	12372 12281 11258	11970	5.17	26456
0.10	1.50	40029 40461 41377	40622	1.69	27042
0.15	2.24	63483 65177 65072	64577	1.47	28775
0.20	3.00	89205 91032 93111	91116	2.14	30328
0.25	3.75	112447 120461 119775	117561	3.78	31380
0.30	4.51	143194 143300 141570	142688	0.68	31663
Slope	32716.62				
Interceção	-6189.02				
r	0.999		Média RF		29274
r²	0.998		SD		2210.04
			RSD (%)		7.55

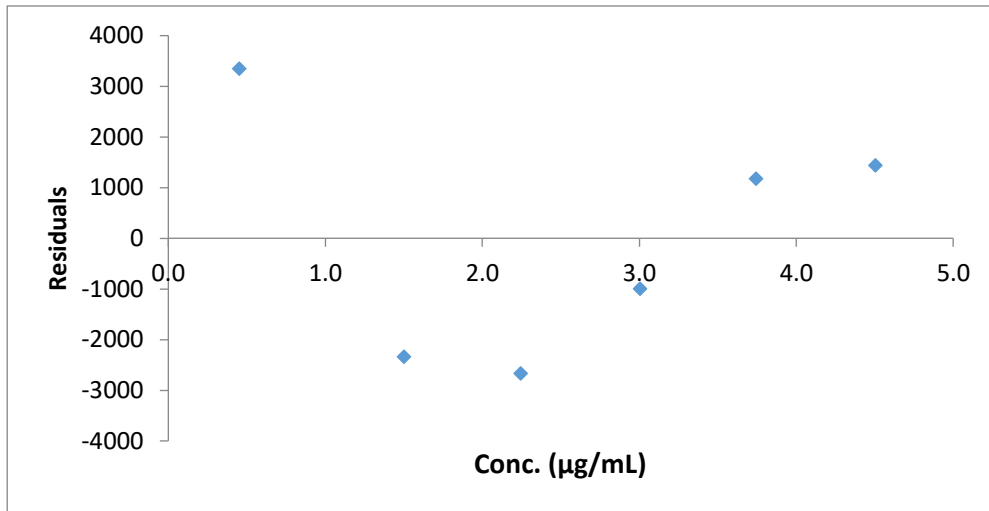


Figura 61 - Distribuição dos resíduos da linearidade da Impureza D do método analítico compostos relacionados teste 1.

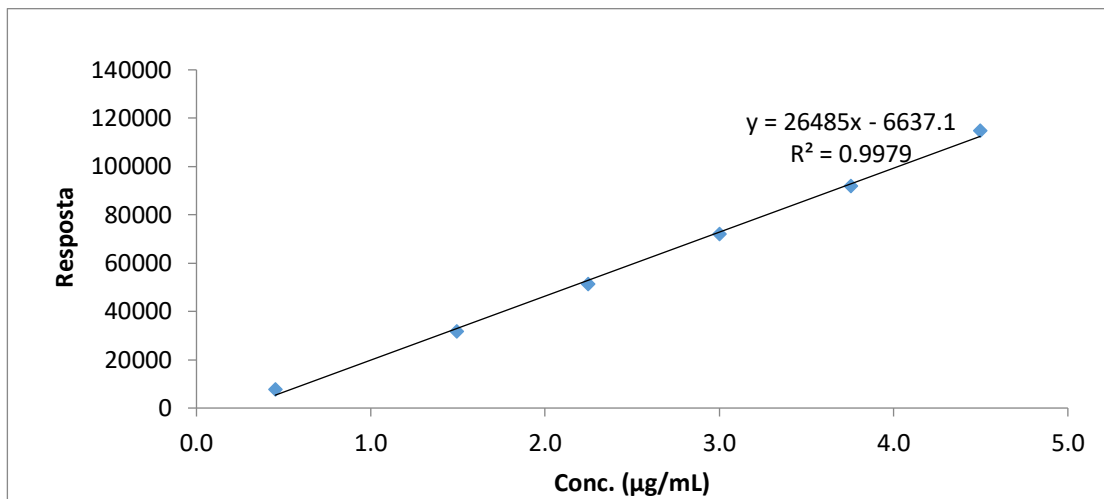


Figura 62 - Regressão linear da Impureza F para a linearidade do método analítico compostos relacionados teste 1.

Tabela 104 - Dados da regressão linear da Impureza F para a linearidade do método analítico compostos relacionados teste 1.

Concentração Nível (%)	Impureza F Concentração (µg/ml)	Impureza F Área do Pico (AU)	Área Média (AU)	RSD (%)	Fator de Resposta (RF)
0.03 (LOQ)	0.45	8060 6974 7836	7623	7.52	16866
0.10	1.50	32042 31272 31865	31726	1.27	21220
0.15	2.25	50971 50862 52124	51319	1.36	22824
0.20	3.00	70786 72044 73014	71948	1.55	23969
0.25	3.76	88334 92948 94694	91992	3.57	24498
0.30	4.50	115865 114015 114321	114734	0.86	25514
Slope	26484.54		Média RF	SD	3121.55
Intercepção	-6637.13				
r	0.999		RSD (%)	13.88	
r²	0.998				

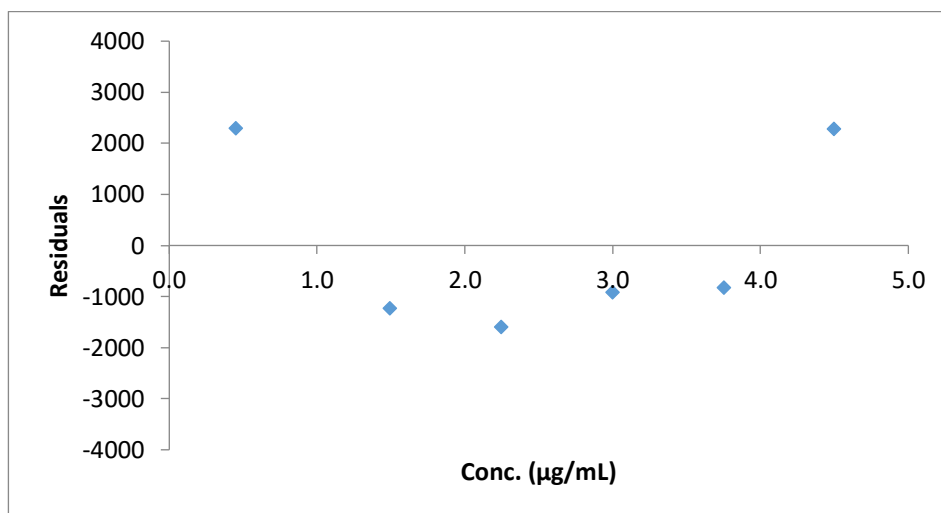


Figura 63 - Distribuição dos resíduos da linearidade da Impureza D do método analítico compostos relacionados teste 1.

Tabela 105 – Fatores de Resposta Relativos para cada impureza do método analítico compostos relacionados teste 1.

Substância	Slope	Relative Fator de Resposta (RRF)
API (unspecified impurities)	37049	1.0
Impureza A	46953	1.3
Impureza B	31993	0.9
Impureza C	39517	1.1
Impureza D	32717	0.9
Impureza F	26485	0.7

Tabela 106 - Resultados da exatidão para o API do método analítico compostos relacionados teste 1 para a determinação de impurezas desconhecidas.

Concentração Nível	% API Recuperação			
	10% (QL)	50%	100%	150%
A1	112.45	95.88	96.50	98.28
A2	104.43	89.37	94.33	100.69
A3	104.12	92.50	97.48	101.45
Média	107.00	92.58	96.11	100.14
SD	4.73	3.26	1.61	1.65
RSD (%)	4.42	3.52	1.68	1.65
Média (n = 12)	98.96			
SD	6.19			
RSD (%)	6.25			

Tabela 107 - Resultados da exatidão do método analítico compostos relacionados teste 1 para a determinação da Impureza A.

Concentração Nível	% Impureza A Recuperação			
	10% (QL)	50%	100%	150%
A1	94.00	96.90	98.78	102.94
A2	96.28	97.92	101.71	103.27
A3	98.41	97.46	103.17	102.87
Média	96.23	97.43	101.22	103.02
SD	2.20	0.51	2.24	0.22
RSD (%)	2.29	0.52	2.21	0.21
Média (n = 12)	99.48			
SD	3.18			
RSD (%)	3.20			

Tabela 108 - Resultados da exatidão do método analítico compostos relacionados teste 1 para a determinação da Impureza B.

Concentração Nível	% Impureza B Recuperação			
	10% (QL)	50%	100%	150%
A1	100.20	93.02	99.17	106.82
A2	94.08	95.13	102.27	107.13
A3	100.01	95.08	100.45	106.86
Média	98.10	94.41	100.63	106.94
SD	3.48	1.20	1.56	0.17
RSD (%)	3.54	1.27	1.55	0.16
Média (n = 12)	100.02			
SD	5.06			
RSD (%)	5.06			

Tabela 109 - Resultados da exatidão do método analítico compostos relacionados teste 1 para a determinação da Impureza C.

Concentração Nível	% Impureza C Recuperação			
	5% (QL)	50%	100%	150%
A1	112.80	93.02	101.07	97.06
A2	109.64	92.79	101.18	96.75
A3	103.89	94.26	102.55	97.15
Média	108.78	93.36	101.60	96.99
SD	4.52	0.79	0.82	0.21
RSD (%)	4.16	0.85	0.81	0.21
Média (n = 12)	100.18			
SD	6.34			
RSD (%)	6.32			

Tabela 110 - Resultados da exatidão do método analítico compostos relacionados teste 1 para a determinação da Impureza D.

Concentração Nível	% Impureza D Recuperação			
	15% (QL)	50%	100%	150%
A1	101.22	107.51	93.14	105.33
A2	95.80	105.68	94.21	106.51
A3	100.37	106.26	93.17	106.29
Média	95.65	105.93	93.51	106.04
SD	5.65	0.30	0.61	0.63
RSD (%)	5.91	0.28	0.65	0.60
Média (n = 12)	101.29			
SD	5.75			
RSD (%)	5.68			

Tabela 111 - Resultados da exatidão do método analítico compostos relacionados teste 1 para a determinação da Impureza F.

Concentração Nível	% Impureza F Recuperação			
	15% (QL)	50%	100%	150%
A1	95.07	105.67	104.23	105.90
A2	90.44	104.60	106.06	105.34
A3	103.71	108.79	105.19	103.79
Média	96.41	106.35	105.16	105.01
SD	6.73	2.18	0.92	1.09
RSD (%)	6.98	2.05	0.87	1.04
Média (n = 12)	103.23			
SD	5.17			
RSD (%)	5.01			

Tabela 112 - Estabilidade intradiária do API no método analítico compostos relacionados teste 1 – solução padrão a 5°C.

Tempo (horas)	API	
	Área do Pico (AU)	Desvio Relativo (%)
0	103583	--
13	104229	0.62
18	104731	1.11
24	104604	0.99
30	103732	0.14
37	103899	0.31
44	103029	-0.53
51	103860	0.27

Tabela 113 - Estabilidade intradiária do API no método analítico compostos relacionados teste 1 – solução amostra a 5°C.

Tempo (horas)	API	
	Área do Pico (AU)	Desvio Relativo (%)
0	97886	--
11	99006	1.14
18	99885	2.04
24	99418	1.57
31	98303	0.43
38	99105	1.25
44	99526	1.68

Tabela 114 - Parâmetros cromatográficos do ensaio robustez do método analítico compostos relacionados teste 1 – solução padrão ($C_{API} = 0,003$ mg/ml) sobrecarregada com impurezas A, B, D e F ($C=0,003$ mg/ml).

	Substância	Área do Pico %RSD	RT (min)	RRT	N	T	Resolution
TQ	API	0.93	30.17	--	70995	1.20	--
	Impureza A	0.94	52.62	1.74	355912	1.10	9.99
	Impureza B	1.16	37.84	1.25	100490	1.23	1.73
	Impureza D	0.75	32.67	1.08	80715	1.20	5.49
	Impureza F	1.21	48.13	1.60	165112	1.00	21.73
Flow 0,9ml/min	API	1.34	31.99	--	122184	1.13	120.12
	Impureza A	2.98	54.39	1.70	579387	1.01	14.16
	Impureza B	0.38	39.72	1.24	148315	1.21	13.24
	Impureza D	1.94	34.50	1.08	133641	1.11	6.76
	Impureza F	1.05	49.81	1.56	303789	0.99	26.15
Flow 1,1ml/min	API	2.97	30.94	--	120630	1.08	132.49
	Impureza A	1.80	52.76	1.71	541215	0.99	12.07
	Impureza B	0.68	38.27	1.24	147568	1.20	12.97
	Impureza D	0.63	33.33	1.08	133409	1.11	6.67
	Impureza F	2.45	48.23	1.56	251154	0.95	25.47
Temp. 28°C	API	0.41	30.94	--	115541	1.13	124.86
	Impureza A	2.88	53.39	1.73	524439	1.02	13.98
	Impureza B	0.37	38.56	1.25	142124	1.21	13.13
	Impureza D	2.53	33.41	1.08	125309	1.06	6.66
	Impureza F	3.16	48.61	1.58	246881	0.99	25.18
Temp. 32°C	API	1.55	30.82	--	118170	1.12	120.20
	Impureza A	4.83	53.04	1.72	520421	1.06	13.94
	Impureza B	3.65	38.21	1.24	145263	1.19	13.08
	Impureza D	1.71	33.27	1.08	131688	1.11	6.77
	Impureza F	0.89	48.42	1.57	255782	1.02	26.09

Tabela 115 - Parâmetros cromatográficos do ensaio robustez do método analítico compostos relacionados teste 1 – solução padrão ($C_{API} = 0,003 \text{ mg/ml}$) sobrecarregada com impureza C ($C=0,015 \text{ mg/ml}$).

	Substância	Área do Pico %RSD	RT (min)	RRT	N	T	Resolution
Condições nominais	API	1.21	29.85	--	80196	1.18	--
	Impureza C	0.34	50.15	1.68	231592	1.09	48.56
Fluxo -10%	API	0.59	31.15	--	84502	1.16	--
	Impureza C	0.18	51.59	1.66	264857	1.10	49.41
Fluxo +10%	API	1.78	28.52	--	73612	1.15	--
	Impureza C	0.21	48.72	1.71	191497	1.07	46.74
Temp. -15%	API	2.10	29.91	--	82396	1.18	--
	Impureza C	0.22	50.33	1.68	274698	1.07	49.71
Temp. +15%	API	1.50	29.88	--	84310	1.14	--
	Impureza C	0.19	50.06	1.68	242772	1.08	49.47

Tabela 116 - Resultados da robustez do método analítico compostos relacionados teste 1 para a impureza A - Amostra de Produto Acabado sobrecarregada com impurezas A, B, D e F (0,003 mg/ml)

CONDIÇÃO	% IMPUREZA A (MÉDIA)	%RSD	DESVIO ABSOLUTO % ÀS CONDIÇÕES NOMINAIS
Condições Nominais	101.22	2.21	--
Fluxo -10%	102.61	2.54	1.40%
Fluxo +10%	102.22	3.34	1.00%
Temperatura da coluna -15%	101.82	2.26	0.60%
Temperatura da coluna +15%	98.97	3.48	-2.25%
Resultado Médio = 101.37%			
RSD = 2.71%			

Tabela 117 - Resultados da robustez do método analítico compostos relacionados teste 1 para a impureza B - Amostra de Produto Acabado sobrecarregada com impurezas A, B, D e F (0,003 mg/ml)

CONDIÇÃO	% IMPUREZA B (MÉDIA)	%RSD	DESVIO % ÀS CONDIÇÕES NOMINAIS
Condições Nominais	100.63	1.55	--
Fluxo -10%	101.38	1.49	0.75%
Fluxo +10%	100.50	1.75	-0.12%
Temperatura da coluna -15%	100.71	2.05	0.09%
Temperatura da coluna +15%	102.12	1.25	1.49%
Resultado Médio = 101.07%			
RSD = 1.52%			

Tabela 118 - Resultados da robustez do método analítico compostos relacionados teste 1 para a impureza C - Amostra de Produto Acabado sobrecarregada com impureza C (0,015 mg/ml)

CONDIÇÃO	% IMPUREZA C (MÉDIA)	%RSD	DESVIO % ÀS CONDIÇÕES NOMINAIS
Condições Nominais	102.02	1.71	--
Fluxo -10%	101.55	0.67	-0.47%
Fluxo +10%	102.01	1.08	-0.01%
Temperatura da coluna -15%	101.18	0.29	-0.84%
Temperatura da coluna +15%	104.02	0.45	2.00%
Resultado Médio = 102.16%			
RSD = 1.30%			

Tabela 119 - Resultados da robustez do método analítico compostos relacionados teste 1 para a impureza D - Amostra de Produto Acabado sobrecarregada com impurezas A, B, D e F (0,003 mg/ml)

CONDIÇÃO	% IMPUREZA D (MÉDIA)	%RSD	DESVIO % ÀS CONDIÇÕES NOMINAIS
Condições Nominais	93.51	0.65	--
Fluxo -10%	93.85	1.09	0.35%
Fluxo +10%	91.41	0.85	-2.10%
Temperatura da coluna -15%	96.96	0.74	3.45%
Temperatura da coluna +15%	94.07	0.65	0.57%
Resultado Médio = 93.96%			
RSD = 2.07%			

Tabela 120 - Resultados da robustez do método analítico compostos relacionados teste 1 para a impureza F - Amostra de Produto Acabado sobrecarregada com impurezas A, B, D e F (0,003 mg/ml)

CONDIÇÃO	% IMPUREZA F (MÉDIA)	%RSD	DESVIO % ÀS CONDIÇÕES NOMINAIS
Condições Nominais	105.16	0.87	--
Fluxo -10%	104.53	1.12	-0.63%
Fluxo +10%	105.67	1.12	0.51%
Temperatura da coluna -15%	103.73	1.15	-1.43%
Temperatura da coluna +15%	106.08	1.08	0.92%
Resultado Médio = 105.03%			
RSD = 1.23%			

ANEXO C - Resultados da validação do método analítico Compostos

Relacionados – Teste 2

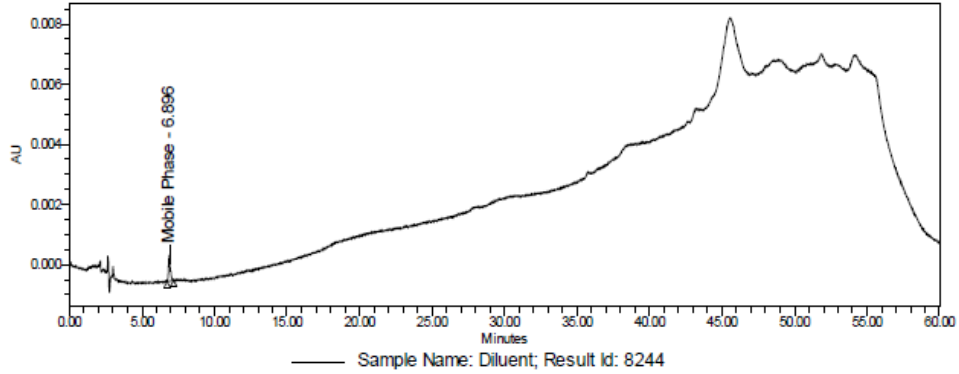


Figura 64 - Cromatograma do diluente (ACN:Tampão 0.1% H₃PO₄, 1:1)

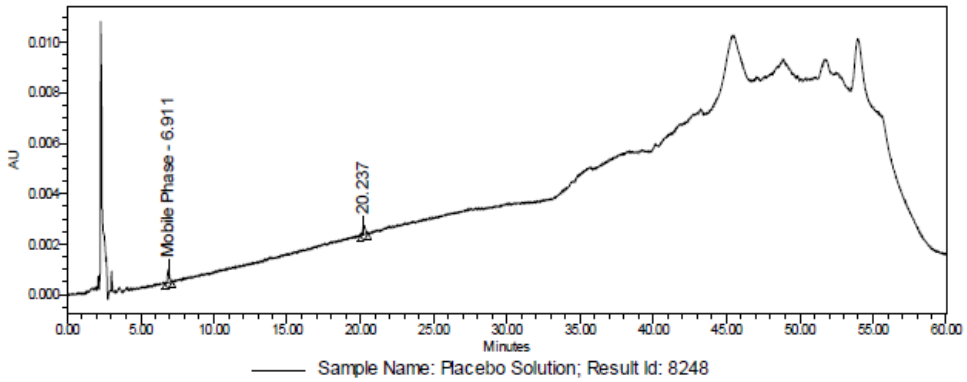


Figura 65 - Cromatograma da solução de placebo do produto acabado.

