



DEPARTAMENTO DE
QUÍMICA

MARIANA ISABEL SERRA MACHADO

Licenciada em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS EM UHPLC-MS PARA QUANTIFICAÇÃO DE IMPUREZAS EM SUBSTÂNCIAS FARMACÊUTICAS

MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA E BIOQUÍMICA

Universidade NOVA de Lisboa
Setembro, 2025

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS EM UHPLC-MS PARA QUANTIFICAÇÃO DE IMPUREZAS EM SUBSTÂNCIAS FARMACÊUTICAS

MARIANA ISABEL SERRA MACHADO

Licenciada em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Doutor Carlos Alberto Duarte Sousa

Diretor do Departamento de Investigação e Desenvolvimento da Cipan-Suanfarma

Coorientadora: Doutora Maria Margarida Canas Mendes de Almeida Cardoso

Professora Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia | NOVA FCT

Júri:

Presidente: Professor Doutor Mário Fernando José Eusébio,
Professor Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia | NOVA FCT

Vogais: Professora Doutora Maria Margarida Boavida Pontes
Gonçalves,
Professora Associada, Faculdade de Ciências e Tecnologia | NOVA FCT
Professora Doutora Maria Margarida Canas Mendes de
Almeida Cardoso,
Professora Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia | NOVA FCT

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS EM UHPLC-MS PARA QUANTIFICAÇÃO DE IMPUREZAS EM SUBSTÂNCIAS FARMACÊUTICAS

Copyright © Mariana Isabel Serra Machado, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa.

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

Este documento foi criado com o processador de texto Microsoft Word e o template NOVAThesis Word [11].

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de expressar a minha profunda gratidão aos meus orientadores, a Professora Margarida Cardoso e o Doutor Carlos Sousa, pelo acompanhamento, disponibilidade e orientação ao longo de todo este percurso. O vosso rigor científico e os conselhos sempre pertinentes foram fundamentais para a concretização deste trabalho e para o meu desenvolvimento académico e profissional.

Quero também deixar um sincero agradecimento à Cipan, por me ter recebido e proporcionado todas as condições necessárias à realização deste trabalho. A oportunidade de integrar uma realidade empresarial tão dinâmica e enriquecedora foi fundamental para a consolidação dos meus conhecimentos e para o desenvolvimento de novas competências.

De forma especial, agradeço ao departamento de investigação e desenvolvimento da Cipan e a todos os colegas que partilharam comigo esta caminhada, Ricardo, Joana, Patrícia, Bia, Ana, Manel e Rafael, pela forma como me acolheram, pelo ambiente colaborativo e pela partilha de conhecimentos que tanto me ajudaram a evoluir. A vossa boa disposição diária e a vossa companhia tornaram esta etapa, não só mais produtiva, como também mais leve e agradável.

Por fim, reservo uma palavra enorme de gratidão à minha família e aos meus amigos, que sempre estiveram ao meu lado. À minha família, mãe, pai, irmã e avós, devo o maior agradecimento de todos. Obrigada pelo apoio incondicional em todas as fases da minha vida, pela paciência nos momentos mais difíceis e de maior cansaço e pela confiança que sempre depositaram em mim. Este trabalho é também fruto da vossa dedicação e do vosso exemplo, que me inspiram diariamente a ser melhor. Aos meus amigos, obrigada pela compreensão, pelo apoio constante e pelas palavras de encorajamento que tantas vezes me deram força para continuar.

“Believe you can and you’re halfway there” (Theodore Roosevelt)

"No presente trabalho não foram utilizados quaisquer conteúdos gerados por tecnologias de inteligência artificial."

RESUMO

Na presente dissertação recorreu-se à técnica de cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (UHPLC-MS) para desenvolvimento de métodos analíticos e quantificação de espécies químicas, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), ácido oxálico e azodicarboxilato de dibenzilo (DBAD), em produtos farmacêuticos.

A impossibilidade de utilização de detetores tradicionais, como os de absorvância (UV-Vis) em compostos químicos que não apresentam grupos cromóforos ativos nessa gama, evidencia a necessidade de recorrer a abordagens alternativas. O recurso a detetores por espectrometria de massa (MS) tende a melhorar a seletividade e a sensibilidade exigidas para quantificação vestigial, embora possam persistir limitações associadas à complexidade do sistema analítico e da matriz.

A otimização dos parâmetros cromatográficos revelou-se determinante para o sucesso do desenvolvimento metodológico e adaptação a uma ampla variedade de compostos. Entre os fatores avaliados destacam-se a composição da fase móvel e do diluente, o volume de injeção e o recurso a coluna cromatográfica ou apenas injeção direta com pré-filtro.

Os resultados demonstraram que os teores de EDTA e de ácido oxálico se encontraram abaixo do limite de quantificação determinado. Na oxitetraciclina dihidratada, o EDTA variou entre 0,0019 e 0,011 % (m/m) e o ácido oxálico entre 0,0024 e 0,0051 % (m/m), consoante o lote. Já na oxitetraciclina base, o ácido oxálico foi quantificado em 0,018 % (m/m).

A quantificação do DBAD no 7-HT não foi possível, pois o método não é específico para este composto, inviabilizando uma quantificação precisa. No cloreto de minociclina foi quantificado cerca de 0,0069 % (m/m) de DBAD.

Relativamente ao desempenho do método, os limites de detecção (LoD) e quantificação (LoQ) variaram entre 0,07 e 0,48 ppm e 0,22 e 1,46 ppm, respetivamente. As curvas de calibração apresentaram linearidade dentro das gamas de concentração testadas com coeficientes de determinação superiores a 0,99, confirmando a fiabilidade do método desenvolvido.

Palavras-chave: Espectrometria de Massa, Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Eficiência, Limites de Detecção e Quantificação, Curvas de Calibração, Condições Cromatográficas.

ABSTRACT

In the present dissertation, ultra-high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (UHPLC-MS) was employed for the development of analytical methods and the quantification of chemical species, namely ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), oxalic acid, and dibenzyl azodicarboxylate (DBAD), in pharmaceutical products.

The impossibility of using traditional detectors, such as absorbance detectors (UV-Vis), in chemical compounds that lack active chromophore groups within this range highlights the need for alternative analytical approaches. The use of mass spectrometry (MS) detectors tends to improve the selectivity and sensitivity required for trace-level quantification, although limitations associated with the complexity of the analytical system and the matrix may persist.

The optimization of chromatographic parameters proved to be crucial for the methodological development and adaptation to a wide variety of compounds. Among the evaluated factors, the composition of the mobile phase and the diluent, the injection volume, and the choice between using a chromatographic column or direct injection with a pre-filter were particularly relevant.

The results demonstrated that the levels of EDTA and oxalic acid were below the established quantification limit. In oxytetracycline dihydrate, EDTA ranged from 0.0019 to 0.011 % (m/m), while oxalic acid varied between 0.0024 and 0.0051 % (m/m), depending on the batch. In oxytetracycline base, oxalic acid was quantified at 0.018 % (m/m).

The quantification of DBAD in 7-HT was not possible, as the method was not specific for this compound, preventing accurate determination. In minocycline chloride, approximately 0.0069 % (m/m) of DBAD was quantified.

Regarding method performance, the detection (LoD) and quantification (LoQ) limits ranged between 0.07 and 0.48 ppm and 0.22 and 1.46 ppm, respectively. Calibration curves exhibited linearity within the tested concentration ranges, with determination coefficients (R^2) above 0.99, confirming the reliability of the developed method.

Keywords: Mass Spectrometry, Ultra-High-Performance Liquid Chromatography, Detection and Quantification Limits, Calibration Curves, Chromatographic Conditions.

ÍNDICE

RESUMO	XI
ABSTRACT	XIII
1 ENQUADRAMENTO E MOTIVAÇÃO.....	1
1.1 Objetivos	3
2 ESTADO DE ARTE.....	5
2.1 Processos Cromatográficos	5
2.1.1 Natureza da Fase Móvel	5
2.1.2 Tipo de Separação	7
2.1.3 Tipos de Cromatografia de Partição.....	7
2.2 Sistema de UHPLC.....	9
2.2.1 Bomba	10
2.2.2 Injetor	10
2.2.3 Coluna Cromatográfica	11
2.2.4 Detetor	12
2.2.5 Sistema de Aquisição e Processamento de Dados	12
2.3 Espetrometria de Massa	13
2.3.1 Sistema de LC-MS	13
2.3.2 Modos de Ionização a Pressão Atmosférica.....	14
2.3.3 Sistema de LC-MS/MS.....	16
2.4 Seleção da Fase Móvel	16
2.5 Interpretação de Cromatogramas	17
2.5.1 Tempo e Volume de Retenção.....	18

2.5.2	Tempo de Retenção Relativo.....	18
2.5.3	Fator de Retenção.....	18
2.5.4	Resolução	19
2.5.5	Seletividade ou Fator de Separação	20
2.5.6	Eficiência de Separação	20
2.5.7	Número de Pratos Teóricos (n).....	20
2.5.8	Simetria.....	21
2.5.9	Razão Sinal/Ruído (S/N).....	22
2.6	Pré Validação de Métodos Analíticos.....	22
2.6.1	Gama de Trabalho.....	23
2.6.2	Exatidão	23
2.6.3	Precisão.....	23
2.6.4	Especificidade/Seletividade.....	24
2.6.5	Linearidade	24
2.6.6	Limites de Detecção e Quantificação	24
2.6.7	Robustez	24
2.7	Métodos de Quantificação	25
2.7.1	Método de Padrão Externo.....	25
2.7.2	Método de Adição Padrão	25
2.8	Casos de Estudo.....	26
2.8.1	EDTA (Ácido Etilenodiaminotetrácético)	26
2.8.2	Ácido Oxálico	28
2.8.3	Cloreto de <i>Terc</i> -Butilo.....	29
2.8.4	DBAD (Azodicarboxilato de Dibenzilo).....	30
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1	Equipamento	33
3.2	Reagentes.....	33
3.3	Amostras.....	33
3.4	Metodologia de Trabalho	34
3.5	Preparação de Soluções e Amostras	34
3.6	Método de Adição Padrão	38

3.7	Pré-Validação	39
3.7.1	Exatidão	39
3.7.2	Gama de Trabalho.....	39
3.7.3	Limites de Detecção e Quantificação	40
3.7.4	Linearidade	41
4	APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS	45
4.1	EDTA.....	45
4.1.1	Impacto das condições cromatográficas	46
4.1.2	Pré-Validação do Método	52
4.1.3	Quantificação pelo Método de Adição Padrão.....	57
4.2	Ácido Oxálico.....	60
4.2.1	Impacto das condições cromatográficas	61
4.2.2	Pré-Validação do Método	75
4.2.3	Quantificação pelo Método de Adição Padrão.....	82
4.3	Cloreto de <i>Terc</i> -Butilo	85
4.4	DBAD	92
4.4.1	Impacto das condições cromatográficas	92
4.4.2	Pré-Validação do Método	99
4.4.3	Quantificação pelo Método de Adição Padrão.....	105
5	CONCLUSÃO E PROPOSTAS DE TRABALHO FUTURO	107

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 - Módulos do sistema de UHPLC-MS (adaptada de [29]).....	9
Figura 2.2 - Sistema de UHPLC-MS (adaptada de [32]).....	9
Figura 2.3 - Bomba quaternária de solventes (adaptada de [31])	10
Figura 2.4 - Injetor Automático (<i>Autosampler</i>) (adaptada de [31])	11
Figura 2.5 - Espetro de massas tipo (adaptado de [44])	14
Figura 2.6 - Cromatograma tipo (adaptado de [58])	17
Figura 2.7 - Razão Sinal/ Ruído de um pico tipo (adaptada de [64])	22
Figura 2.8 - Estrutura química do EDTA.....	27
Figura 2.9 - Estrutura química do EDTA: a) protonado, b) desprotonado	27
Figura 2.10 - Estrutura química do ácido oxálico.....	28
Figura 2.11 - Estrutura química do ácido oxálico desprotonado	29
Figura 2.12 - Estrutura química do cloreto de <i>terc</i> -butilo	30
Figura 2.13 - Estrutura química do DBAD	31
Figura 2.14 - Estrutura química do DBAD protonado	31
Figura 4.1 - Varrimento de massas da amostra a analisar	46
Figura 4.2 - Cromatograma – Soluções de EDTA de diferentes concentrações – Análise com coluna de enchimento C18	47
Figura 4.3 – Cromatograma – Soluções de EDTA de diferentes concentrações - Injeção Direta	47
Figura 4.4 - Cromatograma - EDTA - Filtração de amostras.....	49
Figura 4.5 - Área Vs. Vol. ad. EDTA - Injeção em ordem aleatória	50
Figura 4.6 - Área Vs. Vol. ad. EDTA - Injeção em ordem crescente de concentração.....	50
Figura 4.7 - Representação gráfica do efeito matriz - EDTA	51
Figura 4.8 – Comparação entre o varrimento de massas de uma amostra contaminada com EDTA a) e do diluente usado na análise b).....	53
Figura 4.9 - Linearidade - EDTA na oxitetraciclina dihidratada (lote G002)	54
Figura 4.10 - Análise de Resíduos – EDTA na oxitetraciclina	54
Figura 4.11 - Método de adição padrão EDTA - Oxi Dihid G002.....	58
Figura 4.12 - Método de adição padrão EDTA - Oxi Dihid G003.....	58

Figura 4.13 - Método de adição padrão EDTA - Oxi Dihid G004.....	59
Figura 4.14 - Varrimento de massas da amostra a analisar	60
Figura 4.15 – Cromatograma - Ácido Oxálico - Comparação entre diluentes H ₂ O e HCl	62
Figura 4.16 – Cromatograma - Ácido Oxálico - Diluente: Acetato de Amônio 0,005 M	63
Figura 4.17 - Cromatograma - Ácido Oxálico - Comparação entre diferentes composições de fase móvel	64
Figura 4.18 - Cromatograma - Ácido Oxálico - Fase Móvel com 0,01 % (v/v) de Ácido Fórmico	65
Figura 4.19 - Cromatograma - Ácido Oxálico - Comparação entre diferentes volumes de injeção: 10 e 15 uL	66
Figura 4.20 – Cromatograma - Ácido Oxálico - Injeção Direta (União + pré-filtro).....	67
Figura 4.21 – Cromatograma - Ácido Oxálico – Injeção com coluna de enchimento C18	68
Figura 4.22 - Cromatograma - Ácido Oxálico – Efeito da filtração de amostras	69
Figura 4.23 - Cromatograma - Ácido Oxálico – Amostras filtradas	70
Figura 4.24 – Cromatograma - Ácido Oxálico – Amostras não filtradas.....	70
Figura 4.25 – Área Vs. Conc. – Ácido Oxálico - Comparação entre linearidades das filtradas e não filtradas	71
Figura 4.26 - Cromatograma - Ácido Oxálico - Impacto do tempo (Injeção com coluna de enchimento C18)	72
Figura 4.27 - Área Vs. Vol.ad. – Ácido Oxálico – Ordens de injeção crescente e decrescente de concentração	73
Figura 4.28 - Área Vs. Vol.ad. Ác.Ox - Ordem de injeção aleatória	73
Figura 4.29 - Varrimento de massas de uma amostra contaminada com ácido oxálico a) e de diluente b)	76
Figura 4.30 - Linearidade - Ácido Oxálico na oxitetraciclina dihidratada (lote G002).....	77
Figura 4.31 - Análise de Resíduos - Ácido Oxálico na oxitetraciclina.....	78
Figura 4.32 - Repetibilidade de linearidade do Ácido Oxálico na Oxitetraciclina Dihidratada	79
Figura 4.33 - Método de adição padrão Ác.Ox. - Oxi Dihid G002.....	82
Figura 4.34 - Método de adição padrão Ác.Ox. – Oxi Base 2000322	82
Figura 4.35 - Método de adição padrão Ác.Ox. - Oxi Dihid G004.....	83
Figura 4.36 - Varrimento de massas para uma amostra de 7-HT	92
Figura 4.37 - Espetro - DBAD - Comparação do sinal obtido utilizando diferentes composições de fase móvel.....	93
Figura 4.38 - DBAD - Área Vs. Conc. - Impacto do tempo entre a preparação e a injeção das amostras	94
Figura 4.39 - Área Vs. Vol.ad. DBAD – Injeção das amostras com diluentes intercalados.....	95
Figura 4.40 - Área Vs. Vol.ad. DBAD – Injeção das amostras sem diluentes intercalados	95
Figura 4.41 - Espetro - DBAD - Impacto da voltagem do cone ("Cone Voltage").....	97
Figura 4.42 - Representação gráfica do efeito matriz - DBAD	98

Figura 4.43 - Varrimento de massas para amostra de produto contaminada com DBAD a) e de diluente b)	100
Figura 4.44 - Linearidade - DBAD no 7-HT	101
Figura 4.45 - Linearidade - DBAD no cloridrato de minociclina	102
Figura 4.46 - Análise de Resíduos - DBAD no 7-HT	102
Figura 4.47 - Repetibilidade de linearidade do DBAD no Cloridrato de Minociclina	104
Figura 4.48 - Método de Adição Padrão – Quantificação de DBAD no Cloridrato de Minociclina	106

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 - Comparação entre LC, HPLC e UHPLC	6
Tabela 2.2 - Modos de Ionização (ESI, APCI e APPI)	16
Tabela 4.1 - Condições cromatográficas do método analítico do EDTA	52
Tabela 4.2 - Linearidade – EDTA na oxitetraciclina dihidratada (lote G002)	53
Tabela 4.3 - Parâmetros do Teste de Mandel – EDTA na oxitetraciclina.....	55
Tabela 4.4 - Repetibilidade do método do EDTA	56
Tabela 4.5 - Precisão Intermédia do método do EDTA	56
Tabela 4.6 - Limites de Detecção e Quantificação - EDTA.....	57
Tabela 4.7 - Quantificação do EDTA na Oxitetraciclina Dihidratada nos lotes G002, G003 e G004	59
Tabela 4.8 - Condições cromatográficas do método analítico do ácido oxálico	75
Tabela 4.9 - Linearidade - Ácido Oxálico na oxitetraciclina dihidratada (lote G002).....	77
Tabela 4.10 – Parâmetros do Teste de Mandel - Ácido Oxálico na oxitetraciclina.....	78
Tabela 4.11 - Repetibilidade do método do Ácido Oxálico	79
Tabela 4.12 - Precisão Intermédia do método do ácido oxálico	80
Tabela 4.13 - Limites de Detecção e de Quantificação - Ácido Oxálico	81
Tabela 4.14 - Quantificação do Ácido Oxálico na Oxitetraciclina Base e Dihidratada	83
Tabela 4.15 - Espetros de massa da amostra e do diluente para uma fase móvel constituída por H ₂ O, ACN e MeOH e diluente ACN (ESI +)	86
Tabela 4.16 - Espetros de massa da amostra e diluente para uma fase móvel constituída por H ₂ O, ACN e MeOH e diluente ACN (ESI -).....	87
Tabela 4.17 - Espetros de massa da amostra e do diluente para uma fase móvel constituída por H ₂ O e MeOH e diluente ácido fórmico (ESI +).....	88
Tabela 4.18 - Espetros de massa da amostra e do diluente para uma fase móvel constituída por H ₂ O e MeOH e diluente ácido fórmico (ESI -).....	89
Tabela 4.19 - Espetros de massa da amostra e diluente para uma fase móvel e diluente constituídos por ACN	90
Tabela 4.20 - Condições cromatográficas do método analítico do DBAD.....	99
Tabela 4.21 - Linearidade - DBAD no 7-HT	101

Tabela 4.22 - Linearidade - DBAD no Cloridrato de Minociclina.....	101
Tabela 4.23 - Parâmetros do teste de Mandel - DBAD no 7-HT.....	103
Tabela 4.24 - Repetibilidade do método do DBAD no cloridrato de minociclina	103
Tabela 4.25 - Precisão Intermédia do método do DBAD no cloridrato de minociclina	104
Tabela 4.26 - Limites de Detecção e Quantificação - DBAD.....	105
Tabela 4.27 - Quantificação do DBAD no Cloridrato de Minociclina	106
Tabela A 1 - Características da amostra de EDTA	117
Tabela A 2 - Características da solução de EDTA	117
Tabela A 3 - Características da solução de oxitetraciclina dihidratada G002	117
Tabela A 4 - Linearidade (Área Vs. Conc.) do método do EDTA – Oxitetraciclina dihidratada G002	118
Tabela A 6 - Características da solução de oxitetraciclina dihidratada G003	118
Tabela A 5 - Linearidade (Área Vs. Conc.) do método do EDTA – Oxitetraciclina dihidratada G003	118
Tabela A 7 - Características da solução de Oxitetraciclina dihidratada G004	118
Tabela A 8 - Linearidade (Área Vs. Conc.) do método do EDTA – Oxitetraciclina dihidratada G004	119
Tabela A 9 - Cálculo dos Resíduos - Método do EDTA	119
Tabela A 10 - Teste de Mandel - EDTA	119
Tabela B 1 – Características da amostra de ácido oxálico	121
Tabela B 2 - Características da solução de ácido oxálico.....	121
Tabela B 3 - Características da solução de oxitetraciclina base	121
Tabela B 4 - Linearidade (Área Vs. Conc.) do método do ácido oxálico - oxitetraciclina base	122
Tabela B 5 - Características da solução 2 de ácido oxálico.....	122
Tabela B 6 - Características da solução de oxitetraciclina dihidratada G002.....	122
Tabela B 7 - Linearidade (Área Vs. Conc.) do método do ácido oxálico - Oxitetraciclina dihidratada G002	122
Tabela B 8 - Características da solução de oxitetraciclina dihidratada G004.....	122
Tabela B 9 - Linearidade (Área Vs. Conc.) do método do ácido oxálico - Oxitetraciclina dihidratada G004	123
Tabela B 10 - Cálculo dos resíduos – Ácido Oxálico.....	123
Tabela B 11 - Teste de Mandel - Ácido Oxálico	123
Tabela C 1 - Características da amostra de DBAD.....	125
Tabela C 2 - Linearidade (Área vs. Conc.) do método do DBAD - 7-HT.....	125
Tabela C 3 - Características da solução de cloridrato de minociclina	125

Tabela C 4 - Linearidade (Área Vs. Conc.) do método do DBAD - Cloridrato de Minociclina	126
Tabela C 5 - Cálculo dos resíduos - DBAD	126
Tabela C 6 - Teste de Mandel - DBAD	126

ÍNDICE DE EQUAÇÕES

Equação 2.1 – Equação de definição de Volume de Retenção.....	18
Equação 2.2 – Equação de definição de Fator de Retenção	19
Equação 2.3 – Equação de definição de Resolução	19
Equação 2.4 – Relação entre resolução, eficiência, seletividade e retenção.....	20
Equação 2.5 – Equação de definição de Seletividade	20
Equação 2.6 – Equação de definição de Eficiência de Separação.....	20
Equação 2.7 – Relação entre número de pratos teóricos, comprimento da coluna e altura dos pratos	21
Equação 2.8 – Relação entre número de pratos teóricos e tempo de retenção.....	21
Equação 2.9 – Equação de definição do Coeficiente de Partição do Solute	22
Equação 2.10 – Equação de definição de Razão Sinal/ Ruído	22
Equação 3.1 - Zero da função afim	38
Equação 3.2 - Massa de analito em 9 mL de solução	38
Equação 3.3 - Massa de analito em 100 mL de solução	38
Equação 3.4 - $\%(m/m)$ (analito/ produto).....	38
Equação 3.5 – Equação de definição do erro relativo em %	39
Equação 3.6 – Equação para cálculo da Variância	39
Equação 3.7 – Equação para cálculo da média da resposta	39
Equação 3.8 - Cálculo do valor teste PG com S^2_N maior.....	40
Equação 3.9 - Cálculo do valor teste PG com S^2_1 maior.....	40
Equação 3.10 – Equação para cálculo do Limite de Detecção	40
Equação 3.11 – Equação para cálculo do Limite de Quantificação.....	40
Equação 3.12 - Equação para cálculo dos resíduos	41
Equação 3.13 – Equação para cálculo do Desvio padrão do ajuste linear	41
Equação 3.14 – Equação para cálculo do Desvio padrão do ajuste polinomial	41
Equação 3.15 – Equação para cálculo da diferença entre variâncias.....	42
Equação 3.16 - Cálculo do valor teste PG	42

SIGLAS E ACRÓNIMOS

ACN	Acetonitrilo
APCI	Ionização Química a Pressão Atmosférica
API	Ingrediente Farmacêutico Ativo (<i>Active Pharmaceutical Ingredient</i>)
APPI	Fotoionização a Pressão Atmosférica
CV	Voltagem do Cone (<i>Cone Voltage</i>)
DBAD	Azodicarboxilato de Dibenzilo
DS²	Diferença de Variâncias
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EMA	European Medicines Agency
ESI	Ionização por Electrospray (<i>Electrospray Ionization</i>)
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Food and Drug Administration
GC	Cromatografia Gasosa (<i>Gas Chromatography</i>)
HFIP	Hexafluoro-2-propanol
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HPM	Mistura de Alta Pressão (<i>High Pressure Mixture</i>)
ICH	International Council for Harmonisation
LC	Cromatografia Líquida (<i>Liquid Chromatography</i>)
LC-MS	Cromatografia Líquida acoplada à Espetrometria de Massa (<i>High Performance Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry</i>)

LoD	Limite de Detecção
LoQ	Limite de Quantificação
LPM	Mistura de Baixa Pressão (<i>Low Pressure Mixture</i>)
m/z	Razão massa / carga
MeOH	Metanol
MilliQ	Sistema de Água Purificada e Ultrapurificada
MS	Espectrometria de Massa (<i>Mass Spectrometry</i>)
MS/MS	Espectrometria de Massa Tandem (<i>Tandem Mass Spectrometry</i>)
PDA	Detetor de Arranjo de Díodos (<i>Photodiode Array Detector</i>)
QDa	Detetor de Arranjo de Quadropolo (<i>Quadrupole Array Detector</i>)
RSD	Desvio Padrão Relativo (<i>Relative Standard Deviation</i>)
S/N	Razão Sinal / Ruído
TEA	Trietilamina
TEAA	Acetato de Trietilamónio
TFA	Ácido Trifluoroacético
THF	Tetraidrofurano
UHPLC	Cromatografia Líquida de Ultra – Alta Eficiência (<i>Ultra-High Performance Liquid Chromatography</i>)
USP	Farmacopeia dos Estados Unidos (<i>United States Pharmacopeia</i>)
UV-Vis	Ultravioleta – Visível

SÍMBOLOS

α	Seletividade / Especificidade
a	Declive da reta de regressão
b	Ordenada na origem da reta de regressão
C_M	Concentração do soluto na fase móvel
C_S	Concentração do soluto na fase estacionária
CV_m	Coefficiente de variação do método
E	Eficiência de separação
F	Fluxo
h	Amplitude do ruído
k'	Fator de retenção
K_D	Coefficiente de partição do soluto
L	Altura do pico
M	Massa
n	Número de pratos teóricos da coluna cromatográfica
N	Ruído
R_s	Resolução
S	Sinal
S_a	Desvio padrão do declive
S_b	Desvio padrão da ordenada na origem
S_m	Desvio padrão do método
$S_{y/x}$	Desvio padrão residual da reta de regressão

t_0	Tempo morto
t_R	Tempo de retenção
V	Volume
V_R	Volume de retenção
W	Largura da base do pico
x_i	Valores individuais de concentração
x_{lab}	Valor obtido experimentalmente
x_v	Valor aceite como verdadeiro
y_i	Valores individuais de sinal instrumental
z	Carga

ENQUADRAMENTO E MOTIVAÇÃO

A Cipan, Companhia Industrial Produtora de Antibióticos, constitui uma entidade de referência no setor farmacêutico, destacando-se pela produção de substâncias ativas farmacêuticas (*Active Pharmaceutical Ingredients*, APIs) com especial ênfase nos antibióticos.

A empresa foi fundada no início dos anos 60 por Sebastião Alves, começando pela abertura de uma fábrica-piloto, que tinha como intuito a realização de experiências para a produção de antibióticos de um espectro bacteriano amplo. [1], [2] Em 1965, instalou-se na Vala do Carregado, dedicando-se à produção de APIs, tais como a tetraciclina e a oxitetraciclina. Deste modo, afirmou-se como pioneira na produção de antibióticos em Portugal, quer por processos de fermentação, como de síntese química, tendo obtido aprovação pela agência norte-americana do medicamento, a FDA (*Food and Drug Administration*), o que contribui para que mais de 90% da sua produção anual corresponda a exportação, maioritariamente para os EUA. [2][3]

Durante grande parte do seu percurso, a Cipan esteve integrada no grupo AtralCipan, o que permitiu a sua consolidação como um dos mais proeminentes intervenientes na indústria farmacêutica, fornecendo produtos de excelência, tanto para o mercado nacional, como para o mercado internacional. Com mais de 60 anos de história, a sua presença internacional confere-lhe a capacidade de produzir em conformidade com os padrões mais rigorosos exigidos por prestigiadas agências, como a EMA (*European Medicines Agency*) e a FDA. [3][4]

Em 2016, a Cipan foi incorporada no Grupo Suanfarma, o que reforçou a sua competitividade e capacidade de inovação no setor farmacêutico. Comprometida com a tecnologia e a sustentabilidade, mantém-se como uma referência na indústria, contribuindo ativamente para o desenvolvimento de soluções inovadoras e eficazes para a saúde global. Revela-se uma empresa CDMO ("*Contract Development and Manufacturing Organization*"), que oferece serviços de desenvolvimento e produção de medicamentos para outras empresas farmacêuticas. [3][4]

No contexto da indústria farmacêutica, o controlo rigoroso de impurezas e resíduos de processos nos APIs é essencial para garantir a qualidade, segurança e conformidade regulatória dos produtos. As técnicas analíticas tradicionais, como a cromatografia líquida com deteção por absorvância (UV-Vis), podem oferecer boa sensibilidade e precisão para compostos que

possuam grupos cromóforos ativos. No entanto, revelam limitações significativas na análise de substâncias que não apresentam estes grupos, dificultando a sua deteção e comprometendo a quantificação de componentes em níveis vestigiais, o que afeta a fiabilidade dos resultados analíticos. Neste sentido, a técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) apresenta-se como uma alternativa promissora, pode oferecer uma maior sensibilidade e uma maior capacidade de deteção de compostos em quantidades muito reduzidas, mesmo na presença de matrizes complexas. [5]

O ácido oxálico e o EDTA são compostos utilizados como agentes quelantes, pelo que são adicionados em determinadas etapas do processo de isolamento e purificação de oxitetraciclina dihidratada, com o intuito de se ligarem a iões metálicos, formando complexos estáveis. Esta ligação impede a reação entre estes iões e outras substâncias que se encontrem presentes no meio, mantendo-os isolados e inativos, sem que interfiram no processo. [6][7] No entanto, é essencial garantir que estes agentes não constituem uma quantidade significativa de impurezas nos APIs produzidos, nomeadamente, na oxitetraciclina, devendo corresponder às especificações exigidas, mais concretamente, devem apresentar uma concentração inferior a 0,1% (m/m) [8]. De forma a garantir o cumprimento desta exigência, recorre-se ao desenvolvimento de métodos analíticos que permitam, não só a deteção, como também a quantificação precisa de determinadas impurezas nos APIs por espectrometria de massa LC-MS, idealmente com tempos de análise curtos e preparações de amostras simples e rápidas. [9][10] Para além disso, a necessidade de recorrer a esta técnica advém do EDTA não apresentar grupos cromóforos para deteção direta em UV-Vis, ou seja, sem derivatização e do ácido oxálico apresentar absorção fraca nesta gama. [11], [12]

Os cloretos de alquilo podem surgir como impureza residual ou subproduto volátil em processos de síntese de fármacos, principalmente em reações que envolvem a utilização de agentes alquilantes. Estes podem ser usados como agentes quelantes em sínteses orgânicas, formando ligações C-C com substratos nucleofílicos. Contudo, dada a sua natureza eletrofílica e a sua reatividade especialmente em condições aquosas ou na presença de bases, estes podem não reagir completamente, permanecendo no produto final ou sendo libertados durante as etapas de purificação ou evaporação de solventes. A sua presença em produtos farmacêuticos é indesejável devido à sua toxicidade e ao seu potencial carcinogénico, sendo, por isso, classificadas como impurezas potencialmente genotóxicas. Este facto justifica a necessidade de desenvolver métodos sensíveis e seletivos para a sua monitorização ao longo de um determinado processo de fabrico, pelo que, neste trabalho, se selecionou o cloreto de *terc*-butilo como exemplo de cloreto de alquilo. [13]

O DBAD (azodicarboxilato de dibenzilo) é usado no quarto passo do processo de produção de minociclina como reagente que participa na reação onde se dá a conversão de DOT-B (6-dimetil-6-dioxitetraciclina) em 7-HT (7-(N, N-dicarbobenziloxihidrazino)-6-dimetil-6-dioxitetraciclina) para posterior conversão em cloridrato de minociclina. Este facto torna pertinente o estudo deste composto, bem como a sua quantificação, por LC-MS, no produto que resulta do 4º passo deste processo, ou seja, o 7-HT e também no cloridrato de minociclina. [14]

1.1 Objetivos

A presente dissertação tem como principal objetivo explorar o potencial da técnica de UHPLC-MS para a quantificação de impurezas em matrizes químicas específicas. Para tal, foram selecionados como analitos o ácido oxálico, o EDTA e o DBAD, que participam nos processos industriais de síntese de API's e que têm características químicas distintas, de modo a avaliar a versatilidade da metodologia proposta. Para além disso, pretende-se, também, analisar outro tipo de compostos como o cloreto de *terc*-butilo para estudar o potencial do equipamento de UHPLC-MS utilizado.

Os objetivos específicos que orientam este trabalho são os seguintes:

- **Avaliar o impacto de variáveis críticas do método analítico**, tais como a presença ou não de coluna cromatográfica, a composição da fase móvel e do diluente, o tempo entre a preparação e a injeção das amostras e a ordem de injeção, sobre a resposta analítica e a reprodutibilidade dos resultados, de forma a otimizar as condições experimentais;
- **Estudar o comportamento analítico de cada composto**, nomeadamente no que diz respeito à linearidade da resposta em função da concentração, com o intuito de definir a gama de trabalho mais adequada para a sua quantificação precisa e exata;
- **Aplicar metodologias de quantificação baseadas no método de adição padrão**, de forma a compensar possíveis efeitos-matriz.
- **Proceder à pré-validação do método analítico desenvolvido**, com base em parâmetros como linearidade, precisão e limites de deteção e quantificação, de forma a demonstrar a sua adequabilidade para aplicação futura em contextos analíticos reais, nomeadamente em controlo de qualidade e em investigação.

Não foram explorados todos os pontos da pré-validação.

ESTADO DE ARTE

Neste capítulo são apresentadas informações provenientes da literatura científica e que são relevantes para o tema em estudo. Incide, em particular, sobre os princípios fundamentais da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa, com ênfase no modo de ionização por *electrospray*, bem como nas limitações associadas à análise de determinados tipos de compostos.