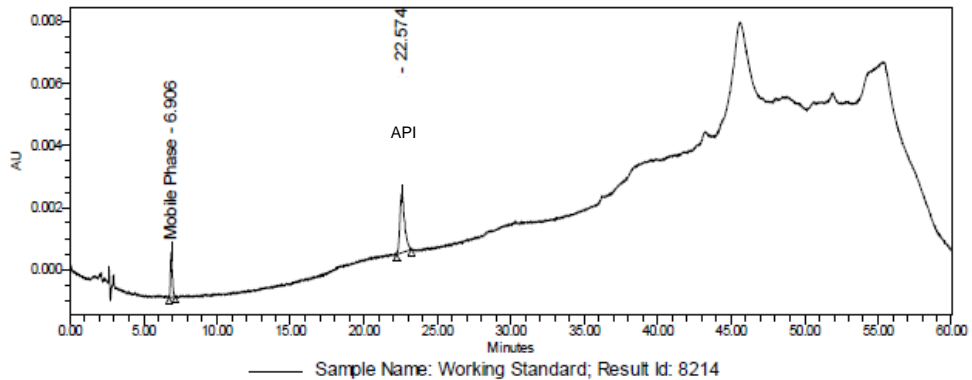


Figura 66 - Cromatograma da solução padrão (0.003 mg/ml).

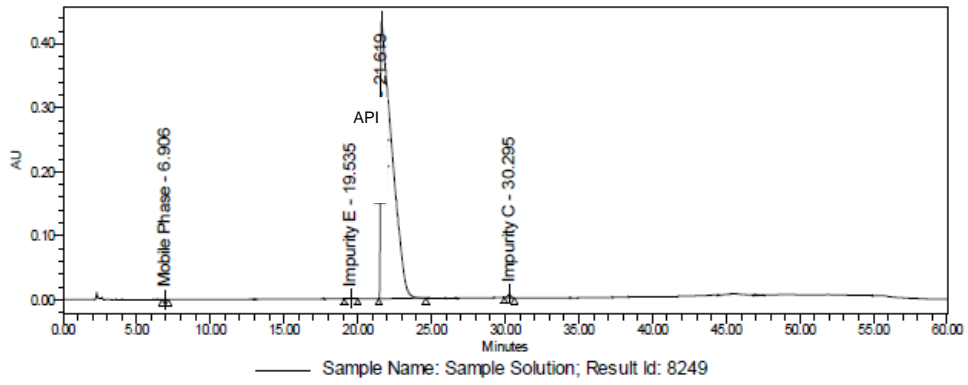


Figura 67 - Cromatograma da amostra do produto acabado 1.5 mg/ml)

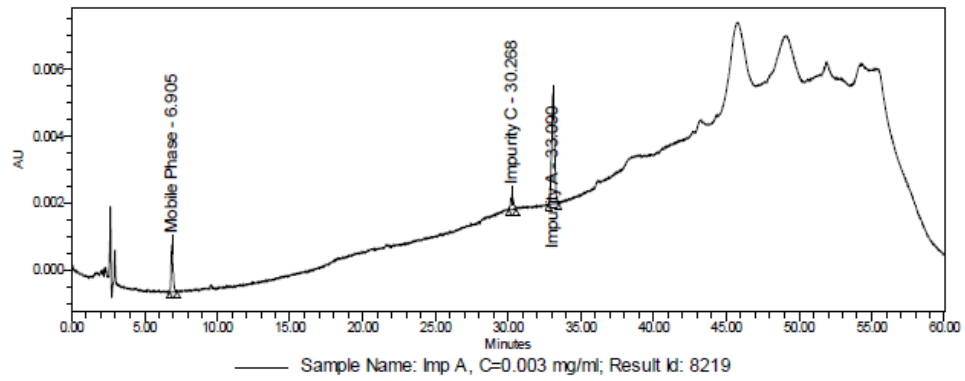


Figura 68 - Cromatograma da solução de Impureza A (0.003 mg/ml).

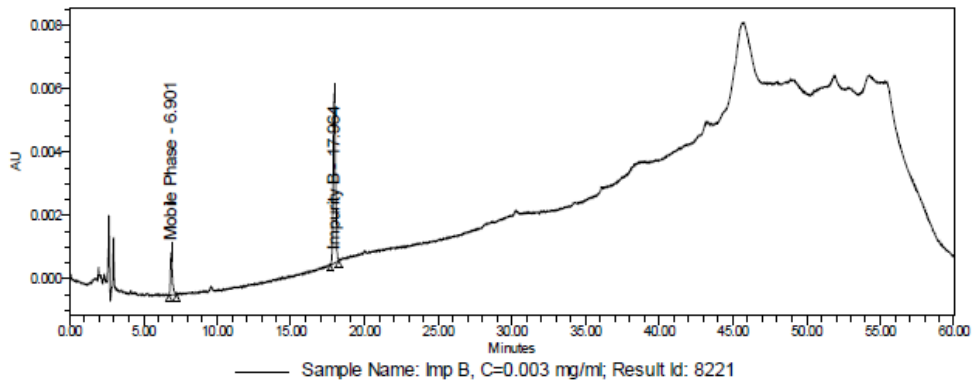


Figura 69 - Cromatograma da solução de Impureza B (0.003 mg/ml).

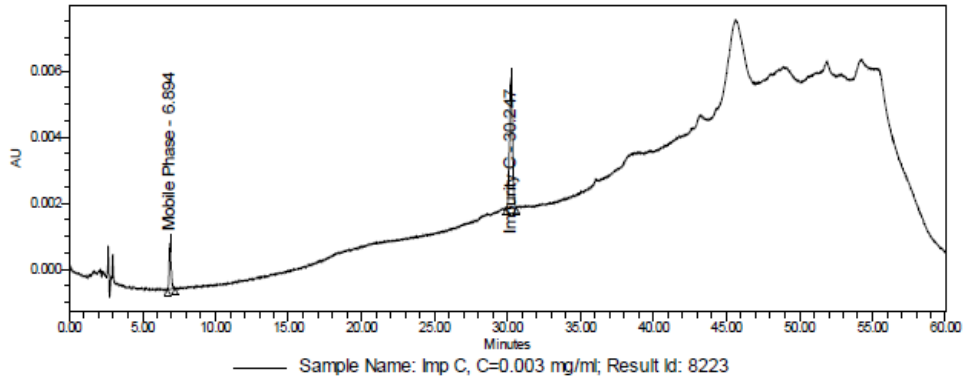


Figura 70 - Cromatograma da solução de Impureza C (0.003 mg/ml).

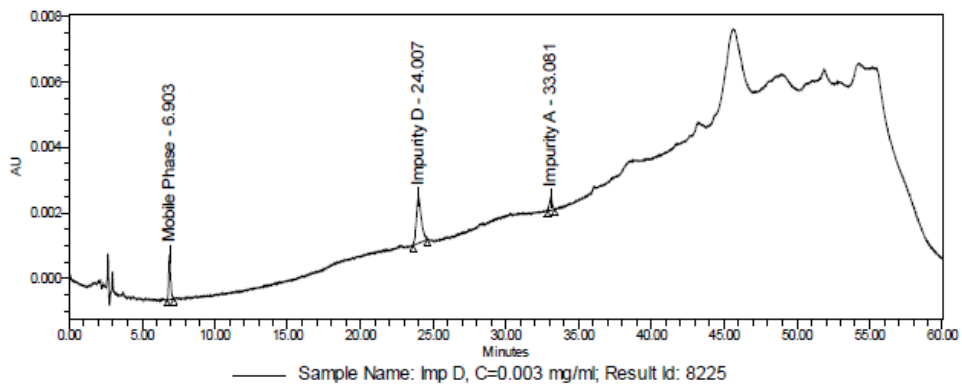


Figura 71 - Cromatograma da solução de Impureza D (0.003 mg/ml).

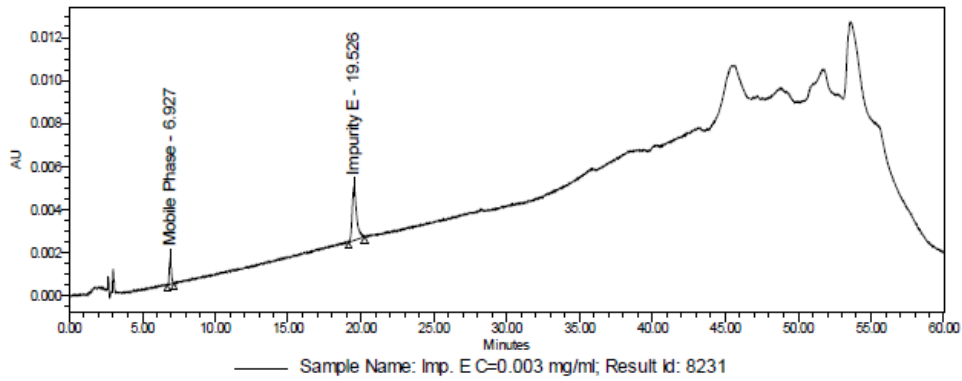


Figura 72 - Cromatograma da solução de Impureza E (0.003 mg/ml).

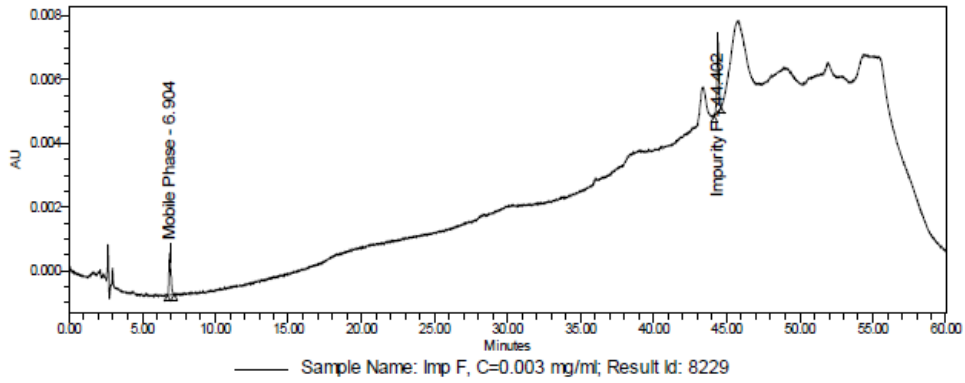


Figura 73 - Cromatograma da solução de Impureza F (0.003 mg/ml).

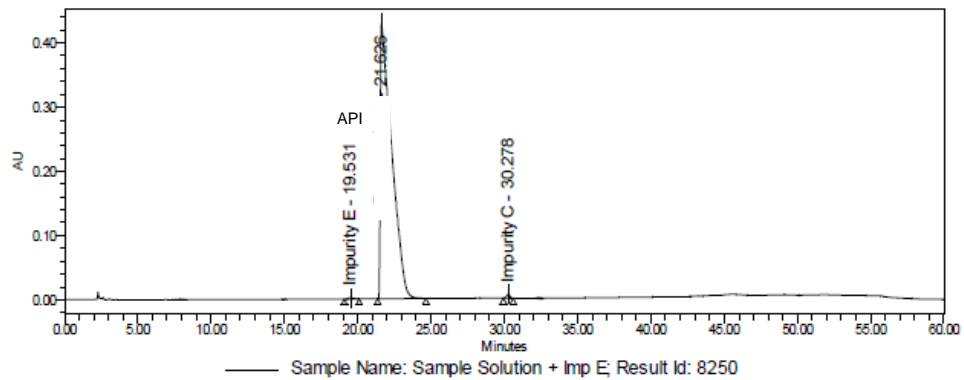


Figura 74 - Cromatograma da amostra de produto acabado (C=1.5 mg/ml) sobrecarregada com Impureza E (C=0.003).

Tabela 121 - Parâmetros cromatográficos do método analítico compostos relacionados teste 2.

Substância	N	T
API	26777	1.36
Impureza E	23859	1.40

Tabela 122 - Resultados da repetibilidade do sistema - compostos relacionados teste 2.

Injeção	API		Impureza E	
	Tempo de Retenção (min)	Área do Pico	Tempo de Retenção (min)	Área do Pico
1	22.670	41670	19.423	51546
2	22.574	42214	19.437	50635
3	22.616	42168	19.424	50519
4	22.617	42102	19.452	50302
5	22.644	41668	19.444	49690
6	22.642	41490	19.468	51075
Média	22.63	41885	19.44	50628
SD	0.03	311.37	0.02	638.84
RSD (%)	0.15	0.74	0.09	1.26

Tabela 123 - Resultados da repetibilidade do método - compostos relacionados teste 2.

Amostra No.	Área (AU)	API Recuperação (%)
1	41758	94.85
2	40735	92.53
3	41447	94.14
4	41638	94.58
5	42730	97.06
6	42327	96.14
Média		94.88
SD		1.58
RSD (%)		1.67

Tabela 124 - Resultados da precisão intermédia do método analítico compostos relacionados teste 2.

Amostra No.	Set 1		Set 2	
	Área (AU)	API (%)	Área (AU)	API (%)
1	41758	94.85	40433	98.79
2	40735	92.53	39838	97.25
3	41447	94.14	40083	97.85
4	41638	94.58	37935	92.61
5	42730	97.06	40715	99.40
6	42327	96.14	39727	96.98
Média		94.88	Média	97.15
SD		1.58	SD	2.40
RSD (%)		1.67	RSD (%)	2.47
Média (2 sets)			96.02	
SD			2.27	
RSD (%)			2.37	

Tabela 125 - Estimativa prévia dos valores de DL do método analítico compostos relacionados teste 2.

API		
	EP S/N	Concentração (µg/ml)
Standard solution (0,2%)	53	2,98
Concentração DL esperada	3	0,17

Tabela 126 - Resultados do limite de detecção do método analítico compostos relacionados teste 2.

Injeção no.	API 0,37 µg/ml
	Área do Pico (AU)
1	3548
2	3715
3	3363
4	3166
5	3453
6	3401
Média	3441
SD	184.38
RSD (%)	5.36
Média S/N	5.42

Tabela 127 - Estimativa prévia dos valores de LOQ do método analítico compostos relacionados teste 2.

API		
	S/N	Concentração (µg/ml)
Standard solution (0,2%)	53	2,98
Concentração QL esperada	10	0,56

Tabela 128 - Resultados do limite de quantificação do método analítico compostos relacionados teste 2.

Injeção no.	API 0,75 µg/ml
	Área do Pico (AU)
1	8679
2	9922
3	8278
4	9418
5	8912
6	8108
Média	8886
SD	689.17
RSD (%)	7.76
Média S/N	11.94

Tabela 129 – Fator de Resposta Relativo da Impureza E - método analítico compostos relacionados teste 2.

Substância	Área do Pico Média	Concentração (µg/ml)	Relative Factor (RF)	Relative Fator de Resposta (RRF)
API	41578	2.991	13901	0.98
Impureza E	52272	3.832	13641	

Tabela 130 - Resultados da exatidão do método analítico compostos relacionados teste 2.

Concentração Nível	% API Recuperação			
	QL (25%)	50%	100%	150%
A1	86.66	84.53	94.85	98.34
A2	87.35	87.82	92.53	96.64
A3	83.09	90.29	94.14	100.26
Média	85.70	87.55	93.84	98.41
SD	2.29	2.89	1.19	1.81
RSD (%)	2.67	3.30	1.27	1.84
Média (n = 12)	91.38			
SD	5.59			
RSD (%)	6.12			

Tabela 131 - Resultados do gama de validação do método analítico compostos relacionados teste 2.

Injeção	API Área do Pico (AU)	
	Baixo Nível (0,75 µg/ml)	Alto Nível (4,49 µg/ml)
1	8679	62004
2	9922	62314
3	8278	60479
4	9418	62546
5	8912	62585
6	8108	61131
Média	8886	61843
SD	689.17	855.57
RSD (%)	7.76	1.38

Tabela 132 - Estabilidade intradiária da solução padrão a 5°C - compostos relacionados teste 2.

Tempo (horas)	API	
	Área do Pico (AU)	Desvio Relativo (%)
0	44026	--
7	42569	-3.3
11	41883	-4.9
15	41701	-5.3
22	42840	-2.7
26	43174	-1.9

Tabela 133 - Parâmetros cromatográficos do ensaio robustez do método analítico compostos relacionados teste 2 – solução padrão ($C_{API} = 0,003$ mg/ml).

	Área do Pico %RSD	RT (min)	N	T
Condições nominais	4.01	24.01	27344	1.23
Fluxo -10%	2.75	25.66	30287	1.25
Fluxo +10%	0.76	22.67	26087	1.21
Temp. -15%	2.40	23.78	27194	1.24
Temp. +15%	1.47	24.42	29726	1.20
Composição orgânico da FM +20%	2.15	23.32	30246	1.25

Anexo D - Resultados da validação do método analítico Pureza

Estereoquímica

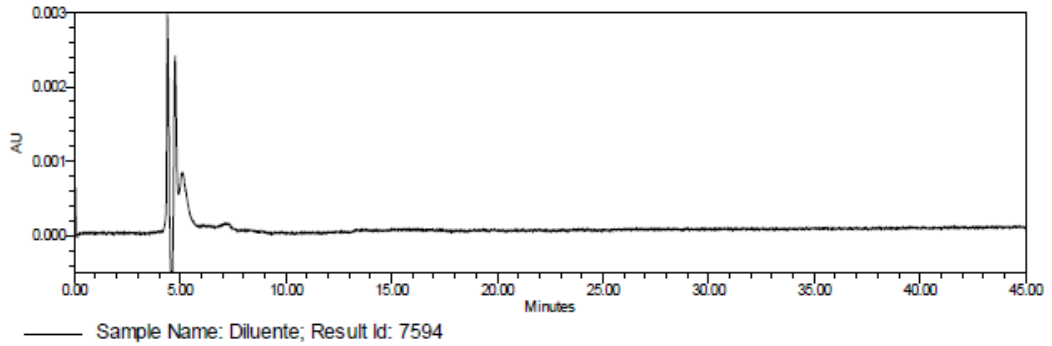


Figura 75 - Cromatograma do diluente (ACN:Tampão, 1:1).

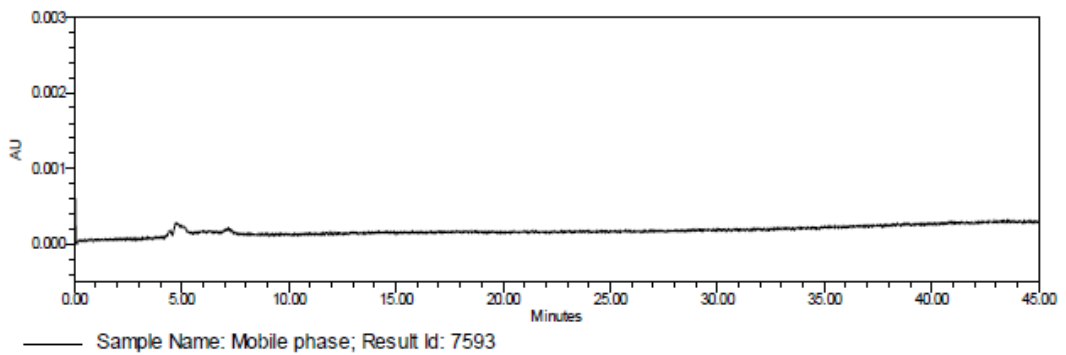


Figura 76 - Cromatograma da fase móvel (volume de injeção igual a 0).

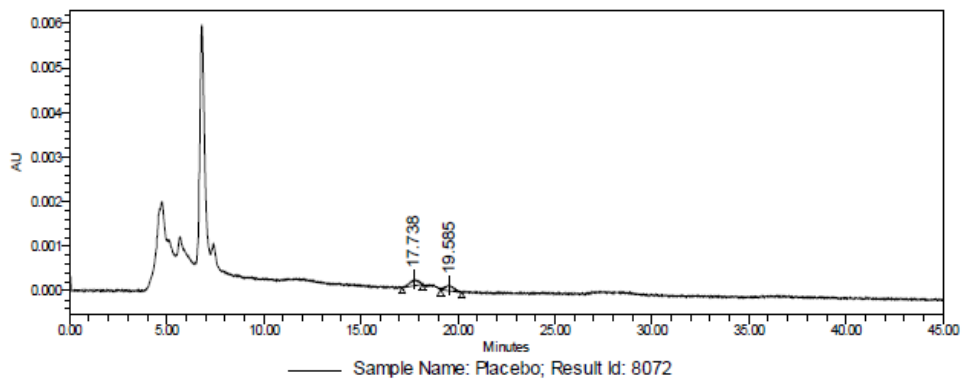


Figura 77 - Cromatograma da amostra de placebo do produto acabado.

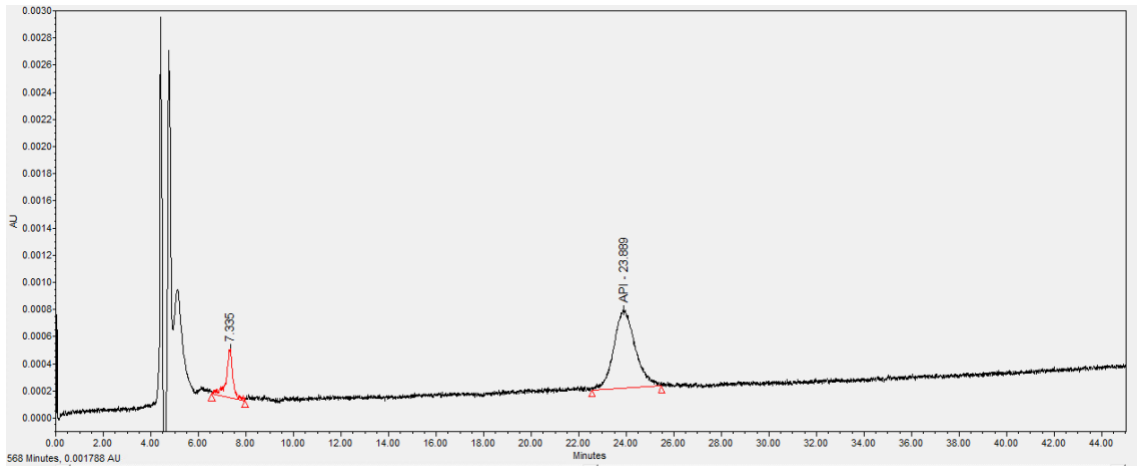


Figura 78 - Cromatograma da solução padrão (0.0006 mg/ml).

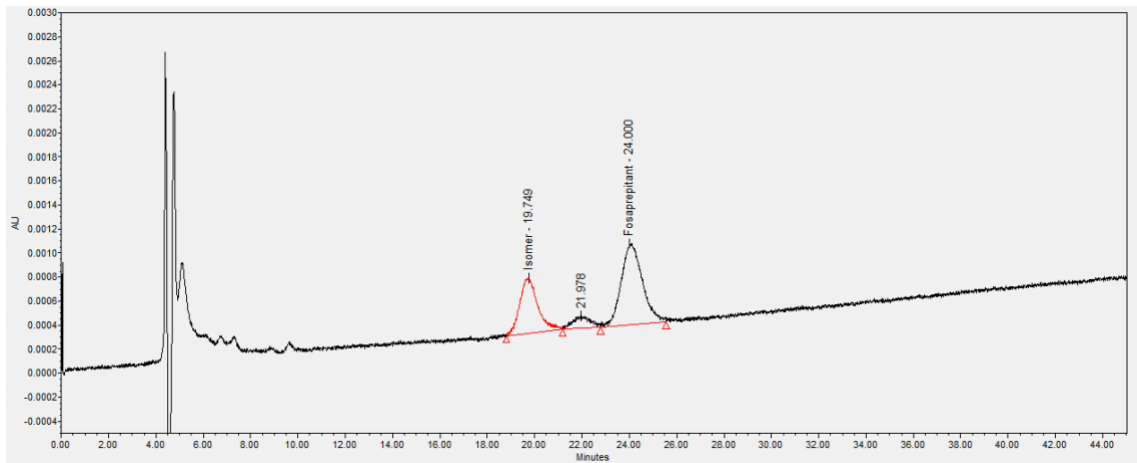


Figura 79 - Cromatograma da solução de isômero à concentração do limite de especificação (0.0006 mg/ml).

Tabela 134 - Parâmetros cromatográficos do método analítico pureza estereoquímica.

Substância	N	T	R
API	3750	1.06	1.46
Enantiômero	3716	1.09	

Tabela 135 - Resultados da repetibilidade do sistema do método analítico pureza estereoquímica.

Injeção	API		Enantiómero	
	Tempo de Retenção (min)	Área do Pico	Tempo de Retenção (min)	Área do Pico
1	24.000	41967	19.749	24340
2	24.156	40327	19.709	24619
3	24.143	41395	19.728	23448
4	24.092	42455	19.757	24586
5	24.136	42065	19.842	23995
6	24.077	41372	19.761	24489
Média	24.10	41597	19.76	24246
SD	0.06	747.85	0.05	452.20
RSD (%)	0.24	1.80	0.23	1.87

Tabela 136 - Resultados da repetibilidade do método do método analítico pureza estereoquímica.

Amostra No.	Área (AU)	API Recuperação (%)
1	34402	95.39
2	33307	92.36
3	35648	98.85
4	34077	94.49
5	34222	94.89
6	33562	93.06
Média	94.84	94.84
SD	2.27	2.27
RSD (%)	2.40	2.40

Tabela 137 - Resultados da precisão intermédia do método analítico pureza estereoquímica.

Amostra No.	Set 1		Set 2	
	Área (AU)	API (%)	Área (AU)	API (%)
1	34402	95.4	34346	103.0
2	33307	92.4	39838	119.1
3	35648	98.9	33342	99.7
4	34077	94.5	31965	95.6
5	34222	94.9	31207	93.3
6	33562	93.1	32695	97.8
Média	94.84	94.84	Média	101.42
SD	2.27	2.27	SD	9.30
RSD (%)	2.40	2.40	RSD (%)	9.17
Média (2 sets)			98.13	
SD			7.31	
RSD (%)			7.45	

Tabela 138 - Estimativa prévia dos valores de DL do método analítico pureza estereoquímica.

<i>API</i>		
	EP S/N	Concentração (µg/ml)
Standard solution (0,2%)	26	0.601
Concentração DL esperada	3	0.070

Tabela 139 - Resultados do limite de detecção do método analítico pureza estereoquímica.

Injeção no.	API - 0,075 µg/ml
	Área do Pico (AU)
1	5115
2	3987
3	3921
4	5745
5	4843
6	4490
Média	4684
SD	698.91
RSD (%)	14.92
Média S/N	2.96

Tabela 140 - Estimativa prévia dos valores de LOQ do método analítico pureza estereoquímica.

<i>API</i>		
	S/N	Concentração (µg/ml)
Standard solution (0,2%)	26	0.601
Concentração QL esperada	10	0,233

Tabela 141 - Resultados do limite de quantificação do método analítico pureza estereoquímica.

Injeção no.	API 0,3 µg/ml
	Área do Pico (AU)
1	17516
2	17060
3	16652
4	17724
5	17859
6	17665
Média	17413
SD	463.35
RSD (%)	2.66
Média S/N	16.63

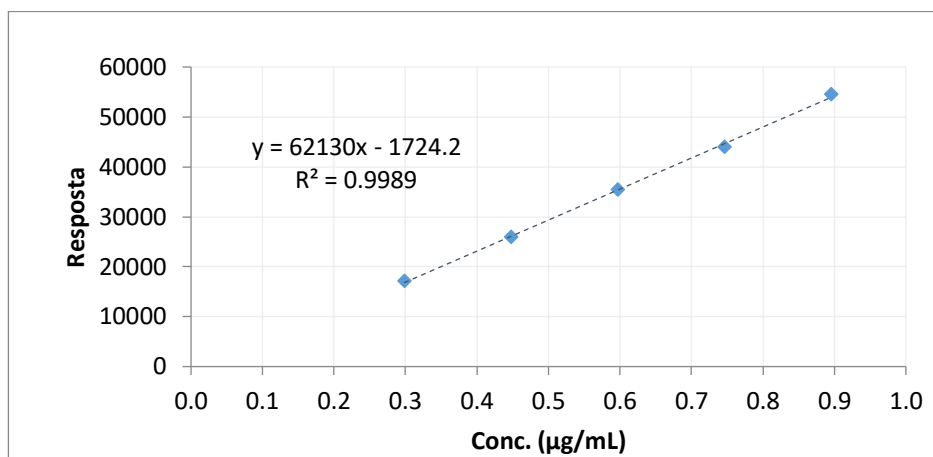


Figura 80 - Regressão linear ao API para a linearidade do método analítico pureza estereoquímica.

Tabela 142 - Dados da regressão linear ao API do método analítico pureza estereoquímica.

Concentração Nível (%)	API Concentração (µg/ml)	API Área do Pico (AU)	Área Média (AU)	RSD (%)	Fator de Resposta (RF)
50 (LOQ)	0.30	17516 17060 16652	17076	2.53	57182
75	0.45	24537 26732 26678	25982	4.82	58004
100	0.60	36320 34778 35225	35441	2.24	59340
124	0.75	44072 44467 43248	43929	1.42	58842
149	0.90	54456 55556 53448	54487	1.94	60820
Slope	62130.12				
Interceção	-1724.2		Média RF		58838
r	0.999		SD		1379.82
r²	0.999		RSD (%)		2.35

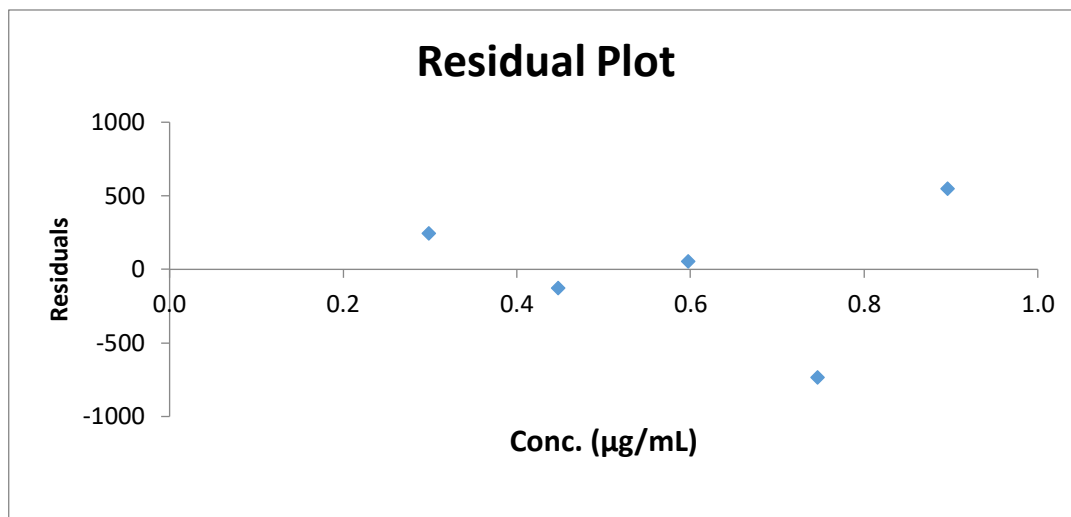


Figura 81 - Distribuição dos resíduos do método analítico pureza estereoquímica.

Tabela 143 - Fator de Resposta Relativo do Isômero - método analítico pureza estereoquímica.

Substância	Área do Pico Média	Standard Enantiômero Pureza (%)	Relative Fator de Resposta (RRF)
API	41597	0.6745	0.83
Enantiômero	24246	0.3256	

Tabela 144 - Resultados da exatidão do método analítico pureza estereoquímica.

Concentração Nível	% API Recuperação		
	50% (QL)	100%	150%
A1	89.64	95.39	93.40
A2	93.71	92.36	96.76
A3	95.75	98.85	93.54
Média	93.03	95.53	94.57
SD	3.11	3.25	1.90
RSD (%)	3.34	3.40	2.01
Média (n = 9)	94.38		
SD	2.67		
RSD (%)	2.83		

Tabela 145 - Resultados do gama de validação do método analítico pureza estereoquímica.

Injeção	API Área do Pico (AU)	
	Baixo Nível (0,30 µg/ml)	Alto Nível (0,90 µg/ml)
1	17516	54456
2	17060	55556
3	16652	53448
4	17724	52744
5	17859	55335
6	17665	52114
Média	17413	53942
SD	463.35	1402.17
RSD (%)	2.66	2.60

Tabela 146 – Estabilidade intra-diária da solução padrão a 5°C – pureza estereoquímica.

Time (hours)	API	
	Peak Area (AU)	Deviation in percentage
0	36063	--
32	36005	-0.2
38	36555	1.4
44	37196	3.1
48	36715	1.8
52	36694	1.7
63	36332	0.7
74	36229	0.5
83	37260	3.3
90	37844	4.9

Tabela 147 - Parâmetros cromatográficos do ensaio robustez do método analítico pureza estereoquímica - solução padrão ($C_{API} = 0,0006 \text{ mg/ml}$).

	Área do Pico %RSD	RT (min)	N	T
TQ	3.97	23.34	3791	0.90
Fluxo -35%	2.89	34.16	4801	1.10
Fluxo +35%	2.59	18.17	3308	1.14
Temp. -5%	3.86	25.28	3813	1.13
Temp. +5%	2.48	21.97	3989	1.09
Composição em orgânico da FM -8%	1.63	17.88	3731	1.13
Composição em orgânico da FM +8%	4.38	0.12	4336	1.07
pH da Fase Móvel -5%	3.79	29.50	4389	1.08
pH da Fase Móvel +5%	3.34	22.57	3637	1.13

ANEXO E - Resultados da monitorização da estabilidade

Cromatogramas do método analítico Doseamento

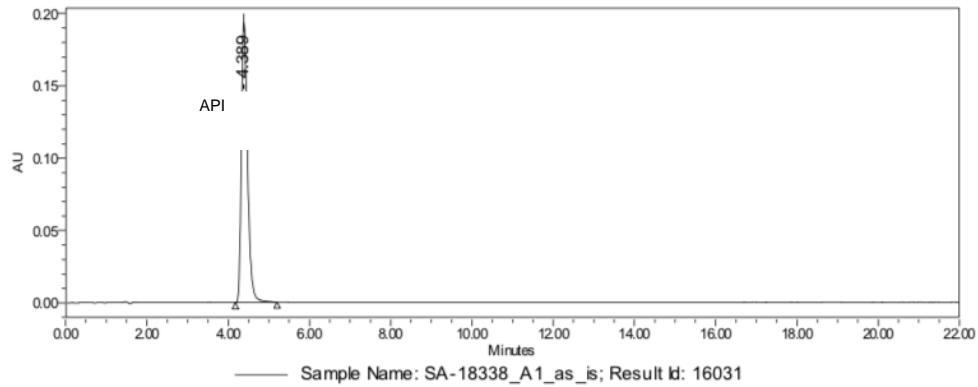


Figura 82 - Cromatograma da amostra de API exposta a luz – doseamento.

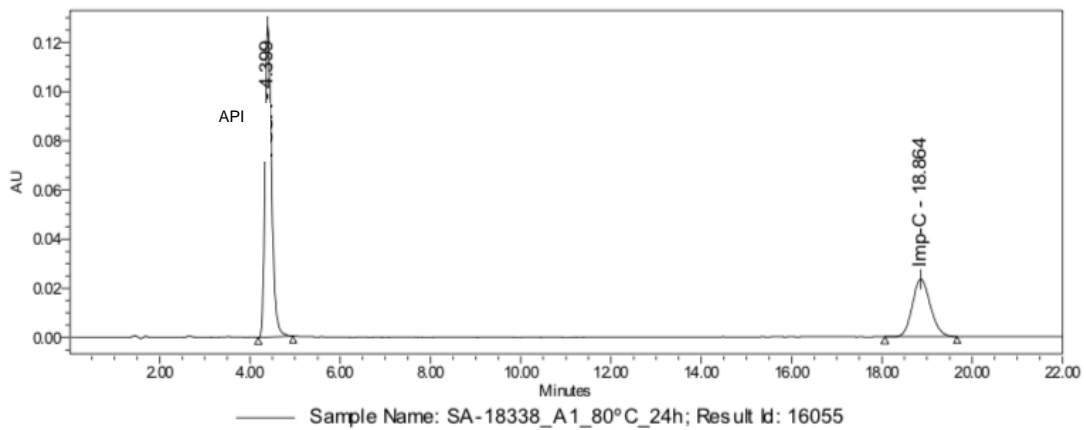


Figura 83 - Cromatograma da amostra de API exposta ao calor – doseamento.

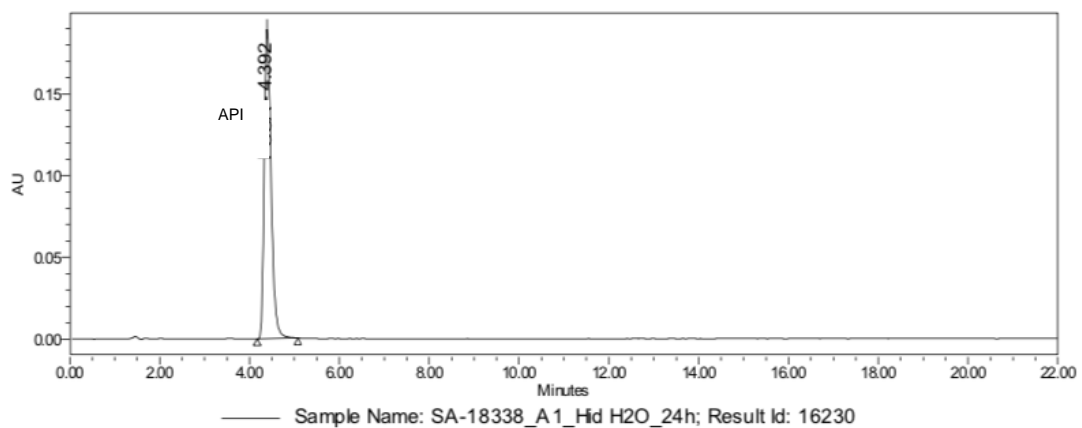


Figura 84 - Cromatograma da amostra de API exposta a hidrolise – doseamento.

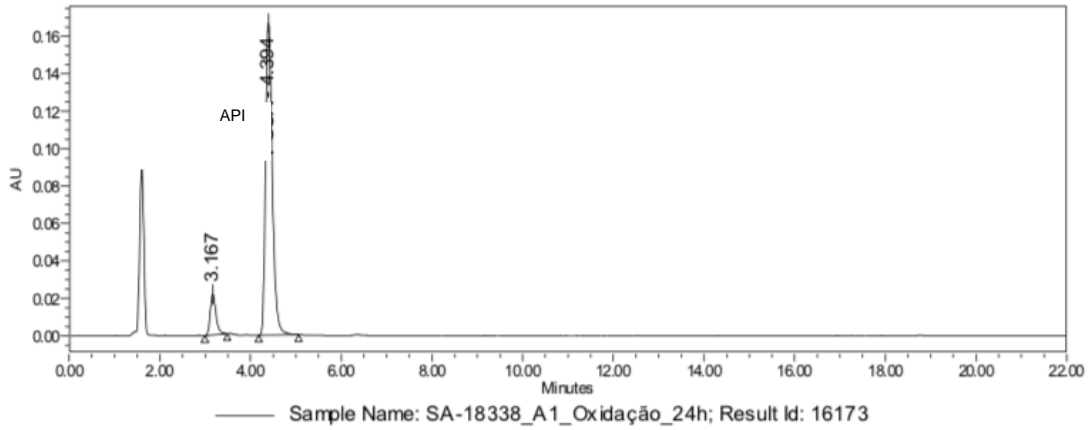


Figura 85 - Cromatograma da amostra de API exposta a oxidação – doseamento.