2.1 Processos Cromatográficos

A Cromatografia é um método de separação através do qual é possível separar e identificar os diversos componentes de uma mistura. Este processo baseia-se na distribuição diferencial dos constituintes entre duas fases distintas: a fase estacionária e a fase móvel. [15]

Enquanto a fase estacionária permanece fixa, a fase móvel é responsável por transportar os diferentes componentes da mistura através da mesma. A interação entre o eluente e os componentes da mistura, influenciada por fatores como a solubilidade e a polaridade das substâncias envolvidas, desempenha um papel determinante na velocidade com que os compostos migram através da fase estacionária. Assim, a composição da fase móvel é determinante, no que diz respeito à separação cromatográfica e à migração de compostos devido a interações químicas. [16][17]

A separação dos componentes da mistura ocorre consoante o tempo que cada substância demora a atravessar a fase estacionária, sendo este parâmetro designado como tempo de retenção. O registo da deteção de todos os compostos em função do tempo de análise, ou volume de eluição constitui o cromatograma. [18]

A cromatografia pode ser subdividida em vários tipos com base na natureza da fase móvel, no tipo de separação e, ainda, no modo de eluição.

2.1.1 Natureza da Fase Móvel

Tendo por base a natureza da fase móvel, esta técnica pode ser categorizada em três tipos principais: Cromatografia Gasosa, Cromatografia Supercrítica e Cromatografia Líquida, sendo que esta última vai ser descrita em maior detalhe por ser a utilizada.

A Cromatografia Líquida (LC) assenta na dissolução da amostra numa fase móvel líquida, que percorre uma fase estacionária sólida, frequentemente constituída por partículas de sílica de elevada pureza. O mecanismo de separação decorre das interações intermoleculares diferenciadas entre os analitos e ambas as fases, nomeadamente forças de adsorção, partição ou interações eletrostáticas, determinando a eluição sequencial dos constituintes da amostra. [19][20]

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) é uma técnica analítica avançada de cromatografia líquida, que se distingue da LC convencional pelos parâmetros operacionais e pela eficiência, conforme detalhado na tabela 2.1. [21]

A Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Eficiência (UHPLC) representa um avanço significativo na área da separação analítica, sendo amplamente usada em diversas áreas, como a farmacêutica, ambiental e alimentar. Caracteriza-se pela melhoria da resolução cromatográfica e significativa redução no tempo de análise. [22]

A tabela 2.1 permite fazer uma comparação entre os três tipos de cromatografia líquida nomeados.

Tabela 2.1 - Comparação entre LC, HPLC e UHPLC

Parâmetro	Cromatografia Líquida Convencional (LC) [19][20]	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) [21]	Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Eficiência (UHPLC) [22]
Pressão Aplicada	Baixa (≤ 5 bar; fluxo por gravidade ou bomba simples)	Elevada (50-400 bar; Bomba com controlo de fluxo)	Muito elevada (> 1035 bar; bombas reforçadas)
Coluna	De vidro ou plástico	De aço inoxidável	De aço inoxidável reforçado
Tempo de Corrida	Longo (30-180 min)	Médio (5-30 min)	Curto (< 5 min)
Resolução	Baixa (sobreposição de picos comum)	Alta (boa separação de compostos semelhantes)	Muito alta (excelente separação de compostos complexos)
Fase Estacionária	Partículas grandes (diâmetro: 50-100 μm)	Partículas pequenas (diâmetro: 3-5 μm)	Partículas muito pequenas (diâmetro: < 2 μm)
Limite de Detecção	Elevado ($\mu\text{L}/\text{mL}$) Amostras concentradas	Médio (ng/mL)	Baixo (pg/mL – ng/mL) Ideal para vestígios
Aplicações	- Testes qualitativos simples - Análises académicas básicas	- Controlo de qualidade farmacêutico - Análise de impurezas - Produtos Cosméticos	- Poluentes ambientais - Resíduos em alimentos - Farmacocinética e bioanálise

Neste trabalho será utilizada a cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC), que vai ser descrita mais adiante.

2.1.2 Tipo de Separação

Dos vários tipos de separação em HPLC é possível destacar a cromatografia de exclusão por tamanho, cromatografia de permuta iônica e a cromatografia de partição, sendo que as características desta última vão ser descritas abaixo, pelo facto de ser a utilizada.

A cromatografia de partição é uma das modalidades mais utilizadas em HPLC e fundamenta-se na diferença de afinidade dos analitos pelas fases móveis e estacionária. Esta afinidade depende das características físico-químicas dos compostos, como a polaridade, os grupos funcionais presentes, a solubilidade nas fases envolvidas e o pH do sistema.

A polaridade dos compostos, determinada pela sua estrutura química, afeta diretamente o comportamento cromatográfico. Compostos com polaridades semelhantes à da fase estacionária tendem a interagir mais fortemente com esta, resultando em eluições mais lentas. Por outro lado, os compostos com maior afinidade pela fase móvel serão eluídos mais rapidamente. Assim, a velocidade de eluição dos analitos depende diretamente da escolha adequada das fases estacionária e móvel, sendo a seletividade da separação determinada pelas interações entre os analitos e ambas as fases, em função da sua polaridade relativa. [23][24][25]

2.1.3 Tipos de Cromatografia de Partição

A cromatografia de partição pode ser dividida em vários tipos com base no seu modo de eluição e nas polaridades das fases móvel e estacionária.

2.1.3.1 Modo de Eluição

O fluxo da fase móvel é impulsionado por uma bomba de alta pressão, sendo direcionado através de uma válvula de comutação. Esta válvula tem como função encaminhar tanto a fase móvel como a amostra (introduzida a partir do injetor) para o interior da coluna cromatográfica, operando sob condições de elevada pressão. Este mecanismo possibilita a automação do processo de injeção, permitindo a introdução sucessiva de amostras através de um sistema de *loop*, sem necessidade de interrupção do fluxo. [26]

Relativamente ao modo de eluição dos solventes no sistema cromatográfico, este pode assumir a forma isocrática ou ser em gradiente, consoante a variação da composição da fase móvel ao longo da análise.

- **Isocrático:** Na eluição isocrática, a composição da fase móvel mantém-se inalterada durante toda a análise cromatográfica. Este modo pode envolver a utilização de um único solvente ou de uma mistura de solventes cuja proporção permanece constante. Trata-se de uma abordagem adequada para misturas relativamente simples, em que os compostos possuem características semelhantes de polaridade e não requerem ajustes dinâmicos na força de eluição. [23][24]

- **Gradiente:** Por oposição, na eluição em gradiente, a composição da fase móvel é alterada progressivamente ao longo do tempo. Este método é especialmente vantajoso na separação de misturas complexas. O gradiente permite reduzir o tempo de retenção de compostos fortemente adsorvidos, aumentando, assim, a eficiência da separação e a resolução cromatográfica. [27]

2.1.3.2 Polaridades das Fases Móvel e Estacionária

A cromatografia de partição pode, ainda, ser classificada de fase normal ou fase reversa, conforme a polaridade relativa das fases estacionária e móvel.

- **Cromatografia de Fase Normal:** Caracteriza-se pela utilização de uma fase estacionária polar (como a sílica) e de uma fase móvel apolar, frequentemente constituída por solventes como o hexano. Esta modalidade é particularmente indicada para a separação de compostos com polaridade intermédia ou para misturas em que se pretende isolar analitos relativamente polares. Os compostos menos polares são eluídos mais rapidamente, uma vez que apresentam menor afinidade para a fase estacionária, enquanto que os analitos de maior polaridade interagem mais intensamente com a fase estacionária, resultando em tempos de retenção superiores. Esta técnica revela-se especialmente eficaz na separação de isómeros estereoquímicos, diastereómeros e compostos aromáticos de baixa massa molecular. [28][29]
- **Cromatografia de Fase Reversa:** Atualmente, é a modalidade mais amplamente utilizada em HPLC, sendo caracterizada pelo uso de uma fase estacionária apolar (geralmente constituída por cadeias de carbono ligadas a sílica) e de uma fase móvel polar, composta por soluções aquosas, tampões ou misturas hidrossolúveis com solventes orgânicos como o metanol ou o acetonitrilo. Nesta técnica, os compostos polares tendem a ser eluídos em primeiro lugar, devido à sua maior afinidade com a fase móvel, enquanto que os compostos apolares interagem de forma mais significativa com a fase estacionária, resultando em tempos de retenção mais elevados. Devido à sua elevada versatilidade, reprodutibilidade e compatibilidade com compostos de diferentes naturezas químicas, esta abordagem é amplamente empregue na indústria farmacêutica, sendo fundamental na análise e purificação de fármacos, metabolitos e outros compostos bioativos. [28][29]

A presença e a natureza dos grupos funcionais nas moléculas analisadas exercem um papel determinante no seu comportamento durante a separação cromatográfica. Grupos funcionais polares, como aminas, ácidos carboxílicos, ou hidroxilos, interagem fortemente com fases estacionárias polares (em cromatografia normal) ou com a fase móvel aquosa (em cromatografia de fase reversa), influenciando a retenção e a seletividade dos analitos. Estas interações podem ocorrer sob a forma de ligações de hidrogénio, forças de dipolo ou interações iónicas, dependendo das características químicas do grupo funcional e das condições experimentais. Em cromatografia reversa, a retenção de analitos com grupos polares e ionizáveis (COO^- , NH_3^+) é significativamente alterada conforme o seu estado de protonação. Assim, conhecer a natureza destes grupos permite ajustar a composição da fase móvel para melhorar a seletividade e reduzir o tempo de análise. [30]

Uma etapa crítica na preparação da amostra reside na solubilização completa dos analitos em solventes compatíveis com a fase móvel e com o sistema de MS. Solventes miscíveis com a fase móvel (como metanol e acetonitrilo) e tampões voláteis melhoram a dissolução de substâncias, prevenindo a precipitação e o comprometimento da coluna. [31]

2.2 Sistema de UHPLC

O sistema de UHPLC-MS, presente na figura 2.1, é composto por vários componentes fundamentais, sendo que cada um desempenha um papel essencial na separação e análise dos compostos da amostra.



Figura 2.1 - Módulos do sistema de UHPLC-MS (adaptada de [29])

A figura 2.2 permite ter uma visão geral simplificada do funcionamento de um sistema de UHPLC com detetor MS.

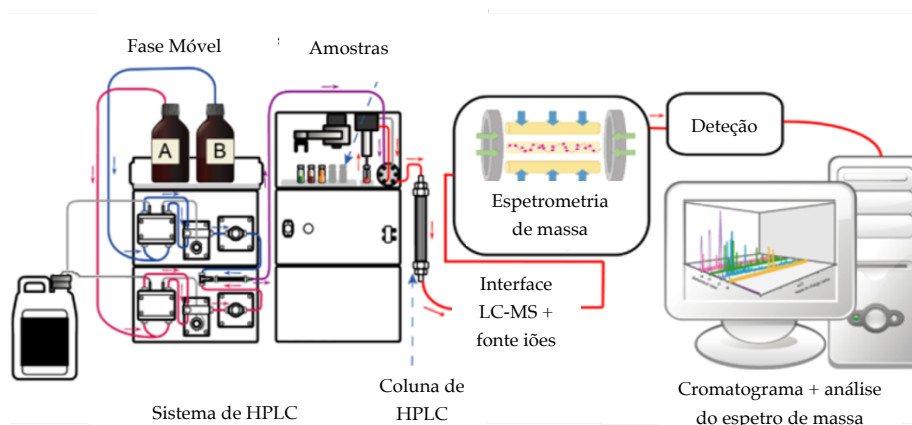


Figura 2.2 - Sistema de UHPLC-MS (adaptada de [32])

Os seus componentes instrumentais estão descritos de seguida.

2.2.1 Bomba

A bomba é responsável por gerar pressão suficiente (cerca de 6000 psi para HPLC e mais de 10000 psi para UHPLC), de forma a que o fluxo da fase móvel seja direcionado dos reservatórios para o sistema, atravessando toda a coluna. Deste modo, garante-se um caudal de solventes preciso e constante dentro de uma gama de 0,1 a 10 mL/min, conforme o tipo de cromatógrafo. [25]

Distinguem-se dois tipos de sistemas de bombeamento, a mistura a baixa pressão (LPM – *Low Pressure Mixing*) e a mistura a alta pressão (HPM – *High Pressure Mixing*) que determinam a forma como os solventes da fase móvel são misturados no sistema nos casos em que se recorre ao modo de eluição em gradiente.

Na LPM, apresentada na figura 2.3, os solventes são misturados antes da bomba, através de válvulas de seleção, sendo, posteriormente, impulsionados por uma bomba quaternária, que permite a combinação simultânea de até quatro solventes. Esta configuração é particularmente vantajosa em sistemas que requerem flexibilidade na composição da fase móvel, permitindo gradientes complexos com elevada precisão de mistura, ainda que, geralmente, a taxas de fluxo mais limitadas. [33]



Figura 2.3 - Bomba quaternária de solventes (adaptada de [31])

Por outro lado, na HPM, a mistura dos solventes ocorre após a ação de duas bombas binárias independentes, cada uma responsável por um solvente. Neste caso, os solventes são combinados em linha sob alta pressão, o que resulta numa resposta mais rápida às alterações de gradiente e numa maior reprodutibilidade em análises de alta exigência. No entanto, esta configuração oferece menos flexibilidade no número de solventes utilizados em simultâneo. [33]

Adicionalmente, é importante realçar que este equipamento deve garantir a mínima variação de pressão possível, assegurando, assim, a reprodutibilidade dos resultados.

2.2.2 Injetor

O injetor introduz um determinado volume de amostra no fluxo da fase móvel de forma reprodutível e controlada sob alta pressão, assegurando a integridade da análise. Geralmente,

esta é realizada através do injetor automático de amostras (*autosampler*), representado na figura 2.4, o que permite a automatização do processo. [34]

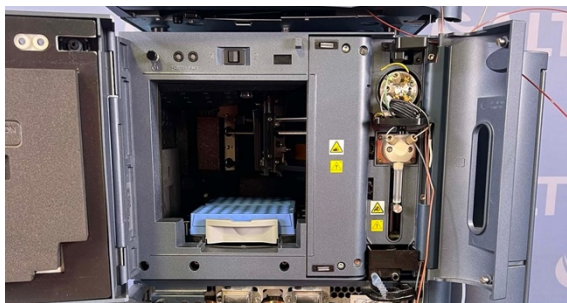


Figura 2.4 - Injetor Automático (*Autosampler*) (adaptada de [31])

2.2.3 Coluna Cromatográfica

A coluna cromatográfica contém a fase estacionária e constitui o núcleo do processo de separação, onde ocorre a separação dos componentes com base nas suas interações diferenciais com as fases móvel e estacionária. Podem apresentar vários tamanhos e tipos, consoante as exigências de cada método ou do tipo de separação. As dimensões mais comuns são entre 5 e 30 cm de comprimento, e entre 4 e 10 mm de diâmetro. São, geralmente, fabricadas em aço inoxidável e mantidas a uma temperatura controlada, habitualmente situada entre 30 e 60 °C, durante o processo de separação. O controlo térmico da coluna tem impacto direto na eficiência da separação, uma vez que uma temperatura mais elevada provoca uma diminuição da viscosidade da fase móvel, facilitando, assim, um fluxo mais rápido através da coluna. Como consequência, os tempos de retenção dos analitos são reduzidos e a resolução cromatográfica tende a melhorar, dado que a velocidade de difusão dos solutos aumenta, favorecendo interações mais dinâmicas entre os analitos e a fase estacionária.

Temperaturas excessivamente elevadas podem comprometer a integridade da fase estacionária, resultando na sua degradação química ou física. Tal degradação traduz-se numa perda de eficiência na separação ao longo do tempo e, consequentemente, numa diminuição do tempo de vida útil da coluna. [35][36]

Relativamente ao enchimento da mesma, usualmente, trata-se de partículas microporosas de sílica de 3 a 5 μm . Especialmente, quando se pretende separar compostos básicos, é utilizada sílica com pontes de etileno ou com constituição polimérica, visto que a maioria dos tipos de sílica dissolve-se em soluções com pH básico. [27]

Existem também colunas monolíticas, cuja estrutura é constituída por um único bloco contínuo de sílica porosa, preenchendo integralmente o volume interno da coluna. Esta configuração representa uma vantagem significativa em relação às colunas tradicionais, compostas por partículas empacotadas, uma vez que elimina os espaços intersticiais entre partículas, promovendo um fluxo mais homogêneo da fase móvel. Quando comparadas com as convencionais de partículas de sílica, as monolíticas apresentam diversas vantagens operacionais: permitem tempos de análise mais reduzidos, requerem menores volumes de fase móvel,

suportam taxas de fluxo significativamente mais elevadas (até cerca de 10 mL/min) e geram menor contrapressão. Estes fatores contribuem para uma separação mais célere e eficiente, sem comprometer a resolução analítica.

Em alternativa às colunas de sílica, podem ser utilizadas colunas constituídas por partículas de óxido de alumínio (alumina) ou por resinas de permuta iónica, consoante a natureza da separação desejada e as características dos analitos em estudo. [25][37]

O seu desempenho pode ser otimizado ao reduzir o tamanho das partículas da coluna, aumentando, deste modo, a área de contacto com a amostra e, melhorando a resolução. Contudo, ao serem seleccionadas partículas menores, é gerada uma contrapressão, o que exige que a coluna suporte estas pressões operacionais elevadas.

Em determinados casos, podem ser usadas pré-colunas antes das colunas, de modo que o tempo de vida desta última seja aumentado, visto que estas são úteis na remoção de contaminantes e partículas que possam estar presentes nos solventes, atuando como pré-filtros. [25]

2.2.4 Detetor

O detetor identifica os analitos eluídos da coluna, monitoriza alterações na composição da fase móvel e, ainda, converte a sua resposta num sinal elétrico, que permite a identificação e quantificação dos compostos presentes na amostra. Os detetores mais utilizados são espectrofotómetros de absorvância, mais concretamente, Ultravioleta-Visível (UV-Vis) e o Fotodíodos (PDA – *Photodiode Array*), os espectrofotómetros de Massa (MS) e, ainda, detetores de índice de refração.

Relativamente aos detetores de absorvância, neles é emitida radiação UV pela lâmpada de deutério, que é irradiada na célula de fluxo (célula de vidro transparente) e a amostra que nela se encontra absorve uma parte dessa mesma radiação. De seguida, esta atinge uma zona de difração, o que faz com que a luz não absorvida seja direcionada para a matriz de fotodíodos. Posteriormente, recorre-se à Lei de *Lambert-Beer*, que permite relacionar a concentração da mesma com os resultados de absorvância obtidos através da absorção da radiação por parte dos diferentes componentes presentes na amostra.

No que diz respeito aos espectrómetros de massa, estes permitem a identificação de diversos componentes de uma mistura através da separação dos iões dos analitos em fase gasosa, de acordo com o seu valor massa/carga (m/z). [27][38][39] Este é o tipo de detetor utilizado neste trabalho, pelo que o seu funcionamento é descrito mais detalhadamente a seguir.

2.2.5 Sistema de Aquisição e Processamento de Dados

Este regista os sinais elétricos que são gerados pelo detetor, traçando um cromatograma. Os diferentes picos nele apresentados representam os diversos compostos separados, permitindo, assim, a análise quantitativa e qualitativa dos analitos e a consequente otimização dos parâmetros cromatográficos experimentais. [40][41]

2.3 Espetrometria de Massa

A espectrometria de massa diz respeito a uma técnica analítica que permite obter informações do analito, não só qualitativas, ou seja, acerca da sua estrutura, como também quantitativas, nomeadamente sobre a sua massa molecular ou concentração.

As limitações dos detetores ditos tradicionais levaram a que fossem desenvolvidos novos detetores, que tornassem possível a quantificação de uma gama mais ampla de compostos. O espectrómetro de massa que, quando acoplado à cromatografia líquida, ao contrário dos detetores de absorvância comuns (como o UV-Vis), permite a análise de diversos compostos como iónicos, polares, termicamente instáveis e não voláteis sem que tenham, necessariamente, grupos cromóforos. A sua exploração na área da proteómica deve-se à sua capacidade de estudar biomoléculas de elevado peso molecular.

Assim, ao utilizar LC-MS em HPLC ou UHPLC, alcança-se uma maior seletividade e sensibilidade e numa gama de aplicação mais vasta, uma vez que se conjuga a capacidade de separação da cromatografia líquida com o elevado poder de identificação estrutural da espectrometria de massa. [42][43][44]

2.3.1 Sistema de LC-MS

Numa etapa inicial, a amostra é introduzida no sistema analítico e os seus constituintes são separados através de uma coluna de HPLC. Posteriormente, os analitos separados são transferidos para uma fonte de ionização (descrita na subsecção 2.3.2.), onde são convertidos em fase gasosa e submetidos à ionização, adquirindo cargas positivas ou negativas. A maior parte do eluente é descartada, sendo encaminhada para o sistema de escoamento. Os iões gerados são direcionados para o analisador de massa, onde são separados com base na sua razão massa/carga (m/z), sob a influência de campos elétricos e/ou magnéticos. Esta separação permite que diferentes iões alcancem regiões distintas do detetor. Em sequência, ocorre a colisão dos iões com gases inertes, como o azoto (N_2) ou o árgon (Ar), promovendo a fragmentação controlada dos analitos. Os fragmentos iónicos produzidos são convertidos em sinais elétricos proporcionais à sua abundância relativa na amostra. Estes sinais são subsequentemente registados e processados por um sistema computacional, permitindo uma análise tanto qualitativa como quantitativa dos compostos presentes. Adicionalmente, obtêm-se informações relevantes acerca da massa molecular e de características estruturais dos analitos, contribuindo para a sua identificação e caracterização aprofundada. [27][38][39]

Na figura 2.5 encontra-se um exemplo de um espectro de massas, onde consta não só a intensidade de cada pico com base na sua razão m/z , como também o seu tempo de retenção.

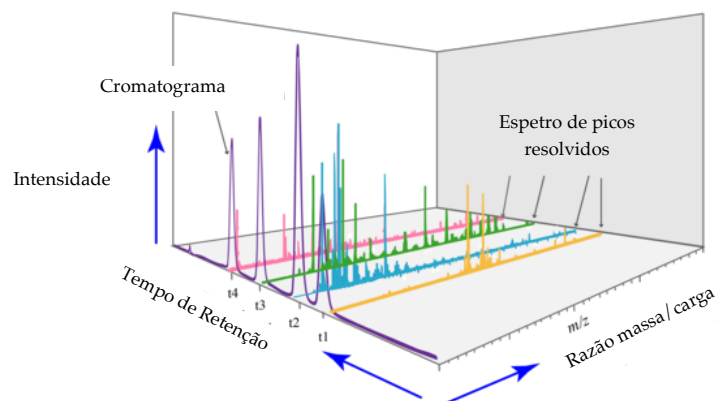


Figura 2.5 - Espectro de massas tipo (adaptado de [44])

2.3.2 Modos de Ionização a Pressão Atmosférica

Ao contrário dos detetores de absorvância (como os UV), o detetor de espectrometria de massa opera sob vácuo, pelo que é exigido um sistema de ligação (interface) que suporte a passagem da amostra, que sai da coluna cromatográfica sob alta pressão para o detetor de massa, sem comprometer a sua integridade. [45][46]

Dado que a espectrometria de massa requer que os analitos se encontrem na fase gasosa e ionizados, a interface entre a cromatografia líquida (LC) e o detetor de massa (MS) integra uma fonte de ionização à pressão atmosférica (API). Esta fonte tem como função promover a transição dos compostos da fase líquida para a fase gasosa, facilitando simultaneamente a sua ionização. Para isso, a câmara da interface aquece a amostra até cerca de 600 °C. [46][47] Além disso, para que não se verifiquem interferências no sistema de vácuo, é necessário remover o excesso de fase móvel antes de a amostra entrar no detetor, o que não acontece nos detetores UV. Para garantir que este processo é eficiente, tanto na ionização, como na eliminação do solvente restante, é usado um gás inerte (gás de arraste), como o azoto, hélio ou árgon, sendo o primeiro o mais comum. [44]

- **Ionização por *Electrospray* (ESI)**

A ionização por *electrospray* (ESI) recorre à aplicação de um campo elétrico de alta voltagem para promover a formação e transferência de iões da fase líquida para a fase gasosa, permitindo a sua posterior análise por espectrometria de massa. Esta técnica distingue-se pela sua elevada sensibilidade e compatibilidade com amostras em solução aquosa ou orgânica. No caso de compostos neutros, a sua deteção por ESI-MS requer a conversão prévia em espécies iónicas, processo que pode ocorrer em solução por meio de reações de protonação, desprotonação ou formação de aductos catiónicos ou, em menor grau, durante a nebulização. Importa salientar que a ionização por ESI é considerada uma técnica "suave", pois induz fragmentação mínima dos analitos, sendo especialmente adequada para a análise de compostos altamente polares, pouco voláteis ou termicamente instáveis.

Esta transferência envolve três etapas, que incluem a aplicação de um, gás de nebulização, como o azoto. Primeiramente, através da extração e pulverização de soluções de amostras na ponta de um tubo capilar, onde é aplicada uma tensão elevada de cerca de +- 3 a 5 kV, é gerada uma névoa fina de gotículas altamente carregadas com a mesma polaridade que a tensão capilar aplicada. Quando a força repulsiva mútua das cargas excede a tensão superficial do líquido (repulsão), ocorre a cisão. Posto isto, verifica-se um aumento da densidade de carga superficial e uma diminuição do raio da gotícula, uma vez que a temperatura elevada da fonte ESI e/ou da corrente de secagem de azoto fazem com que as partículas carregadas sejam continuamente reduzidas em tamanho por evaporação do solvente. Por fim, à medida que a intensidade do campo elétrico aumenta sucessivamente, esta atinge um ponto crítico, que faz com que os iões que se encontram à superfície das gotas sejam libertados para a fase gasosa, recolhidos e, ainda, acelerados para o analisador de massas com o intuito de se proceder à análise da sua massa molecular e medir a intensidade destes mesmos iões.

É, ainda, relevante mencionar que a tendência para formar iões multivalentes é fortemente influenciada pelo pKa do composto e o pH da solução. [48][49]

- **Ionização química a pressão atmosférica (APCI)**

Ao contrário do que acontece na ESI, a APCI envolve um processo de energia mais elevada e não tem tendência para formar iões com cargas múltiplas, o que faz com que seja mais adequado para analisar compostos apolares ou compostos que não se ionizam em solução. Neste modo de ionização, as moléculas do solvente e da amostra são vaporizadas, a solução da amostra é pulverizada num aquecedor (a cerca de 400 °C), utilizando um gás, como o azoto, e as moléculas do solvente são ionizadas pela agulha de descarga para gerar iões estáveis. Os prótons são transferidos entre os iões gerados e as moléculas da amostra (reação ião-molécula). [49]

- **Fotoionização a pressão atmosférica (APPI)**

Neste modo de ionização, as substâncias a analisar são ionizadas por radiação ultravioleta de vácuo (VUV) a comprimento de onda curto e é utilizada com compostos de baixa a moderada polaridade, como os aromáticos policíclicos.

Ao contrário da APCI, a APPI não utiliza uma agulha de descarga de alta voltagem, mas sim uma lâmpada de VUV. Tal como na APCI, o sistema inclui um nebulizador e um aquecedor, responsáveis por gerar gotículas e promover a vaporização do solvente. Após a irradiação com luz VUV, os componentes da amostra podem absorver um fóton e atingir um estado eletronicamente excitado. Se a energia do fóton for superior ao potencial de ionização da molécula, esta pode ser ionizada diretamente ou transferir carga a outro composto. Em meio solvente, os iões gerados podem ainda sofrer reações secundárias, como a protonação, originando catiões protonados aptos para deteção por espectrometria de massa. [49]

Na tabela 2.2 encontram-se apresentadas as principais diferenças entre os dois modos de ionização descritos.

Tabela 2.2 - Modos de Ionização (ESI, APCI e APPI)

Modos de Ionização	ESI	APCI	APPI
Processo de Ionização	Analito vaporizado e ionizado por aplicação de voltagem.	Ionização por aplicação de um campo elétrico intenso.	Ionização ocorre na fase gasosa por irradiação UV.
Tipo de Iões Formados	Iões de carga única. Iões de cargas múltiplas.	Iões de carga única.	Iões de carga única.
Volatilidade do Analito	Não precisa de ser volátil.	Requer um certo grau de volatilidade.	Requer um certo grau de volatilidade.
Estabilidade do Analito	Não precisa de ser termicamente estável.	Tem de ser termicamente estável.	Tem de ser termicamente estável.

A ESI é mais utilizada em análise de proteínas, péptidos e polímeros. A APCI é mais usada em casos de compostos orgânicos com alguma volatilidade, como fármacos e aditivos. Por fim, a APPI é selecionada quando se trata de alguns fármacos e produtos químicos cujos compostos são facilmente ionizáveis por UV. [49]

2.3.3 Sistema de LC-MS/MS

Este sistema consiste na utilização de dois detetores de espectrometria de massa ligados ao instrumento de HPLC. Primeiramente, os iões são isolados no primeiro MS e entram na célula de colisão, onde são fragmentados. Daqui resultam os iões produto, que são, posteriormente, separados e detetados no segundo MS.

O sistema de LC-MS/MS apresenta vantagens em relação ao sistema LC-MS, uma vez que proporciona uma maior seletividade, especificidade e sensibilidade, que possibilita o fornecimento de dados suplementares sobre a massa e a estrutura do componente em causa. É, assim, utilizado em situações de matrizes de amostras complexas, quando se trata de quantidades reduzidas de componentes ou, ainda, quando a resolução não é favorável à separação cromatográfica em questão. Destaca-se pela sua utilidade, no que toca ao desenvolvimento de novas entidades químicas, na sua identificação e, ainda, na quantificação de metabolitos, polissacáridos e proteínas. [43][50]

2.4 Seleção da Fase Móvel

Na escolha do eluente é relevante ter em conta o modo de ionização (ESI ou APCI, positivo ou negativo) e as características do analito, tais como o seu pKa, a sua solubilidade e a compatibilidade com as técnicas de ionização. Adicionalmente, as soluções tampão utilizadas devem ter a menor concentração possível, de forma a que não haja supressão iónica. Para além disso, não é possível analisar componentes que tenham massa molecular inferior à da fase

móvel ou dos seus aditivos. Em vez de serem usados ácidos inorgânicos, como o clorídrico e o sulfúrico, estes devem ser substituídos por ácidos orgânicos, como o fórmico, o acético e o TFA (ácido trifluoroacético), uma vez que os primeiros são corrosivos, podendo danificar o detetor de massas. Os solventes mais usados na composição da fase móvel são a água, o acetoneitrilo, o metanol, o isopropanol, o etanol e o propanol, sendo que a sua pureza deve ser mais elevada do que a dos utilizados em HPLC sem detetor MS.

Os aditivos mais utilizados são o ácido fórmico e acético, o formato, o acetato, o hidróxido e o bicarbonato de amónio, o THF (tetrahydrofurano), o HFIP (hexafluoro-2-propanol), o TEA (triethylamina) e o TEAA (acetato de triethylamónio). É importante referir que aditivos, como ácidos inorgânicos, sais não voláteis (fosfatos) e detergentes não devem ser selecionados como constituintes do eluente, já que podem causar corrosão, depositarem-se na fonte ou suprimir a ionização, respetivamente. [51]

O pH da fase móvel é um parâmetro determinante tanto para a retenção cromatográfica dos analitos como para a eficiência da ionização. A variação do pH afeta diretamente o estado de ionização dos grupos funcionais presentes nas moléculas, como grupos carboxílicos e aminas, influenciando a sua polaridade, solubilidade e interação com a fase estacionária. Por exemplo, ácidos fracos com pK_a próximo de 4 estão predominantemente na forma neutra em meios ácidos ($pH < 3$), o que favorece a sua retenção em colunas de fase reversa. Em contraste, em pH acima de 5, estes ácidos encontram-se ionizados, tornando-se mais polares e eluindo mais rapidamente. O mesmo raciocínio aplica-se a bases fracas ($pK_a \approx 8-9$), que se encontram protonadas e mais retidas em pH ácido a neutro, mas tornam-se neutras em pH alcalino, reduzindo a sua interação com a fase estacionária. [52]

Para garantir uma separação eficiente e uma ionização estável, utilizam-se tampões voláteis, como formiato de amónio ou acetato de amónio, geralmente em intervalos de pH entre 3 e 6. Estes tampões mantêm o equilíbrio ácido-base dos analitos sem comprometer a compatibilidade com a fonte de ionização, ao contrário de tampões não voláteis que podem provocar *fouling*, supressão de sinal ou contaminação do espectrómetro. O controlo adequado do pH não só melhora a forma e simetria dos picos cromatográficos como também maximiza a sensibilidade do detetor de massa, especialmente em modos de ionização seletiva como ESI^+ ou ESI^- . [52]

2.5 Interpretação de Cromatogramas

Existem vários parâmetros importantes, na interpretação de cromatogramas, que serão descritos de seguida.

Na figura 2.6 encontra-se representado um cromatograma tipo, onde se encontram apresentados alguns parâmetros como o tempo de retenção (t_{R1} e t_{R2}), o tempo morto (t_0) e a largura da base do pico (W_1 e W_2).

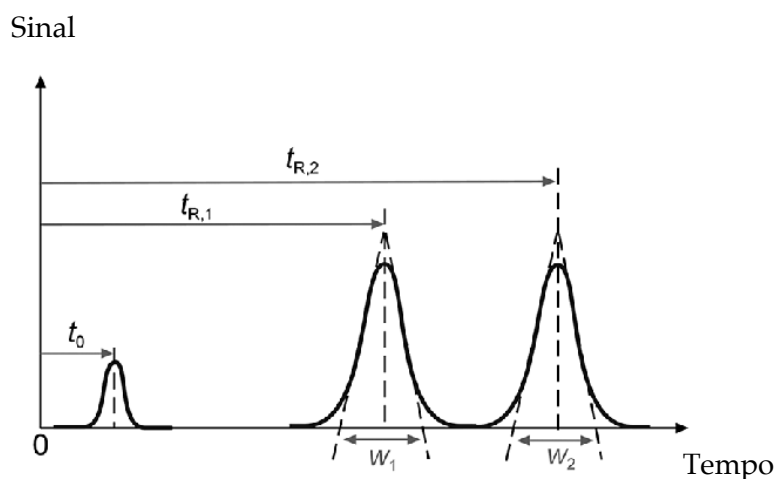


Figura 2.6 - Cromatograma tipo (adaptado de [58])

2.5.1 Tempo e Volume de Retenção

O Tempo de Retenção é definido como o tempo que decorre entre a injeção da amostra e o aparecimento da resposta correspondente ao máximo do pico do componente, podendo, por isso, ser entendido como um parâmetro de identificação.

O Volume de Retenção corresponde ao volume de fase móvel necessária para eluir o composto, sendo ele dependente, não só do tempo de retenção, como também do fluxo de fase móvel, F , em mL/min.

Estes três parâmetros podem ser relacionados através da equação 2.1. [17][53]

$$V_R = t_R \cdot F$$

Equação 2.1 – Equação de definição de Volume de Retenção

2.5.2 Tempo de Retenção Relativo

O Tempo de Retenção Relativo é dado pelo quociente entre o tempo de retenção de um analito e tempo de retenção de um composto padrão. [16][17]

2.5.3 Fator de Retenção

O Fator de Retenção, também denominado Fator de Capacidade, é descrito como uma medida de distribuição da amostra entre a fase móvel e a fase estacionária, e pode ser determinado pela equação 2.2. A fatores de retenção elevados estão associados tempos de retenção também elevados.

$$k' = \frac{\text{quantidade de substância na fase estacionária}}{\text{quantidade de substância na fase móvel}} = \frac{t_R - t_0}{t_R}$$

Equação 2.2 – Equação de definição de Fator de Retenção

em que t_R representa o tempo de retenção e t_0 o tempo morto, sendo que este diz respeito ao tempo decorrido entre a injeção e a detecção de um componente que não foi retido na fase estacionária, mas sim eluído. [17]

Sabe-se que, apesar deste parâmetro, geralmente, tomar valores compreendidos entre 1 e 10, as melhores resoluções equivalem fatores de capacidade entre 2 e 5. No entanto, valores superiores a 10 não são favoráveis, uma vez que o tempo de análise aumenta significativamente.

É relevante mencionar que, para modificar o fator de retenção de um pico, é necessário ajustar a força de eluição da fase móvel, o que pode conduzir a uma melhoria da resolução, conforme descrito na equação 2.3. Para exemplificar, na cromatografia de fase reversa, ou seja, em que a fase estacionária é apolar, a seleção de fases móveis com baixo teor de solvente orgânico, ou seja, mais hidrofílicas, promove uma maior interação entre os analitos e a coluna, aumentando, assim, o tempo de retenção. Por outro lado, o aumento da proporção de solvente orgânico na fase móvel eleva a força de eluição, reduzindo o fator de retenção dos compostos e, conseqüentemente, diminuindo o tempo que estes permanecem retidos na coluna. [60][61]

2.5.4 Resolução

A Resolução está relacionada com os picos obtidos no cromatograma. Este fator depende dos tempos de retenção (t_R) e das larguras da base dos dois picos (W), podendo, então, ser calculado através da equação 2.3.

$$R_S = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2}$$

Equação 2.3 – Equação de definição de Resolução

onde os índices 1 e 2 representam os dois picos em análise, sendo que o 1 equivale ao analito que elui em primeiro lugar. [54]

Para garantir que os diferentes componentes de uma amostra são separados adequadamente a resolução deve ser superior a 1,5. No entanto, segundo as normas da USP (*United States Pharmacopeia*) e FDA é recomendável um valor superior a 2.

A resolução (R_S) pode ser relacionada com a eficiência (primeiro termo), a seletividade (segundo termo) e a retenção (terceiro termo), de acordo com a equação 2.4.

$$R_S = \frac{1}{4} \sqrt{n} * \frac{\alpha - 1}{\alpha} * \frac{k'}{1 + k'}$$

Equação 2.4 – Relação entre resolução, eficiência, seletividade e retenção

em que n corresponde ao número de pratos teóricos, α ao fator de seletividade e k' ao fator de retenção. [54]

2.5.5 Seletividade ou Fator de Separação

O Fator de Separação revela a capacidade que o sistema cromatográfico tem para diferenciar os componentes de uma determinada amostra e pode ser determinado através do quociente entre os fatores de retenção de dois picos (k'_1 e k'_2), segundo a equação 2.5.

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{t_{r2} - t_0}{t_{r1} - t_0}$$

Equação 2.5 – Equação de definição de Seletividade

Quanto maior for o resultado obtido, melhor é a separação dos picos, sendo que valores de seletividade iguais a 1 indicam que os picos estão sobrepostos. Este parâmetro é dependente de diversos fatores, tais como o pH da fase móvel e a temperatura da coluna. [55]

2.5.6 Eficiência de Separação

A Eficiência da separação é medida em função da banda de dispersão da coluna. Os analitos que têm mais tendência a ficar retidos na fase estacionária têm um tempo de retenção superior, o que faz com que se obtenham picos com maior largura, quando comparados com os dos que eluem mais facilmente. Por vezes, esse alargamento do pico dificulta a integração do mesmo. [55]

Desta forma, a eficiência de separação (E) pode ser determinada através da equação 2.6.

$$E = 16 \left(\frac{t_r}{W} \right)^2$$

Equação 2.6 – Equação de definição de Eficiência de Separação

sendo que o tempo de retenção e a largura da base do pico têm ambas unidades de tempo.

2.5.7 Número de Pratos Teóricos (n)

Uma coluna cromatográfica pode ser comparada com uma coluna de destilação convencional, na medida em que se afirma que ambas são constituídas por pratos teóricos. Sabe-se que, quanto maior for o número de pratos teóricos, mais perto das condições de equilíbrio do

analito entre as fases móvel e estacionária, o que resulta numa melhor separação dos compostos.

O número de pratos teóricos de uma coluna cromatográfica (n) pode ser obtido por:

$$n = \frac{L}{h}$$

Equação 2.7 – Relação entre número de pratos teóricos, comprimento da coluna e altura dos pratos

onde L corresponde ao comprimento da coluna e h à altura média dos pratos.

Por outro lado, este é dado, também, por:

$$n = 16 \left(\frac{t_r}{w} \right)^2 = 5,54 \left(\frac{t_r}{w_{\frac{h}{2}}} \right)^2$$

Equação 2.8 – Relação entre número de pratos teóricos e tempo de retenção

com t_r equivalente ao tempo de retenção, w à largura do pico na linha de base e $w_{\frac{h}{2}}$ à largura do pico a meia altura, em unidades de tempo.

É relevante mencionar que o número de pratos teóricos depende, não só do analito, como também do fluxo e da viscosidade da fase móvel, da temperatura e do enchimento da coluna e, ainda, do seu comprimento e diâmetro interno. [17][56]

2.5.8 Simetria

O facto de os picos obtidos no cromatograma, por vezes, não apresentarem uma forma gaussiana, ou seja, serem assimétricos, deve-se ao arrastamento dos mesmos, que é provocado pela ocorrência de mais de um mecanismo de retenção do analito. Caso este arrastamento seja na parte de trás do pico, dá-se o nome de *tailing* (assimetria à direita). Se, por outro lado, o pico é mais largo na parte da frente, denomina-se *fronting* (assimetria à esquerda). São as diferenças na retenção do soluto ao longo da própria coluna que fazem com que os picos obtidos nos cromatograma sejam assimétricos. Fatores como o volume morto e o empacotamento da fase estacionária podem ser determinantes, no que diz respeito a esta assimetria. Idealmente, o pico diz-se simétrico se o coeficiente de partição do soluto (K_D), dado pela equação 2.9, for constante para uma gama de concentrações ao longo da coluna.

$$K_D = \frac{C_S}{C_M}$$

Equação 2.9 – Equação de definição do Coeficiente de Partição do Solute

com C_S igual à concentração de soluto na fase estacionária e C_M igual à concentração de soluto na fase móvel. [57]

2.5.9 Razão Sinal/Ruído (S/N)

A razão sinal/ruído permite avaliar a conformidade do sistema e pode ser calculada pela equação abaixo.

$$\frac{S}{N} = \frac{2 H}{h}$$

Equação 2.10 – Equação de definição de Razão Sinal/Ruído

em que S é o sinal, H representa a altura do pico, ou seja, a distância entre a linha de base e o máximo do pico, e h a amplitude do ruído, mais especificamente, a diferença entre os valores de maior e menor ruído, tal como ilustrado na figura 2.7. [16]

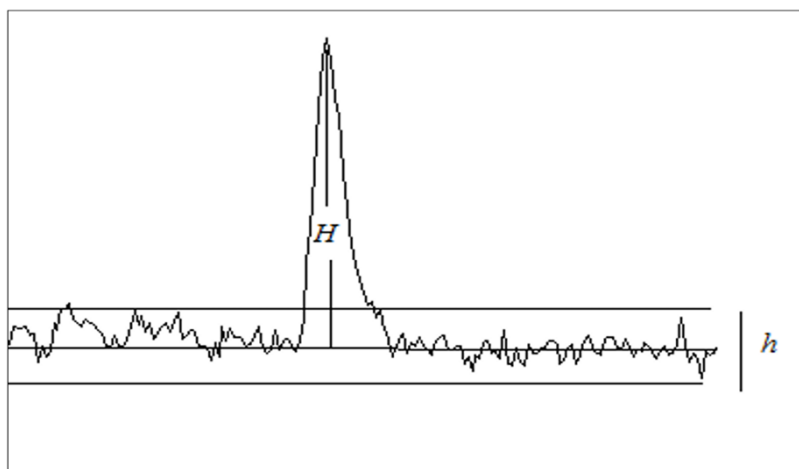


Figura 2.7 - Razão Sinal/Ruído de um pico tipo (adaptada de [64])

Um valor elevado de S/N indica uma boa distinção entre o analito e o ruído, refletindo uma maior fiabilidade na deteção.

2.6 Pré Validação de Métodos Analíticos

A Pré-Validação de métodos analíticos constitui um procedimento essencial no desenvolvimento dos mesmos, pois permite aferir a sua qualidade, garantindo a obtenção de resultados fidedignos e compatíveis com os requisitos para os quais foram concebidos.

Quando se pretende implementar um método, ou caso se faça alguma alteração no mesmo, é necessário realizar alguns estudos de validação antes de o colocar em prática.

Neste contexto, é fundamental definir alguns conceitos associados à validação de métodos analíticos, tais como exatidão, precisão e os limiares analíticos de deteção e quantificação, os quais são descritos de seguida. [66][67]

2.6.1 Gama de Trabalho

A gama de trabalho refere-se ao intervalo de concentrações do analito na amostra considerado para estudo. [58] A escolha da mesma está diretamente relacionada com o objetivo da análise. Para processos de produção, utilizam-se geralmente gamas de concentração elevadas, uma vez que se pretende quantificar os principais componentes em níveis percentuais. Já nas análises de validação de limpezas, assim como na quantificação de impurezas e contaminantes, recorre-se a gamas de trabalho baixas, dada a necessidade de deteção ou quantificação em níveis muito reduzidos (normalmente ppm ou ppb). Assim, a sensibilidade do método deve ser ajustada ao intervalo de concentrações esperado garantindo a fiabilidade dos resultados e o cumprimento dos requisitos regulamentares. [59]

2.6.2 Exatidão

A exatidão é um tipo de avaliação direta, que representa o grau de concordância entre os resultados obtidos e os valores aceites como convencionalmente verdadeiros. Esta pode ser avaliada com recurso a ensaios interlaboratoriais, testes de recuperação e, ainda, materiais de referência certificados, através do cálculo do erro relativo. Cabe ao laboratório e/ou autoridades competentes estipular o grau de exigência requerido para a análise. [54][58]

2.6.3 Precisão

A precisão relaciona-se com a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos, com a mesma amostra, ou idênticas, e em condições definidas. A avaliação da precisão pode ser feita com base na repetibilidade, na precisão intermédia e na reprodutibilidade. É importante salientar que esta pode variar conforme a gama de concentrações de estudo.

A repetibilidade avalia a concordância dos resultados obtidos para uma mesma amostra, ou idênticas, ao aplicar o mesmo método analítico sob condições idênticas e estáveis de análise, incluindo o mesmo analista, equipamento, laboratório, tipo de reagentes e em curtos intervalos de tempo.

A precisão intermédia ou variabilidade intralaboratorial refere-se à variabilidade dos resultados para uma mesma amostra ou idênticas, utilizando o mesmo método, apresentando diferenças no dia de análise, no equipamento e analista. O laboratório pode ou não ser o mesmo.

A reprodutibilidade avalia a capacidade do método em gerar resultados consistentes em condições de ensaio diferentes, mais concretamente, quando aplicado em diferentes laboratórios e equipamentos, por analistas distintos e/ou em épocas diferentes. [54][58]

2.6.4 Especificidade/Seletividade

A especificidade consiste na capacidade do método de identificar e distinguir inequivocamente o analito de interesse, quando este se encontra numa mistura complexa, sem interferência dos restantes componentes. De forma a avaliar esta possível interferência, podem ser realizados testes de recuperação, utilizando amostras com a mesma matriz, mas com concentrações do analito distintas. Estas devem ser escolhidas com base na gama de trabalho e em proporções bem conhecidas. É importante referir que o método é considerado seletivo/específico, quando se verificam taxas de recuperação próximas de 100%. [58][60]

2.6.5 Linearidade

A linearidade revela a capacidade que o método demonstra em obter resultados diretamente proporcionais à concentração de analito presente numa determinada amostra, numa certa gama de trabalho. Para avaliá-la, poder-se-á recorrer à análise de uma representação gráfica e do respetivo coeficiente de correlação. Por outro lado, esta pode também ser avaliada com base num modelo estatístico através da função de calibração linear e não linear e, ainda, dos respetivos desvios padrão residuais. [54][58]

2.6.6 Limites de Detecção e Quantificação

O limite de deteção define-se como a menor concentração do analito que pode ser detetada com uma certeza estatística razoável, em relação ao branco (amostra que contém a mesma matriz, mas sem o analito), mas não necessariamente quantificada como um valor exato. É relevante mencionar que um resultado inferior a este limite não significa a ausência do analito de interesse, mas sim que a concentração do componente em causa é inferior a um determinado valor.

O limite de quantificação corresponde à menor concentração do analito que pode ser determinada quantitativamente com uma certa precisão e exatidão. Após ser obtido, deve ser avaliada a exatidão e a precisão obtidas, ao analisar padrões de concentração muito próxima ou até mesmo igual a este limite.

Estes limiares analíticos devem ser atualizados, caso seja feita uma nova curva de calibração, ou haja alguma alteração no próprio equipamento, ou, ainda, nos reagentes utilizados durante o procedimento analítico. [54][58][60]

2.6.7 Robustez

A robustez está relacionada com a capacidade dos resultados analíticos permanecerem inalterados perante pequenas variações nos parâmetros experimentais. Um método é

considerado robusto quando se mostra praticamente insensível a variações que possam ocorrer aquando da sua execução, como alterações no pH e na composição da fase móvel. Quanto maior a sua robustez, maior é a confiança no método, em relação à sua precisão. Pode ser avaliada recorrendo ao teste de YOUNG, que permite, também, retirar conclusões acerca do tipo de influência (por excesso ou por defeito) de cada uma destas variações nos resultados finais obtidos. Percorre as seguintes etapas: seleção de um determinado número de fatores independentes entre si e suscetíveis de influenciarem os resultados; estabelecimento de valores nominal e alternativo (normalmente 1 e -1) para quantificação dos desvios dos fatores em relação aos valores prescritos; fixação de condições de realização da série de ensaios, como o procedimento de ensaio; e, por fim, a elaboração de um quadro como plano de ensaios.

A validação dos métodos analíticos é, assim, imprescindível para assegurar a confiabilidade dos dados obtidos, garantindo, assim, que estes sejam adequados às aplicações pretendidas. [54][58][59]

2.7 Métodos de Quantificação

Os principais métodos de calibração selecionados para análise quantitativa em química analítica são o método de padrão externo e o método de adição padrão.

2.7.1 Método de Padrão Externo

Este método é o mais utilizado, no que diz respeito à quantificação dos compostos de interesse e baseia-se na preparação de um ou mais padrões externos, sendo que cada um contém uma concentração conhecida de analito. Estes padrões são analisados separadamente das amostras, nas condições das mesmas e no mesmo equipamento. Seguidamente, traça-se a curva de calibração com as concentrações conhecidas e as respostas obtidas para cada uma. A concentração do analito é determinada comparando a sua resposta com a curva de calibração. A vantagem deste método reside no facto de ser um método simples e direto. Além disso, é adequado a uma ampla gama de analitos e equipamentos, o que o torna mais versátil em diversas aplicações analíticas. Por outro lado, é suscetível a erros provocados por efeitos matriz, que ocorrem quando a matriz da amostra, que pode conter impurezas e/ou substâncias interferentes, afeta a resposta do analito. Como a curva de calibração é construída com padrões em diferentes matrizes, a precisão deste método pode ser comprometida. Adicionalmente, este é mais propenso a variações instrumentais, como determinadas mudanças na sensibilidade do equipamento, que podem afetar a precisão dos resultados obtidos. [61][62][63]

2.7.2 Método de Adição Padrão

Neste método, preparam-se inicialmente soluções do analito de concentração conhecida. A cada uma dessas soluções é adicionada uma quantidade fixa e conhecida da amostra, sendo o volume final completado com solvente. Após a construção da curva de calibração, torna-se possível determinar a concentração do analito presente na amostra de interesse por

extrapolação da equação da reta para o ponto em que $y=0$. Existem duas formas distintas de execução: adição de padrão num único ponto, em que se prepara um padrão com a amostra e se regista o sinal do mesmo e, ainda, o da amostra diluída por si só, ou adição múltipla de padrão, onde se preparam vários padrões e se utiliza uma equação linear para calcular a concentração da amostra.

Em comparação com o método de padrão externo, o método de adição padrão é selecionado, quando existem interferências do efeito matriz no sinal do analito, uma vez que, ao adicionar a substância a analisar diretamente na amostra, são mitigadas discrepâncias provenientes de substâncias desconhecidas. Adicionalmente, não é preciso que o padrão e a amostra tenham o mesmo solvente ou matriz, ao contrário de outros métodos. Por outro lado, apresenta algumas limitações, pelo facto de ser um método mais demorado, visto que a adição de padrões requer múltiplas medições. Além disso, tem associado um maior consumo de reagentes, já que, para cada amostra a analisar, é preparada a correspondente solução padrão. [61][64][65]

2.8 Casos de Estudo

A avaliação do potencial de quantificação de um determinado composto por LC-MS exige uma análise detalhada da natureza dos compostos em questão, permitindo assim a seleção dos métodos analíticos mais apropriados e das condições operacionais adequadas. Este capítulo oferece, portanto, uma contextualização para cada um dos casos de estudo apresentados.

O estudo realizado surge de necessidades da empresa em analisar o potencial de utilização da espectroscopia de massa na quantificação de compostos de diferentes classes químicas e, conseqüentemente, com características químicas bastante distintas, através da técnica UHPLC-MS, que são usados nos processos de produção de diversos API's ou libertados nos mesmos. Os componentes analisados são o EDTA (ácido etilenodiaminotetrácetico), o ácido oxálico, o cloreto de *terc*-butilo e o DBAD (azodicarboxilato de dibenzilo).

2.8.1 EDTA (Ácido Etilenodiaminotetrácetico)

O EDTA ($C_{10}H_{16}N_2O_8$) é um agente quelante hexadentado, de massa molar 292,2 g/mol, amplamente utilizado na química analítica e industrial para a complexação de iões metálicos divalentes e trivalentes. A sua estrutura contém quatro grupos carboxílicos e dois grupos amina, permitindo-lhe formar complexos muito estáveis com catiões metálicos. [66][67]

O seu manuseio requer precauções devido à sua potencial toxicidade por inalação e à irritação que pode causar na pele e nos olhos. O seu armazenamento deve ser feito em local ventilado, seco e protegido de fontes de calor.

De seguida, encontra-se apresentada a sua estrutura química na figura 2.8. [66]

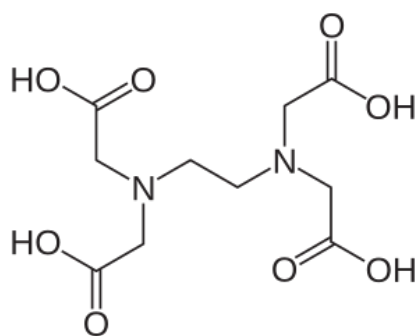


Figura 2.8 - Estrutura química do EDTA

Apresenta seis valores de pK_a (0, 1,5, 2,0, 2,7, 6,2 e 10,3), refletindo a sua natureza fortemente poliprótica e a presença de vários equilíbrios ácido-base. Essa multiplicidade de estados de protonação tem impacto direto no seu comportamento durante a cromatografia e ionização. [68]

O EDTA apresenta elevada polaridade e baixa hidrofobicidade, o que pode resultar, em análises por UHPLC, numa fraca retenção em colunas C18 convencionais e, por isso, numa eluição rápida, podendo ser arrastados contaminantes e impurezas. Este facto deve-se à elevada afinidade com a fase aquosa, sabendo-se que prejudica a separação. Assim, a separação pode ser otimizada ao recorrer a fases estacionárias modificadas. [69]

É importante mencionar que a presença de traços metálicos na amostra pode originar a formação de complexos EDTA-metal que podem levar à alteração dos iões observados em MS e, consequentemente, dos perfis cromatográficos obtidos.

A forma iónica observada no detetor de massa depende diretamente do pH da fase móvel, uma vez que este regula o grau de protonação do EDTA no momento da ionização. Em pH ácido (por exemplo, em fases móveis contendo 0,1% de ácido fórmico ou acético), o EDTA encontra-se predominantemente na sua forma protonada (figura 2.9 a)), sendo detetado em modo positivo (ESI^+) como $[M+H]^+$, com $m/z = 293$. Em contrapartida, em pH neutro ou ligeiramente básico, prevalecem formas aniónicas (figura 2.9 b)) como $[M-H]^-$, com $m/z = 291$, observadas em modo negativo (ESI^-).

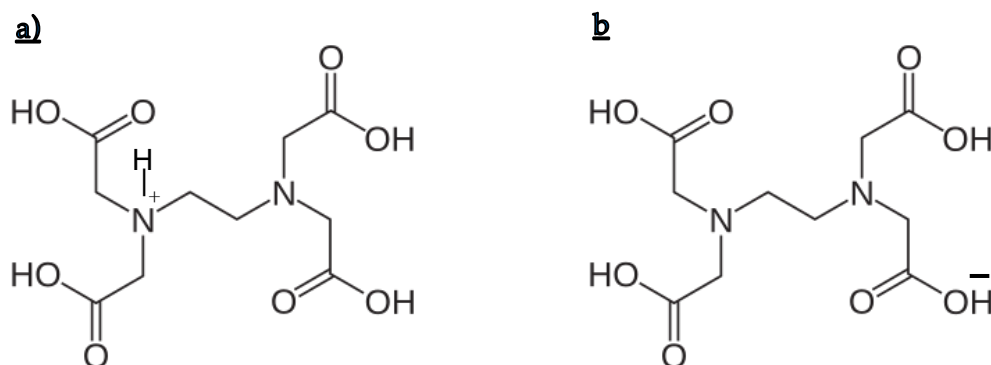


Figura 2.9 - Estrutura química do EDTA: a) protonado, b) desprotonado

Diversas técnicas analíticas têm sido propostas para a sua determinação numa ampla variedade de matrizes amostrais. Entre os métodos mais utilizados destacam-se a espectrofotometria, técnicas eletroquímicas (como amperometria e polarografia), a eletroforese capilar, bem como métodos cromatográficos, incluindo GC e HPLC. Apesar das limitações inerentes, como a sua baixa absorção na região UV-visível e baixa volatilidade, a cromatografia líquida acoplada a detetores UV-Vis ou MS permanece como a estratégia predominante. A ausência de grupos cromóforos na sua estrutura química dificulta a sua deteção direta por UV, o que justifica a adoção de procedimentos de derivatização prévia do EDTA dissódico, frequentemente, com solução de cloreto férrico. Assim, formam-se complexos que apresentam melhor absorção na região UV, facilitando a sua deteção. No caso da cromatografia gasosa, a determinação de EDTA exige sua conversão em ésteres metílicos, propílicos ou butílicos, processo necessário para conferir volatilidade ao composto. No entanto, essas etapas adicionais tornam o procedimento mais complexo e menos direto, o que limita sua aplicabilidade. [70][71]

2.8.2 Ácido Oxálico

O ácido oxálico ($C_2H_2O_4$) é um composto orgânico dicarboxílico, de massa molar 90,03 g/mol, presente naturalmente em diversos vegetais e também utilizado industrialmente como agente redutor, acidificante e complexante. Pode causar irritação severa na pele, olhos e vias respiratórias, bem como efeitos mais graves em caso de ingestão ou exposição prolongada. Este é incompatível com oxidantes fortes e alguns metais, podendo reagir violentamente, pelo que o seu armazenamento deve ser feito em recipientes bem fechados, em local fresco, seco e afastado de fontes de calor.

Apresenta dois valores de pKa de 1,2 e 4,2, o que lhe confere uma tendência para se desprotonar em soluções aquosas com pH acima de 2, conduzindo à formação de aniões. [72][73]

Na figura 2.10 encontra-se apresentada a sua estrutura química. [72]

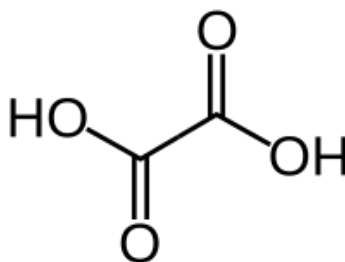


Figura 2.10 - Estrutura química do ácido oxálico

Na análise por UHPLC-MS, o ácido oxálico representa um desafio cromatográfico devido, principalmente, à sua elevada polaridade e à sua baixa massa molecular, quando comparado com outros ácidos orgânicos. Estas características fazem com que o composto tenha uma forte afinidade pela fase móvel aquosa e pouca interação com a fase estacionária hidrofóbica típica das colunas de fase reversa como C18 (cadeias octadecilsilano). Como resultado, o ácido oxálico tende a eluir rapidamente, o que pode levar a coeluição com contaminantes ou

componentes da matriz, além de poder comprometer a resolução e a reprodutibilidade da análise. [74][75]

Na ionização por *eletrospray* em modo negativo (ESI), o ácido oxálico é detetado, predominantemente, sob a forma desprotonada $[M-H]^-$ com uma razão massa/carga (m/z) de 89, o que corresponde à sua forma monoaniônica (figura 2.11). [76]

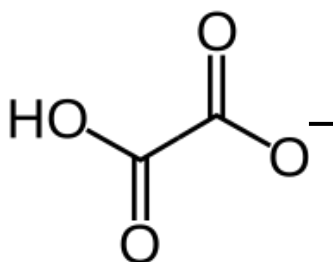


Figura 2.11 - Estrutura química do ácido oxálico desprotonado

A seleção de uma fase móvel com aditivos voláteis, como o ácido fórmico, é fundamental para garantir a compatibilidade com o detetor de massas e a formação estável da espécie iônica desejada.

Atualmente, os métodos analíticos utilizados para a sua determinação são a titulação, HPLC e a espectrofotometria na região do UV-Visível. Quando se recorre a esta última isoladamente, pode apresentar limitações relacionadas com a interferência de compostos cromóforos, que absorvem na mesma faixa de comprimento de onda do analito de interesse, comprometendo a seletividade da análise. Por outro lado, métodos mais avançados, como LC-MS/MS, têm demonstrado uma sensibilidade significativamente superior na detecção deste composto do que técnicas baseadas em LC-MS. Embora a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) apresente, teoricamente, uma sensibilidade elevada, a sua aplicabilidade para este componente é limitada, devido à necessidade de uma etapa prévia de derivatização, indispensável para tornar o composto mais volátil, o que, consequentemente, aumenta o tempo e a complexidade da preparação da amostra. Além disso, métodos eletroquímicos enfrentam limitações causadas por interferências de variações na condutividade da solução, entupimento de colunas e baixa resolução em sistemas baseados em separações capilares ou colunares. [77][12]

2.8.3 Cloreto de *Terc*-Butilo

O cloreto de *terc*-butilo ($(CH_3)_3CCl$) é um líquido incolor e inflamável, de massa molar 92,6 g/mol, que é produzido industrialmente como precursor de outros compostos orgânicos. Este organoclorado revela-se moderadamente solúvel em água, sendo propício a sofrer hidrólise para o álcool *terc*-butílico que lhe corresponde. Pode ser utilizado como agente alquilante, que introduz grupos *terc*-butilo em várias reações, como intermediário na síntese de agroquímicos e de compostos farmacêuticos e, ainda, como solvente em síntese orgânica. Este composto apresenta riscos ambientais e na saúde, o que justifica a aplicação de métodos analíticos sensíveis e seletivos para a sua identificação e quantificação. [78][79][80]

O seu manuseio requer cuidados rigorosos para evitar a inalação de vapores irritantes e potencialmente nocivos, pelo que, para além da utilização dos equipamentos de proteção individual (bata, óculos de laboratório e luvas), deve recorrer-se a uma capela de exaustão. Devido à sua volatilidade, é importante manter os recipientes bem fechados fora do uso, armazenando-os num local fresco, seco e afastado de fontes de ignição. Adicionalmente, deve ter-se especial atenção ao risco de formação de gases tóxicos em caso de aquecimento excessivo. A eliminação de resíduos deve seguir protocolos específicos para solventes clorados, evitando descargas em esgotos comuns. [81]

A sua estrutura química encontra-se representada na figura 2.12. [78]

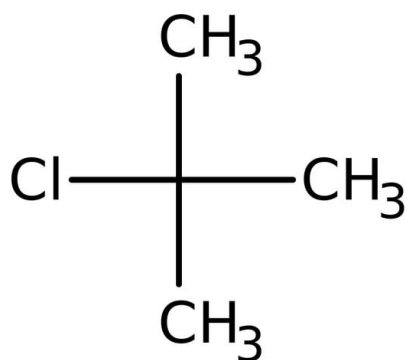


Figura 2.12 - Estrutura química do cloreto de *terc*-butilo

A sua quantificação por HPLC-MS tem particular interesse devido à necessidade de monitorizar com precisão compostos orgânicos voláteis e potencialmente tóxicos em matrizes complexas. Existem registos da determinação de cloreto de *terc*-butilo por cromatografia gasosa (GC), utilizando uma coluna do tipo DB-502 e azoto como gás de arraste. Este composto é igualmente compatível com acoplamento a espectrometria de massa (GC-MS), sendo que, neste caso, o gás de arraste mais comum é o hélio. [13]

No entanto, não foram encontradas na literatura referências à sua análise através do modo de ionização ESI, pelo que se considerou pertinente recorrer a esta técnica com o intuito de perceber se era ou não possível detetar este composto pela sua razão massa/carga.

2.8.4 DBAD (Azodicarboxilato de Dibenzilo)

O DBAD ($C_{16}H_{16}N_2O_4$) é um reagente sólido, de massa molar 298,3, utilizado em síntese orgânica que auxilia na produção de diversos compostos farmacêuticos e que permite a conversão de álcoois numa variedade de grupos funcionais. Este é solúvel em solventes orgânicos, como o diclorometano, o THF e o éter etílico. [82]

Este composto deve ser manuseado com extrema precaução devido à sua toxicidade e potencial instabilidade. Pode causar irritação cutânea, ocular e respiratória, pelo que, apesar da utilização de bata, luvas e óculos de laboratório, deve trabalhar-se em capela de exaustão para evitar a inalação de vapores ou partículas. Adicionalmente, é sensível à luz e ao calor, podendo decompor-se e originar subprodutos perigosos, logo deve ser armazenado em

recipientes hermeticamente fechados, em ambiente fresco (2-8 °C) e protegido da radiação luminosa. [83]

A sua estrutura química é apresentada na figura 2.13. [82]

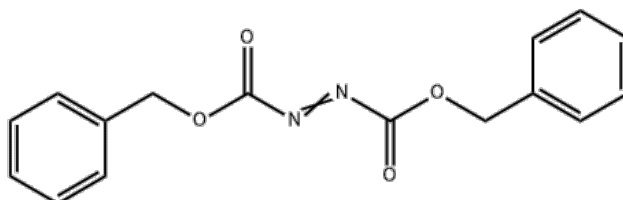


Figura 2.13 - Estrutura química do DBAD

Quando colocado em condições propícias (solução aquosa, por exemplo) prevê-se que este possa receber dois prótons nos átomos de azoto, passando, assim, a ligação dupla a simples, tal como apresentado na figura 2.14. Neste caso, o composto, com carga positiva 2, será detetado no modo positivo com uma razão m/z de 150.

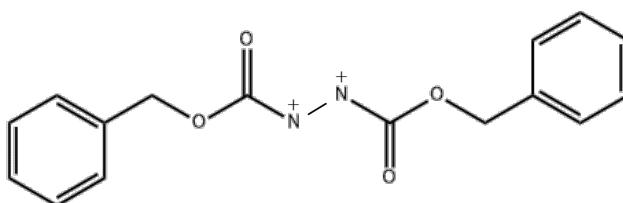


Figura 2.14 - Estrutura química do DBAD protonado

Na Cipan o método analítico utilizado para determinar a pureza cromatográfica em amostras de DBAD é HPLC acoplado com detetor UV. Nesse método, a fase móvel é composta por água, acetonitrilo (40:60 v/v) e ácido fosfórico (0,1 % v/v), sendo adicionada trietilamina para acertar o pH a 4. Recorre-se a uma coluna cromatográfica de dimensões 100 x 4,6 mm com enchimento C18 e tamanho de partícula 4 μm . [84]

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são descritos os equipamentos e reagentes utilizados, bem como os procedimentos adotados para a preparação das soluções, amostras e curvas de calibração. É, ainda, apresentado o método analítico desenvolvido para a quantificação de cada um dos compostos em estudo, por UHPLC-MS.

3.1 Equipamento

- UHPLC: Waters ACQUIRITY Arc QSM 2998, acoplado a detector UV-PDA e a detector QDA
- Coluna C18 (50 x 4,6 mm, 4,7 μm)
- Ultrassons
- Balança analítica: *Mettler Toledo* AG285, gama de trabalho 0 e 210 g;
- Medidor de pH: *Mettler Toledo, Seven Excellence*;
- Material de laboratório (*vials*, micropipetas, pipetas volumétricas e graduadas, provetas, balões volumétricos, copos, seringas, matrizes e filtros de seringa de celulose regenerada e tamanho de poro de 0,45 μm).

3.2 Reagentes

- Água purificada para cromatografia (Sistema MilliQ – Merck)
- Metanol: grau LC-MS (Carlo Erba, CAS: 67-56-1)
- Acetonitrilo: grau LC-MS (Carlo Erba, CAS: 75-05-8)
- Ácido Clorídrico 37% (Honeywell, CAS: 7647-01-0)
- Ácido Fórmico (VWR, CAS: 64-18-6)
- Ácido Oxálico Dihidratado (VWR, CAS: 6153-56-6)
- Ácido Etilenodiaminotetracético dissódico di-hidratado (Chem-lab, CAS: 6381-92-6)
- Acetato de Amônio (Carlo Erba, CAS: 631-61-8)
- Cloreto de *Terc*-Butilo (Fluka, CAS: 507-20-0)

3.3 Amostras

A quantificação dos compostos químicos selecionados como casos de estudo foi realizada nas seguintes amostras:

- Oxitetraciclina Dihidratada – Lote 303.45G002
- Oxitetraciclina Dihidratada – Lote 303.45G003

- Oxitetraciclina Dihidratada – Lote 303.45G004
- Oxitetraciclina Base – Lote 2000322
- 7-HT (CAS: 50-55-5)
- DBAD (CAS: 2449-05-0) – Lote 00619
- Padrão de Cloridrato de Minociclina 329.55K004 – Lote USP: R01680

3.4 Metodologia de Trabalho

Inicialmente, é essencial analisar o espectro de massas que se obtém ao injetar a amostra em concentrações aleatórias conhecidas, de modo a identificar a forma como o composto, que se pretende quantificar, tende a ionizar em determinadas soluções e a razão m/z pela qual se deve procurar nos ensaios seguintes com auxílio do modo de *scan SIR* (*Selected Ion Recording*). Em vez de registar todos os iões num determinado intervalo de massas e permitir uma visão global do espectro de massas, o SIR foca apenas os iões específicos de interesse, monitorizando-os continuamente ao longo da corrida cromatográfica. Assim, este é particularmente útil em análises complexas, constituindo uma estratégia de aquisição de dados que aumenta a sensibilidade e a seletividade da análise.