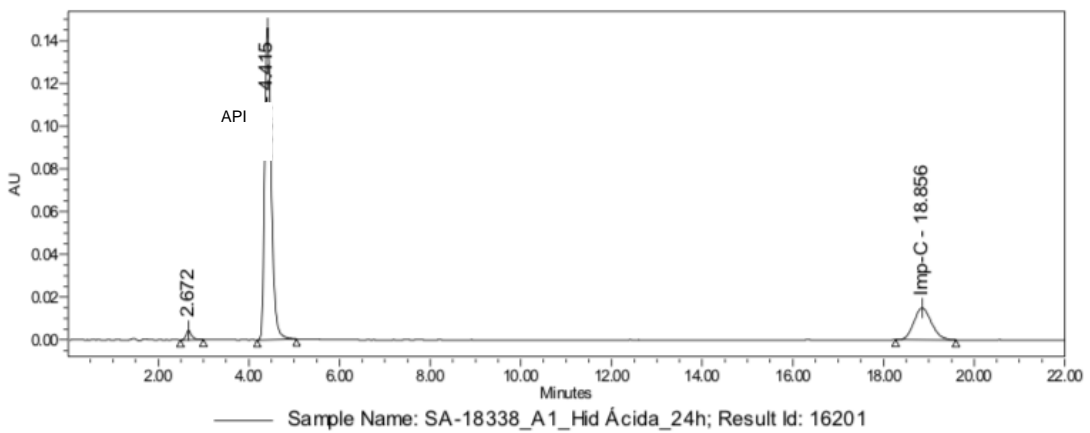


Figura 86 - Cromatograma da amostra de API exposta a hidrolise acida – doseamento.

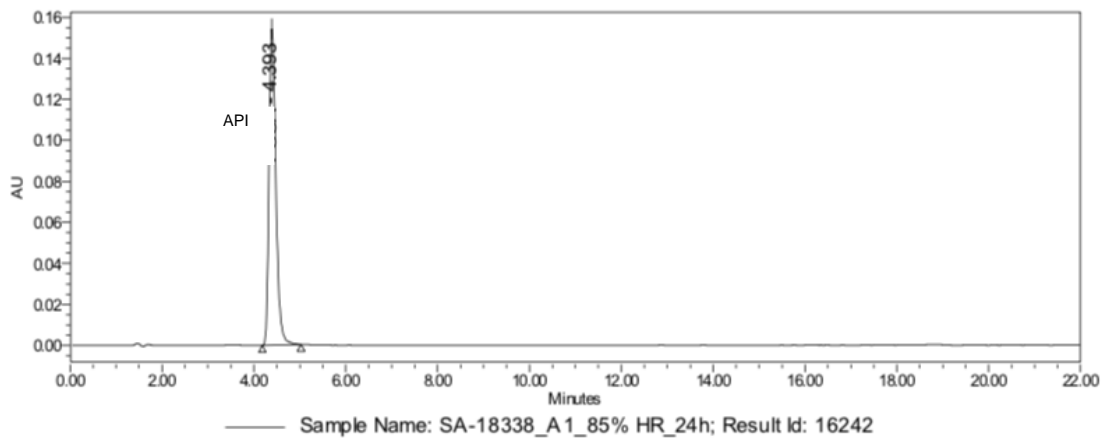


Figura 87 - Cromatograma da amostra de API exposta a humidade – doseamento.

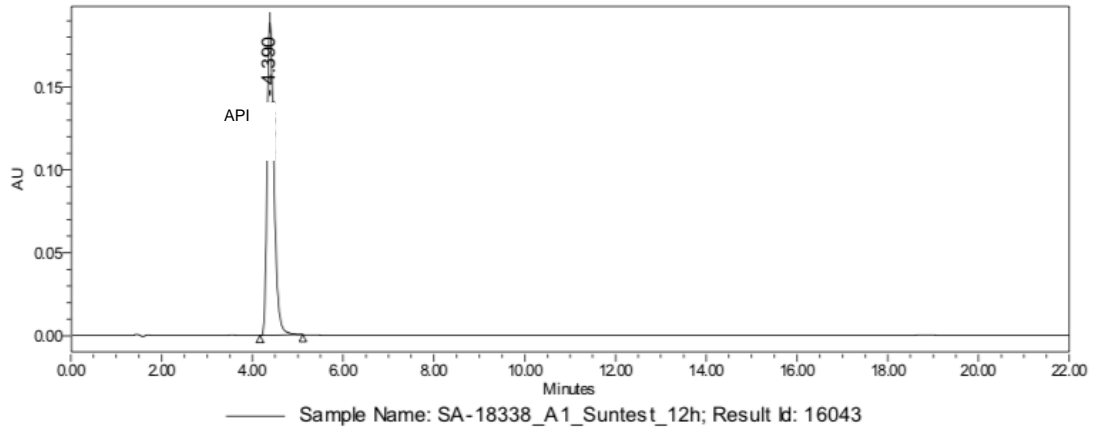


Figura 88 - Cromatograma da amostra de API exposta a luz – doseamento.

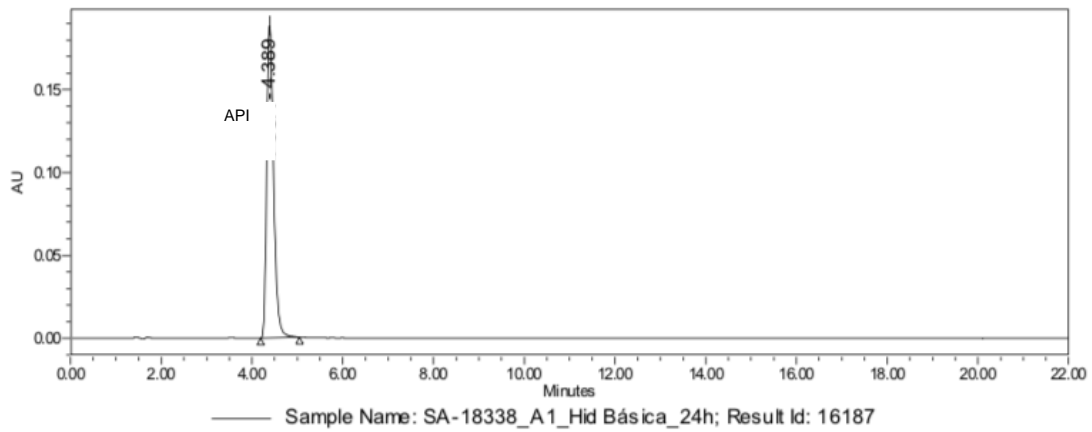


Figura 89 - Cromatograma da amostra de API exposta a hidrolise básica – doseamento.

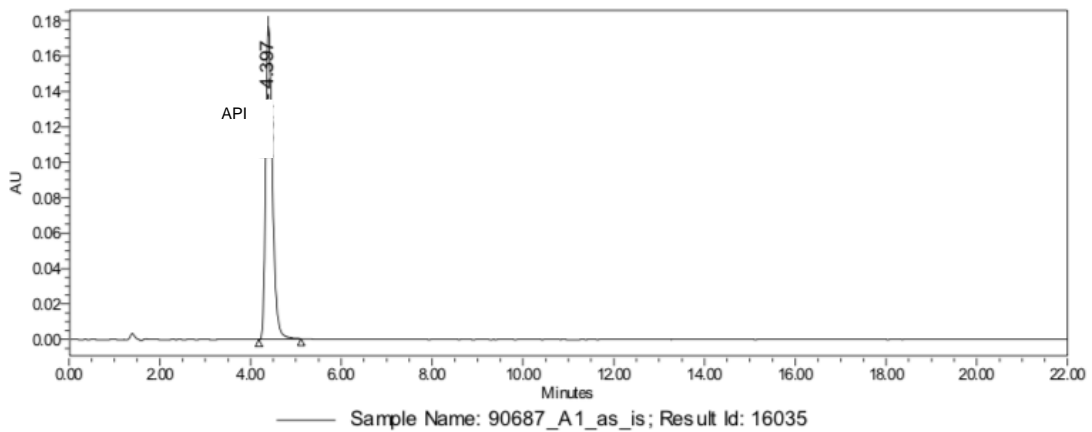


Figura 90 - Cromatograma da amostra de produto acabado sem degradação – doseamento.

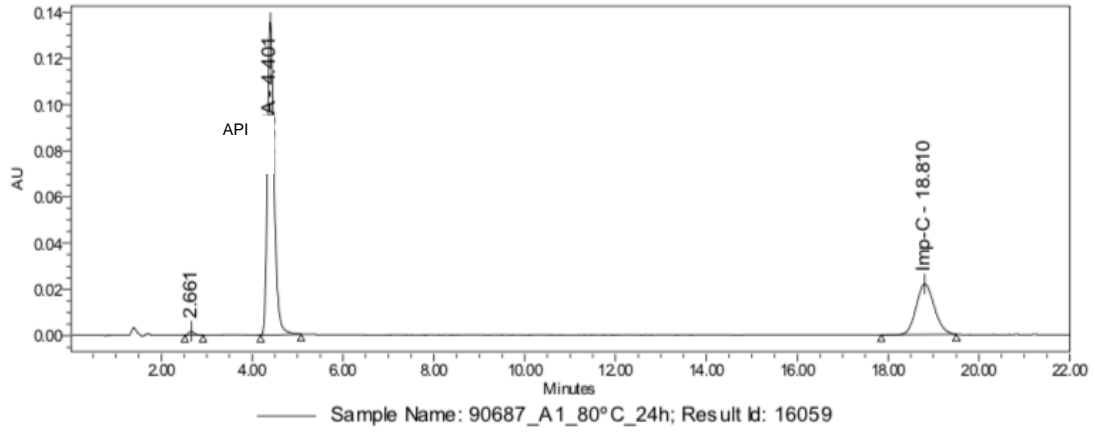


Figura 91 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a calor – doseamento.

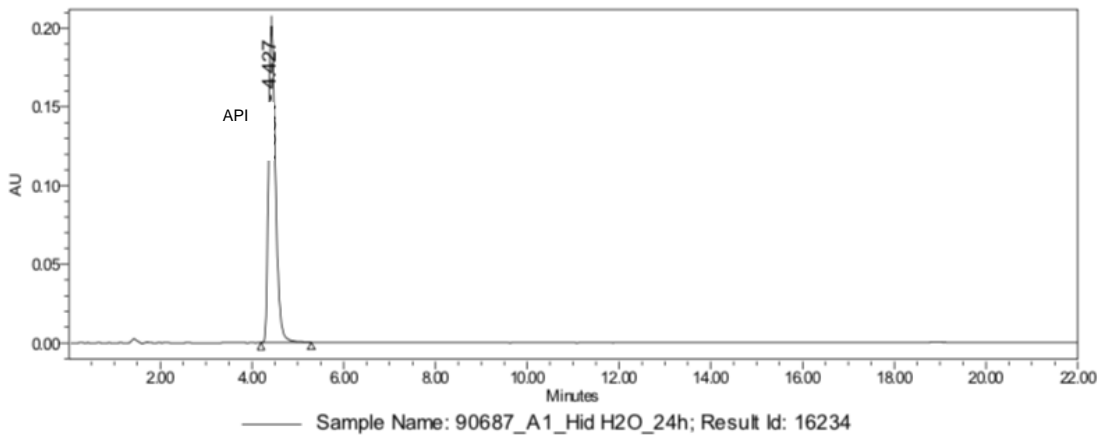


Figura 92 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a hidrólise – doseamento.

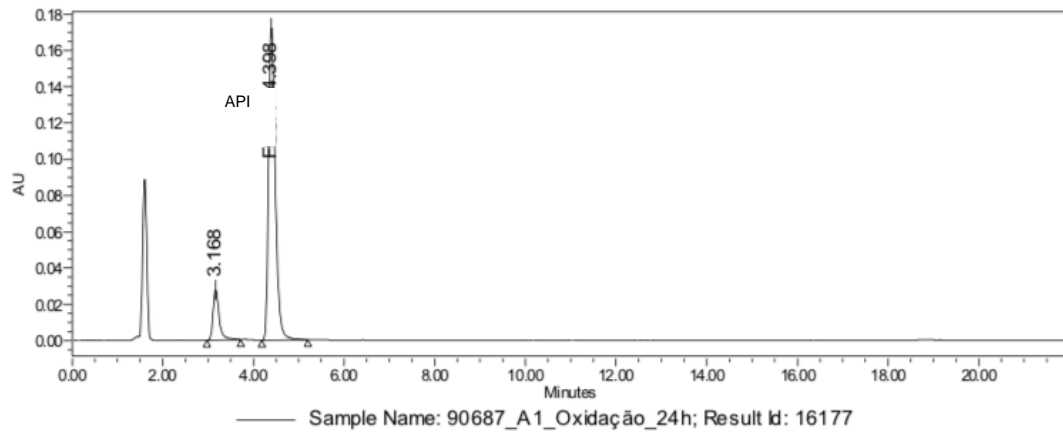


Figura 93 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a oxidação – doseamento.

Validação de Métodos Analíticos em HPLC e Estudo de Degradação Forçada de um Medicamento Injetável

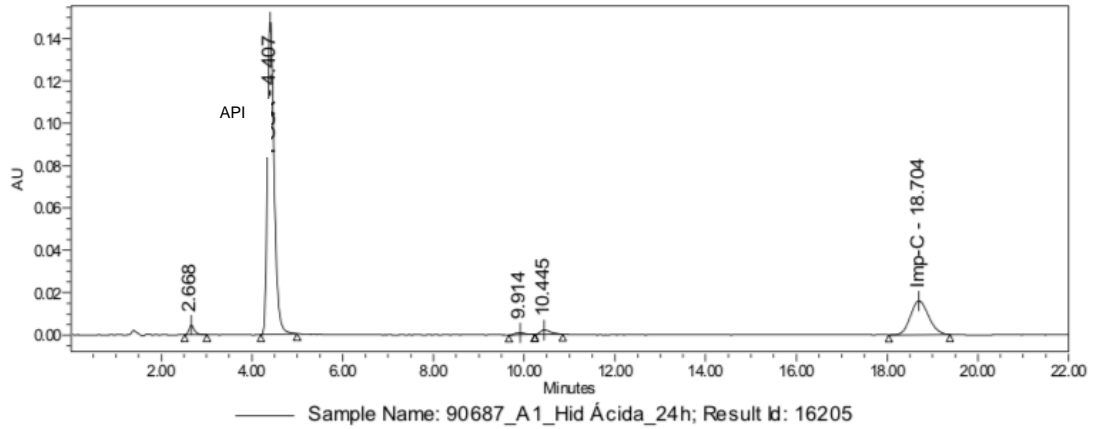


Figura 94 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a hidrólise ácida – doseamento.

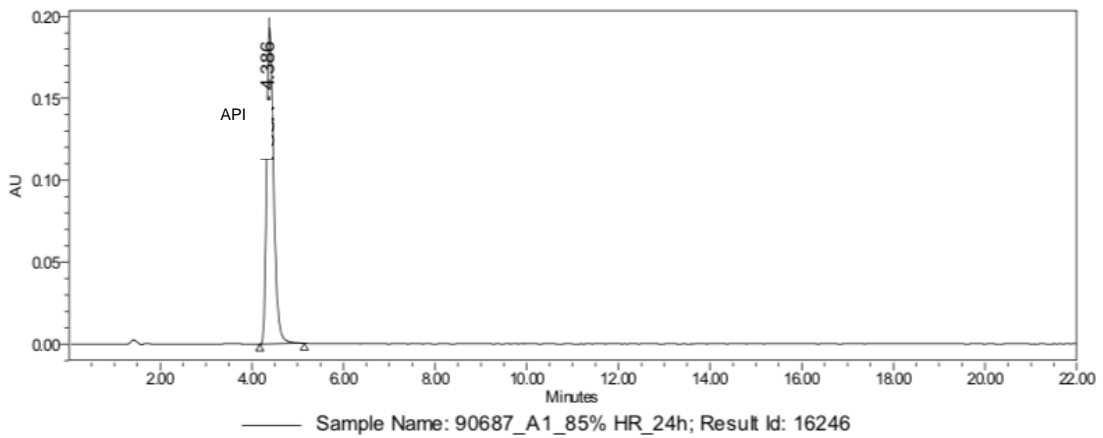


Figura 95 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a humidade – doseamento.

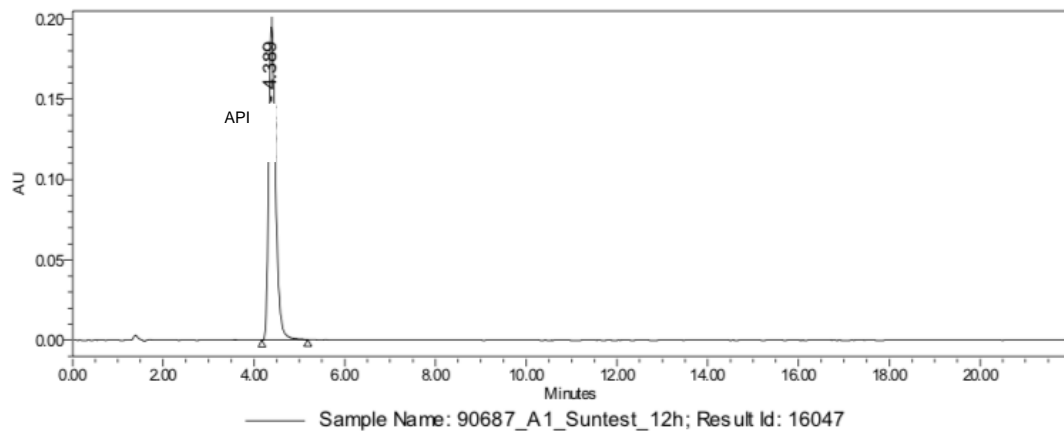


Figura 96 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a luz – doseamento.

Cromatogramas do método compostos relacionados teste 1

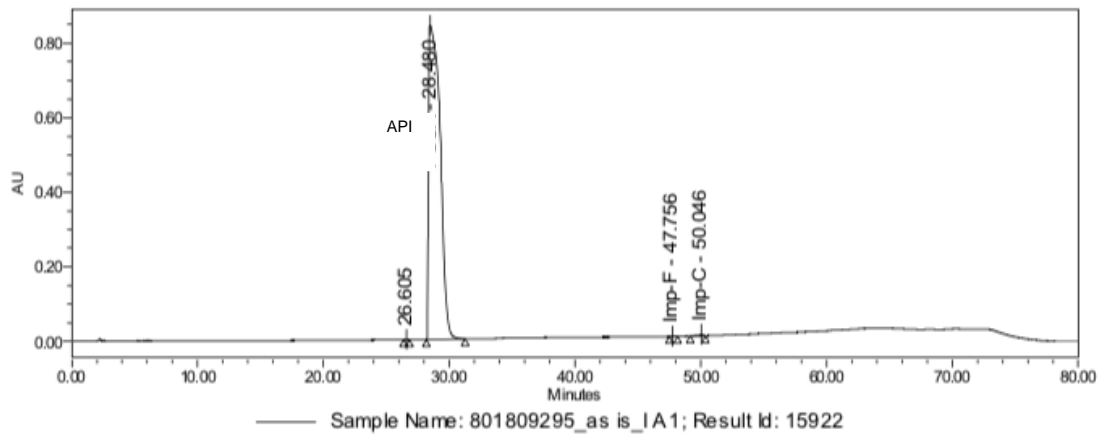


Figura 97 - Cromatograma da amostra de API sem degradação – compostos relacionados teste 1.

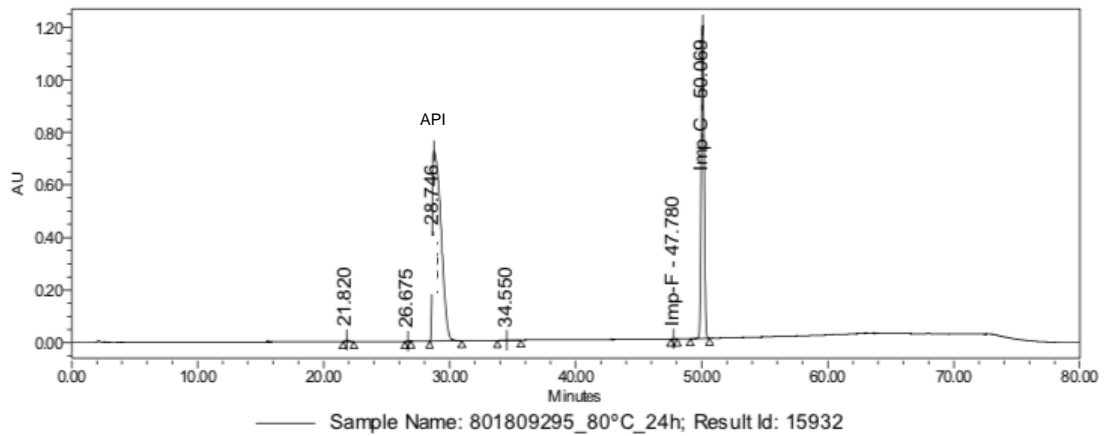


Figura 98 - Cromatograma da amostra de API exposta a calor – compostos relacionados teste 1.

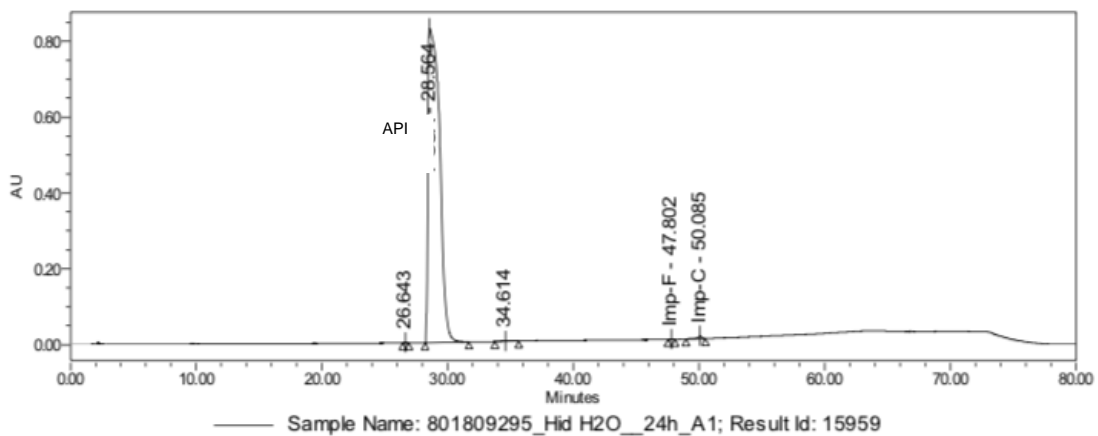


Figura 99 - Cromatograma da amostra de API exposta a hidrolise – compostos relacionados teste 1.

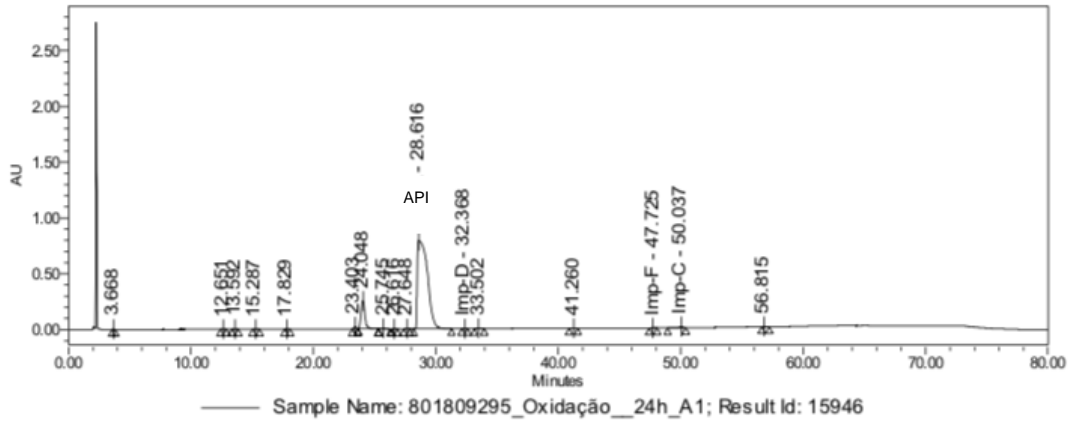


Figura 100 - Cromatograma da amostra de API exposta a oxidação – compostos relacionados teste 1.

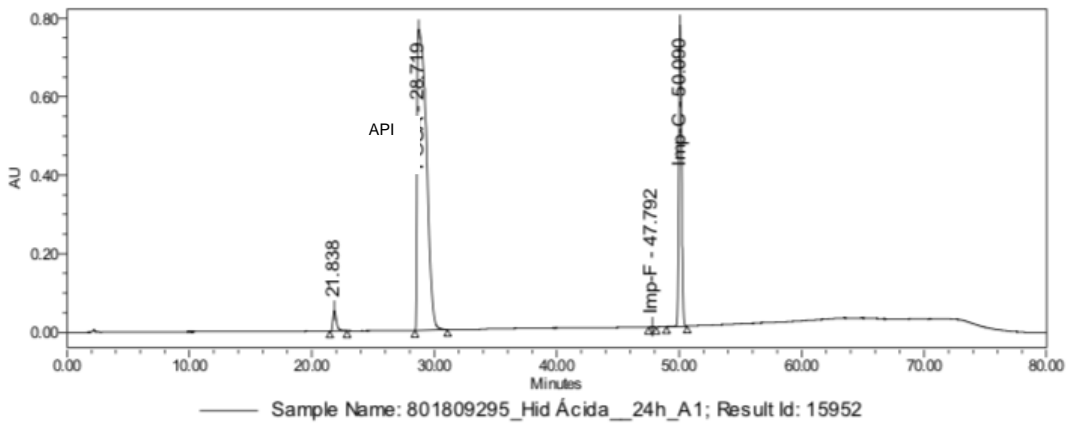


Figura 101 - Cromatograma da amostra de API exposta a hidrólise ácida – compostos relacionados teste 1.

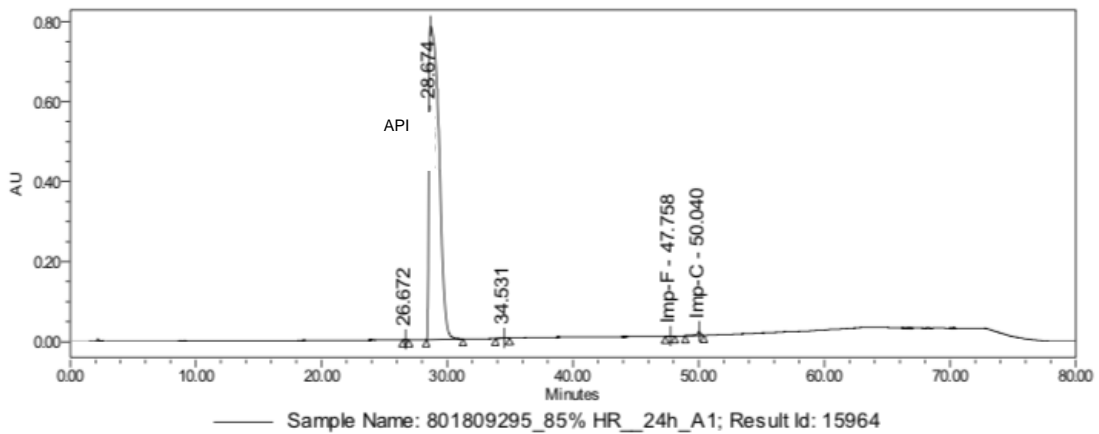


Figura 102 - Cromatograma da amostra de API exposta a humidade – compostos relacionados teste 1.

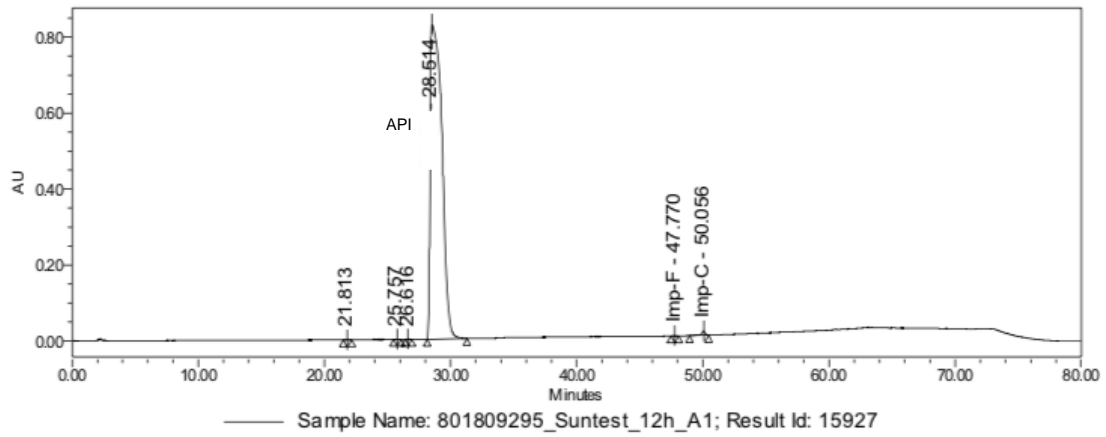


Figura 103 - Cromatograma da amostra de API exposta a luz – compostos relacionados teste 1.

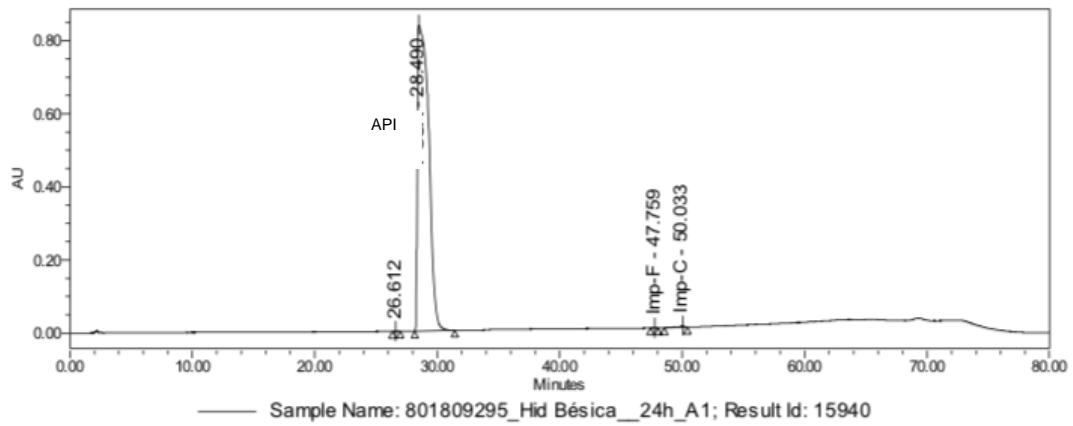


Figura 104 - Cromatograma da amostra de API exposta a hidrólise básica – compostos relacionados teste 1.

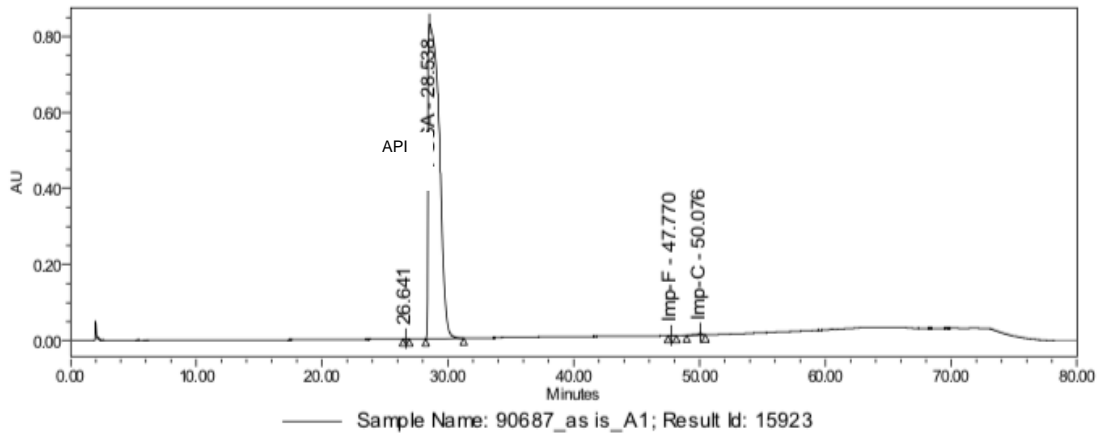


Figura 105 - Cromatograma da amostra de produto acabado sem degradação – compostos relacionados teste 1.

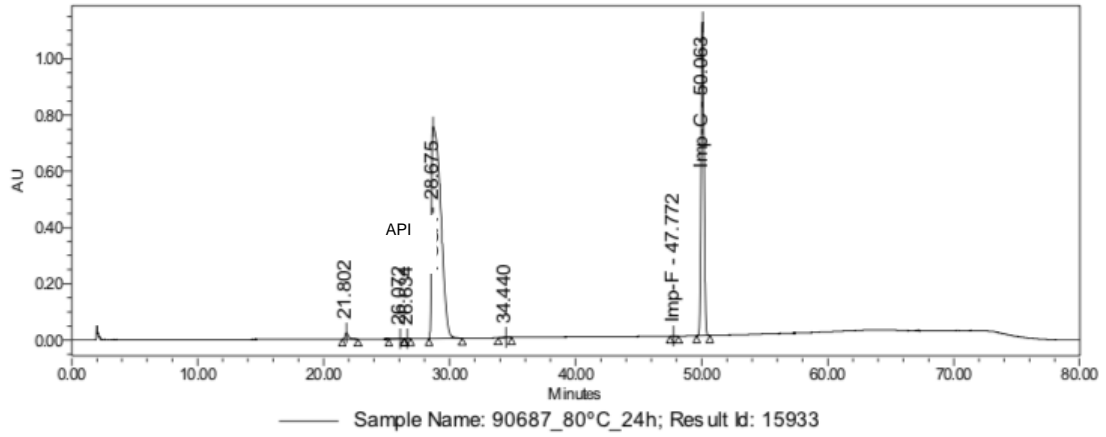


Figura 106 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a calor – compostos relacionados teste 1.

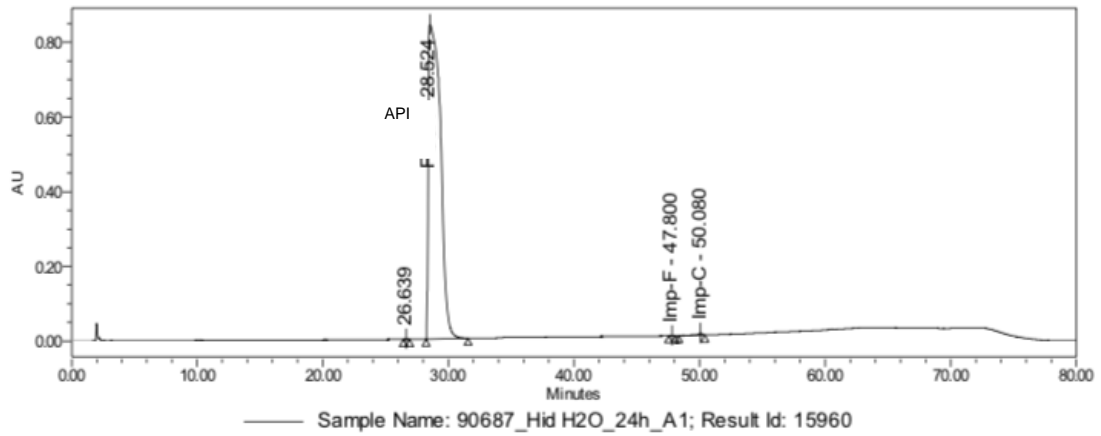


Figura 107 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a hidrolise – compostos relacionados teste 1.

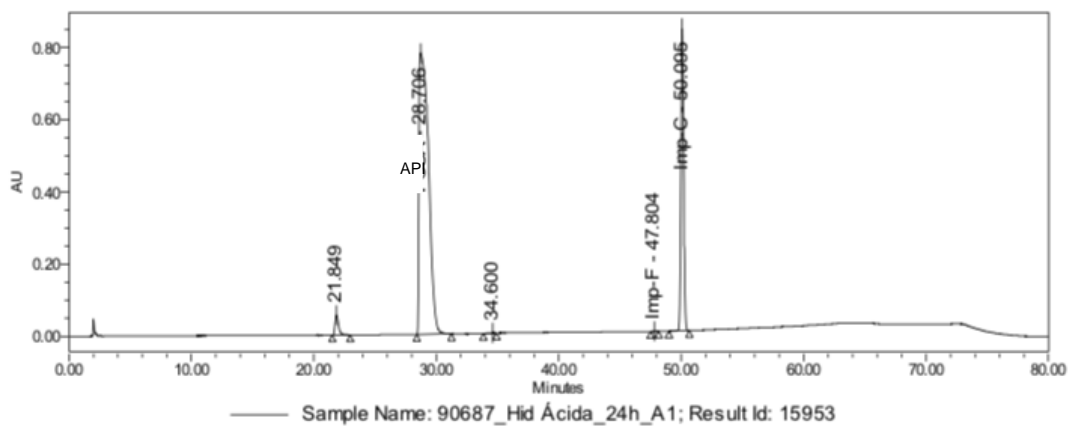


Figura 108 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a hidrolise acida – compostos relacionados teste 1.

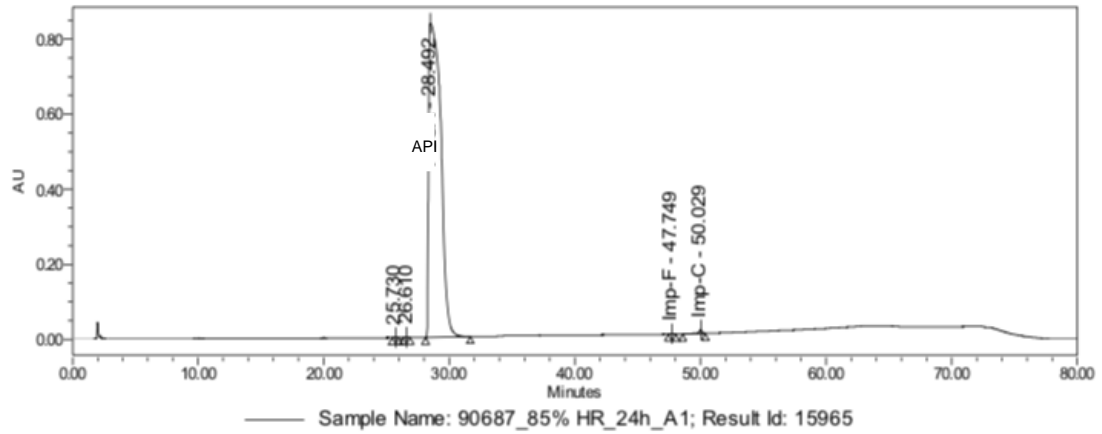


Figura 109 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a umidade – compostos relacionados teste 1.

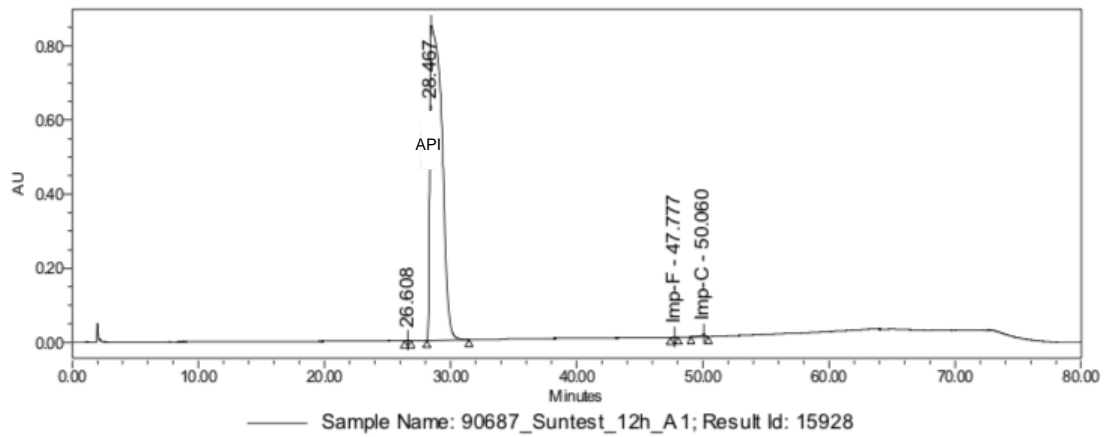


Figura 110 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a luz – compostos relacionados teste 1.