Relativamente ao desenvolvimento do método analítico, numa primeira fase estuda-se o comportamento do composto que se pretende analisar, de forma a perceber quais os parâmetros experimentais que propiciam e melhoram a sua ionização e deteção e, ainda, a estrutura dos picos obtidos no espectro. Entre estes parâmetros estão as composições da fase móvel e do diluente, a presença de coluna ou apenas o uso de pré-filtro, o volume de injeção e a filtração das amostras. Além disso, é necessário confirmar se existe uma relação linear entre a resposta do detetor e a concentração do analito sem que encontre no produto, por meio de preparação de amostras de diferentes concentrações por sucessivas diluições de uma solução inicial do analito.

Numa fase posterior, traça-se a curva de calibração pelo método de adição padrão, desta vez, para estudar o comportamento do analito no lote de produto respetivo e determinar o seu teor.

3.5 Preparação de Soluções e Amostras

Preparação de Solução de Acetato de Amónio 0,1 M:

- Pesar 7,70 g de acetato de amónio;
- Dissolver em água para cromatografia num balão volumétrico de 1 L e perfazer ao menisco;
- Agitar e levar ao banho de ultrassons durante 3 minutos.

Preparação de Soluções de Ácido Clorídrico (1,5 g/L e 3 g/L):

- Medir 2,5 mL de HCl 37% (no caso da solução 1,5 g/L) e 5 mL (no caso da solução de 3 g/L);
- Adicionar a água para cromatografia num balão volumétrico de 1 L e perfazer ao menisco;
- Agitar e levar ao banho de ultrassons durante 3 minutos.

Preparação de Fases Móveis:

EDTA (H₂O:ACN:MeOH + Ác. Fórmico, 70:15:15 + 0,3% v/v):

- Medir 700 mL de água para cromatografia, 150 mL de acetonitrilo e 150 mL de metanol;
- Verter para um frasco shott de 1 L e agitar;
- Adicionar 3 mL de ácido fórmico e agitar novamente;
- Levar ao banho de ultrassons durante 3 minutos.

Ácido Oxálico (H₂O:ACN:MeOH + Ác. Fórmico, 70:15:15 + 0,01% v/v):

- Medir 700 mL de água para cromatografia, 150 mL de acetonitrilo e 150 mL de metanol;
- Verter para um frasco shott de 1 L e agitar;
- Adicionar 100 µL de ácido fórmico e agitar;
- Levar ao banho de ultrassons durante 3 minutos.

Cloreto de Terc-Butilo (H₂O:ACN:MeOH, 70:15:15):

- Medir 700 mL de água para cromatografia, 150 mL de acetonitrilo e 150 mL de metanol;
- Verter para um frasco shott de 1 L e agitar;
- Levar ao banho de ultrassons durante 3 minutos.

DBAD (H₂O:ACN:MeOH + Ác. Fórmico, 70:15:15 + 0,04% v/v):

- Medir 700 mL de água para cromatografia, 150 mL de acetonitrilo e 150 mL de metanol;
- Verter para um frasco shott de 1 L e agitar;
- Adicionar 400 µL de ácido fórmico e agitar;
- Levar ao banho de ultrassons durante 3 minutos.

Preparação de Amostras e Curva de Calibração:

EDTA:

Solução-padrão de EDTA:

- Pesar 20 mg de EDTA dissódico dihidratado;
- Dissolver em HCl 3 g/L num balão volumétrico de 250 mL e aferir ao menisco;
- Agitar e levar a solução ao banho de ultrassons durante 3 minutos.

Solução de Oxitetraciclina Dihidratada:

- Pesar 200 mg de oxitetraciclina dihidratada;
- Dissolver em HCl 3 g/L num balão volumétrico de 200 mL e aferir ao menisco;
- Agitar e levar a solução ao banho de ultrassons durante 3 minutos.

Linearidade (área do pico em função da concentração de analito):

- Colocar um determinado volume de solução-mãe de EDTA num balão de 10 mL e perfazer o restante volume com HCl 3 g/L;
- Repetir este procedimento com volumes diferentes de solução de EDTA adicionada para traçar a linearidade.

Curva de Calibração para quantificação pelo método de adição padrão:

- Pipetar 9 mL de solução de oxitetraciclina dihidratada para balões de 10 mL (normalmente 6);
- Adicionar um determinado volume de solução-mãe de EDTA (*spiked*);
- Aferir ao menisco com diluente (HCl 3 g/L), agitar e levar ao banho de ultrassons durante 3 minutos.

Ácido Oxálico:

Solução-padrão de ácido oxálico:

- Pesar 20 mg de ácido oxálico dihidratado;
- Dissolver em H₂O num balão volumétrico de 250 mL e aferir ao menisco;
- Agitar e levar a solução de ácido oxálico ao banho de ultrassons durante 3 minutos.

Solução de oxitetraciclina dihidratada:

- Pesar 200 mg de oxitetraciclina dihidratada;
- Dissolver em 100 mL de HCl 1,5 g/L num balão volumétrico de 200 mL e aferir ao menisco;
- Agitar e levar ao banho de ultrassons durante 5 minutos;
- Adicionar os restantes 100 mL de acetato de amónio 0,1 M e perfazer ao menisco.
- Agitar e levar ao banho de ultrassons durante 3 minutos.

Linearidade (área do pico em função da concentração de analito):

- Colocar um determinado volume de solução-mãe de ácido oxálico num balão de 10 mL e perfazer o restante volume com HCl 1,5 g/L e acetato de amónio 0,1 M (50:50);
- Repetir este procedimento com volumes diferentes de solução de ácido oxálico adicionada para traçar a linearidade.

Curva de Calibração para quantificação pelo método de adição padrão:

- Pipetar 9 mL de solução de oxitetraciclina dihidratada para balões de 10 mL (normalmente 6);
- Adicionar um determinado volume de solução-mãe de ácido oxálico (*spiked*);
- Aferir ao menisco com diluente (HCl 1,5 g/L e acetato de amônio 0,1 M, 50:50), agitar e levar ao banho de ultrassons durante 3 minutos.

Cloreto de Terc-Butilo:

Foram preparadas diversas amostras para posterior análise do espectro de massas correspondente. Em balões de 10 mL, foram colocados possíveis diluentes (acetonitrilo, ácido fórmico) contaminados com determinados volumes (50 e 150 μ l) de cloreto de terc-butilo. Depois de preparadas, são agitadas e levadas ao banho de ultrassons durante 3 minutos.

DBAD:

Solução-padrão de DBAD:

- Pesar 20 mg de DBAD;
- Dissolver em ACN:H₂O (50:50) num balão volumétrico de 100 mL e aferir ao menisco;
- Agitar e levar a solução ao banho de ultrassons durante 3 minutos;

Soluções de 7-HT e cloridrato de minociclina:

- Pesar 100 mg de 7-HT e 100 mg de cloridrato de minociclina;
- Dissolver cada em ACN:H₂O (50:50) em balões volumétricos de 100 mL e aferir ao menisco;
- Agitar e levar as soluções de 7-HT e cloridrato de minociclina ao banho de ultrassons durante 3 minutos;

Linearidade (área do pico em função da concentração de analito):

- Colocar um determinado volume de solução-mãe de DBAD num balão de 10 mL e perfazer o restante volume com ACN: H₂O (50:50);
- Repetir este procedimento com volumes diferentes de solução de ácido oxálico adicionada para traçar a linearidade.

Curva de Calibração para quantificação pelo método de adição padrão:

- Pipetar 9 mL de solução de 7-HT e cloridrato de minociclina para balões de 10 mL (normalmente 6);
- Adicionar um determinado volume de solução-mãe de DBAD (*spiked*);
- Aferir ao menisco com diluente (ACN:H₂O, 50:50), agitar e levar ao banho de ultrassons durante cerca de 3 minutos.

3.6 Método de Adição Padrão

Em primeiro lugar, para cada um dos analitos em estudo, representa-se graficamente a área do pico, que resulta da sua integração, em função do volume adicionado de solução-padrão desse mesmo analito. Seguidamente, por extrapolação da reta obtida, determina-se o valor do zero da função, ou seja, o valor da abcissa para a qual a sua ordenada é zero. O módulo desse valor permite calcular a quantidade de analito nos 9 mL de solução de produto farmacêutico pipetada para os balões volumétricos de 10 mL e, conseqüentemente, nos 100 mL de solução de produto inicialmente preparada. Por fim, chega-se ao valor da % (m/m) do analito no produto. As equações utilizadas (3.1, 3.2, 3.3 e 3.4) para proceder a estes cálculos são as seguintes.

$$x_{(y=0)} = - \frac{\text{ordenada na origem}}{\text{declive}}$$

Equação 3.1 - Zero da função afim

$$m \text{ (9 mL solução de produto)} = \frac{m \text{ pesada analito}}{V \text{ solução do analito}} * |x_{(y=0)}|$$

Equação 3.2 - Massa de analito em 9 mL de solução

$$m \text{ (100 mL solução de produto)} = \frac{V \text{ solução produto}}{V \text{ balão amostra}} * m \text{ (9 mL solução de produto)}$$

Equação 3.3 - Massa de analito em 100 mL de solução

$$\% \text{ (m/m) (analito/produto)} = \frac{m \text{ analito nos 100 mL de solução de produto}}{m \text{ produto pesada inicialmente}}$$

Equação 3.4 - % (m/m) (analito/produto)

3.7 Pré-Validação

3.7.1 Exatidão

O cálculo do erro relativo (equação 3.5), que exprime a componente de erros sistemáticos, é uma das formas possíveis de avaliar a exatidão.

$$\text{Erro Relativo \%} = \frac{(x_{lab} - x_v)}{x_v} * 100$$

Equação 3.5 – Equação de definição do erro relativo em %

sendo x_{lab} o valor obtido experimentalmente ou a média dos mesmos e x_v o valor aceite como verdadeiro.

Apesar de ser responsabilidade do laboratório definir qual o seu grau de exigência em termos de exatidão do método em estudo, um valor de 5% pode ser satisfatório.

3.7.2 Gama de Trabalho

A gama de trabalho pode ser avaliada pelo teste de homogeneidade de variâncias, que tenciona averiguar se existem diferenças significativas entre elas nos limites da gama de trabalho. Segundo o Guia Relacre 13 [60], são recomendados dez pontos de calibração, não devendo nunca ser inferior a cinco e distribuindo-se de igual modo na gama de concentrações. O primeiro e o último padrão devem ser analisados em dez réplicas independentes.

Primeiramente, são determinadas as variâncias associadas aos pontos menos e mais concentrado através da equação 3.6.

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^N (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1}$$

Equação 3.6 – Equação para cálculo da Variância

sendo que

$$\bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^N y_{i,j}}{n_i}$$

Equação 3.7 – Equação para cálculo da média da resposta

para $i=1$ e para $i=N$.

onde i representa o número do padrão e j o número das repetições efetuadas para cada padrão.

Posteriormente, procede-se ao cálculo do valor teste PG a partir das equações abaixo. A equação 3.8 utiliza-se para $S_N^2 > S_1^2$ e a equação 3.9 quando $S_1^2 > S_N^2$.

$$PG = \frac{S_N^2}{S_1^2}$$

Equação 3.8 - Cálculo do valor teste PG com S_N^2 maior

$$PG = \frac{S_1^2}{S_N^2}$$

Equação 3.9 - Cálculo do valor teste PG com S_1^2 maior

Por fim, compara-se o valor de PG calculado com o valor tabelado da distribuição de Fisher para n-1 graus de liberdade.

- Se $PG \leq F$: As diferenças entre as variâncias não são significativas e a gama de trabalho está bem ajustada.
- Se $PG > F$: As diferenças entre as variâncias são significativas e a gama de trabalho deve ser reduzida até que a diferença entre as mesmas permita ter $PG \leq F$.

3.7.3 Limites de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção (LoD) e quantificação (LoQ) podem ser determinados recorrendo às equações 3.10 e 3.11.

$$LoD = \frac{3,3 \sigma}{a}$$

Equação 3.10 – Equação para cálculo do Limite de Detecção

$$LoQ = \frac{10 \sigma}{a}$$

Equação 3.11 – Equação para cálculo do Limite de Quantificação

onde σ representa o desvio padrão residual (erro padrão da regressão) e a o declive da curva de calibração.

3.7.4 Linearidade

Para averiguar a linearidade podem ser feitos alguns testes estatísticos, como a análise de resíduos, o teste de Mandel e o teste de Rikilt. Antes destes faz-se uma avaliação prévia a partir da representação gráfica (área em função da concentração ou volume adicionado) e a partir do coeficiente de correlação da reta de ajuste aos dados experimentais, que deve ser superior a 0,99. [58]

A análise de resíduos é feita a partir de uma nova representação gráfica, desta vez, da concentração em função dos resíduos sendo estes calculados através da equação 3.12. É confirmada a linearidade do método se os pontos se encontrarem aleatoriamente distribuídos, ou seja, sem nenhuma tendência definida. [58]

$$\text{Resíduos} = \bar{y} - y_{1,estimado} = \bar{y} - (ax + b)$$

Equação 3.12 - Equação para cálculo dos resíduos

onde $\bar{y}$ diz respeito à média dos valores de área obtidos para cada concentração analisada, $y_{1,estimado}$ o valor de área estimado resultante da equação da reta de ajuste aos pontos, a o declive da reta de calibração e b a ordenada na origem da mesma.

Relativamente à decisão de qual o ajuste que melhor se adequa aos dados experimentais, linear ou polinomial, o método da análise gráfica dos resíduos é subjetivo, o que faz com que deva ser complementado com o teste de Mandel. [58]

Para realizar este teste, deve proceder-se aos cálculos dos desvios padrão residuais $S_{y/x}$ e S_{y2} , sendo estes feitos a partir das equações 3.13 e 3.14.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (\bar{y} - y_{1,estimado})^2}{N - 2}}$$

Equação 3.13 – Equação para cálculo do Desvio padrão do ajuste linear

$$S_{y2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (\bar{y} - y_{2,estimado})^2}{N - 3}}$$

Equação 3.14 – Equação para cálculo do Desvio padrão do ajuste polinomial

em que $\bar{y}$ representa a média dos valores de área obtidos para cada concentração analisada, $y_{1,estimado}$ o valor estimado pela equação linear, $y_{2,estimado}$ o valor estimado pela equação de 2º grau (ajuste polinomial) e N o número de concentrações analisadas.

De seguida, procede-se ao cálculo da diferença entre variâncias.

$$DS^2 = (N - 2)S_{y/x}^2 - (N - 3)S_{y2}^2$$

Equação 3.15 – Equação para cálculo da diferença entre variâncias

onde N corresponde ao número de padrões da calibração.

Seguidamente, calcula-se o valor teste PG através da equação 3.16.

$$PG = \frac{DS^2}{S_{y2}^2}$$

Equação 3.16 - Cálculo do valor teste PG

Por fim, compara-se este valor teste com o valor tabelado da distribuição de Fisher.

- Se $PG \leq F$: A função de calibração é linear na gama de trabalho considerada.
- Se $PG > F$: A função de calibração é não linear na gama de trabalho considerada.

No caso de $PG > F$ deve ponderar-se reduzir a gama de trabalho.

Para avaliar a linearidade também se deve proceder à sua representação gráfica e análise do respetivo coeficiente de correlação. [58]

3.7.4.1 Repetibilidade

Para avaliar a repetibilidade, uma única amostra deve ser analisada várias vezes pelo mesmo analista, utilizando o mesmo equipamento e sob as mesmas condições experimentais, num curto intervalo de tempo. Os resultados obtidos devem ser utilizados para calcular a média, o desvio padrão e o desvio padrão relativo (RSD). Um valor baixo de RSD (< 2%) indica boa repetibilidade. Esta análise permite quantificar a variabilidade associada apenas ao processo analítico, sem interferência de fatores externos. [58]

Os parâmetros anteriormente mencionados podem ser retirados a partir da folha de cálculo do *Microsoft Excel* (“Analisar dados – Regressão”).

3.7.4.2 Precisão Intermédia

A precisão intermédia deve ser determinada ao realizar o ensaio da mesma amostra em diferentes dias, por diferentes analistas e, se possível, com diferentes lotes de reagentes, mas sempre dentro do mesmo laboratório. Devem ser realizadas análises em vários dias distintos. Os resultados obtidos devem ser tratados estatisticamente através do cálculo do RSD %, que deve ser inferior a 5% e da aplicação de ANOVA (um ou dois fatores), com o objetivo de avaliar a variabilidade inter-dia e inter-operador. Esta abordagem permite verificar a consistência do método ao longo do tempo e sob pequenas variações operacionais. [58]

3.7.4.3 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade deve ser avaliada através da repetição do ensaio por diferentes analistas, utilizando eventualmente diferentes equipamentos ou em diferentes laboratórios (caso aplicável), mantendo-se o mesmo procedimento analítico. Cada analista realiza as medições da mesma amostra, em condições controladas. Os dados podem ser comparados através de uma análise de variância (ANOVA de dois fatores), permitindo identificar se as diferenças observadas entre operadores ou equipamentos são estatisticamente significativas e qual a magnitude da variabilidade introduzida por esses fatores. [58]

APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Neste capítulo são apresentados e analisados os resultados obtidos no trabalho experimental, com o objetivo de avaliar o potencial de detecção e quantificação de determinados compostos com características físico-químicas distintas por UHPLC-MS. Para cada um dos compostos (EDTA, ácido oxálico, cloreto de *terc*-butilo e DBAD) são apresentados os resultados sobre o impacto da variação de parâmetros analíticos na detecção do sinal MS, de forma a desenvolver e otimizar um método quantitativo por UHPLC-MS. Quando aplicável, procede-se à pré-validação dos métodos obtidos, seguido da quantificação dos analitos nos produtos farmacêuticos de interesse.

4.1 EDTA

O método analítico utilizado para este composto foi, inicialmente, baseado no artigo *“Rapid qualitative and quantitative HPLC/MS analysis of ethylenediaminetetraacetic acid in a pharmaceutical product without prior sample preparation”* ([85]), com alguns parâmetros modificados, tendo em consideração as propriedades das amostras a analisar e em prol da melhoria da intensidade do sinal registado. Enquanto que a composição da fase utilizada no artigo é xxxxxx, optou-se por seleccionar a seguinte composição: H₂O:MeOH:ACN (70:15:15 v/v), + 0,3 % (v/v) ácido fórmico. A substituição do uso de HCl por H₂O garante uma maior compatibilidade com LC-MS, evitando a presença de cloretos não voláteis que podiam levar à formação de aductos. O aumento da percentagem de ácido fórmico pretende manter o pH ácido adequado à análise do EDTA. A oxitetraciclina apresenta baixa solubilidade em água, por isso, para que se dissolva uma maior quantidade de composto, utilizou-se HCl 3 g/L (aq.) como diluente. Não se aumentou mais o teor de HCl, já que a utilização do mesmo acima de determinadas concentrações em detetores MS pode ser prejudicial ao equipamento. Ainda assim, é possível atingir uma concentração de oxitetraciclina dihidratada de 2 g/L em HCl 3 g/L (aq.).

Este estudo já decorria quando o presente trabalho se iniciou.

Inicialmente, efetuou-se um varrimento de massas moleculares com o intuito de procurar a razão m/z de 293, prevista como razão de interesse, o que comprovaria a presença de EDTA nas amostras de oxitetraciclina a analisar (figura 4.1).

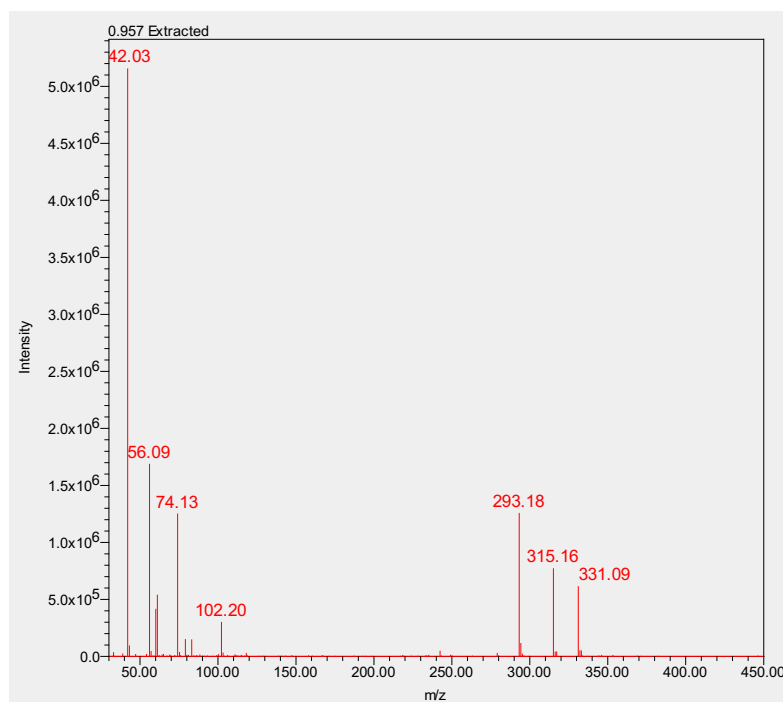


Figura 4.1 - Varrimento de massas da amostra a analisar

Na análise realizada, foram detetados vários iões na amostra, nomeadamente com m/z 293, 315 e 331. A seleção do ião com m/z 293 como alvo analítico justifica-se pelo facto de os iões com m/z 315 e 331 serem potenciais aductos de sódio ou potássio ($[M+Na]^+$, $[M+K]^+$), cuja formação é fortemente influenciada pela composição da matriz e pela presença de sais no sistema. Deste modo, o ião de m/z 293, presumivelmente correspondente ao protão adicionado ($[M+H]^+$), constitui o marcador mais adequado para a identificação e quantificação do composto de interesse, assegurando maior fiabilidade analítica.

4.1.1 Impacto das condições cromatográficas

Esta subsecção pretende explicar de que maneira determinados fatores testados, tais como a presença de coluna, a filtração de amostras e a ordem de injeção das mesmas, impactam os resultados obtidos.

4.1.1.1 Presença de Coluna

A presença de coluna cromatográfica é determinante para garantir a separação eficaz das substâncias que constituem o produto, sendo frequentemente utilizadas para separação em UV-Vis, obtendo picos bem definidos e reduzindo as interferências. De forma a perceber se o analito é ou não retido na coluna, efetuam-se análises com e sem coluna instalada.

Os espectros de massas contínuos apresentados nas figuras 4.2 e 4.3 mostram o sinal obtido para soluções de diferentes concentrações de EDTA, com e sem coluna cromatográfica. O primeiro diz respeito à injeção direta + pré-filtro e o segundo à presença da coluna *Waters Cortecs* de enchimento C18. Em ambos os casos o volume de injeção é 10 μL e a composição da fase móvel é a seguinte: $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}:\text{MeOH}$ (70:15:15) + 0,3% ácido fórmico.

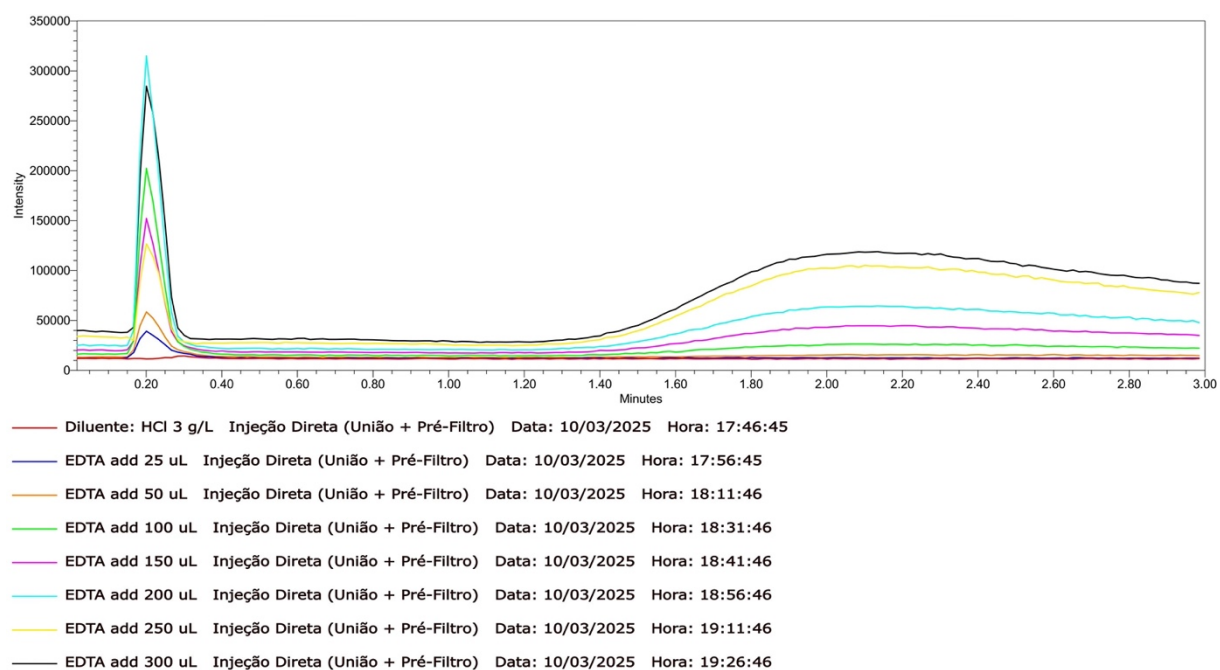


Figura 4.3 – Cromatograma – Soluções de EDTA de diferentes concentrações - Injeção Direta

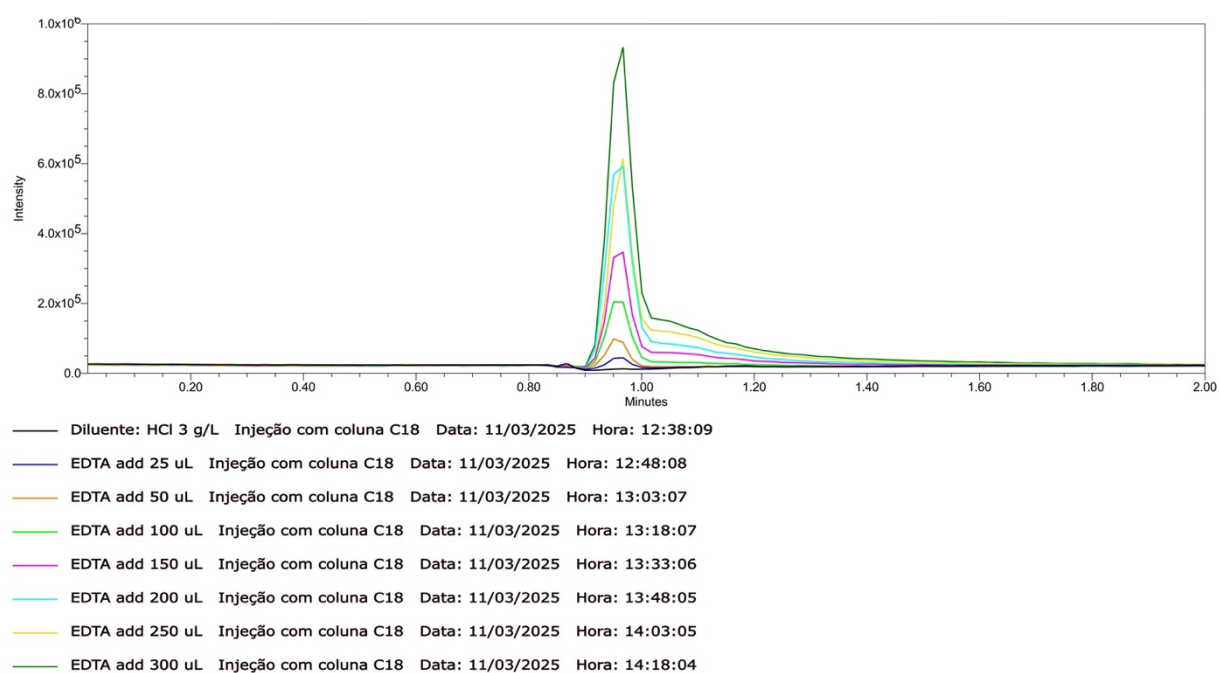


Figura 4.2 - Cromatograma – Soluções de EDTA de diferentes concentrações – Análise com coluna de enchimento C18

A comparação entre os cromatogramas obtidos com e sem a utilização da coluna cromatográfica evidencia de forma clara o papel fundamental da fase estacionária na separação e definição do sinal do EDTA.

No caso da ausência de coluna, ou seja, da injeção direta + pré-filtro, observa-se um pico inicial muito precoce seguido de uma elevação prolongada, sobretudo nas amostras mais concentradas. Verifica-se, ainda, que não é possível estabelecer uma relação linear entre a intensidade do pico e a concentração de EDTA na amostra. Este comportamento sugere uma possível interação não específica, por parte do analito, com superfícies metálicas do sistema, como a própria união, ou até válvulas, já que este apresenta uma elevada afinidade por íons metálicos, podendo, assim, formar complexos metálicos estáveis, o que pode resultar em eluições arrastadas, comprometendo a forma do pico.

Por outro lado, na presença de coluna, o EDTA apresenta um pico bem definido com um tempo de retenção superior de, aproximadamente, 0,95 min, o que indica uma interação efetiva com a fase estacionária. Apesar de, ainda assim, se verificar um arrastamento do sinal, mais visível para concentrações superiores, e haver um conflito entre o sinal das amostras correspondentes a 200 e 250 μL adicionados de solução-mãe de EDTA, é possível afirmar que a presença de coluna é essencial na análise deste composto, pelo que os próximos ensaios vão ser realizados nessa condição.

4.1.1.2 Filtração de Amostras

No caso específico dos filtros de seringa, estes consistem num invólucro de polipropileno com uma membrana filtrante na sua extremidade. Quando é aplicada pressão através da seringa, o líquido é forçado a passar pela membrana, que permite a remoção de impurezas e contaminantes, garantindo a integridade da amostra antes da análise. [86]

No entanto, caso seja selecionado um filtro incompatível com a amostra em questão, pode resultar em contaminação, membranas entupidas ou, ainda, resultados imprecisos. O tamanho dos poros, a própria membrana e a capacidade do filtro são fatores a ter em consideração perante esta escolha. [87] Neste caso, a sua matriz é de celulose regenerada.

Na figura 4.4 encontra-se apresentado o espectro contínuo obtido, que permite comparar as intensidades dos picos registados, no caso das amostras filtradas e no das não filtradas. Este ensaio foi realizado com coluna cortecs de enchimento C18. O volume de injeção é 10 μL e a composição da fase móvel é a seguinte: $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}:\text{MeOH}$ (70:15:15) + 0,3% ácido fórmico.

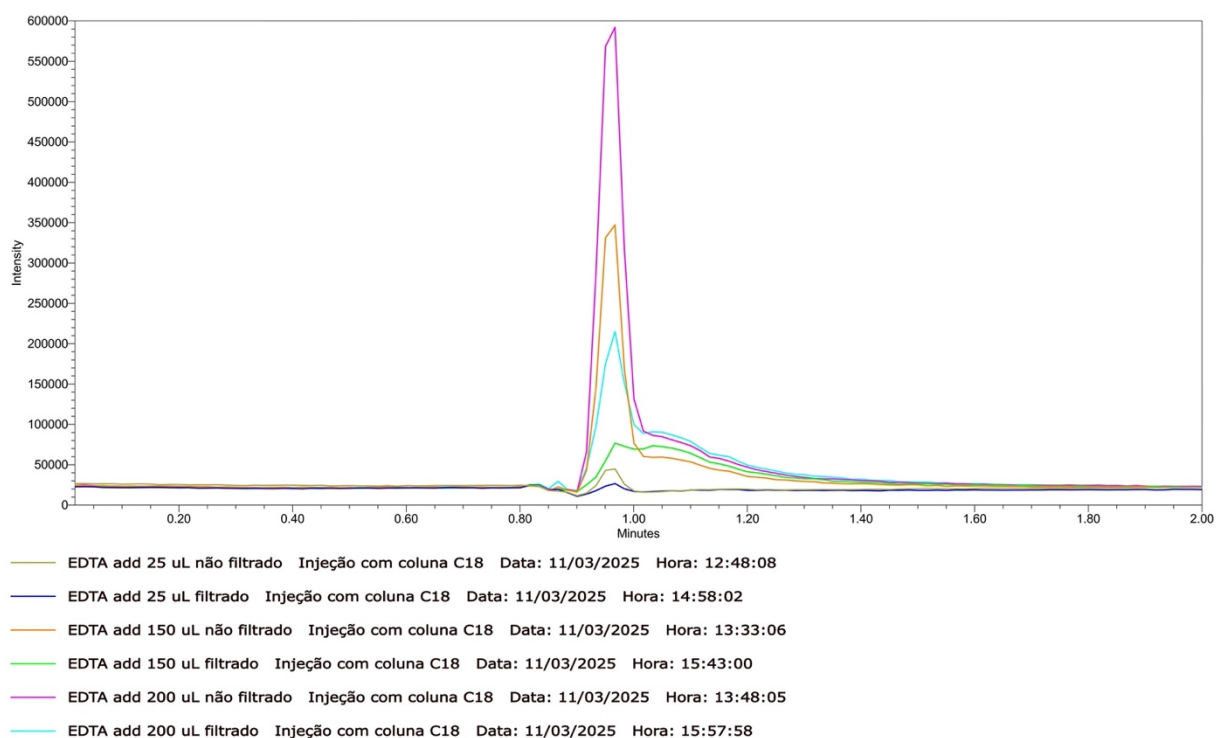


Figura 4.4 - Cromatograma - EDTA - Filtração de amostras

Tal como se pode constatar pela figura acima, as intensidades dos picos diminuem, quando as amostras são filtradas, o que leva a crer que a membrana do filtro de seringa utilizado está a reter parte do analito. Posto isto, nos próximos ensaios não é recomendável a filtração de amostras.

4.1.1.3 Ordem de Injeção das Amostras

Recomenda-se que a ordem de injeção das amostras seja da mais diluída para a mais concentrada para evitar situações de contaminação em cadeia entre as injeções das várias soluções. Teoricamente, a ordem de injeção (em crescente ou decrescente de concentração ou, ainda, aleatoriamente) não deveria afetar significativamente a linearidade dos resultados, desde que o equipamento esteja devidamente qualificado e com o sistema estabilizado. Contudo, na prática, alguns fatores podem influenciar essa linearidade, ocasionando variações nos resultados obtidos.

Na figura 4.5, observa-se que, quando as amostras são injetadas em ordem crescente de concentração, a relação entre a área do pico e o volume adicionado segue uma tendência polinomial. No entanto, quando as amostras são injetadas em ordem aleatória de concentração, a relação entre a área do pico e o volume adicionado tende a aproximar-se mais da linearidade, tal como mostra a figura 4.6.

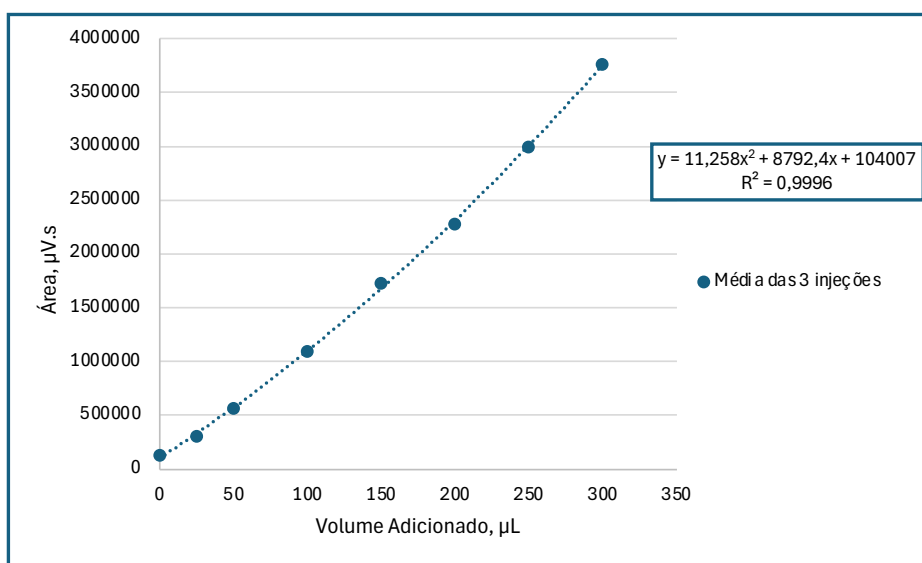


Figura 4.5 - Área Vs. Vol. ad. EDTA - Injeção em ordem crescente de concentração

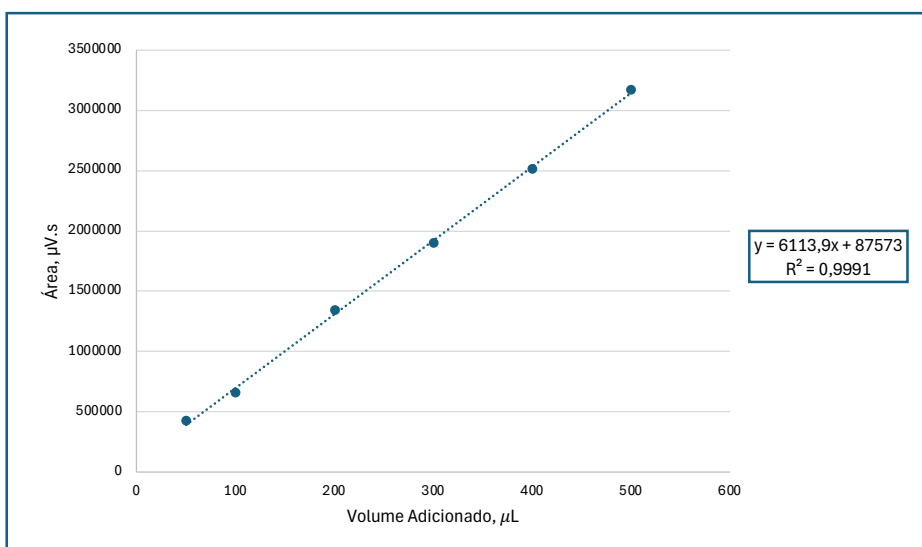


Figura 4.6 - Área Vs. Vol. ad. EDTA - Injeção em ordem aleatória

Ainda não é possível determinar se esse comportamento é inerente ao composto analisado ou se resulta de uma resposta sistemática do próprio equipamento. Em técnicas acopladas como o HPLC-MS, vários fatores podem contribuir para relações não lineares, incluindo a adsorção diferencial do analito nos componentes do sistema (particularmente na coluna), efeitos de contaminação em cadeia (*carryover*) entre injeções, saturação do detetor em concentrações elevadas, ou ainda efeitos de matriz que afetam a eficiência de ionização na fonte ESI. Por outro lado, coloca-se ainda a hipótese de que a adição de diferentes volumes de solução de EDTA (*spiking*) possa alterar as propriedades químicas das amostras contaminadas, influenciando assim a sua resposta analítica. Os restantes casos de estudo permitirão uma análise mais aprofundada desse fenómeno, ajudando a distinguir entre efeitos instrumentais e propriedades do analito.

4.1.1.4 Efeito Matriz

O efeito matriz refere-se às interferências causadas pelos componentes da matriz da amostra em solução, os quais podem influenciar negativamente a resposta do detetor, o tempo de retenção ou a eficiência da separação cromatográfica. Estas interferências podem resultar na supressão ou intensificação do sinal, comprometendo a precisão e a exatidão dos resultados analíticos. Este fenómeno é particularmente relevante em matrizes complexas. Para minimizar o efeito matriz, é comum adicionar padrões internos, aplicar técnicas de purificação ou utilizar sistemas de detecção mais seletivos (HPLC-MS/MS). [88][89]

A partir da mesma solução-mãe de EDTA foram preparadas várias soluções-alvo, de modo a traçar duas curvas de calibração em diferentes matrizes: a laranja, correspondente ao EDTA adicionado a uma solução de HCl 3 g/L (aq.); e a azul, correspondente ao EDTA adicionado a soluções de oxitetraciclina dihidratada em HCl 3 g/L (aq.), tal como mostra a figura 4.7.

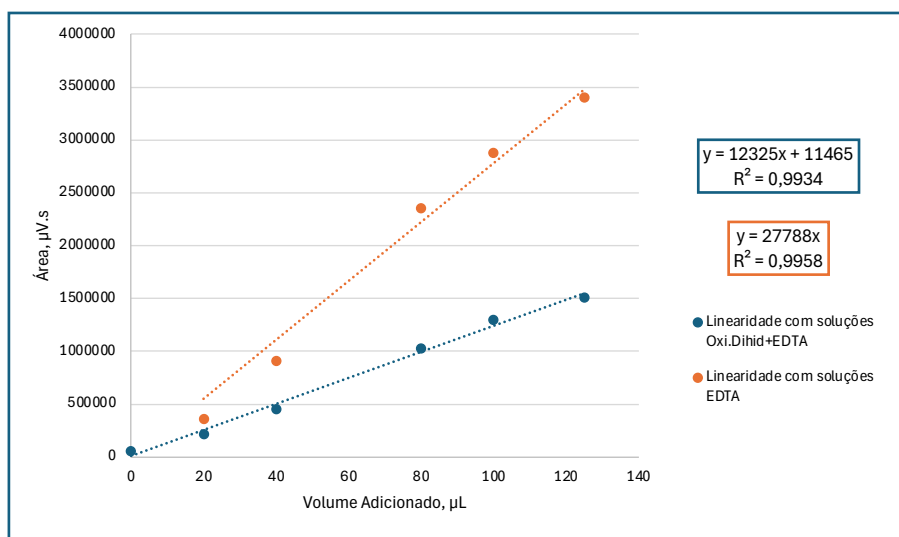


Figura 4.7 - Representação gráfica do efeito matriz - EDTA

Como se pode observar, as retas de calibração obtidas não são paralelas entre si, o que indica a presença de efeito matriz. Esta divergência sugere que a resposta analítica é influenciada por componentes da matriz da amostra, comprometendo a exatidão da quantificação pelo método de padrão externo. Assim, uma vez que se pretende analisar o analito no produto oxitetraciclina dihidratada, torna-se necessário recorrer ao método de adição padrão, que permite compensar as interferências da matriz e garantir uma quantificação mais precisa do EDTA no API em causa.

4.1.2 Pré-Validação do Método

Com base no estudo do impacto das alterações dos parâmetros analíticos descritos anteriormente, definiu-se o método analítico para este composto, apresentado na tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Condições cromatográficas do método analítico do EDTA

Parâmetros	Condições
Coluna	C18 (50 x 4,6 mm, 4,7 μ m)
Volume de Injeção	10 μ L
Fluxo	0,5 mL/min
Modo de Eluição	Isocrático
Tempo de Corrida	3 min
Temperatura da Coluna	25 °C
Temperatura do Injetor Automático	15 °C
Fase Móvel	H ₂ O:ACN:MeOH + Ác. Fórmico, 70:15:15 + 0,3% (v/v)
Diluyente	HCl (3 g/L)
Voltagem do Cone	CV = 15 V
MS Scan	30-300 Da
Tipo de Scan	SIR 293 Da
ESI	Positivo

Para comprovar o potencial do método para análise quantitativa, procedeu-se a uma pré-validação, ou seja, executaram-se alguns dos testes exigidos num procedimento de validação analítica.

4.1.2.1 Especificidade/Seletividade

Com o objetivo de averiguar a seletividade do método, recorre-se ao varrimento de massas, na ionização positiva, de uma amostra de oxitetraciclina que contém EDTA (figura 4.8 a)) e de uma amostra de diluyente (figura 4.8 b)).

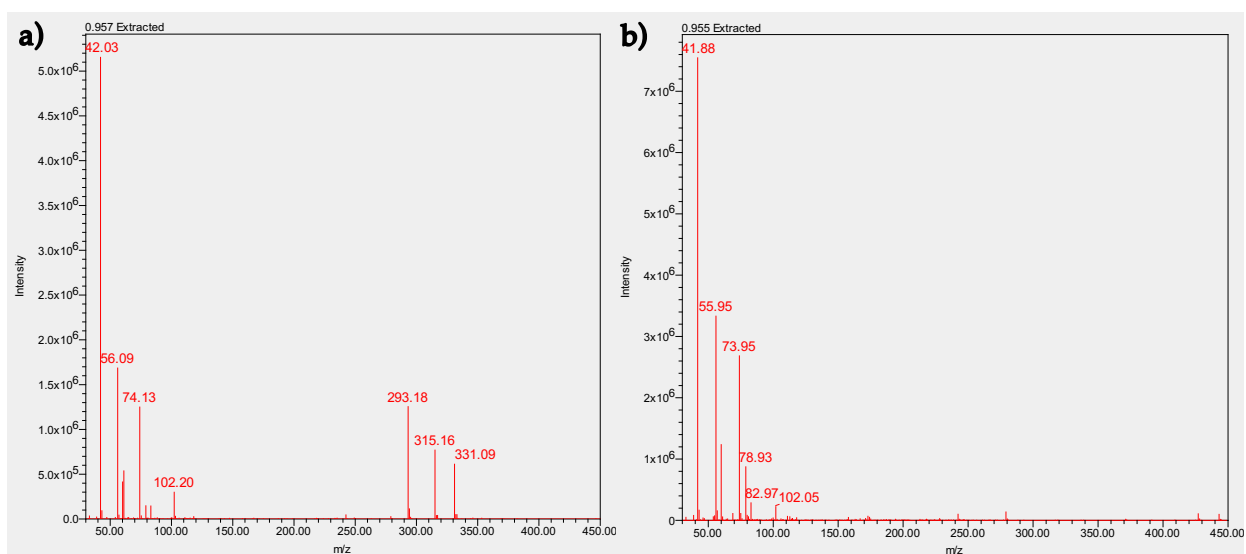


Figura 4.8 – Comparação entre o varrimento de massas de uma amostra contaminada com EDTA a) e do diluente usado na análise b)

A razão m/z 293 é considerada específica, porque corresponde a um ião característico do analito, tal como já foi explicado com maior detalhe anteriormente. Comprova-se que o método consegue detetar o EDTA, ainda que na presença de outros componentes. A ausência de sinal em 293 no diluente (branco) e a sua presença apenas na amostra confirmam que a deteção nessa razão m/z é exclusiva do analito, garantindo a seletividade do método.

4.1.2.2 Linearidade

Para avaliar a linearidade do método, foram preparadas oito soluções-alvo a partir de uma mesma solução-mãe, sendo que cada uma delas foi injetada três vezes. Recorrendo à tabela 4.2, construiu-se o gráfico da área de integração do pico em função do volume adicionado, que é apresentado na figura 4.9, bem como o respetivo ajuste linear. No apêndice A.1 estão presentes as tabelas de apoio a esta subsecção utilizadas para traçar a linearidade.

Tabela 4.2 - Linearidade – EDTA na oxitetraciclina dihidratada (lote G002)

Concentração do adicionado, ppm	0	0,12	0,24	0,49	0,73	0,97	1,21	1,46
Volume Adicionado, μL	0	25	50	100	150	200	250	300
Fator de Diluição	0	100 000	50 000	25 000	16 667	12 500	10 000	8 333
Média das áreas, $\mu V \cdot s$	138 124	284 024	488 655	972 818	1 466 305	2 092 389	2 409 387	3 051 913

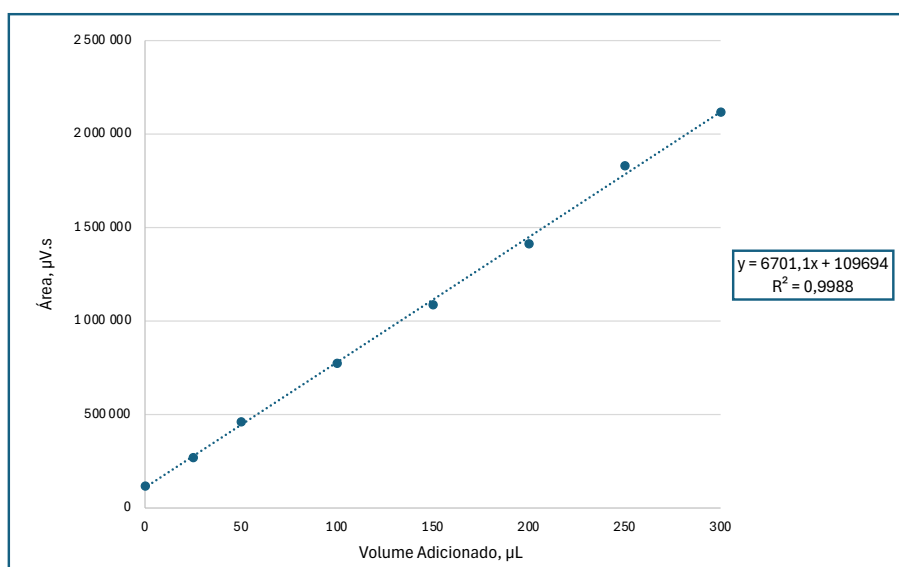


Figura 4.9 - Linearidade - EDTA na oxitetraciclina dihidratada (lote G002)

Observando a figura 4.9, verifica-se que existe uma relação linear entre a área dos picos e o volume adicionado de solução de EDTA, que é comprovada pelo valor do coeficiente de correlação obtido, superior ao critério de aceitação de 0,99. Logo, o método mostra ter potencial para gerar valores de áreas de integração dos picos diretamente proporcionais à concentração de analito ou volume adicionado do mesmo. Para confirmação da relação linear, recorreu-se a outros testes estatísticos, nomeadamente à análise de resíduos e ao teste de Mandel.

Análise de Resíduos:

Os resíduos, calculados pela equação 3.12 (capítulo 3), encontram-se representados graficamente em função da concentração na figura 4.10. No apêndice A.2 encontram-se os cálculos feitos mais detalhadamente.

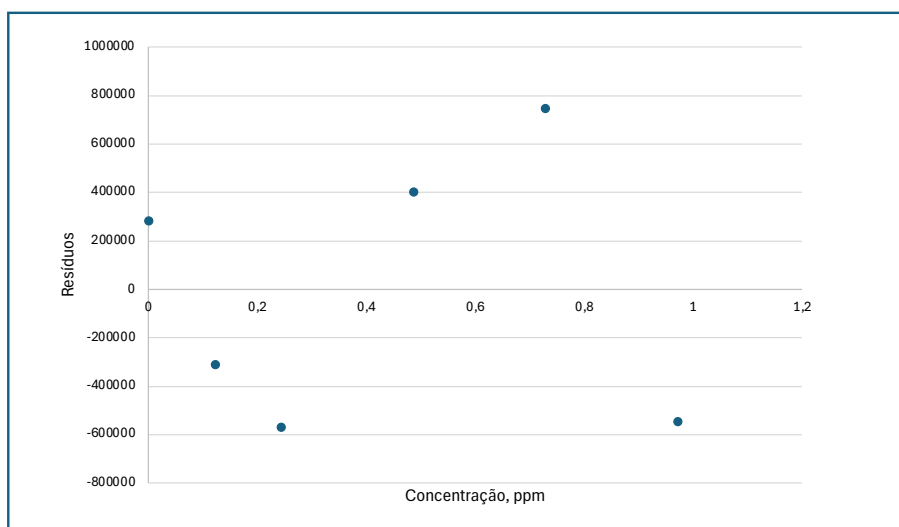


Figura 4.10 - Análise de Resíduos – EDTA na oxitetraciclina

A distribuição aleatória dos pontos na figura 4.10 confirma a linearidade do método. Ainda assim, uma análise gráfica dos resíduos pode ser subjetiva na tomada de decisão em relação ao melhor ajuste aos dados, pelo que se recorre ao teste de Mandel.

Teste de Mandel:

Para realizar o teste de Mandel, é necessário proceder à determinação de alguns parâmetros: o desvio padrão do ajuste linear ($S_{y/x}$), o desvio padrão do ajuste polinomial (S_{y2}), a diferença entre variâncias (DS^2), o valor de teste PG e ao valor de F tabelado resultante da distribuição de Fisher. Para calcular estes parâmetros foram utilizadas as equações 3.13 a 3.16 que constam no capítulo 3. Os resultados estão presentes na tabela 4.3. No apêndice A.2 encontram-se os cálculos feitos mais detalhadamente.

Tabela 4.3 - Parâmetros do Teste de Mandel – EDTA na oxitetraciclina

Parâmetro	Resultado
$S_{y/x}$	27 482
S_{y2}	27 757
DS^2	$6,80 \times 10^8$
PG	0,882
F (5%, 1, 5)	6,61

Pela análise da tabela anterior, como $PG \leq F$, pode afirmar-se que existe linearidade na gama de concentrações considerada.

4.1.2.3 Precisão

Tal como já foi referido, existem três níveis de precisão que devem ser avaliados: a repetibilidade, a precisão intermédia e a reprodutibilidade.

Repetibilidade

De acordo com as normas ICH, o estudo da repetibilidade de um método analítico deve envolver a preparação de três amostras de concentrações distintas (alta, média e baixa) e a respetiva injeção três vezes consecutivas de cada uma delas, avaliando a sua variabilidade.

Na tabela 4.4 encontram-se as áreas obtidas para cada uma das injeções, bem como o valor de desvio padrão relativo (RSD%) correspondente.

Tabela 4.4 - Repetibilidade do método do EDTA

Concentração do contaminado	Área ($\mu\text{V.s}$) Injeção 1	Área ($\mu\text{V.s}$) Injeção 2	Área ($\mu\text{V.s}$) Injeção 3	RSD %
Baixa (0,73 ppm)	1 094 398	1 083 105	1 088 196	0,73
Média (0,97 ppm)	1 404 513	1 423 979	1 411 128	0,97
Alta (1,21 ppm)	1 843 481	1 819 014	1 811 814	0,94

Como os RSD % obtidos para as diferentes concentrações são inferiores ao limite definido como limiar da repetibilidade (2%), confirma-se a repetibilidade do método. [59]

Precisão Intermédia

Em dias distintos foram preparadas várias soluções de concentrações conhecidas para averiguar se se verifica precisão intermédia, tal como se apresenta na tabela 4.5.

Tabela 4.5 - Precisão Intermédia do método do EDTA

Concentração do contaminado	Dias	Área ($\mu\text{V.s}$) Média das Injeções	RSD %
0,60 ppm	Dia 1	733 425	4,04
	Dia 2	776 599	
1,11 ppm	Dia 1	1 488 881	3,64
	Dia 2	1 414 246	
1,73 ppm	Dia 1	2 252 935	4,40
	Dia 2	2 116 996	

Como se pode constatar, os valores de RSD% (3,64–4,40%) indicam boa reprodutibilidade, dentro dos limites aceitáveis, evidenciando a robustez do método frente a variações operacionais (RSD < 5%). [59]

Reprodutibilidade

Como o estudo da reprodutibilidade engloba uma variabilidade dos resultados interlaboratorial e interanalista, este parâmetro não foi averiguado.

4.1.2.4 Limites de Detecção e Quantificação

A determinação dos limites de detecção (LoD) e de quantificação (LoQ) pode ser realizada com base na equação da reta de calibração, utilizando o declive da reta e o erro padrão da regressão, tal como indicam as equações 3.10 e 3.11 presentes na subsecção 3.7.3. A aplicação deste método pressupõe a linearidade da resposta analítica no intervalo em estudo e permite uma estimativa estatisticamente fundamentada da sensibilidade do método.

Na tabela 4.6 são apresentados os resultados obtidos de LoD e LoQ para cada um dos lotes de oxitetraciclina dihidratada estudados (G002, G003 e G004).

Tabela 4.6 - Limites de Detecção e Quantificação - EDTA

Lotes	Oxitetraciclina Dihidratada G002	Oxitetraciclina Dihidratada G003	Oxitetraciclina Dihidratada G004
Erro padrão da regressão	29 799	75 810	62 377
Declive	1 378 951	2 016 959	1 870 041
LoD	0,07 ppm	0,12 ppm	0,11 ppm
LoQ	0,22 ppm	0,38 ppm	0,33 ppm

Como se pode observar, os valores obtidos para o LoD e o LoQ que variaram entre 0,07–0,12 ppm e entre 0,22–0,38 ppm, respetivamente. Demonstra-se boa sensibilidade do método analítico para o EDTA, com desempenho consistente entre os diferentes lotes.

No artigo “*Development and validation of a method for the determination of EDTA in non-alcoholic drinks by HPLC*” ([90]) recorreu-se à técnica de HPLC com deteção por UV-Vis para detetar EDTA indiretamente ao formar complexos metálicos, já que este, na sua forma livre, não apresenta grupos cromóforos. Foram reportados valores de LoD de 0,6 ppm e de LoQ de 2 ppm, que refletem a sensibilidade típica da deteção UV, inferior à de outras técnicas. Sendo a técnica utilizada neste trabalho UHPLC-MS, normalmente de maior sensibilidade, é de esperar que se obtenham valores de LoD e LoQ inferiores, o que se verificou.

4.1.3 Quantificação pelo Método de Adição Padrão

O último objetivo a cumprir é a quantificação do EDTA no API desejado, a oxitetraciclina. Tal como já foi referido, para proceder a este cálculo, é necessário extrapolar a linha de tendência de ajuste aos dados do gráfico da área do pico em função do volume adicionado até que esta intersete o eixo das abcissas (ponto representado a laranja). Os restantes cálculos deste procedimento já foram descritos detalhadamente no capítulo 3 relativo aos materiais e métodos.

Nas figuras 4.11, 4.12 e 4.13 encontram-se representadas as linearidades obtidas para cada um dos lotes de oxitetraciclina dihidratada (G002, G003 e G004) com a respectiva extrapolação da reta de ajuste, que permite a determinação do zero da função. Os pontos laranja correspondem aos zeros das funções.

Oxitetraciclina Dihidratada – Lote G002

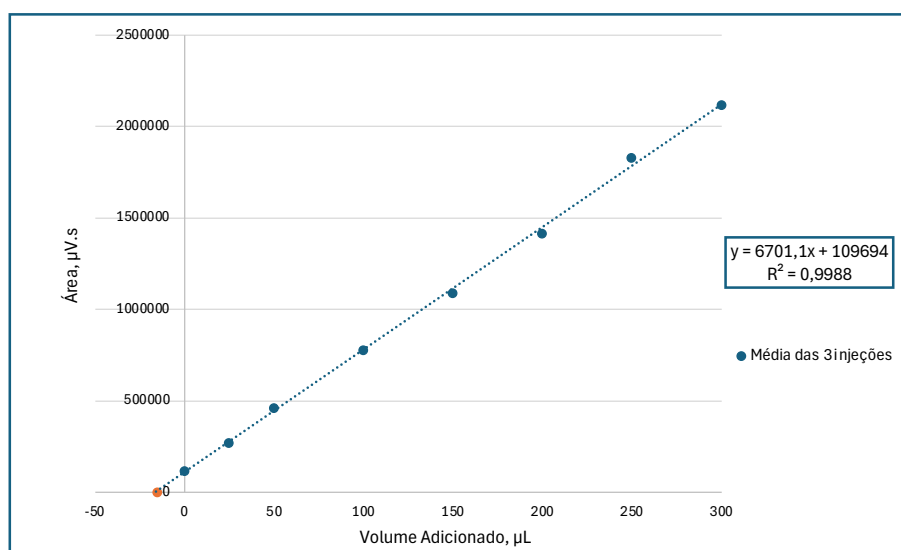


Figura 4.11 - Método de adição padrão EDTA - Oxi Dihid G002

Oxitetraciclina Dihidratada – Lote G003

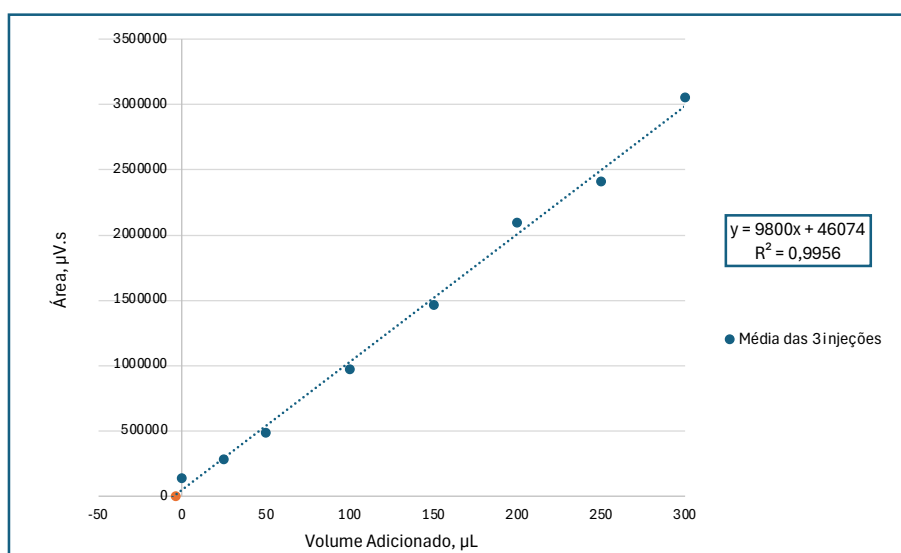


Figura 4.12 - Método de adição padrão EDTA - Oxi Dihid G003

Oxitetraciclina Dihidratada – Lote G004

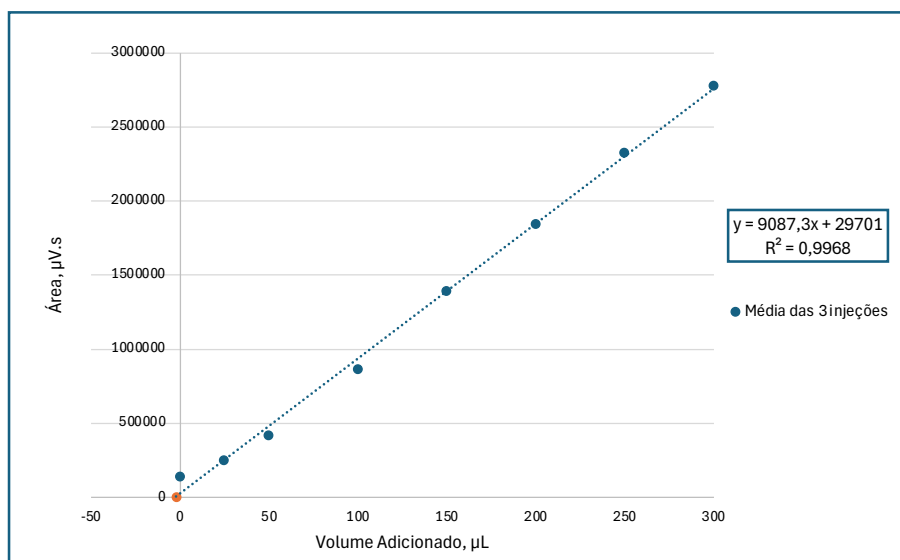


Figura 4.13 - Método de adição padrão EDTA - Oxi Dihid G004

Na tabela 4.7 encontram-se apresentados os resultados obtidos na quantificação de EDTA na oxitetraciclina dihidratada para os três lotes em estudo.

Tabela 4.7 - Quantificação do EDTA na Oxitetraciclina Dihidratada nos lotes G002, G003 e G004

Parâmetros	Oxitetraciclina Dihidratada G002	Oxitetraciclina Dihidratada G003	Oxitetraciclina Dihidratada G004
X (y=0), μL	-15,80	-4,36	-2,88
EDTA em 9 mL de solução de API, mg	0,0010	0,00029	0,00019
EDTA em 100 mL de solução de API, mg	0,011	0,0029	0,0019
% (m EDTA/m API)	0,011 (<LoQ)	0,0029 (<LoQ)	0,0019 (<LoQ)

Os resultados obtidos para a quantificação de EDTA nas amostras de oxitetraciclina dihidratada (G002, G003 e G004), apresentados na tabela 4.6, demonstram que todas as amostras atendem aos critérios estabelecidos para o limite máximo permitido de impurezas, que é de 0,1% (m/m). [8] Os teores encontrados foram de 0,011% para a amostra G002, 0,0029% para a G003 e 0,0019% para a G004, evidenciando níveis residuais desse agente quelante. Esses valores indicam que o processo de produção da oxitetraciclina foi conduzido de forma eficiente, minimizando a presença de contaminantes indesejados. A conformidade com a especificação regulatória garante uma maior segurança e consistência nos processos de formulação e produção de medicamentos que contenham a oxitetraciclina dihidratada como princípio ativo.

Convém, no entanto, salientar que estes valores se encontram abaixo do limite de quantificação do método e, por isso, devem ser considerados apenas como aproximados. Nessa faixa de concentração, a variabilidade analítica é maior, o que reduz a confiabilidade absoluta dos resultados, embora não comprometa a conclusão de que os teores residuais de EDTA são baixos.

4.2 Ácido Oxálico

Como ponto de partida para este composto, utilizou-se o método analítico desenvolvido para o EDTA. Conforme a resposta obtida face às alterações realizadas nos parâmetros do método analítico, são feitos alguns ajustes no mesmo, tendo por base as características do composto em causa.

Assim, em primeiro lugar, efetuou-se um varrimento de massas moleculares com o intuito de procurar a razão m/z de 89, o que comprovaria a presença de ácido oxálico nas amostras de oxitetraciclina a analisar (figura 4.14).

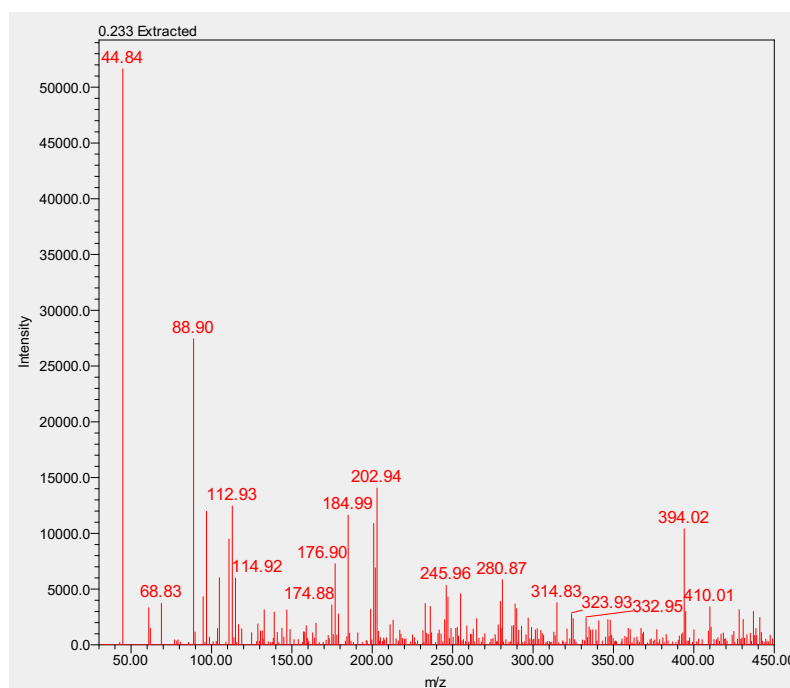


Figura 4.14 - Varrimento de massas da amostra a analisar

A presença da razão m/z de 88,90 nesse espectro de massas de uma amostra de produto a analisar comprova que esta é a razão alvo pela qual se deve procurar nos ensaios seguintes, o que está de acordo com o facto de o ácido oxálico perder um protão, tal como visto anteriormente. É importante salientar que a razão massa/carga detetada de 44,84 podia gerar alguma dúvida e levar a pensar que o ácido oxálico estivesse a perder 2 protões em vez de um, e por isso, a sua razão fosse de $(89,03-2)/2$, ou seja, 44,02. É necessário confirmar se esta razão é detetada também no diluente.

4.2.1 Impacto das condições cromatográficas

4.2.1.1 Diluente

Foram testados os três diluentes seguintes para perceber o seu efeito no espectro de massas e selecionar o mais adequado, tendo por base as características físico-químicas do analito, o ácido oxálico.

- H_2O ;
- HCl 3 g/L;
- Acetato de Amónio 0,005 M.

A água representava a escolha mais simples, garantindo uma matriz limpa e sem interferências. O HCl permitia aumentar a solubilização da amostra e, conseqüentemente, do analito, bem como evitar a formação de complexos com metais, embora apresentasse menor compatibilidade com o detetor. Já o acetato de amónio oferecia a vantagem de ser um tampão volátil que estabiliza o pH, melhorando o pico e favorecendo a ionização no modo negativo. Entre estas opções foi selecionado o diluente que proporcionou o melhor compromisso entre a solubilização do API, a qualidade cromatográfica e a compatibilidade com a deteção por espectrometria de massa.

Para isso, primeiramente, injetou-se uma amostra, com uma determinada concentração, dissolvida em H_2O e em HCl (3 g/L) para comparar os sinais obtidos e decidir qual o diluente mais indicado. Na figura 4.15 é apresentado o espectro contínuo obtido.