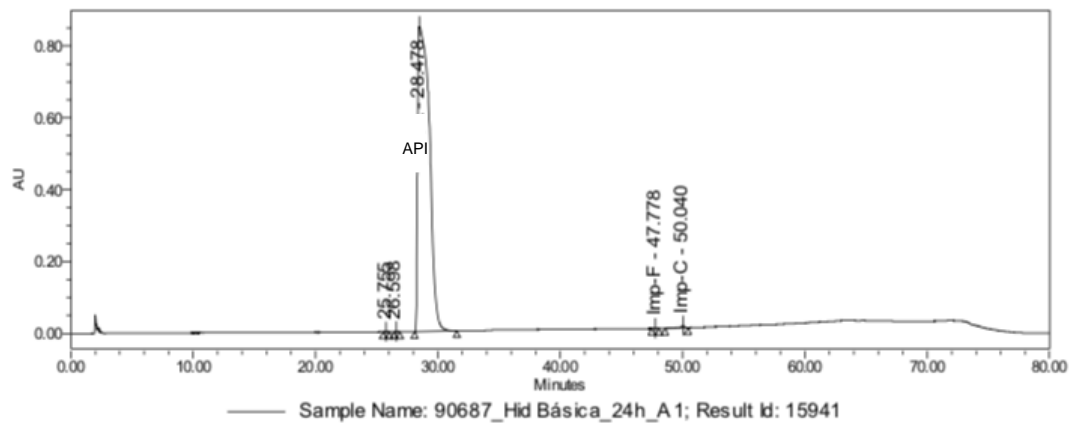


Figura 111 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a hidrólise básica – compostos relacionados teste 1.

Cromatogramas do método analítico Compostos Relacionados teste 2

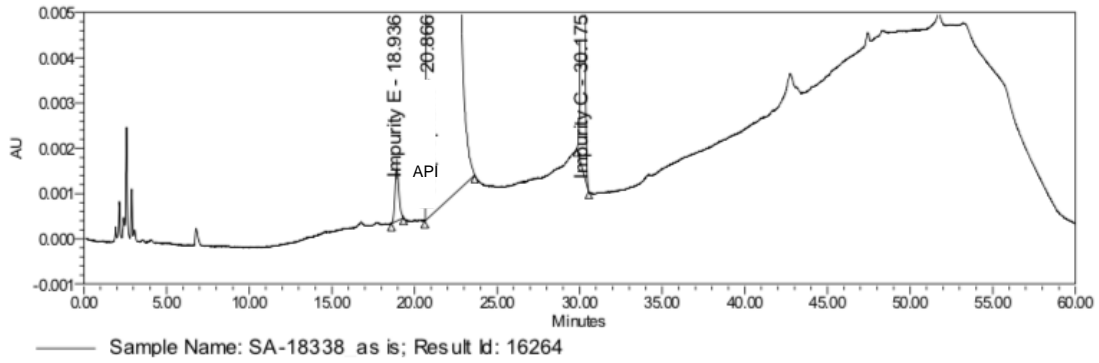


Figura 112 - Cromatograma da amostra de API sem degradação – compostos relacionados teste 2.

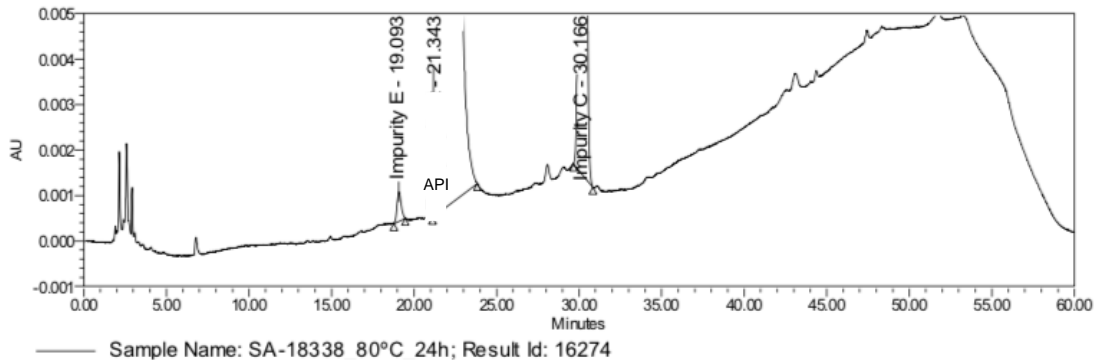


Figura 113 - Cromatograma da amostra de API exposta a calor – compostos relacionados teste 2.

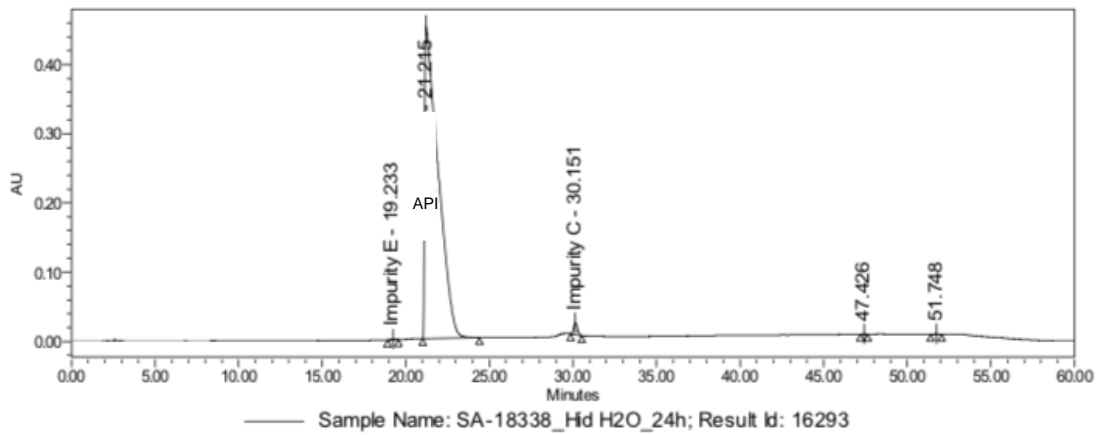


Figura 114 - Cromatograma da amostra de API exposta a hidrolise – compostos relacionados teste 2.

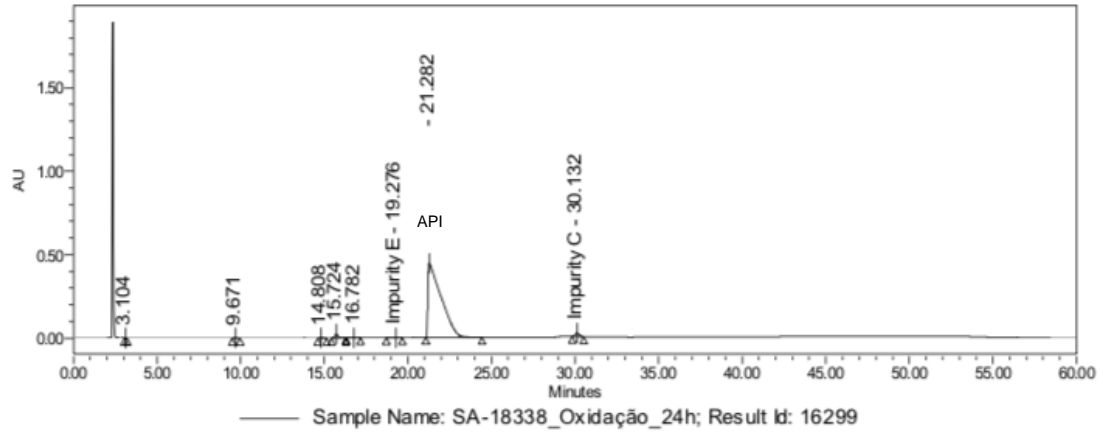


Figura 115 - Cromatograma da amostra de API exposta a oxidação – compostos relacionados teste 2.

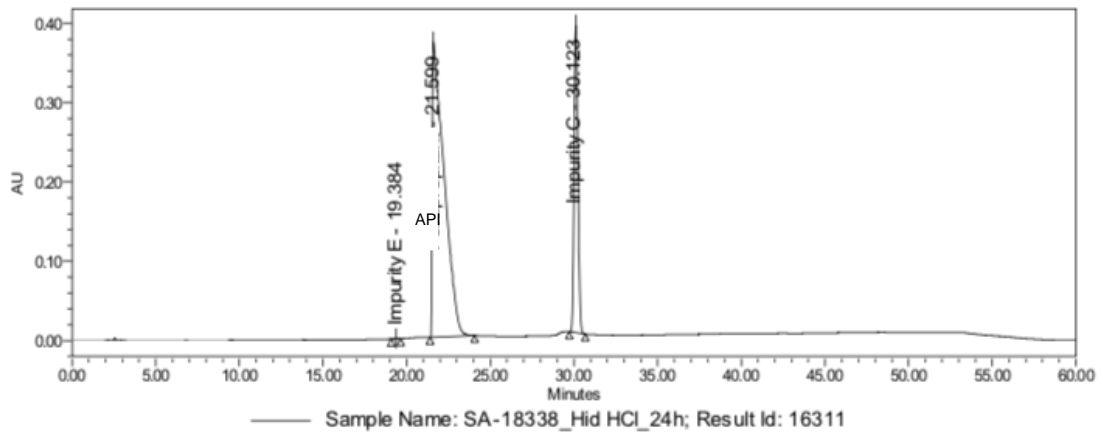


Figura 116 - Cromatograma da amostra de API exposta a hidrólise ácida – compostos relacionados teste 2.

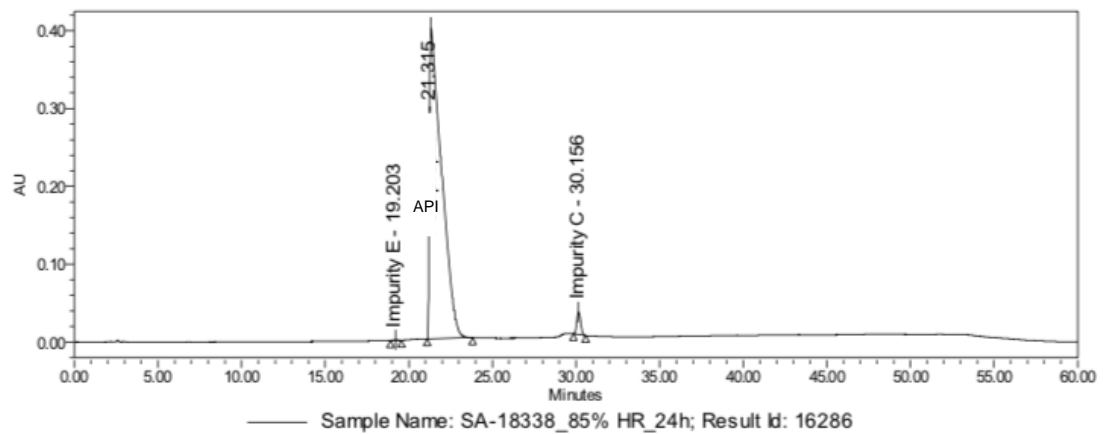


Figura 117 - Cromatograma da amostra de API exposta a humidade – compostos relacionados teste 2.

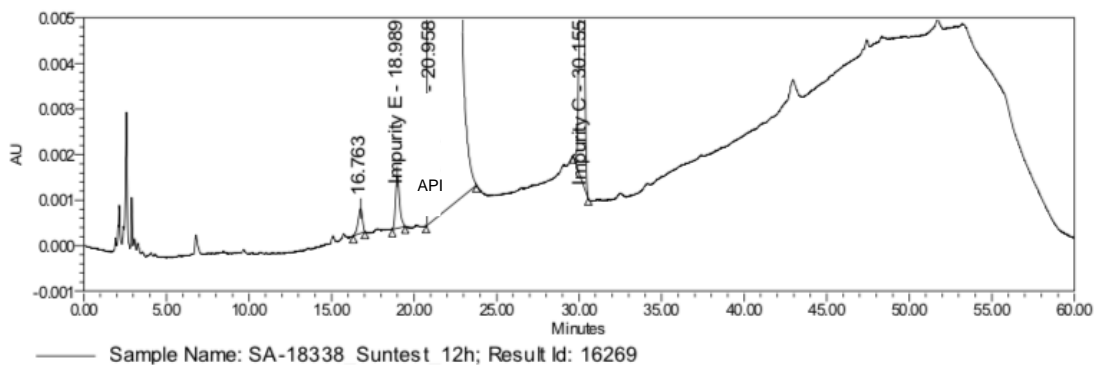


Figura 118 - Cromatograma da amostra de API exposta a luz- compostos relacionados teste 2.

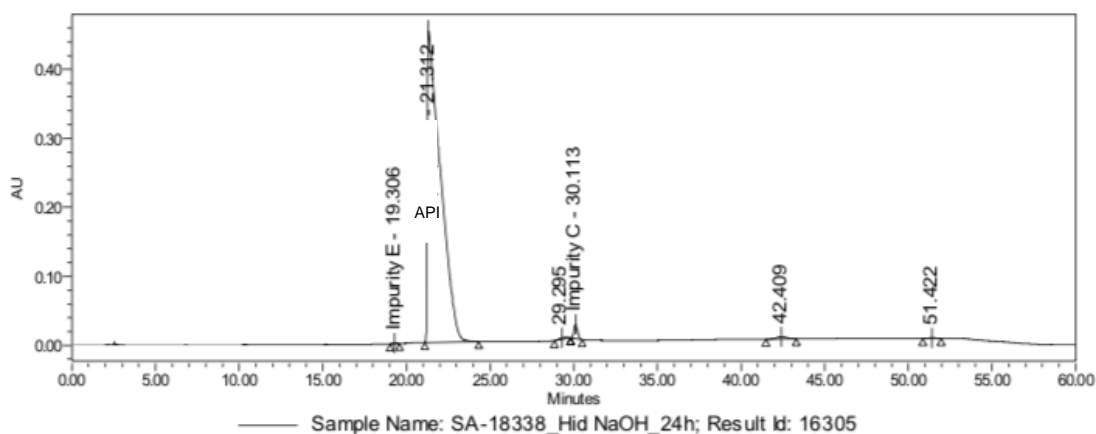


Figura 119 - Cromatograma da amostra de API exposta a hidrólise básica – compostos relacionados teste 2.

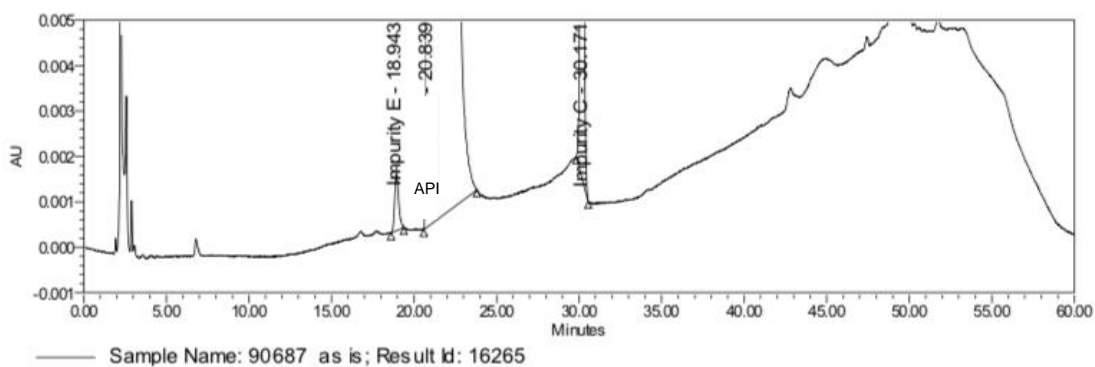


Figura 120 - Cromatograma da amostra de produto acabado sem degradação – compostos relacionados teste 2.

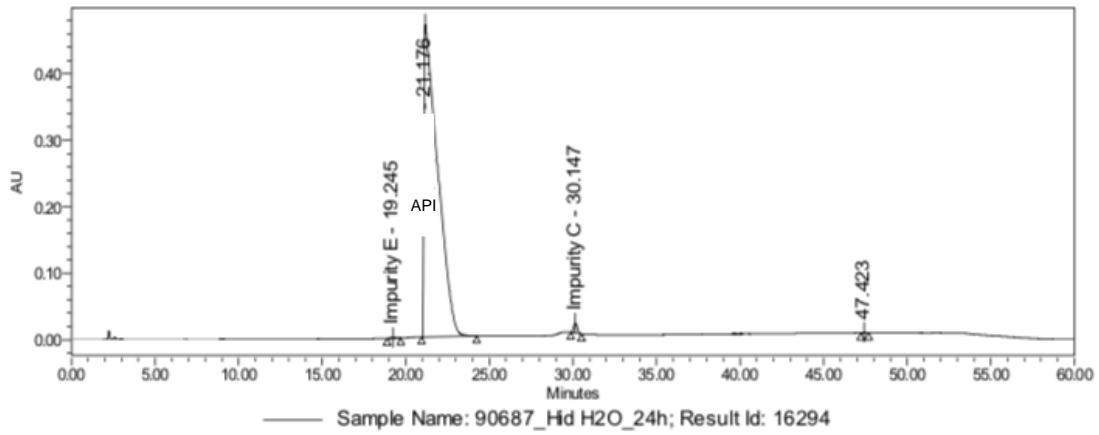


Figura 121 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a hidrólise – compostos relacionados teste 2.

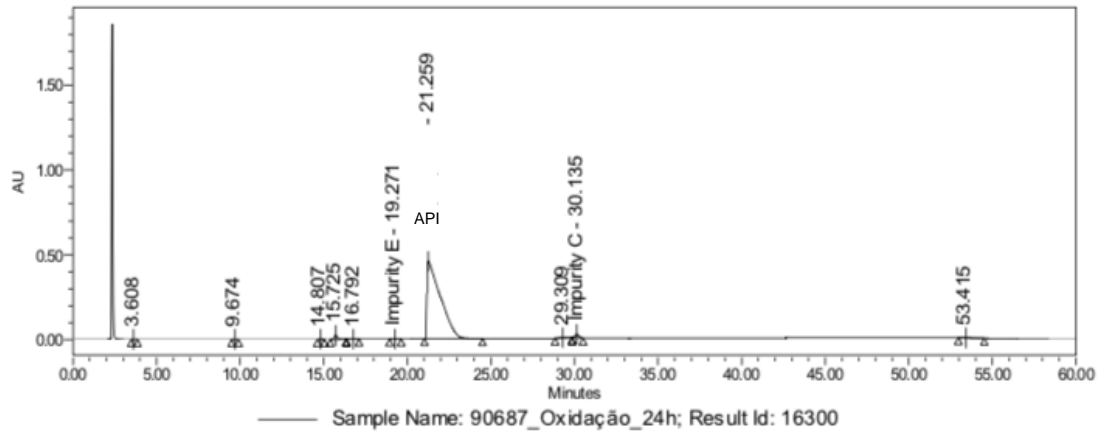


Figura 122 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a oxidação – compostos relacionados teste 2.