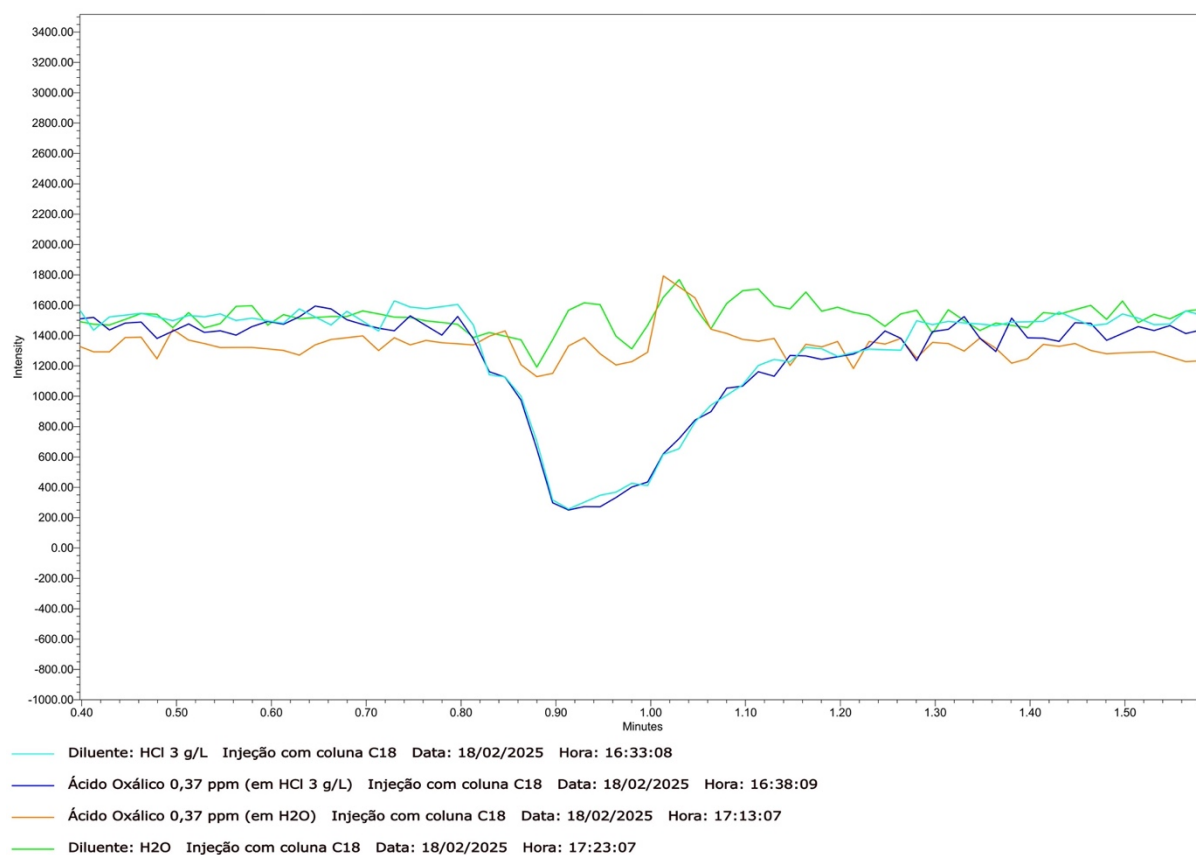


Figura 4.15 – Cromatograma - Ácido Oxálico - Comparação entre diluentes H₂O e HCl

Ao analisar o cromatograma obtido, quando se utiliza HCl como diluente, verifica-se um desnível no sinal no tempo de retenção do ácido oxálico, o que representa um evidente efeito matriz por parte do HCl. No entanto, quando se utiliza água como diluente, obtém-se uma linha de base contínua e estável, com variações mínimas atribuídas apenas ao ruído instrumental, o que justifica a escolha desta como diluente preferencial. Possivelmente, o facto de o HCl 3 g/L ser um ácido volátil e forte pode inibir a ionização por variação brusca do pH, dando origem a um pico negativo, uma queda no sinal, em relação à linha de base. Porém, a amostra de oxitetraciclina, onde se pretende quantificar o ácido oxálico, não é solúvel em H₂O, logo deve ser arranjada uma alternativa para contornar este facto, explorando melhor a opção do HCl, ainda que noutras proporções.

De seguida, injetam-se amostras de diferentes concentrações em acetato de amónio 0,005M para perceber qual o comportamento do analito neste diluente. Os resultados encontram-se apresentados na figura 4.16.

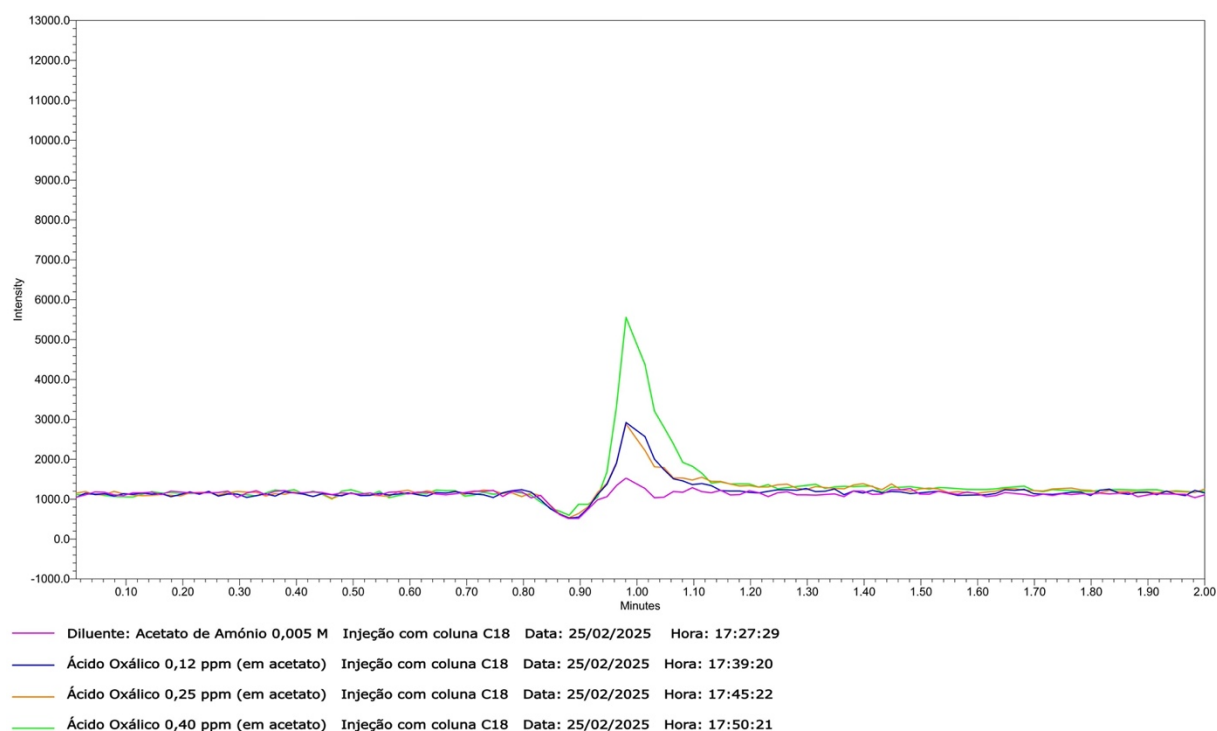


Figura 4.16 – Cromatograma - Ácido Oxálico - Diluente: Acetato de Amônio 0,005 M

Após analisar os resultados obtidos, conclui-se que, ao utilizar acetato de amônio 0,005 M como diluente, os picos tornam-se mais intensos, com menos arrastamento e mais fáceis de distinguir da linha de base, não se verificando a existência de um pico negativo no sinal do diluente, como no caso do HCl 3 g/L.

A escolha final do diluente recaiu sobre uma mistura entre HCl 1,5 g/L e acetato de amônio 0,1 M (50:50 v/v). A escolha de utilizar uma solução de acetato de amônio 0,1 M, em vez de 0,005 M, deveu-se à necessidade de elevar o pH do meio acidificado com HCl, uma vez que o ácido oxálico tende a desprotonar, processo que é desfavorecido em condições excessivamente ácidas, conforme já referido anteriormente. Deste modo, a combinação destes dois componentes torna possível mitigar as limitações observadas quando usados isoladamente. O HCl permite a dissolução da oxitetraciclina dihidratada e o acetato de amônio atua como tampão ao estabilizar o pH da solução.

4.2.1.2 Fase Móvel

Foram testadas as seguintes composições para a fase móvel a utilizar neste método:

- 70% (v/v) H₂O, 15% (v/v) MeOH, 15% (v/v) ACN;
- 70% (v/v) Acetato de Amônio 0,005 M, 15% (v/v) MeOH, 15% (v/v) ACN;
- 70% (v/v) H₂O, 15% (v/v) MeOH, 15% (v/v) ACN, + 0,05% (v/v) Ácido Fórmico.
- 70% (v/v) H₂O, 15% (v/v) MeOH, 15% (v/v) ACN, + 0,01% (v/v) Ácido Fórmico.

A primeira fase móvel ($\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}:\text{MeOH}$, 70:15:15) foi considerada como condição de referência por ser a mais simples, permitindo avaliar a retenção do analito numa matriz limpa e compatível com MS. A substituição da água por acetato de amónio 0,005 M na mesma proporção foi testada por introduzir um tampão volátil capaz de estabilizar o pH e possivelmente melhorar a forma do pico. Foram ainda exploradas fases móveis com adição de ácido fórmico em duas quantidades distintas (+ 0,05 % v/v e + 0,01 % v/v), uma vez que este aditivo é frequentemente utilizado para melhorar a eficiência cromatográfica e a ionização em ESI. Contudo, tendo em conta que a ionização em modo negativo tende a ser suprimida a pH muito ácido, pensa-se que a concentração mais elevada de ácido fórmico possa reduzir a intensidade do sinal do analito.

O cromatograma obtido para comparação do sinal ao utilizar as diferentes fases móveis está apresentado na figura 4.17.

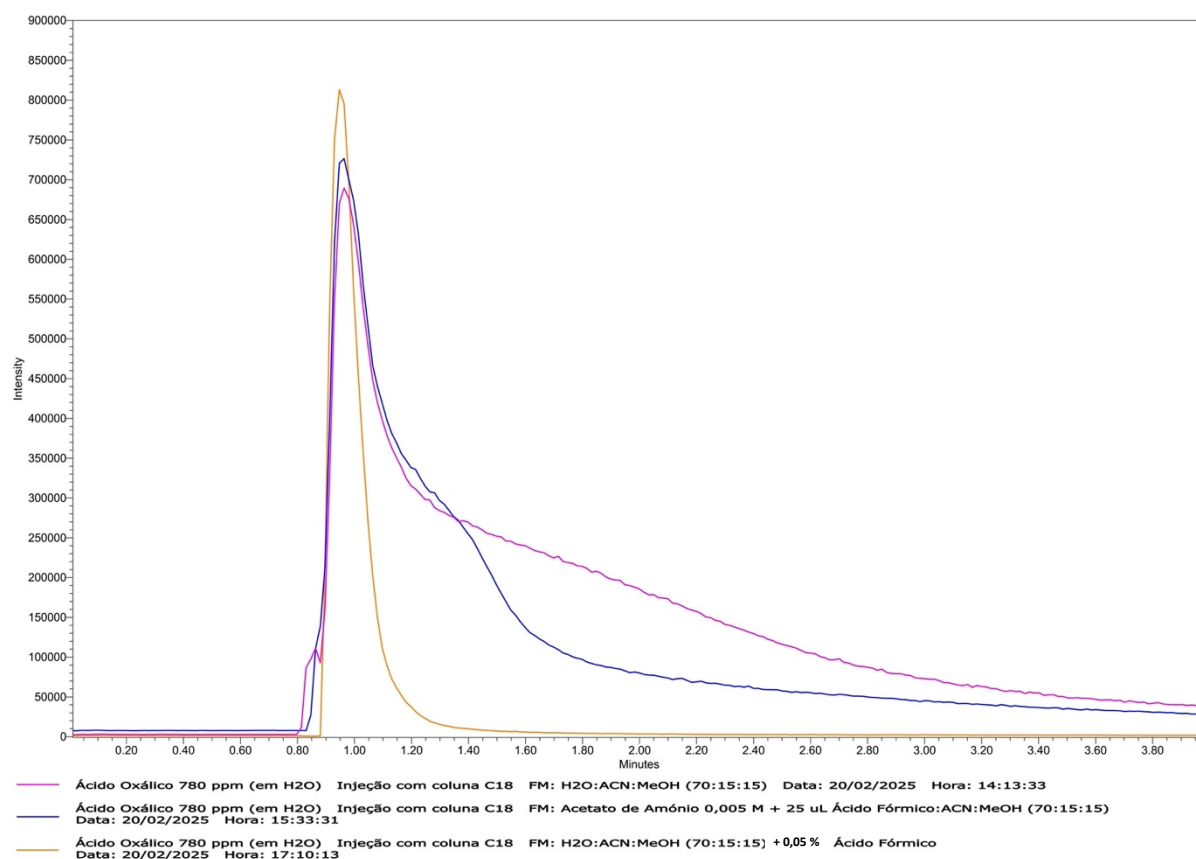


Figura 4.17 - Cromatograma - Ácido Oxálico - Comparação entre diferentes composições de fase móvel

Para amostras concentradas (780 ppm), ao recorrer a uma fase móvel sem ácido fórmico na sua constituição (linha rosa), o pico registado no cromatograma apresenta um grande arrastamento. Na expectativa de melhorar o sinal, substituiu-se a água por acetato de amónio 0,005 M e adicionou-se uma pequena quantidade de ácido fórmico (25 μ L) antes de juntar o acetonitrilo e o metanol (linha azul). Verificou-se que a intensidade do pico aumentou e o arrastamento do pico diminuiu, mas, ainda assim, não é suficiente, pelo que se testou outra fase móvel com mais quantidade de ácido fórmico na sua composição. Optou-se de novo por uma fase móvel composta, essencialmente, por água, acetonitrilo e metanol e aumentou-se a quantidade de ácido fórmico presente na solução (+ 0,05 % v/v). O pico obtido (linha laranja) foi ainda mais intenso e a conformação do mesmo melhorou, já que se eliminou o arrastamento.

Como o ácido oxálico tende a desprotonar, expectou-se que fases móveis muito ácidas inibissem o sinal, pelo que se optou por testar ainda mais uma fase móvel em que a percentagem de ácido fórmico adicionada foi de 0,01 % (v/v) em vez de 0,05 % (v/v) na expectativa de aumentar mais a intensidade do sinal registado no cromatograma. Para além disso, as amostras testadas foram menos concentradas do que a anterior (0,10, 0,20 e 0,19 ppm) para perceber qual o comportamento nestas condições, tal como mostra a figura 4.18.

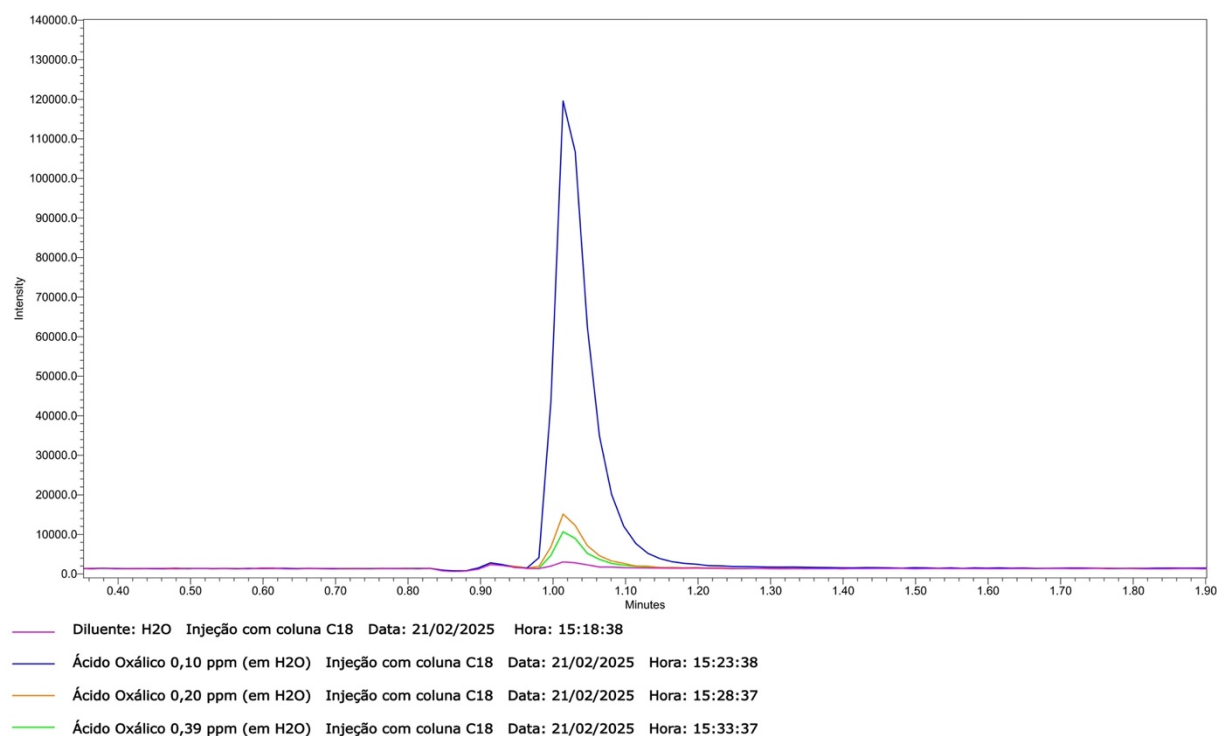


Figura 4.18 - Cromatograma - Ácido Oxálico - Fase Móvel com 0,01 % (v/v) de Ácido Fórmico

Pela análise dos cromatogramas obtidos, para as distintas fases móveis, seleccionou-se a composta por H₂O:ACN:MeOH, + ácido fórmico (70:15:15, + 0,01 % v/v), uma vez que esta condição demonstrou oferecer a melhor relação entre eficiência cromatográfica e a resposta em espetrometria de massa, garantindo picos bem definidos sem que a ionização em modo negativo seja comprometida. A baixa quantidade de ácido fórmico adicionada foi suficiente

para melhorar a estrutura do pico sem acidificar excessivamente o meio, evitando, assim, a supressão do sinal do analito.

Adicionalmente, constatou-se que não se regista um aumento da intensidade com a concentração de ácido oxálico na amostra, tal como seria expectável, o que pode estar relacionado com a coluna cromatográfica. Esta questão será abordada na subsecção 4.2.1.4, acerca da presença de coluna.

4.2.1.3 Volume de Injeção

Foram testados dois volumes de injeção: 10 μL e 15 μL para uma amostra de uma determinada concentração, estando os resultados obtidos apresentados na figura 4.19. A fase móvel utilizada neste ensaio tem a seguinte composição: $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}:\text{MeOH}$ (70:15:15) + 0,05 % (v/v) ácido fórmico.

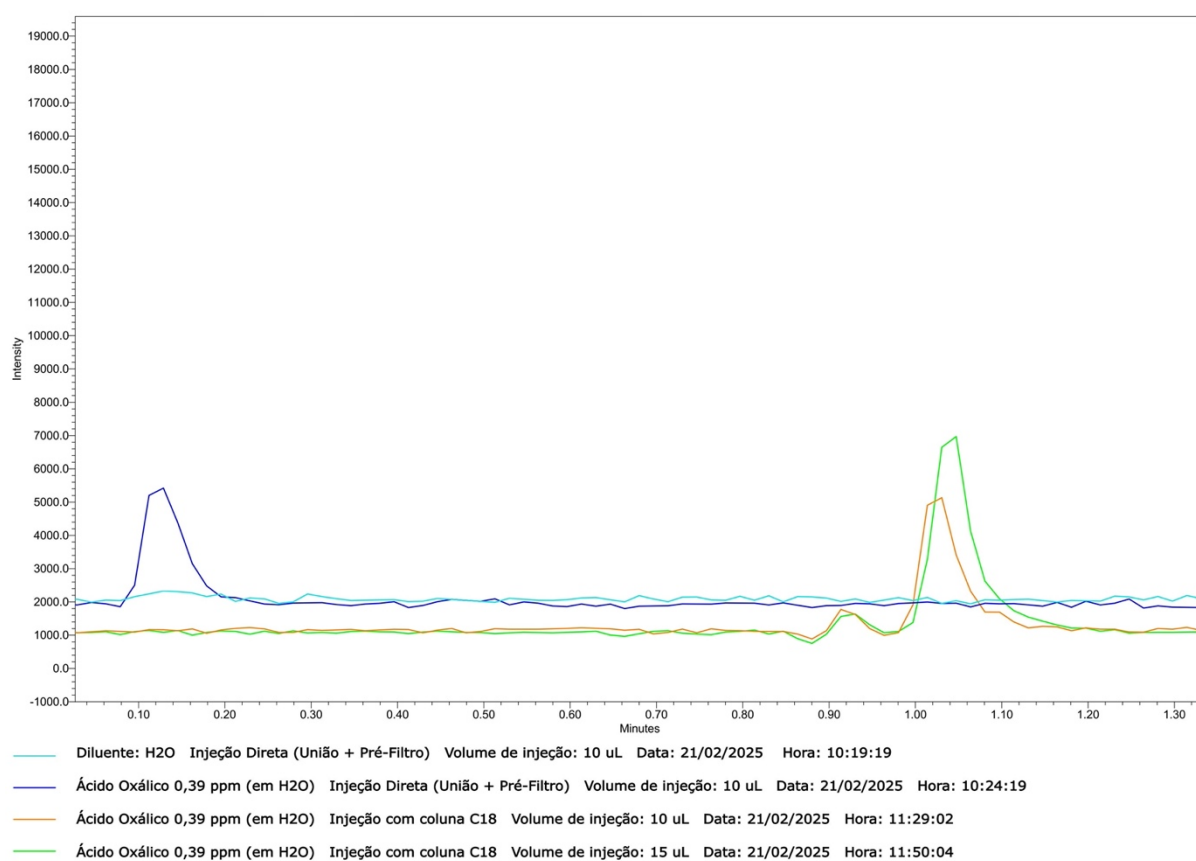


Figura 4.19 - Cromatograma - Ácido Oxálico - Comparação entre diferentes volumes de injeção: 10 e 15 μL

O aumento do volume de injeção pode conduzir a uma melhoria na visibilidade e intensidade dos picos cromatográficos, uma vez que mais analito é introduzido no sistema, o que favorece a sua deteção, como esperado. Contudo, devido ao facto de se injetarem amostras concentradas de API's em que o ácido oxálico é, apenas, uma impureza vestigial, é aconselhável manter o volume de injeção nos 10 μL para que não se proporcione uma contaminação em cadeia no sistema LC-MS.

A introdução de volumes excessivos podem comprometer a eficiência da separação, sobretudo em colunas de pequeno diâmetro, devido ao sobrecarregamento da fase estacionária e à possível distorção dos picos.

4.2.1.4 Presença de Coluna

Na secção 4.2.1.2, verificou-se que o aumento da concentração do analito não resultava necessariamente num aumento da intensidade do pico, contrariando o que seria de esperar. Questionou-se se poderia dever-se à utilização de coluna cromatográfica, pelo que se optou pela realização de ensaios sem coluna, tratando-se de uma injeção direta, recorrendo a um pré-filtro antes da passagem da amostra pelo detetor para proteção do equipamento.

A composição da fase móvel utilizada neste ensaio foi a seguinte: H₂O:ACN:MeOH (70:15:15 v/v) + 0,01 % (v/v) ácido fórmico e o volume de injeção foi 10 µL. Os espectros de massas encontram-se apresentados nas figuras 4.20 e 4.21.

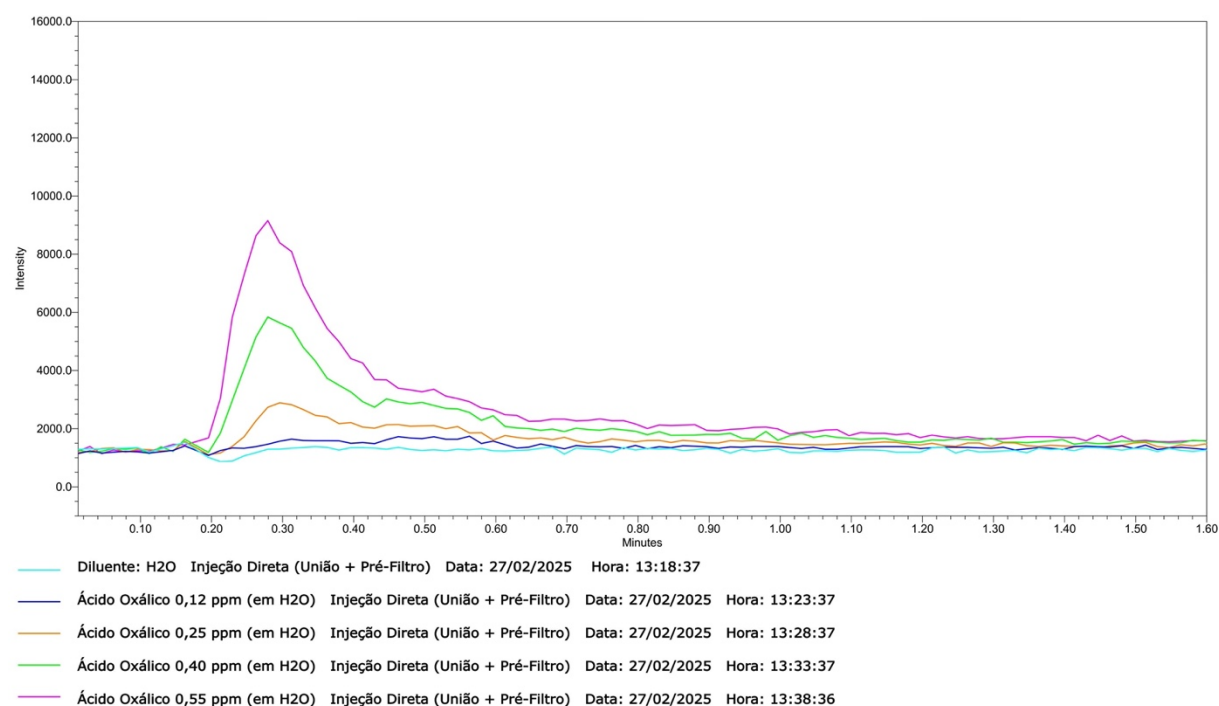


Figura 4.20 – Cromatograma - Ácido Oxálico - Injeção Direta (União + pré-filtro)

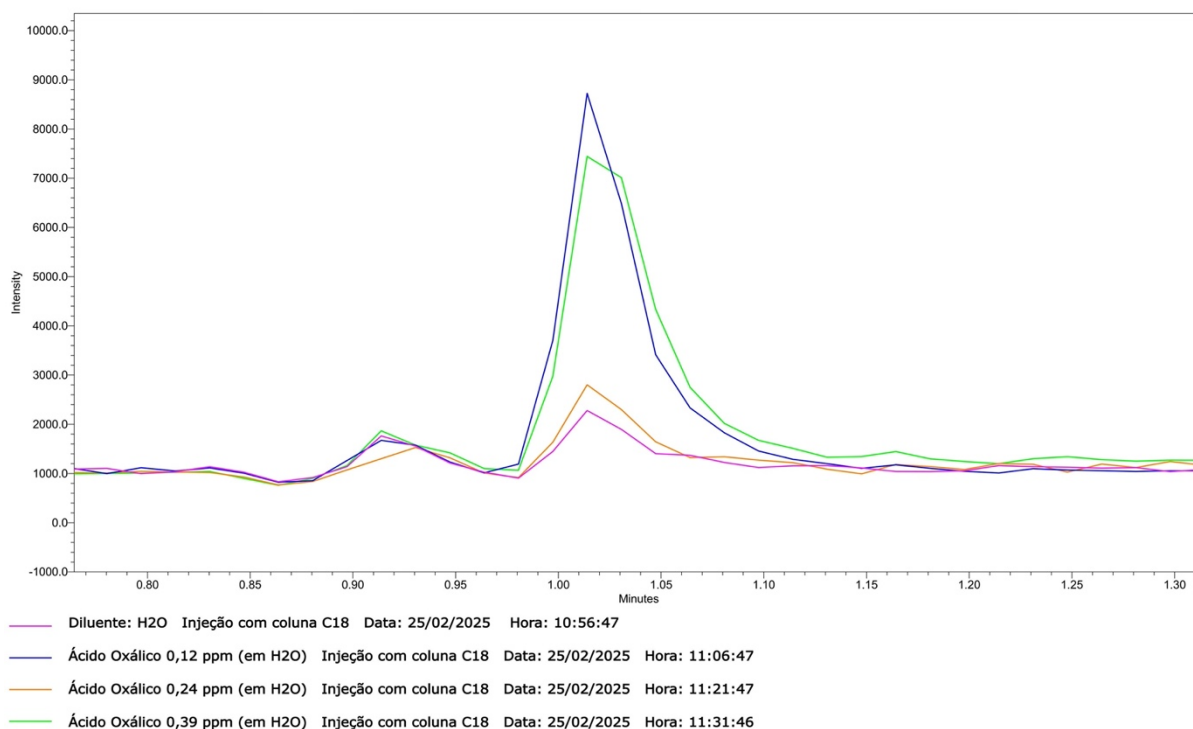


Figura 4.21 – Cromatograma - Ácido Oxálico – Injeção com coluna de enchimento C18

Tal como é de esperar e se pode constatar na figura 4.21, a presença de uma coluna no sistema cromatográfico atrasa a eluição do ácido oxálico. Para além disso, causa uma perturbação no sinal do diluente e no das próprias amostras, já que não se verifica um crescendo do sinal com a concentração da mesma. Provavelmente, deve-se a uma retenção parcial do composto na coluna. Distinguem-se dois picos com tempos de retenção diferentes, pelo que se suspeita que o ácido oxálico não esteja a eluir todo ao mesmo tempo, resultando numa resposta não proporcional à concentração.

Ao utilizar um sistema de injeção direta + pré-filtro, regista-se uma menor interação entre o diluente e a fase estacionária e já se consegue verificar uma relação proporcionalmente direta entre a intensidade do sinal e a concentração de ácido oxálico. Neste contexto, o ácido oxálico apresenta um tempo de retenção mais curto, como seria esperado, dado que, na ausência da coluna, não ocorre retenção efetiva e o composto passa diretamente para o detetor com mínima interação. Contudo, ainda que já não se distingam perfeitamente dois picos, nota-se um arrastamento do pico registado.

4.2.1.5 Filtração de Amostras

Frequentemente, as amostras são filtradas as amostras com filtros de celulose regenerada antes de serem colocadas nos *vials* e injetadas, pelo que também se considera pertinente avaliar o seu impacto na intensidade do pico registado, ou seja, se há contaminação ou retenção do composto.

O efeito da filtração das amostras foi, assim, analisado em amostras com três concentrações de analito e os resultados encontram-se na figura 4.22.

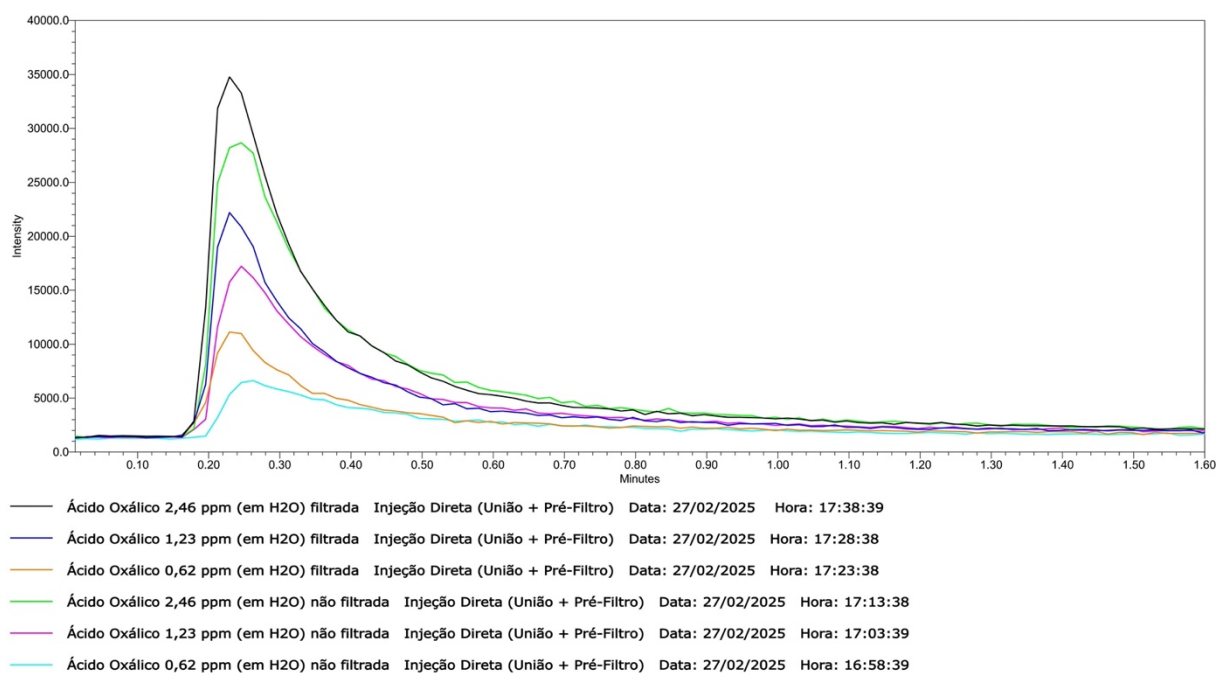


Figura 4.22 - Cromatograma - Ácido Oxálico – Efeito da filtração de amostras

Com a análise da figura 4.22, conclui-se que o sinal obtido para as amostras filtradas se revela superior ao das não filtradas para as diferentes concentrações, o que pode significar que determinados constituintes presentes na matriz da amostra ou do próprio filtro podem estar a interferir com a deteção do analito, possivelmente por efeitos de intensificação ou supressão de sinal. A filtração pode estar a provocar uma introdução de um contaminante na amostra com razão m/z igual à procurada, o que justificaria o incremento na intensidade do sinal.

Seguidamente, encontram-se apresentados os cromatogramas obtidos para várias concentrações de analito, em que o primeiro diz respeito à injeção de amostras e diluente não filtrados (figura 4.23) e o segundo à injeção de amostras e diluente filtrados (figura 4.24).

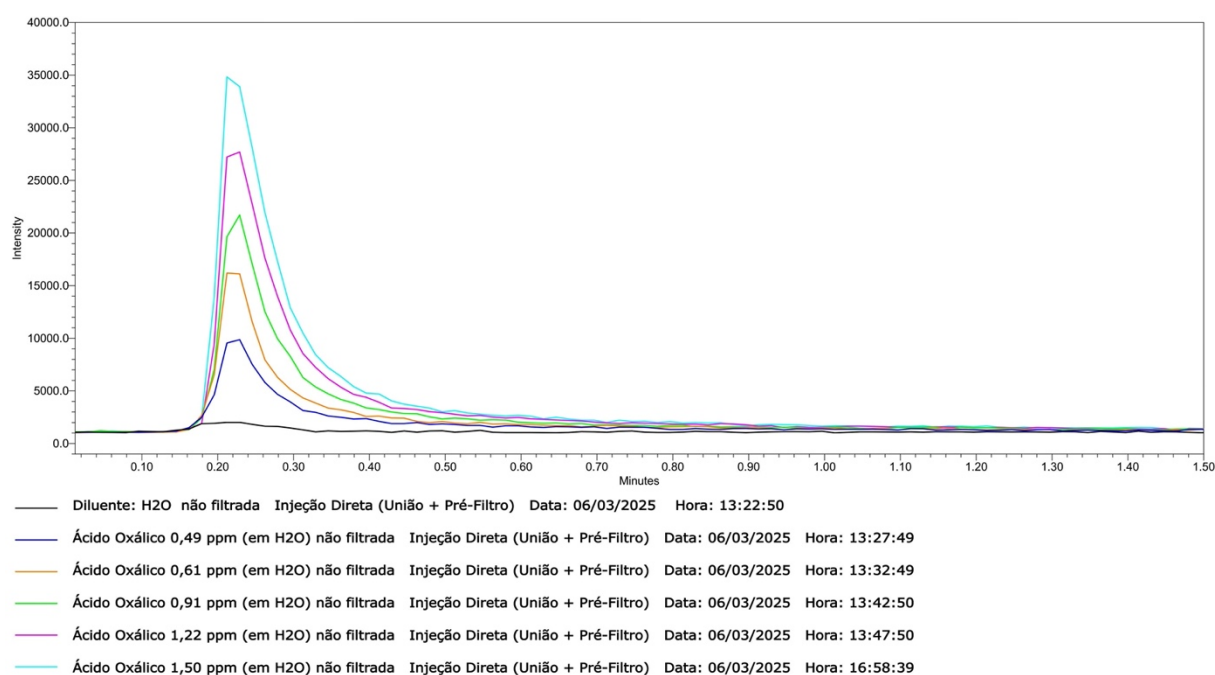


Figura 4.23 - Cromatograma - Ácido Oxálico – Amostras não filtradas

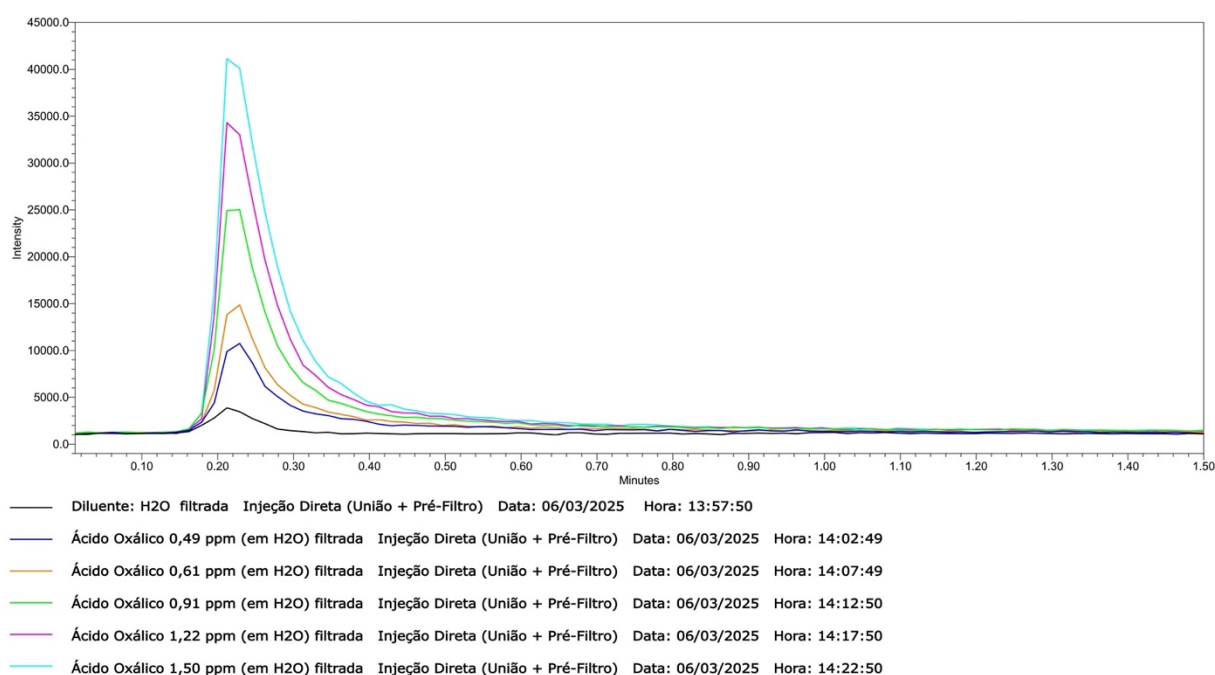


Figura 4.24 - Cromatograma - Ácido Oxálico – Amostras filtradas

Comparando as figuras 4.23 e 4.24, verifica-se que há um aumento da intensidade dos picos para as amostras e para o diluente que, neste ensaio, é água, quando as amostras são filtradas. Este facto revela que, possivelmente, o filtro de seringa está a contaminar, tanto as amostras, como o diluente, o que faz com que o pico seja mais intenso do que quando não se filtra. Assim, decidiu-se não filtrar as amostras de ácido oxálico em ensaios futuros.

No gráfico da figura 4.25 encontram-se apresentadas as áreas dos picos obtidas em função da concentração, numa gama entre 0,5 e 2,5 ppm, relativas aos cromatogramas anteriores, para as amostras filtradas e não filtradas.

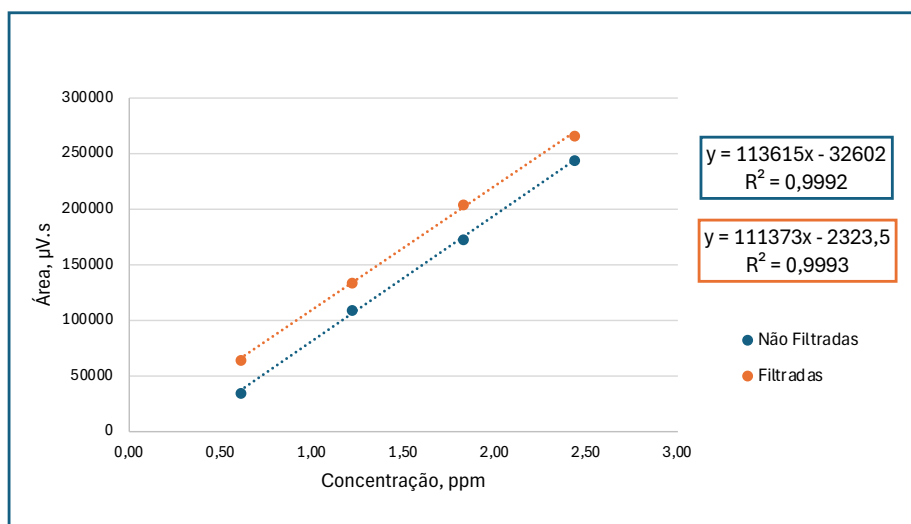


Figura 4.25 – Área Vs. Conc. – Ácido Oxálico - Comparação entre linearidades das filtradas e não filtradas

Tal como já foi mencionado, a filtração das amostras provoca um aumento na intensidade do sinal e, consequentemente, da área do pico. Apesar disso, a linearidade é preservada, o que significa que o contaminante do filtro tem uma interferência sistemática, já que o incremento na área do pico é aproximadamente constante.

4.2.1.6 Tempo entre preparação e injeção de amostras

Pretende-se, também, estudar o impacto do tempo entre a preparação e injeção de amostras nos resultados obtidos nos cromatogramas, ou seja, se existe diferença nas intensidades e na estrutura do próprio pico, ao injetar as amostras logo depois de prepará-las ou passado algum tempo (horas ou dias). Os resultados obtidos encontram-se apresentados na figura 4.26, sendo que diz respeito a uma injeção com coluna de enchimento C18, usando como diluente água.

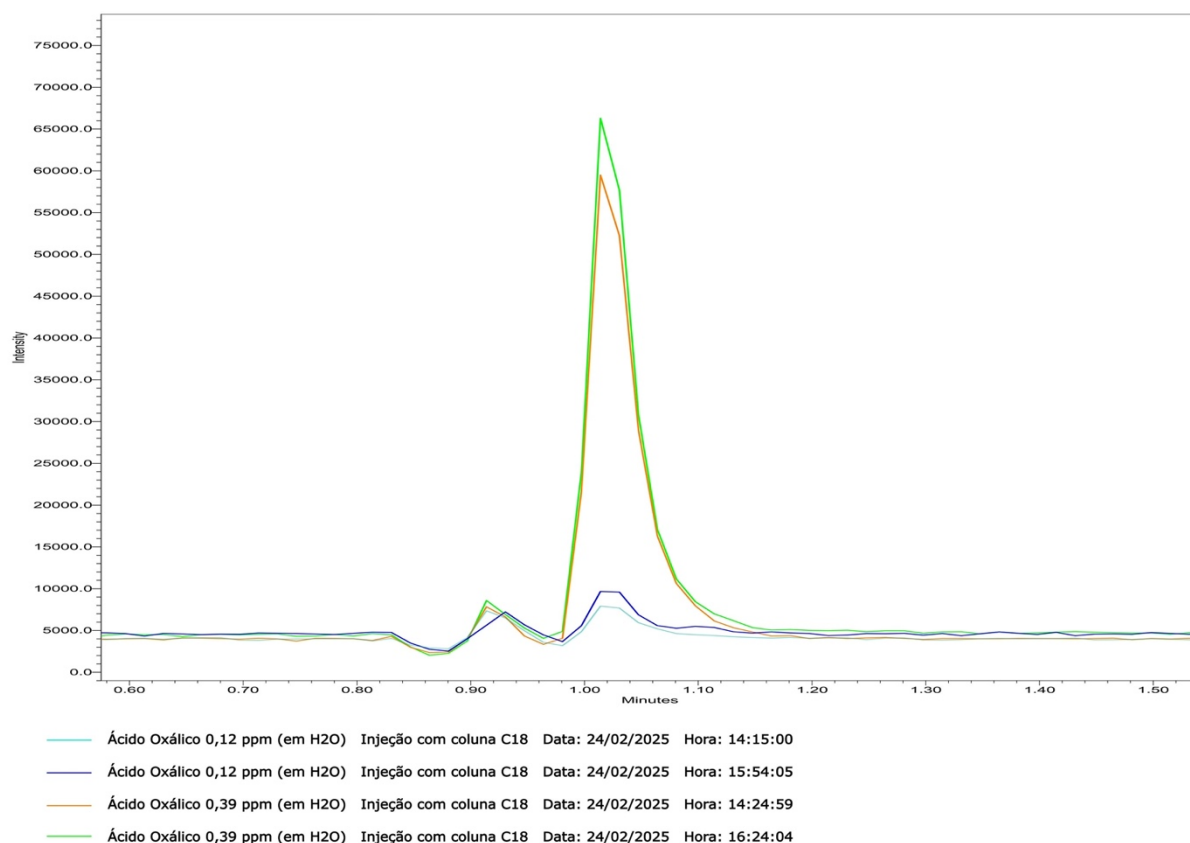


Figura 4.26 - Cromatograma - Ácido Oxálico - Impacto do tempo (Injeção com coluna de enchimento C18)

Após a reinjeção das mesmas amostras (0,12 ppm e 0,39 ppm), decorridos 1 h e 40 min, observaram-se picos um pouco mais intensos. Podia pensar-se que este comportamento pudesse estar associado a um aumento da concentração da amostra devido à evaporação parcial do solvente ao longo do tempo. Contudo, considerando que, neste caso, o diluente utilizado foi água, este efeito não seria o mais expectável. Por outro lado, após um determinado tempo, podem ocorrer mudanças na composição da matriz, como a degradação de certos componentes interferentes, o que pode reduzir a supressão iónica e aumentar a eficiência da ionização, dando origem a picos mais intensos.

4.2.1.7 Ordem de Injeção das Amostras

Durante a análise cromatográfica, verificou-se que, ao proceder à injeção das amostras em ordem crescente de concentração, as curvas de calibração obtidas apresentavam tendência para ajustes polinomiais em vez de relações lineares, o que poderia indicar um efeito associado à sequência de injeção. Para avaliar esta possibilidade, alterou-se a ordem de injeção para aleatória e também decrescente em termos de concentração, de forma a investigar se o mesmo comportamento se repetia e, assim, excluir ou confirmar a influência da ordem de injeção nos resultados.

Na figura 4.27 são apresentados a área do pico e o volume adicionado de solução-mãe de ácido oxálico às amostras de oxitetraciclina dihidratada G003, quer para uma ordem de injeção da mais diluída para a mais concentrada, quer para uma ordem de injeção da mais concentrada para a mais diluída, verificando-se uma relação polinomial entre os mesmos.

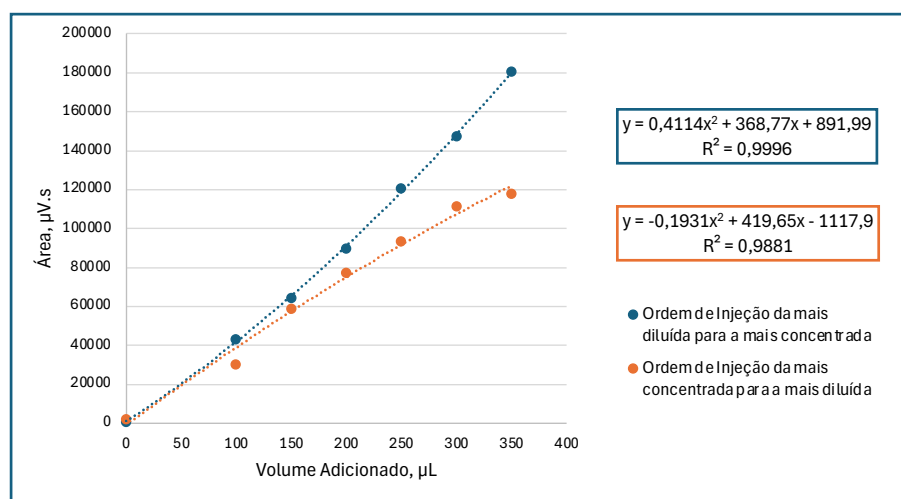


Figura 4.27 - Área Vs. Vol.ad. - Ácido Oxálico - Ordens de injeção crescente e decrescente de concentração

Por outro lado, através da figura 4.28, verifica-se que, ao injetar as amostras em ordem aleatória, o ajuste aos dados se aproxima mais de uma relação linear do que ao injetar por ordem crescente ou decrescente de concentração, mantendo, no entanto, uma ligeira tendência polinomial.

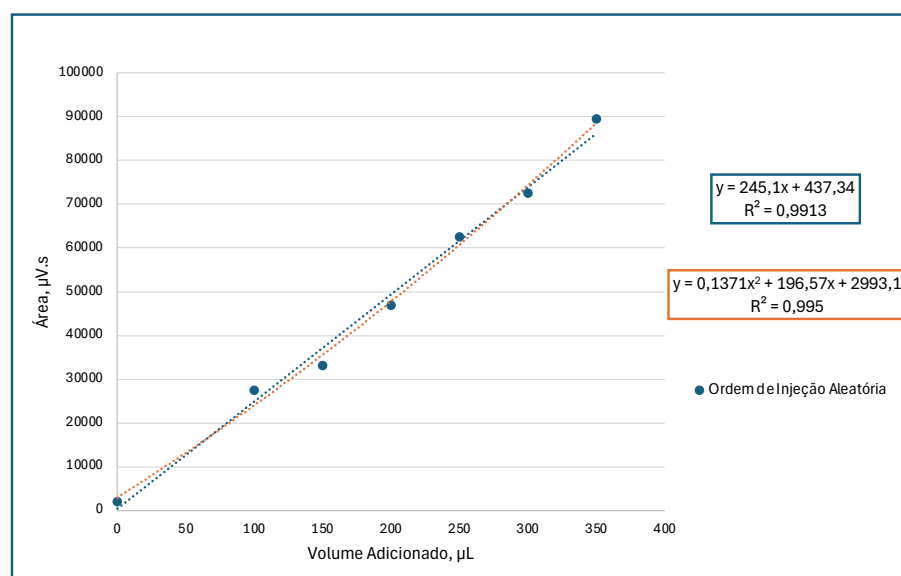


Figura 4.28 - Área Vs. Vol.ad. Ác.Ox - Ordem de injeção aleatória

O facto de se obter um ajuste polinomial, para mais do que um dos compostos em estudo, indica que a razão estará associada ao próprio equipamento utilizado e não a uma determinada propriedade de um composto concreto. Este aspeto pode estar relacionado com um fenómeno de ligeira contaminação em cadeia, ou seja, uma possível transferência indesejada de resíduos de uma amostra previamente injetada para a amostra subsequente. Este efeito pode comprometer a linearidade da resposta analítica, uma vez que introduz um sinal adicional não correspondente à concentração real do analito, levando a desvios na curva de calibração, especialmente em níveis baixos de concentração. Por outro lado, pode também ocorrer uma interação entre o analito e as superfícies metálicas presentes no percurso da amostra dentro do sistema, como válvulas e conexões, o que levaria a retenções indesejadas ou picos residuais em injeções posteriores, distorcendo a resposta analítica e, por conseguinte, a linearidade do método. A falta de sensibilidade do equipamento para concentrações tão baixas também pode ser um fator explicativo, já que é nessas concentrações que a tendência polinomial dos dados é mais evidente.

4.2.1.8 Efeito Matriz

Tal como discutido na subsecção 4.2.1.1., relativa à escolha do diluente, a preparação da solução de ácido oxálico em água ou em HCl origina diferenças no sinal registado no cromatograma, evidenciando a presença de efeito de matriz. Consequentemente, torna-se necessário recorrer ao método de adição padrão em detrimento do método de padrão externo, de modo a compensar as interferências da matriz e assegurar a quantificação correta do ácido oxálico no API em estudo.

4.2.2 Pré-Validação do Método

Com base no estudo do impacto das alterações dos parâmetros analíticos descritos, definiu-se o método analítico para este composto, apresentado na tabela 4.8.

Tabela 4.8 - Condições cromatográficas do método analítico do ácido oxálico

Parâmetros	Condições
Coluna	Injeção direta + pré-filtro
Volume de Injeção	10 μ L
Fluxo	0,5 mL/min
Modo de Eluição	Isocrático
Tempo de Corrida	3 min
Temperatura da Coluna	27 °C
Temperatura do Injetor Automático	10 °C
Fase Móvel	H ₂ O:ACN:MeOH + Ác. Fórmico, 70:15:15 + 0,01% (v/v)
Diluyente	HCl (1,5 g/L) + Acet. Amónio 0,1 M (50:50 v/v)
Voltagem do Cone	CV = 20 V
Intervalo MS Scan	30-300 Da
Tipo de Scan	SIR 89 Da
ESI	Negativo

4.2.2.1 Especificidade/Seletividade

Com o objetivo de comprovar a seletividade do método, recorre-se ao varrimento de massas, na ionização negativa, de uma amostra contaminada com ácido oxálico (figura 4.29 a)) e do diluente utilizado no método do ácido oxálico (figura 4.29 b)).

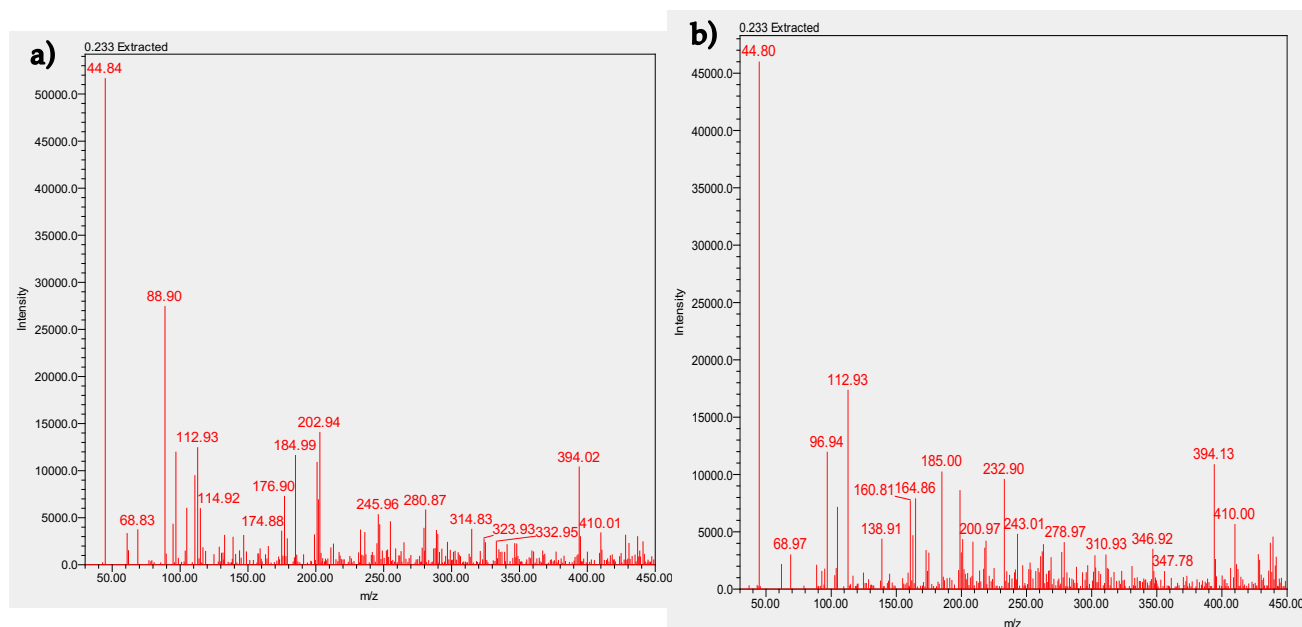


Figura 4.29 - Varrimento de massas de uma amostra contaminada com ácido oxálico a) e de diluente b)

Ao comparar os dois cromatogramas (figuras 4.29 a) e 4.29 b)), justifica-se a seletividade do método com base em três aspetos. Em primeiro lugar, a razão massa/carga detetada de 88,90 detetada mostra que esta está bastante próxima da esperada para a perda de um protão (89,03) e que o método consegue detetar especificamente o ácido oxálico, mesmo na presença de outros componentes. Em segundo lugar, a região próxima da razão massa/carga de 89 (entre 85 e 95) está relativamente limpa, o que assegura a ausência de interferentes significativos nesse intervalo. Por último, a intensidade do pico é relativamente elevada, o que indica uma boa sensibilidade e baixa interferência do ruído.

Confirma-se que a razão m/z de 44,84 não corresponde ao ácido oxálico, deverá ser de um possível aducto formado pelos compostos da fase móvel, uma vez que esta também está presente no diluente.

4.2.2.2 Linearidade

Para avaliar a linearidade do método, foram preparadas sete soluções a partir de uma mesma solução-mãe, sendo que cada uma delas foi injetada duas vezes. Recorrendo à tabela 4.9, construiu-se o gráfico da área de integração do pico em função do volume adicionado, que consta na figura 4.30, bem como o respetivo ajuste linear. No apêndice B.1 encontram-se as tabelas de apoio a esta subsecção utilizadas para traçar a linearidade.

Tabela 4.9 - Linearidade - Ácido Oxálico na oxitetraciclina dihidratada (lote G002)

Concentração do adicionado, ppm	0	0,61	0,91	1,21	1,52	1,82	2,13
Volume Adicionado, μL	0	100	150	200	250	300	350
Fator de Diluição	0	20 000	13 333	10 000	8 000	6 667	5 714
Média das áreas, $\mu\text{V.s}$	2 144	27 406	33 055	46 867	62 506	72 506	89 460

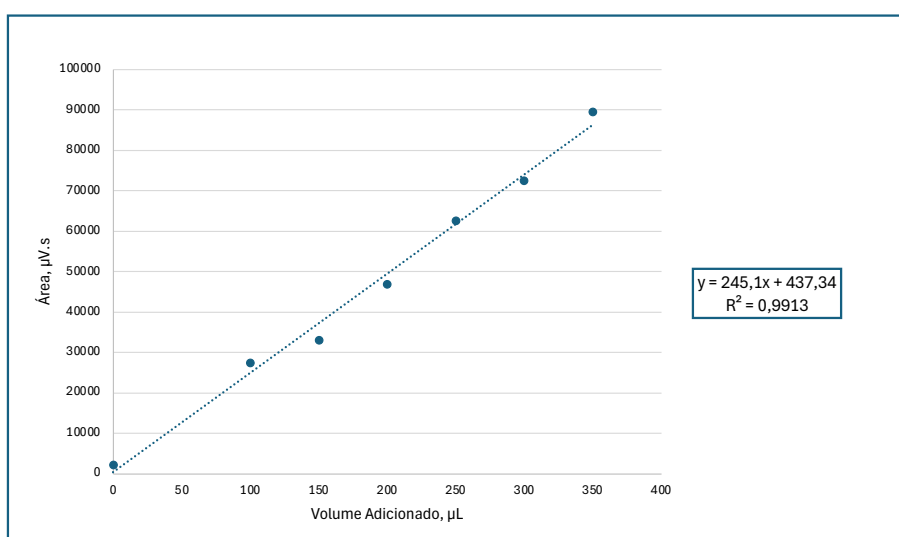


Figura 4.30 - Linearidade - Ácido Oxálico na oxitetraciclina dihidratada (lote G002)

O método mostra ter potencial para gerar valores de áreas de integração dos picos diretamente proporcionais à concentração de analito ou volume adicionado do mesmo, uma vez que, por observação gráfica e pelo coeficiente de correlação, revela-se uma tendência linear dos resultados, já que este é superior a 0,99. Para confirmação da relação linear, recorreu-se a outros testes estatísticos, nomeadamente à análise de resíduos e ao teste de Mandel.

Análise de Resíduos:

Tal como descrito no capítulo 3, a equação 3.12 é utilizada para o cálculo dos resíduos.

A representação gráfica dos resíduos em função da concentração encontra-se apresentada na figura 4.31. No apêndice B.2 estão presentes os cálculos feitos em maior detalhe.

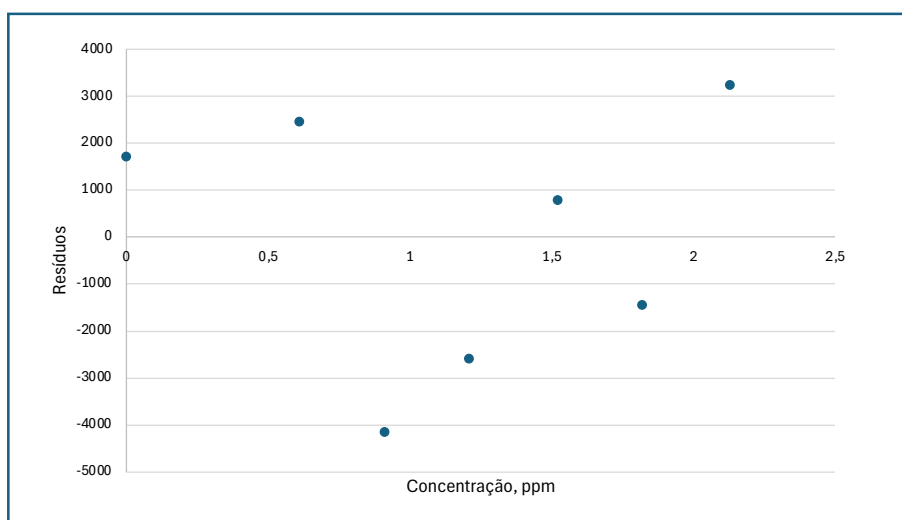


Figura 4.31 - Análise de Resíduos - Ácido Oxálico na oxitetraciclina

Observando a figura anterior, verifica-se que os pontos se distribuem de forma aleatória, confirmando a linearidade do método. No entanto, a subjetividade por trás de uma análise gráfica dos resíduos leva a que seja necessário recorrer aos testes de Mandel para averiguar qual o melhor ajuste aos dados, o linear ou o polinomial.

Teste de Mandel:

Através das equações 3.13 a 3.16, calcularam-se os parâmetros necessários à realização do teste de Mandel. Os resultados encontram-se na tabela 4.10. No apêndice B.2 são apresentados os cálculos efetuados.

Tabela 4.10 – Parâmetros do Teste de Mandel - Ácido Oxálico na oxitetraciclina

Parâmetro	Resultado
$S_{y/x}$	3 036
S_{y2}	2 575
DS^2	$1,96 \times 10^7$
PG	2,95
F (5%, 1, 4)	7,71

Pelos resultados obtidos, pode concluir-se que a gama de trabalho selecionada está compreendida na gama de linearidade, uma vez que $PG \leq F$.

4.2.2.3 Precisão

Repetibilidade

Na tabela 4.11 encontram-se as áreas obtidas para cada uma das três injeções consecutivas e para cada amostra de concentração distinta (alta, média e baixa), bem como o valor de desvio padrão relativo (RSD%) correspondente.

Tabela 4.11 - Repetibilidade do método do Ácido Oxálico

Concentração do contaminado	Área ($\mu\text{V.s}$) Injeção 1	Área ($\mu\text{V.s}$) Injeção 2	Área ($\mu\text{V.s}$) Injeção 3	RSD %
Baixa (1,2 ppm)	67 507	68 062	67 894	0,42
Média (3,1 ppm)	191 146	195 124	194 526	1,10
Alta (5,0 ppm)	293 390	286 979	292 473	1,20

Como os RSD % obtidos para as diferentes concentrações são inferiores ao limite definido como limiar da repetibilidade (2%), confirma-se a repetibilidade do método. [59]

Na figura 4.32 apresenta-se uma ilustração da repetibilidade da linearidade em duas injeções consecutivas de amostras de soluções de oxitetraciclina dihidratada contaminadas com ácido oxálico.

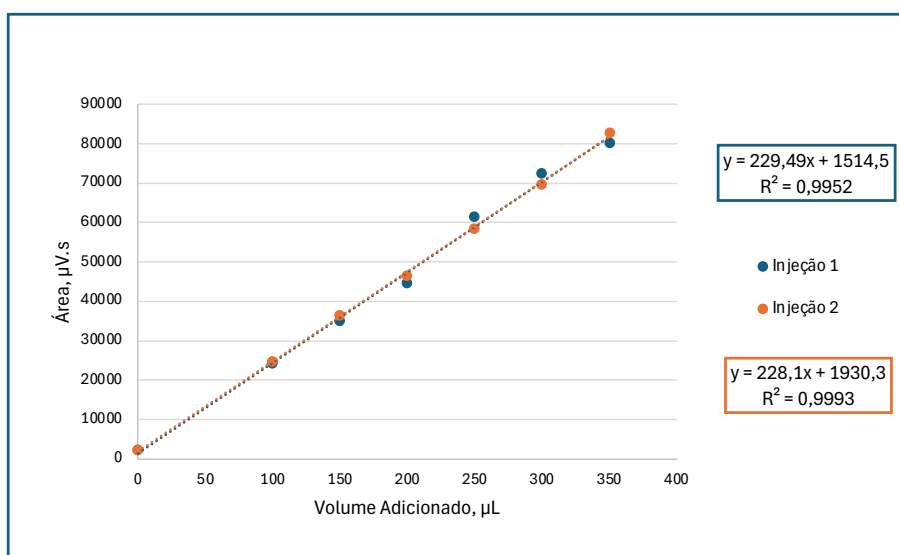


Figura 4.32 - Repetibilidade de linearidade do Ácido Oxálico na Oxitetraciclina Dihidratada

Precisão Intermédia

A tabela 4.12 resume as áreas obtidas, resultantes da integração dos picos, em dois dias distintos para três concentrações diferentes (0,93 ppm, 3,09 ppm e 4,94 ppm).

Tabela 4.12 - Precisão Intermédia do método do ácido oxálico

Concentração do contaminado	Dias	Área ($\mu\text{V.s}$) Média das Injeções	RSD %
0,93 ppm	Dia 1	61 285	1,93
	Dia 2	62 979	
3,09 ppm	Dia 1	187 663	1,43
	Dia 2	183 912	
4,94 ppm	Dia 1	279 048	0,31
	Dia 2	280 274	

Observa-se que os valores de área média das injeções apresentaram variações relativamente pequenas entre os dias para todas as concentrações testadas. O desvio padrão relativo (RSD%) foi utilizado como parâmetro de precisão, mantendo-se abaixo de 5% em todos os casos. Estes resultados demonstram que o método possui boa precisão intermédia, revelando-se promissor na determinação de ácido oxálico nas condições testadas. [59]

Reprodutibilidade

Como o estudo da reprodutibilidade engloba uma variabilidade dos resultados interlaboratorial e interanalista, este parâmetro não foi averiguado.

4.2.2.4 Limites de Detecção e Quantificação

Na tabela 4.13 são apresentados os resultados obtidos de LoD e de LoQ para a oxitetraciclina base e para os dois lotes de oxitetraciclina dihidratada estudados (G002 e G004). Os parâmetros do erro padrão da regressão e do declive foram obtidos usando as funcionalidades do programa *Microsoft Excel*. Foram utilizadas as equações 3.10 e 3.11 presentes na subsecção 3.7.3

Tabela 4.13 - Limites de Detecção e de Quantificação - Ácido Oxálico

Lotes	Oxitetraciclina Base	Oxitetraciclina Dihidratada G002	Oxitetraciclina Dihidratada G004
Erro padrão da regressão	7 832	2 928	1 017
Declive	56 181	40 344	37 651
LoD	0,46 ppm	0,24 ppm	0,09 ppm
LoQ	1,39 ppm	0,73 ppm	0,27 ppm

Observa-se que, para a oxitetraciclina base, os limites analíticos obtidos (LoD e LoQ) foram significativamente mais elevados, indicando uma menor sensibilidade do método nesta matriz. Em contraste, os resultados demonstram que o método apresenta maior sensibilidade na detecção de ácido oxálico nas amostras de oxitetraciclina dihidratada, o que está associado a um erro padrão da regressão inferior. Esta diferença pode estar relacionada com uma maior interferência da matriz na forma base, possivelmente devido à presença de mais impurezas, uma vez que esta não passa pelas mesmas etapas de purificação que a forma dihidratada. Assim, os dados sugerem que a maior pureza das amostras dihidratadas contribui para melhores parâmetros analíticos, refletindo-se na maior sensibilidade do método.

No artigo *“Validation of an HPLC-UV Method for Simultaneous Analysis of Ascorbic and Oxalic Acids in Beverages”* ([91]), o ácido oxálico foi detetado na região do UV profundo (< 210 nm) recorrendo a HPLC com detecção por UV-Vis, tendo sido reportados valores de LoD de 1,3 ppm e de LoQ de 3,9 ppm. Estes limites estão de acordo com a sensibilidade típica da detecção por UV-Vis, adequada para a análise de ácidos orgânicos simples em bebidas. Contudo, é expectável que no presente trabalho os valores obtidos sejam mais baixos, uma vez que a metodologia utilizada recorre a detecção por espectrometria de massa que apresenta maior sensibilidade e seletividade, permitindo alcançar limites de detecção e quantificação inferiores.

4.2.3 Quantificação pelo Método de Adição Padrão

Por fim, procede-se à quantificação do ácido oxálico no API de interesse, a oxitetraciclina, sendo que o procedimento é idêntico ao utilizado para o EDTA. Este composto vai ser quantificado em vários lotes de oxitetraciclina: a oxitetraciclina base (lote 2000322), a oxitetraciclina dihidratada G002 e G004. Nas figuras 4.33, 4.34 e 4.35 são apresentadas as linearidades obtidas para cada um dos casos em estudo. Os pontos laranja dizem respeito aos zeros das funções.