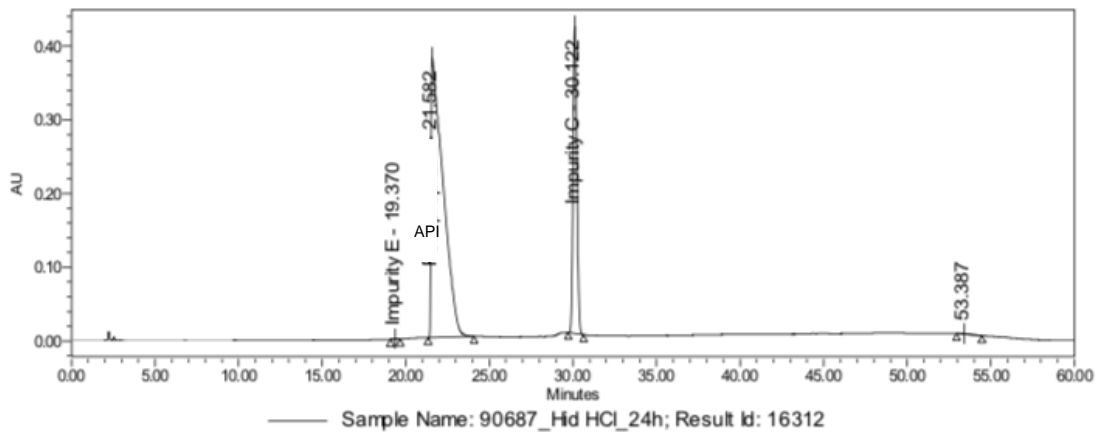


Figura 123 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a hidrólise ácida – compostos relacionados teste 2.

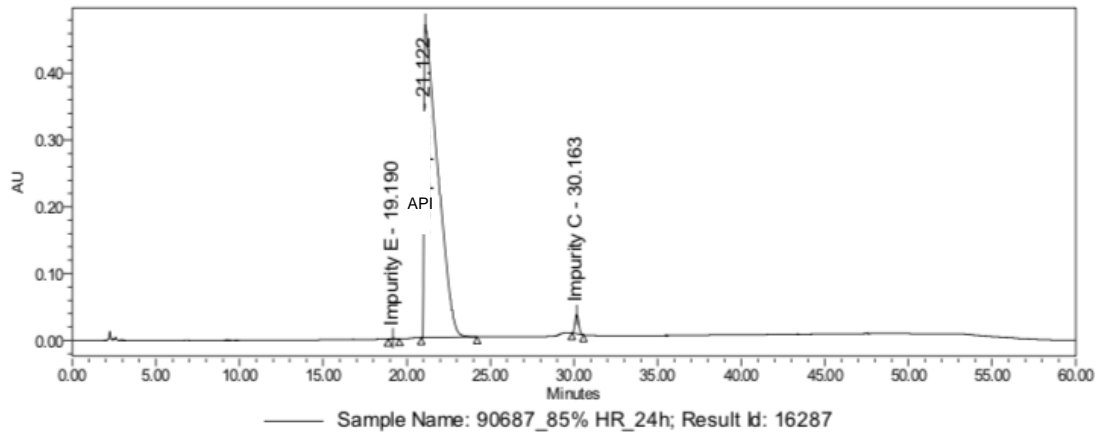


Figura 124 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a humidade – compostos relacionados teste 2.

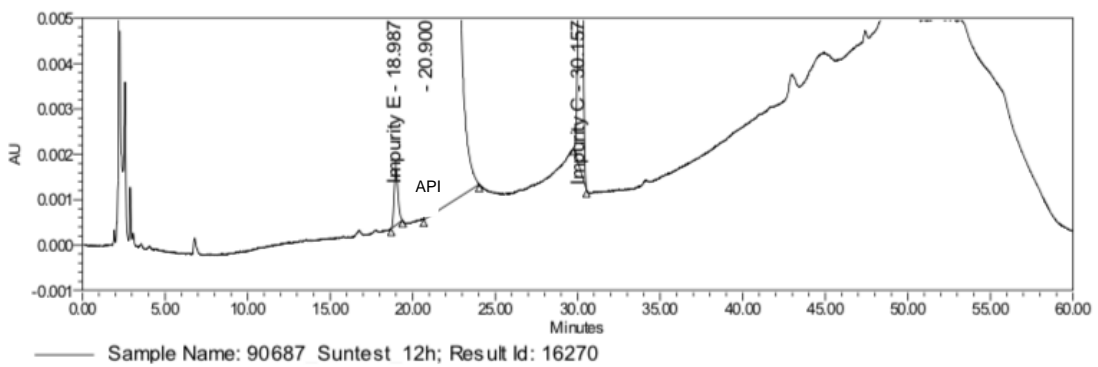


Figura 125 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a luz – compostos relacionados teste 2.

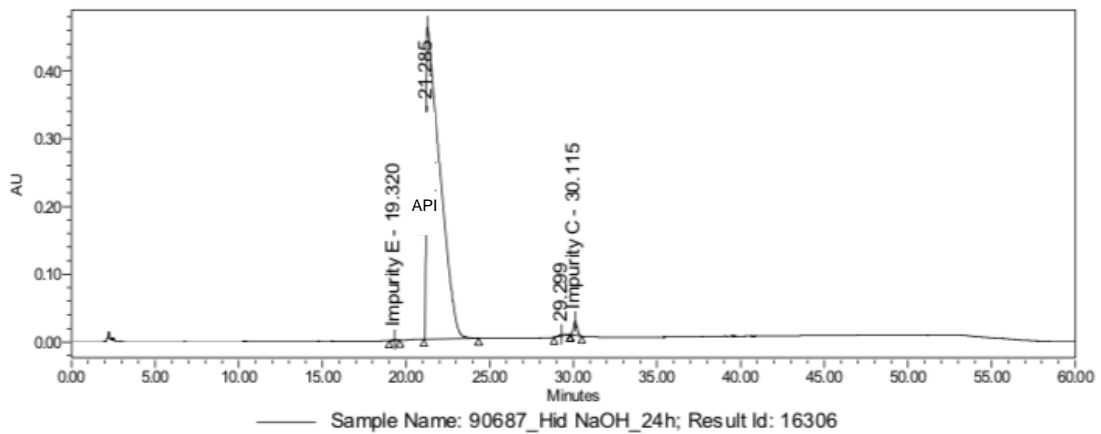


Figura 126 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a hidrólise básica – compostos relacionados teste 2.

Cromatogramas do método analítico Pureza Estereoquímica

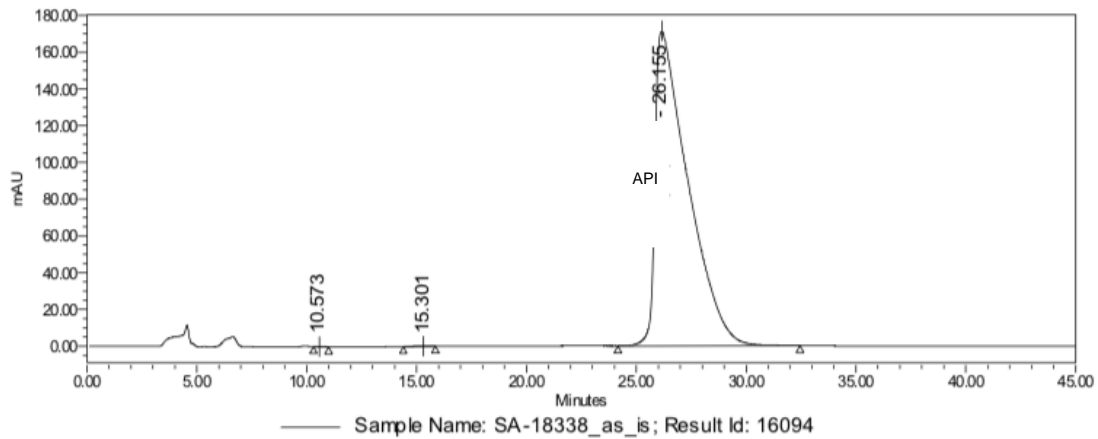


Figura 127 - Cromatograma da amostra de API sem degradação – pureza estereoquímica.

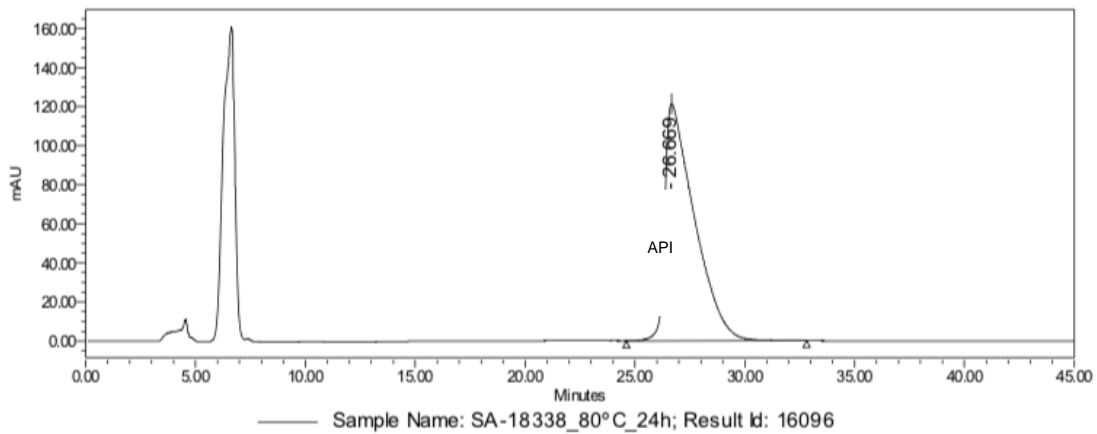


Figura 128 - Cromatograma da amostra de API exposta a calor – pureza estereoquímica.

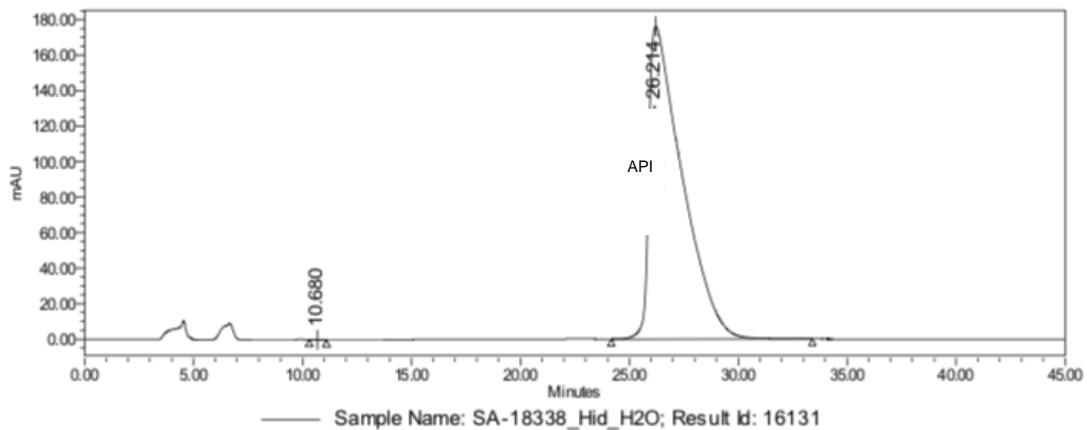


Figura 129 - Cromatograma da amostra de API exposta a hidrolise – pureza estereoquímica.

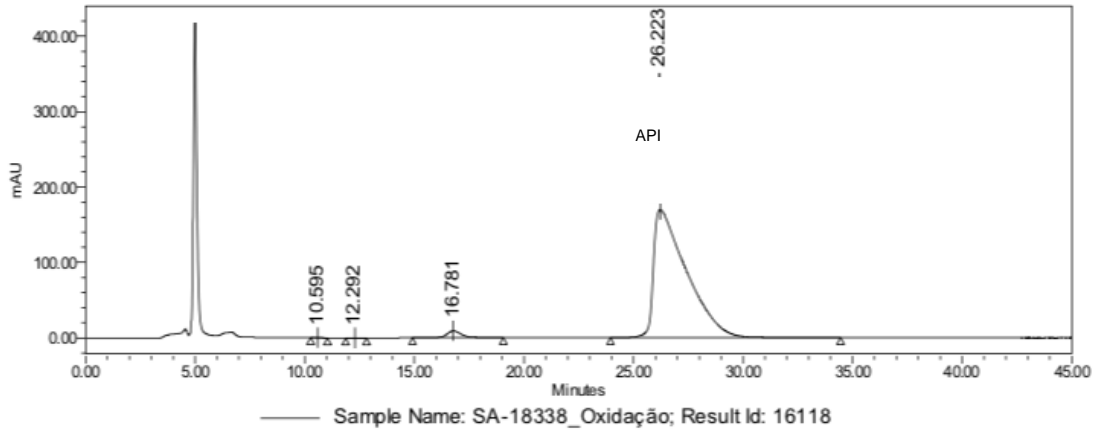


Figura 130 - Cromatograma da amostra de API exposta a oxidação – pureza estereoquímica.

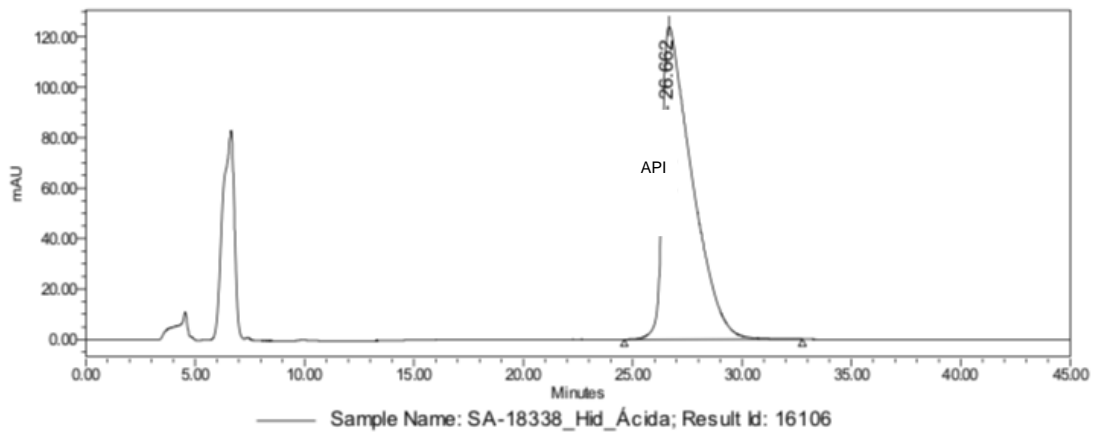


Figura 131 - Cromatograma da amostra de API exposta a hidrolise acida – pureza estereoquímica.

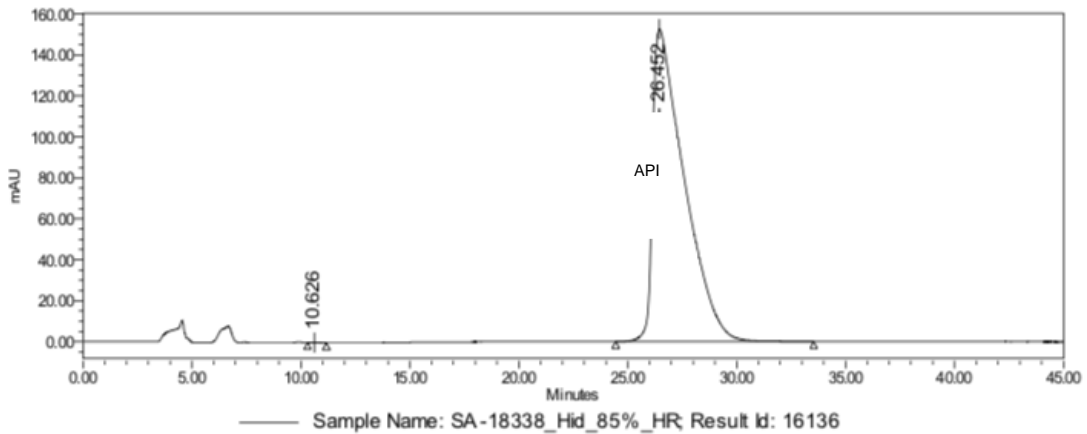


Figura 132 - Cromatograma da amostra de API exposta a humidade – pureza estereoquímica.

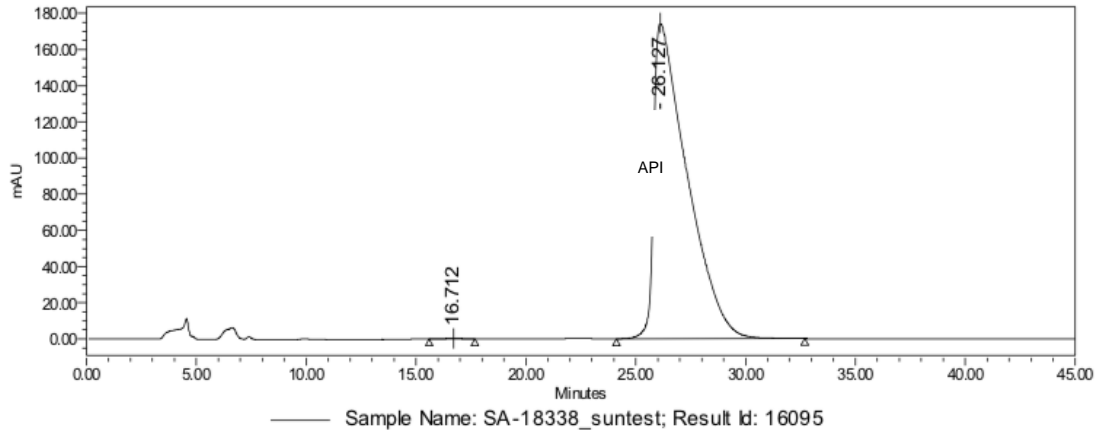


Figura 133 - Cromatograma da amostra de API exposta a luz – pureza estereoquímica.

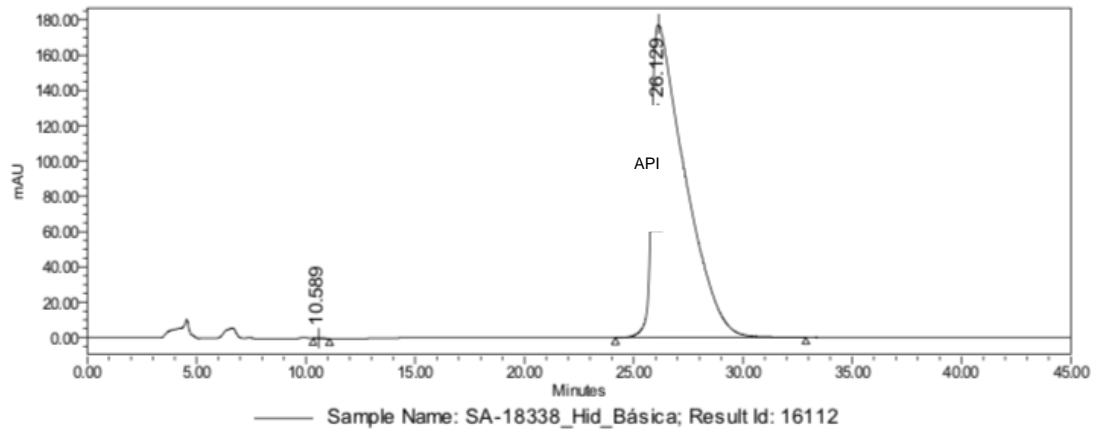


Figura 134 - Cromatograma da amostra de API exposta a hidrólise básica – pureza estereoquímica.

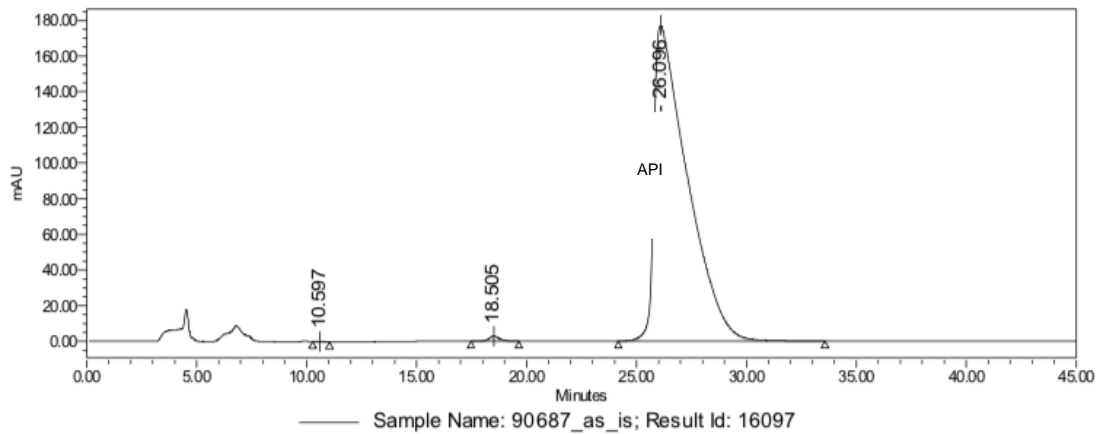


Figura 135 - Cromatograma da amostra de produto acabado sem degradação – pureza estereoquímica.

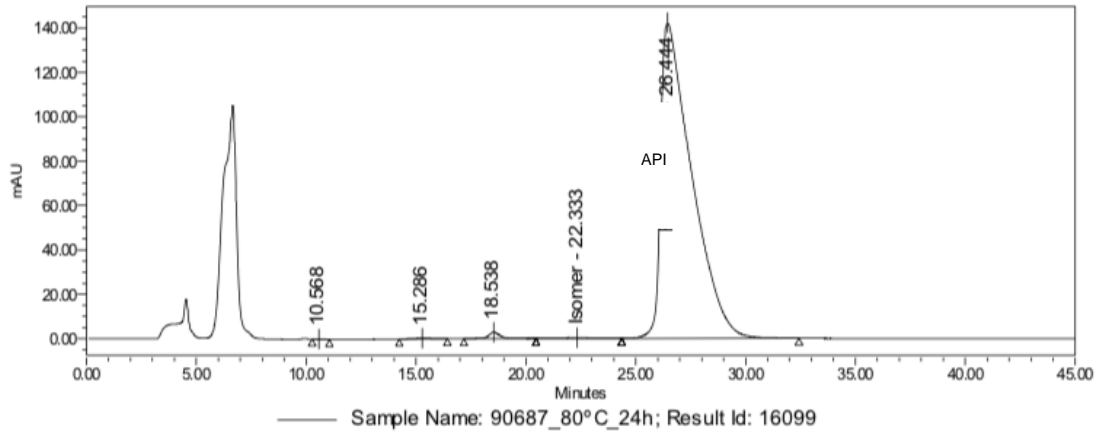


Figura 136 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a calor – pureza estereoquímica.

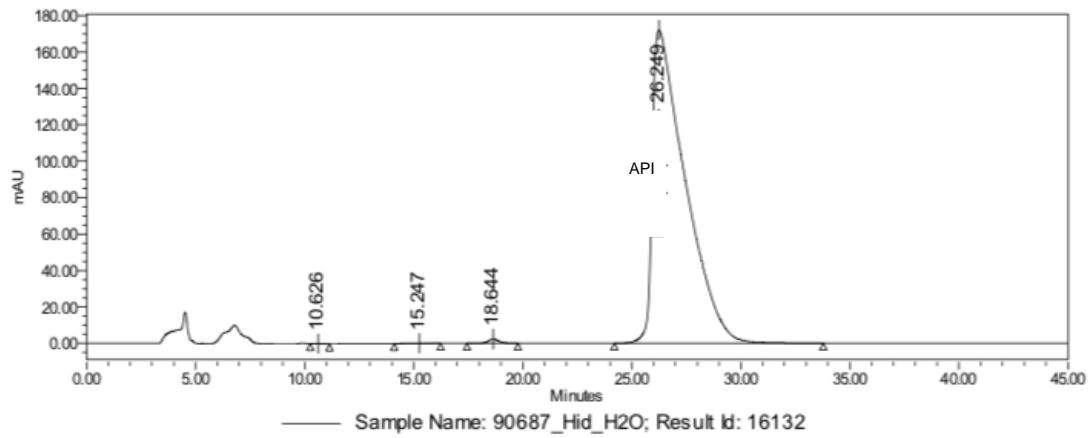


Figura 137 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a hidrólise – pureza estereoquímica.

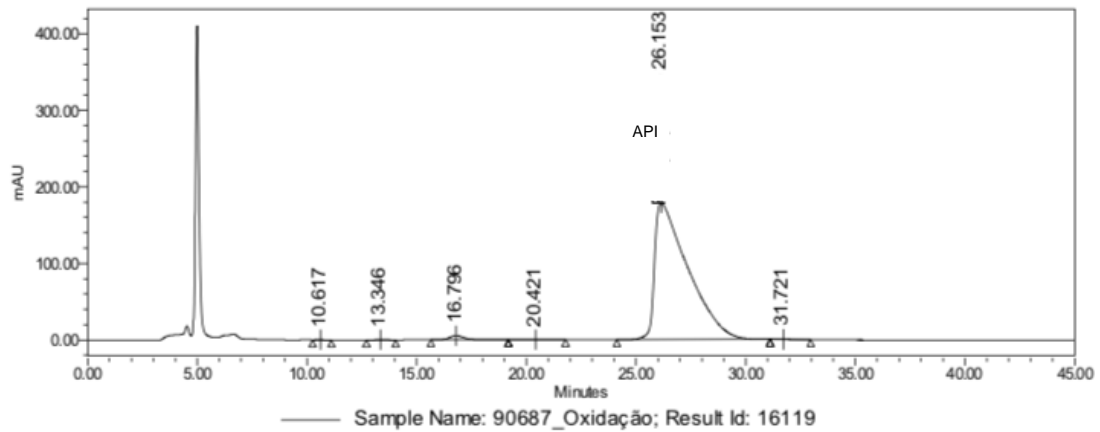


Figura 138 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a oxidação – pureza estereoquímica.

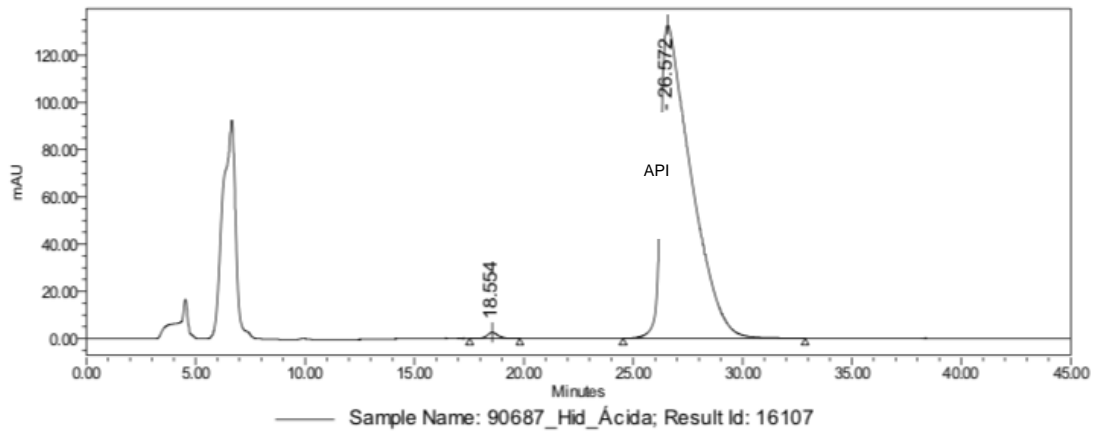


Figura 139 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a hidrólise ácida – pureza estereoquímica.

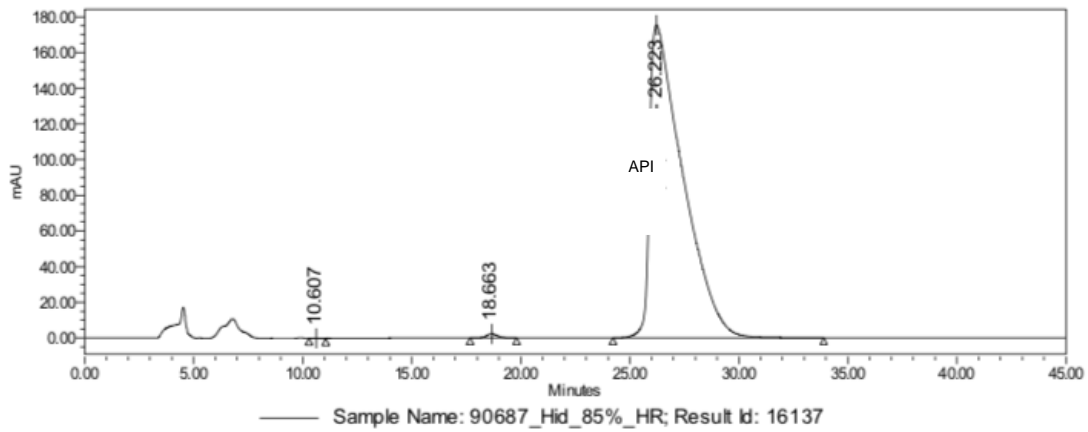


Figura 140 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a humidade – pureza estereoquímica.

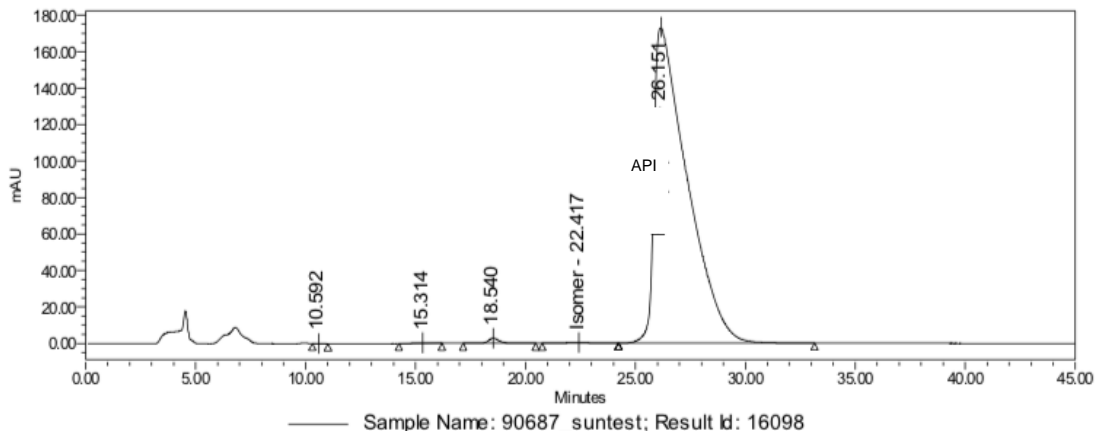


Figura 141 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a luz – pureza estereoquímica.

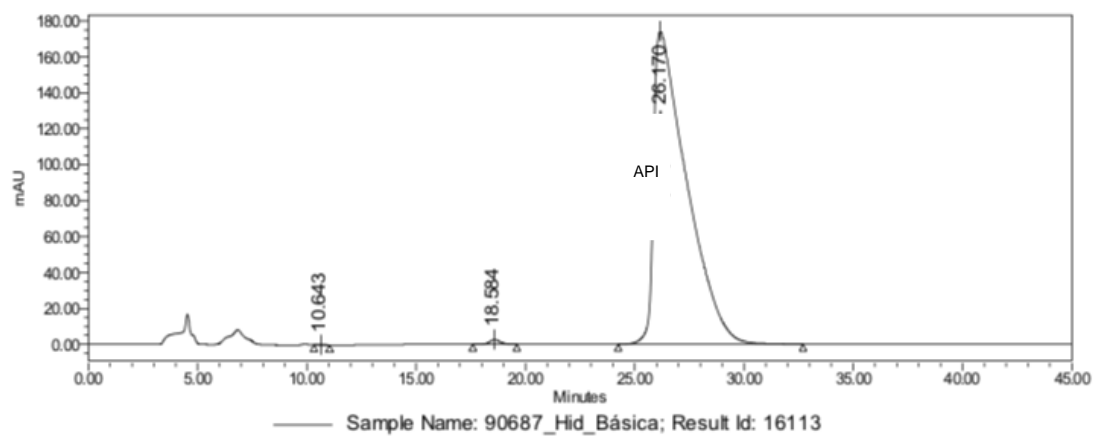


Figura 142 - Cromatograma da amostra de produto acabado exposta a hidrólise básica – pureza estereoquímica.

Tabela 148 - Primeiro ensaio da monitorização da estabilidade - resultados das amostras de API.

IMPUREZAS	SEM DEGRADAÇÃO	LUZ	CALOR	HUMIDADE	HIDRÓLISE	HIDRÓLISE ÁCIDA	HIDRÓLISE BÁSICA	OXIDAÇÃO
RRT 0,13	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,037%	n.d.
RRT 0,44	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,030%	n.d.
RRT 0,48	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,050%	n.d.
RRT 0,53	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,026%	n.d.
RRT 0,62	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,016%	n.d.
RRT 0,76	n.d.	0,016%	0,233%	n.d.	2,126%	n.d.	n.d.	n.d.
RRT 0,82	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,489%	n.d.
RRT 0,84	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	10,897%	n.d.
RRT 0,90	n.d.	0,029%	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,210%	n.d.
RRT 0,93	0,032%	0,032%	0,021%	0,032%	n.d.	0,032%	0,024%	0,032%
RRT 0,97	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,053%	n.d.
Impureza D	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,015%	n.d.
RRT 1,17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,146%	n.d.
RRT 1,20	n.d.	n.d.	0,104%	0,100%	n.d.	n.d.	n.d.	0,045%
RRT 1,44	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,056%	n.d.
Impureza F	0,050%	0,044%	0,033%	0,045%	0,039%	0,043%	0,045%	0,051%
Impureza C	0,183%	0,413%	34,721%	0,307%	22,282%	0,268%	0,390%	0,440%
RRT 1,99	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,066%	n.d.
Impureza E	0,089%	0,090%	0,051%	0,082%	0,037%	0,072%	0,089%	0,079%
Isómero	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Impurezas Desconhecidas	0,032%	0,032%	0,233%	0,100%	2,126%	0,032%	10,897%	0,045%
Total Impurezas	0,354%	0,624%	35,163%	0,566%	24,484%	0,415%	12,639%	0,647%
Doseamento	108,07%	105,62%	67,62%	105,68%	78,40%	104,29%	89,65%	105,84%
Balanço de Massas	108,42%	106,24%	102,78%	106,25%	102,88%	104,71%	102,29%	106,49%
Desvio		-2,18%	-5,64%	-2,18%	-5,54%	-3,72%	-6,14%	-1,94%

Tabela 149 – Segundo ensaio da monitorização da estabilidade - resultados das amostras de API.

IMPUREZAS	SEM DEGRADAÇÃO	LUZ	CALOR	HUMIDADE	HIDRÓLISE	HIDRÓLISE ÁCIDA	HIDRÓLISE BÁSICA	OXIDAÇÃO
RRT 0,13	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,025%	n.d.
RRT 0,45	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,033%	n.d.
RRT 0,47	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,073%	n.d.
RRT 0,54	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,026%	n.d.
RRT 0,63	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,021%	n.d.
RRT 0,76	n.d.	n.d.	0,212%	n.d.	2,382%	n.d.	n.d.	n.d.
RRT 0,82	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,280%	n.d.
RRT 0,84	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6,635%	n.d.
RRT 0,90	n.d.	0,051%	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,217%	n.d.
RRT 0,93	0,034%	0,030%	0,020%	0,032%	n.d.	0,027%	0,024%	0,030%
RRT 0,97	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,061%	n.d.
Impureza D	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,196%	n.d.
RRT 1,17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RRT 1,20	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RRT 1,43	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,071%	n.d.
Impureza F	0,047%	0,040%	0,037%	0,053%	0,042%	0,042%	0,044%	0,046%
Impureza C	0,258%	0,511%	32,183%	0,318%	23,687%	0,266%	0,413%	0,497%
RRT 1,96	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,050%	n.d.
Impureza E	0,089%	0,090%	0,051%	0,082%	0,037%	0,072%	0,089%	0,079%
Isômero	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Impurezas Desconhecidas	0,034%	0,051%	0,212%	0,032%	2,382%	0,027%	6,635%	0,030%
Total Impurezas	0,428%	0,722%	32,503%	0,485%	26,148%	0,407%	8,258%	0,652%
Doseamento	106,77%	96,15%	64,15%	103,71%	74,37%	101,12%	80,44%	107,23%
Balanço de Massa	107,20%	96,87%	96,65%	104,20%	100,52%	101,53%	88,70%	107,88%
Desvio		-10,33%	-10,55%	-3,00%	-6,68%	-5,67%	-18,50%	0,68%

Tabela 150 - Primeiro ensaio da monitorização da estabilidade - resultados das amostras de produto acabado.

Impurezas	Sem degradação	Luz	Calor	Humidade	Hidrólise	Hidrólise Ácida	Hidrólise Básica	Oxidação
RRT 0,13	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,025%	n.d.
RRT 0,44	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RRT 0,48	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,019%	n.d.
RRT 0,53	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RRT 0,62	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RRT 0,76	n.d.	n.d.	0,788%	n.d.	2,133%	n.d.	n.d.	n.d.
RRT 0,82	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,812%	n.d.
RRT 0,84	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	12,590%	n.d.
RRT 0,90	n.d.	n.d.	0,033%	n.d.	n.d.	0,017%	0,035%	0,020%
RRT 0,93	0,028%	0,031%	0,029%	0,033%	n.d.	0,027%	0,029%	0,030%
RRT 0,96	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,116%	n.d.
Impureza D	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,014%	n.d.
RRT 1,17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RRT 1,20	n.d.	n.d.	0,034%	n.d.	0,031%	n.d.	n.d.	n.d.
RRT 1,44	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Impureza F	0,045%	0,046%	0,043%	0,043%	0,039%	0,049%	0,041%	0,050%
Impureza C	0,226%	0,285%	30,971%	0,310%	22,951%	0,297%	0,357%	0,378%
Impureza E	0,092%	0,088%	*	0,092%	0,037%	0,078%	0,081%	0,081%
Isómero	n.d.	0,162%	0,139%	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Impurezas Desconhecidas	0,028%	0,031%	0,788%	0,033%	2,133%	0,027%	12,590%	0,030%
Total Impurezas	0,391%	0,450%	31,898%	0,478%	25,191%	0,468%	14,119%	0,559%
Doseamento	104,35%	102,88%	71,82%	104,86%	77,07%	103,96%	87,96%	102,91%
Balanço de Massas	104,74%	103,49%	103,86%	105,34%	102,26%	104,43%	102,08%	103,47%
Desvio	--	-1,25%	-0,88%	0,60%	-2,48%	-0,31%	-2,66%	-1,27%

*Amostra não foi analisada devido a falha no equipamento.

Tabela 151 - Segundo ensaio da monitorização da estabilidade - resultados das amostras de produto acabado.

Impurezas	Sem degradação	Luz	Calor	Humidade	Hidrólise	Hidrólise Ácida	Hidrólise Básica	Oxidação
RRT 0,13	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,026%	n.d.
RRT 0,44	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RRT 0,47	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,023%	n.d.
RRT 0,53	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RRT 0,62	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RRT 0,76	n.d.	n.d.	0,596%	n.d.	2,381%	n.d.	n.d.	n.d.
RRT 0,82	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,415%	n.d.
RRT 0,84	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6,555%	n.d.
RRT 0,90	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,015%	0,053%	0,022%
RRT 0,93	0,032%	0,032%	0,032%	0,032%	n.d.	0,028%	0,029%	0,026%
RRT 0,97	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,084%	n.d.
Impureza D	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,017%	n.d.
RRT 1,17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RRT 1,20	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RRT 1,43	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,018%	n.d.
Impureza F	0,057%	0,045%	0,049%	0,049%	0,035%	0,046%	0,048%	0,053%
Impureza C	0,247%	0,316%	20,372%	0,289%	25,285%	0,314%	0,374%	0,434%
RRT 1,91	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,100%
Impureza E	0,092%	0,088%	*	0,092%	0,037%	0,078%	0,081%	0,081%
Enantiómero	n.d.	0,162%	0,139%	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Impurezas Desconhecidas	0,032%	0,032%	0,596%	0,032%	2,381%	0,028%	6,555%	0,100%
Total Impurezas	0,428%	0,481%	21,049%	0,462%	27,738%	0,481%	7,723%	0,716%
Doseamento	104,18%	103,17%	76,24%	102,98%	73,56%	98,74%	81,58%	101,58%
Balanço de Massa	104,61%	103,81%	97,43%	103,44%	101,30%	99,22%	89,30%	102,30%
Desvio	--	-0,80%	-7,18%	-1,17%	-3,31%	-5,39%	-15,31%	-2,31%

*Amostra não foi analisada devido a falha no equipamento.