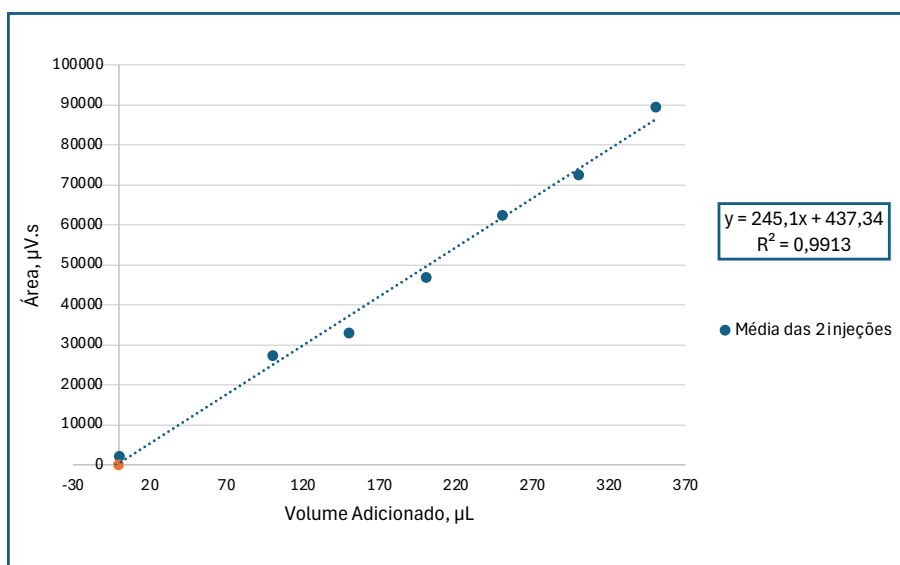


Figura 4.33 - Método de adição padrão Ác.Ox. - Oxi Dihid G002

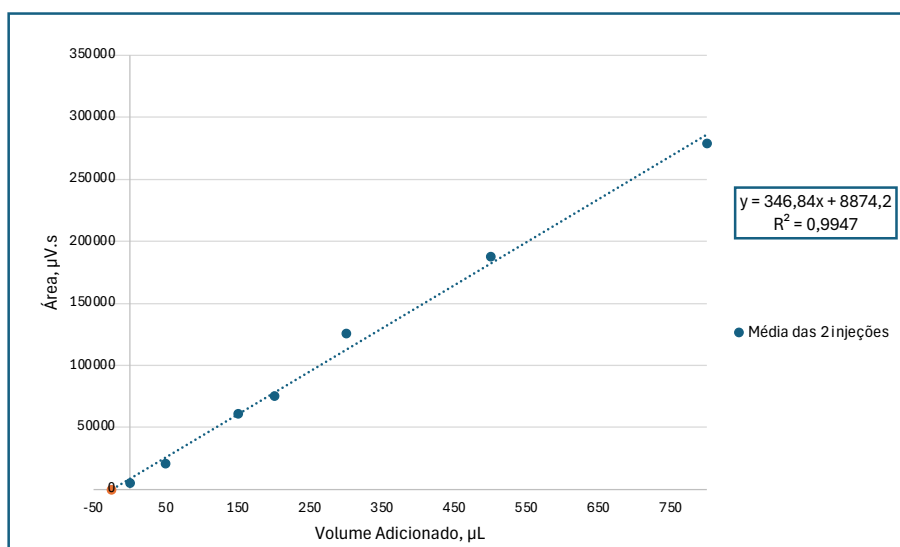


Figura 4.34 - Método de adição padrão Ác.Ox. - Oxi Base 2000322

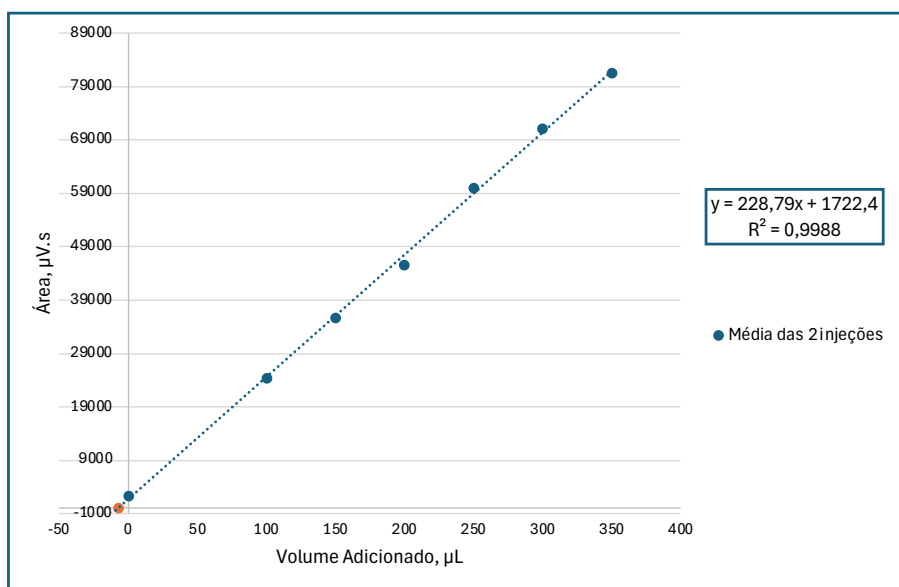


Figura 4.35 - Método de adição padrão Ác.Ox. - Oxi Dihid G004

Na tabela 4.14 encontram-se os resultados obtidos para a quantificação de ácido oxálico nos diferentes lotes de oxitetraciclina.

Tabela 4.14 - Quantificação do Ácido Oxálico na Oxitetraciclina Base e Dihidratada

Parâmetros	Oxitetraciclina Base 2000322	Oxitetraciclina Dihidratada G002	Oxitetraciclina Dihidratada G004
X (y=0), µL	-25,59	-1,78	-7,53
Ác. Oxálico em 9 mL de solução de API, mg	0,0016	0,00011	0,00046
Ác. Oxálico em 100 mL de solução de API, mg	0,035	0,0024	0,0051
% (m Ác. Ox./m API)	0,018 (<LoQ)	0,0024 (<LoQ)	0,0051 (<LoQ)

Os resultados da quantificação de ácido oxálico em diferentes formas de oxitetraciclina, presentes na tabela anterior, evidenciam que a oxitetraciclina base (lote 2000322) possui um teor significativamente superior de ácido oxálico (0,018 % (m/m)) relativamente às amostras de oxitetraciclina dihidratada G002 (0,0024 % (m/m)) e G004 (0,0051 % (m/m)). Essa diferença está associada ao processo de síntese e purificação das distintas formas do API, visto que a forma dihidratada, geralmente mais estável, passa por etapas adicionais de purificação, resultando em menores níveis de impurezas. Importa destacar que, apesar das diferenças entre as amostras, todos os teores de ácido oxálico encontrados estão bastante abaixo da especificação máxima permitida de 0,1% (m/m), atendendo aos critérios de qualidade estabelecidos.

Convém, ainda, referir que os valores obtidos se encontram abaixo do limite de quantificação do método e, por isso, devem ser considerados apenas como aproximados. Nessa faixa de concentração, a variabilidade analítica é maior, o que reduz a confiabilidade absoluta dos resultados, embora não comprometa a conclusão de que os teores residuais de ácido oxálico são baixos.

4.3 Cloreto de *Terc*-Butilo

Foram testadas diferentes composições de fase móvel sem aditivos, nomeadamente, H₂O:ACN:MeOH (70:15:15), H₂O:MeOH (85:15), 100% ACN. A alteração entre combinações de distintas de ACN, MeOH e H₂O na fase móvel permite verificar se os picos observados no cromatograma correspondem ao composto em estudo ou a aductos formados com esses solventes, assegurando a correta atribuição das massas registadas. Paralelamente, pela mesma razão, testaram-se diluentes distintos, 100% ACN e 100% de ácido fórmico. Pretendeu-se averiguar se o composto-alvo sofre modificações estruturais, como derivatização em meio aquoso, suscetível de se refletir no espetro de massa obtido. Todos os ensaios foram realizados sem coluna, ou seja, injeção direta + pré-filtro.

Nas tabelas 4.15 a 4.19 estão apresentados os espetros de massa da amostra e do diluente obtidos, quer no modo positivo, quer no negativo para cada uma das combinações de fase móvel e diluente testadas.

Tabela 4.15 - Espetros de massa da amostra e do diluente para uma fase móvel constituída por H₂O, ACN e MeOH e diluente ACN (ESI +)

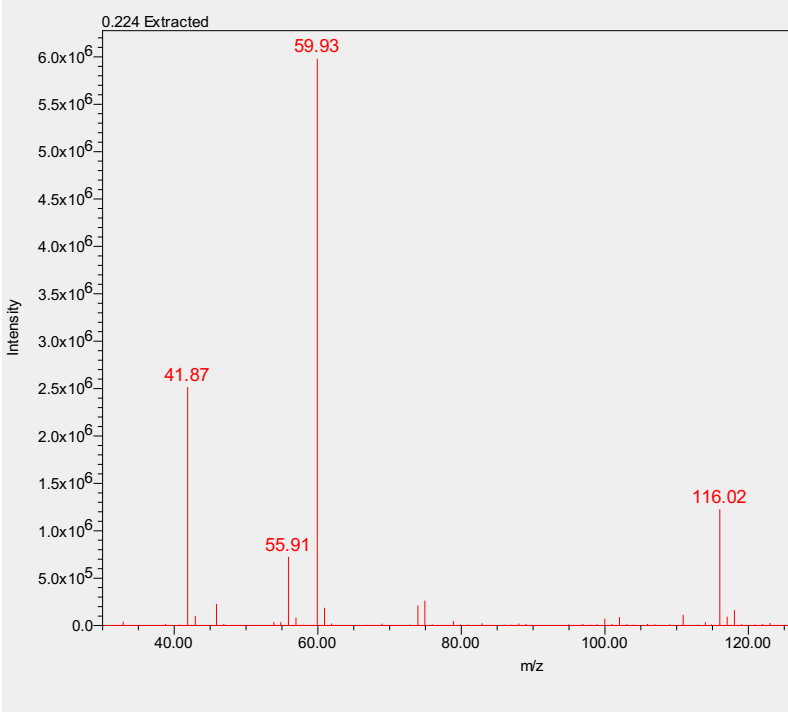
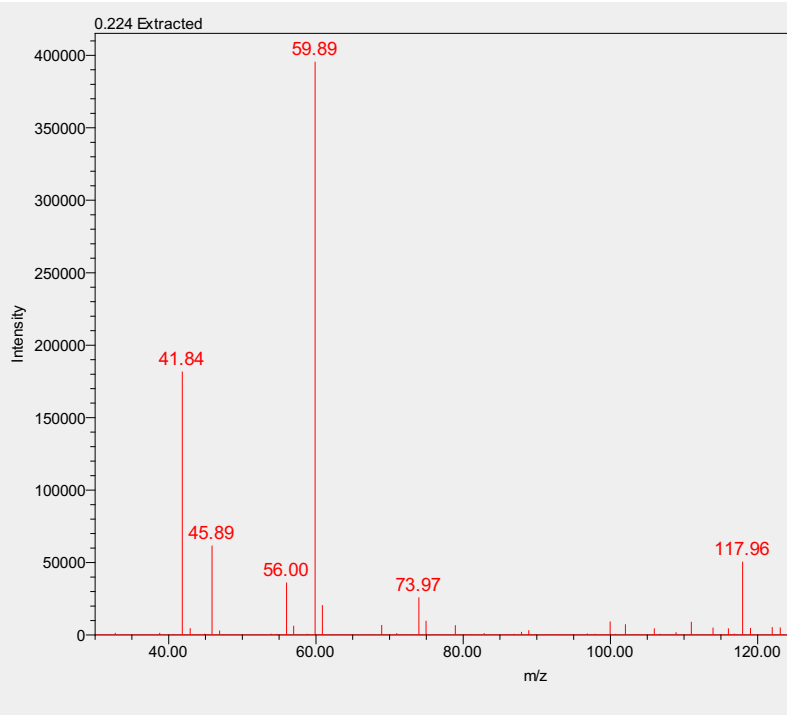
ESI +	Fase Móvel: H ₂ O:ACN:MeOH (70:15:15) Diluyente: 100% ACN														
Espetro de massa da amostra	 0.224 Extracted <table border="1"> <thead> <tr> <th>m/z</th> <th>Intensity (approx.)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>41.87</td> <td>2.5 × 10⁶</td> </tr> <tr> <td>55.91</td> <td>0.8 × 10⁶</td> </tr> <tr> <td>59.93</td> <td>6.0 × 10⁶</td> </tr> <tr> <td>116.02</td> <td>1.2 × 10⁶</td> </tr> </tbody> </table>	m/z	Intensity (approx.)	41.87	2.5 × 10 ⁶	55.91	0.8 × 10 ⁶	59.93	6.0 × 10 ⁶	116.02	1.2 × 10 ⁶				
m/z	Intensity (approx.)														
41.87	2.5 × 10 ⁶														
55.91	0.8 × 10 ⁶														
59.93	6.0 × 10 ⁶														
116.02	1.2 × 10 ⁶														
Espetro de massa do diluente	 0.224 Extracted <table border="1"> <thead> <tr> <th>m/z</th> <th>Intensity (approx.)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>41.84</td> <td>180,000</td> </tr> <tr> <td>45.89</td> <td>60,000</td> </tr> <tr> <td>56.00</td> <td>40,000</td> </tr> <tr> <td>59.89</td> <td>400,000</td> </tr> <tr> <td>73.97</td> <td>30,000</td> </tr> <tr> <td>117.96</td> <td>50,000</td> </tr> </tbody> </table>	m/z	Intensity (approx.)	41.84	180,000	45.89	60,000	56.00	40,000	59.89	400,000	73.97	30,000	117.96	50,000
m/z	Intensity (approx.)														
41.84	180,000														
45.89	60,000														
56.00	40,000														
59.89	400,000														
73.97	30,000														
117.96	50,000														

Tabela 4.16 - Espectros de massa da amostra e diluente para uma fase móvel constituída por H₂O, ACN e MeOH e diluente ACN (ESI -)

ESI -	Fase Móvel: H₂O:ACN:MeOH (70:15:15) Diluente: 100% ACN										
Espetro de massa da amostra	0.233 Extracted <table border="1"> <thead> <tr> <th>m/z</th> <th>Intensity</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>61.83</td> <td>~8,000</td> </tr> <tr> <td>68.94</td> <td>~65,000</td> </tr> <tr> <td>96.87</td> <td>~22,000</td> </tr> <tr> <td>112.84</td> <td>~90,000</td> </tr> </tbody> </table>	m/z	Intensity	61.83	~8,000	68.94	~65,000	96.87	~22,000	112.84	~90,000
m/z	Intensity										
61.83	~8,000										
68.94	~65,000										
96.87	~22,000										
112.84	~90,000										
Espetro de massa do diluente	0.233 Extracted <table border="1"> <thead> <tr> <th>m/z</th> <th>Intensity</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>61.85</td> <td>~30,000</td> </tr> <tr> <td>68.89</td> <td>~180,000</td> </tr> <tr> <td>96.87</td> <td>~50,000</td> </tr> <tr> <td>112.90</td> <td>~500,000</td> </tr> </tbody> </table>	m/z	Intensity	61.85	~30,000	68.89	~180,000	96.87	~50,000	112.90	~500,000
m/z	Intensity										
61.85	~30,000										
68.89	~180,000										
96.87	~50,000										
112.90	~500,000										

Tabela 4.17 - Espectros de massa da amostra e do diluente para uma fase móvel constituída por H₂O e MeOH e diluente ácido fórmico (ESI +)

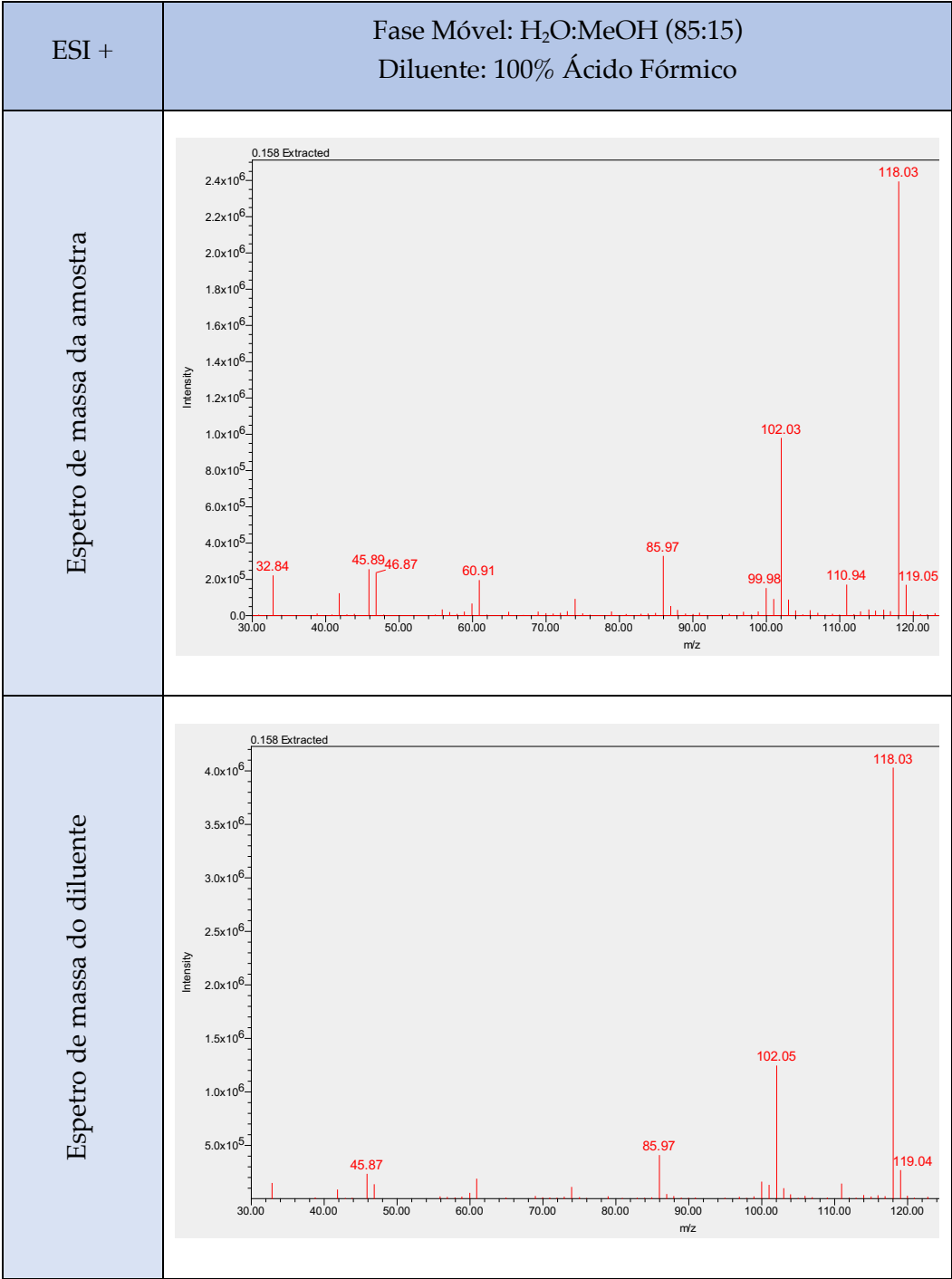


Tabela 4.18 - Espetros de massa da amostra e do diluente para uma fase móvel constituída por H₂O e MeOH e diluente ácido fórmico (ESI -)

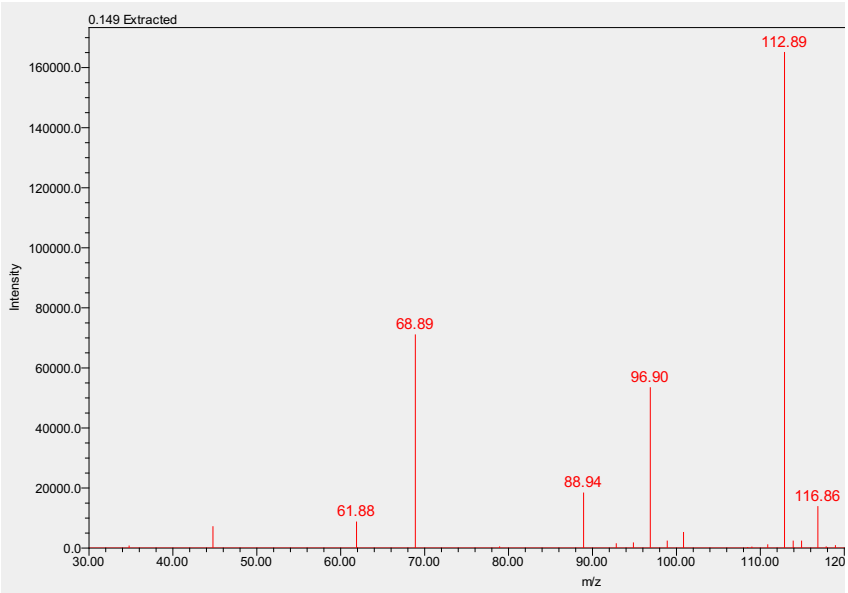
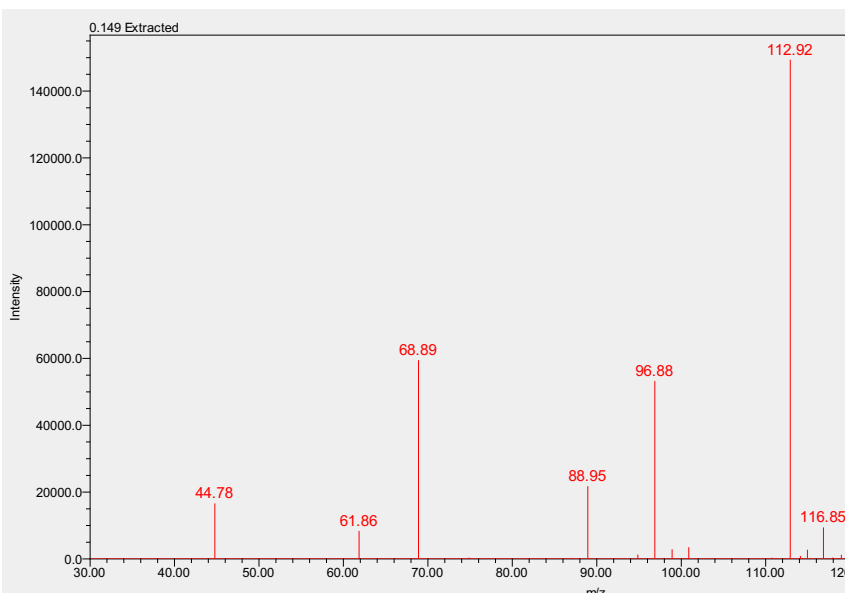
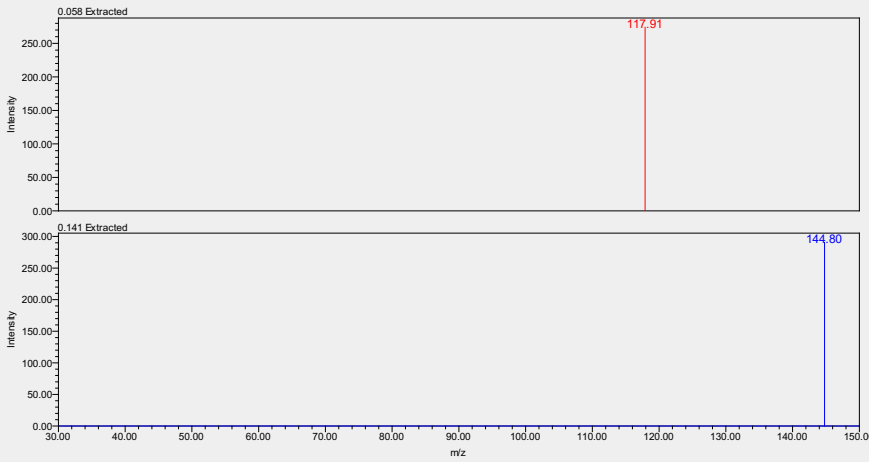
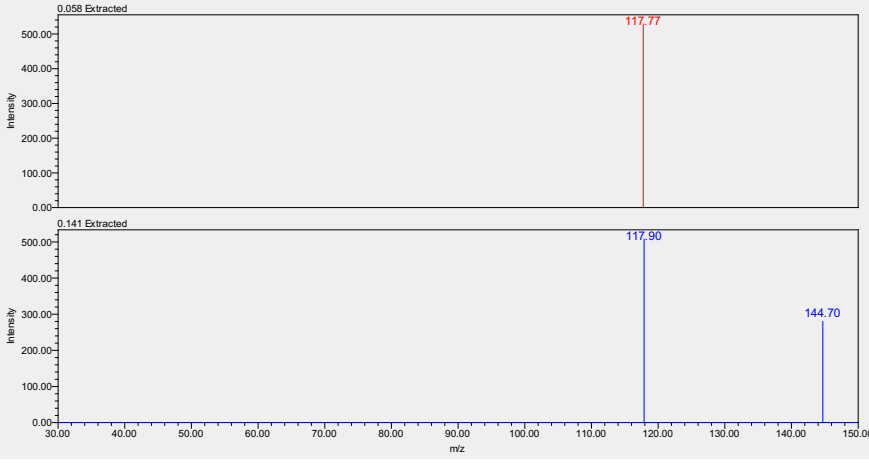
ESI -	Fase Móvel: H ₂ O:MeOH (85:15) Diluente: 100% Ácido Fórmico																
Espetro de massa da amostra	 0.149 Extracted <table border="1"> <thead> <tr> <th>m/z</th> <th>Intensity (approx.)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>61.88</td><td>10000</td></tr> <tr><td>68.89</td><td>70000</td></tr> <tr><td>88.94</td><td>20000</td></tr> <tr><td>96.90</td><td>50000</td></tr> <tr><td>112.89</td><td>160000</td></tr> <tr><td>116.86</td><td>15000</td></tr> </tbody> </table>	m/z	Intensity (approx.)	61.88	10000	68.89	70000	88.94	20000	96.90	50000	112.89	160000	116.86	15000		
m/z	Intensity (approx.)																
61.88	10000																
68.89	70000																
88.94	20000																
96.90	50000																
112.89	160000																
116.86	15000																
Espetro de massa do diluente	 0.149 Extracted <table border="1"> <thead> <tr> <th>m/z</th> <th>Intensity (approx.)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>44.78</td><td>15000</td></tr> <tr><td>61.86</td><td>10000</td></tr> <tr><td>68.89</td><td>60000</td></tr> <tr><td>88.95</td><td>20000</td></tr> <tr><td>96.88</td><td>50000</td></tr> <tr><td>112.92</td><td>140000</td></tr> <tr><td>116.85</td><td>10000</td></tr> </tbody> </table>	m/z	Intensity (approx.)	44.78	15000	61.86	10000	68.89	60000	88.95	20000	96.88	50000	112.92	140000	116.85	10000
m/z	Intensity (approx.)																
44.78	15000																
61.86	10000																
68.89	60000																
88.95	20000																
96.88	50000																
112.92	140000																
116.85	10000																

Tabela 4.19 - Espetros de massa da amostra e diluente para uma fase móvel e diluente constituídos por ACN

ESI +	Fase Móvel: 100% ACN Diluente: 100% ACN
Espetro de massa da amostra	
Espetro de massa do diluente	

Pela análise dos resultados, verifica-se que, independentemente da composição da fase móvel ou do diluente utilizado, existe uma sobreposição entre as massas registadas nos espectros da amostra e do diluente, o que evidencia a estabilidade do analito sob as condições experimentais aplicadas. Embora se pudesse admitir a possibilidade de perda do átomo de cloro ou a formação de um aducto, fenómenos estes comuns em ionização por *electrospray* (ESI), sobretudo em compostos voláteis, os dados obtidos sugerem que o cloreto de *terc*-butilo permanece inalterado, não sofrendo ionizações, nem fragmentações observáveis.

A ausência de sinal detetável para este composto por UHPLC-MS em modo ESI está associada às suas propriedades físico-químicas e ao próprio mecanismo de ionização característico desta técnica. Embora o cloreto de *tert*-butilo seja uma molécula polar devido à presença do átomo de cloro, este grupo, apesar de eletronegativo, não apresenta caráter ionizável nas condições experimentais utilizadas. Além disso, a molécula não contém grupos funcionais tipicamente ionizáveis, como aminas, ácidos carboxílicos ou hidroxilos, que facilitem a formação de espécies carregadas. Em ESI, a eficiência de ionização depende não apenas da simples adição ou remoção de prótons, mas também da capacidade da molécula de formar iões estáveis (por protonação, desprotonação ou formação de aductos). Assim, a ausência desses grupos funcionais limita a formação de iões detetáveis, justificando a ausência de resposta no espectro de massas.

Por fim, mesmo em condições de tentativa de derivatização espontânea, como o contacto com a água, onde poderia sofrer hidrólise, não se observam alterações no espectro de massa, o que reforça a ideia de que o composto, tal como introduzido no sistema, mantém a sua integridade química e não gera espécies ionizáveis por ESI. Esta técnica de ionização é particularmente eficaz para compostos polares ou iónicos em solução, que facilmente estabilizem como espécies carregadas.

4.4 DBAD

Mais uma vez, começou-se por efetuar um varrimento de massas moleculares com o intuito de procurar a razão m/z de 150, o que comprovaria a presença de DBAD na amostra de 7-HT a analisar (figura 4.36) e que esta deve ser a massa a procurar.

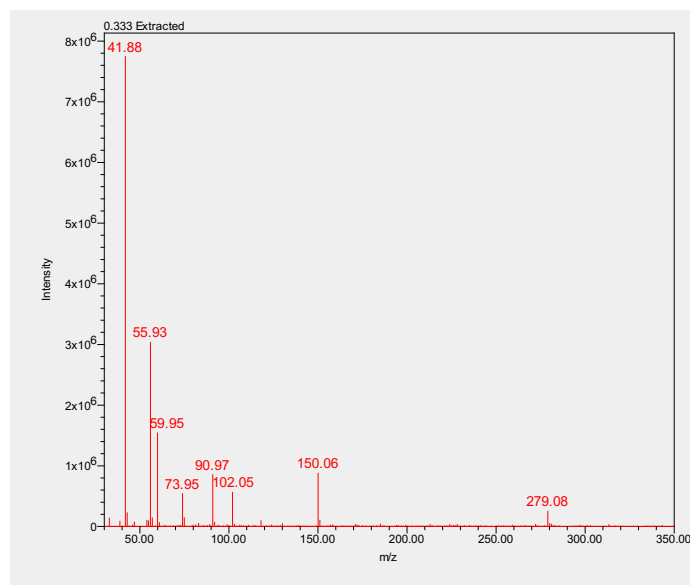


Figura 4.36 - Varrimento de massas para uma amostra de 7-HT

O m/z de 150 está de acordo com o esperado, na medida em que se prevê que o DBAD receba dois prótons, ou seja, $(298,29 + 2) / 2 = 150,29$, que é bastante próximo de 150,06, pelo que esta vai ser a massa procurada.

4.4.1 Impacto das condições cromatográficas

4.4.1.1 Diluente

Tendo por base testes de solubilidade realizados na Cipan, sabe-se que o DBAD é solúvel em ACN:H₂O (50:50), pelo que este vai ser o diluente selecionado nestes ensaios.

4.4.1.2 Fase Móvel

Através das conclusões retiradas dos ensaios anteriores, sabe-se que a acidificação da solução pela adição de ácido fórmico tende a aumentar a intensidade do sinal e a melhorar a estrutura do pico, especialmente nos casos em que o composto em estudo tende a protonar.

Na figura 4.37 observa-se o efeito da variação da concentração de ácido fórmico na fase móvel sobre o perfil cromatográfico do analito para duas injeções consecutivas de uma amostra contaminada com 200 μ L de solução de DBAD. As fases móveis testadas têm as seguintes composições:

- 70% (v/v) H₂O, 15% (v/v) MeOH, 15% (v/v) ACN, + 0,01 % (v/v) ácido fórmico
- 70% (v/v) H₂O, 15% (v/v) MeOH, 15% (v/v) ACN, + 0,04 % (v/v) ácido fórmico

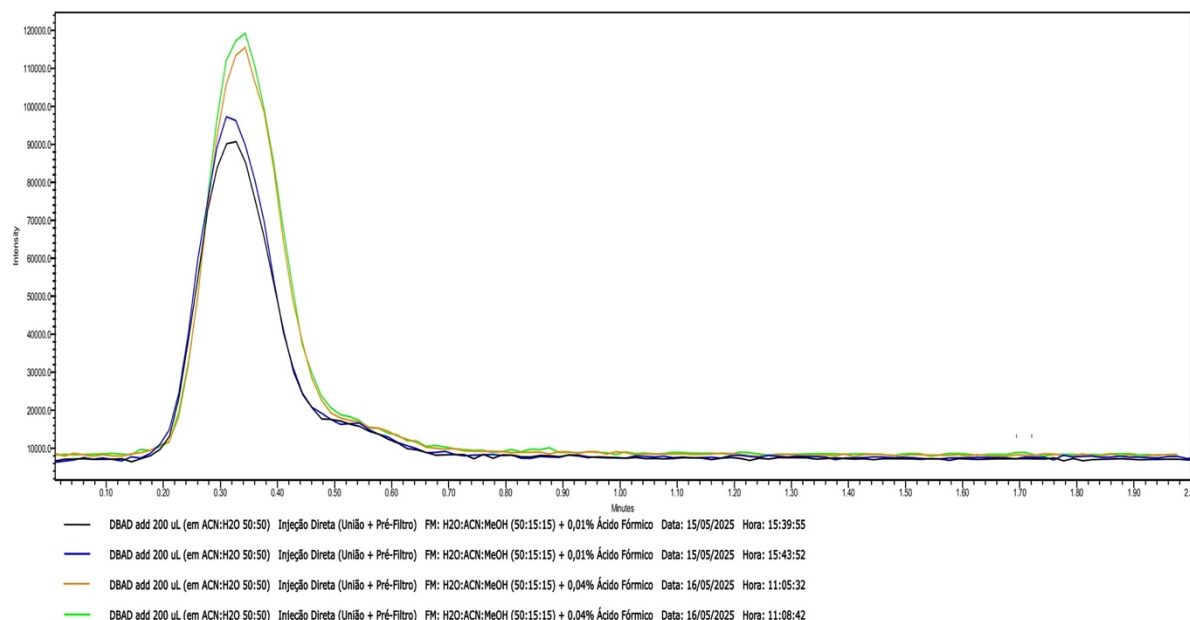


Figura 4.37 - Espetro - DBAD - Comparação do sinal obtido utilizando diferentes composições de fase móvel

A comparação entre os picos revela que a maior intensidade de sinal (maior área e altura) foi obtida com 0,04 % (v/v) de ácido fórmico (linhas verde e laranja), pelo que é esta a fase móvel selecionada para os ensaios seguintes. Este comportamento é consistente com a função do ácido fórmico como agente acidificante da solução e como promotor de protonação na fonte de ionização ESI. Uma maior concentração de ácido fórmico pode aumentar a eficiência de ionização do analito, melhorando a sensibilidade e o sinal detetado.

4.4.1.3 Tempo entre preparação e injeção de amostras

A figura 4.38 apresenta as curvas de calibração obtidas para amostras injetadas imediatamente após a sua preparação e após um período de espera de 2 horas.

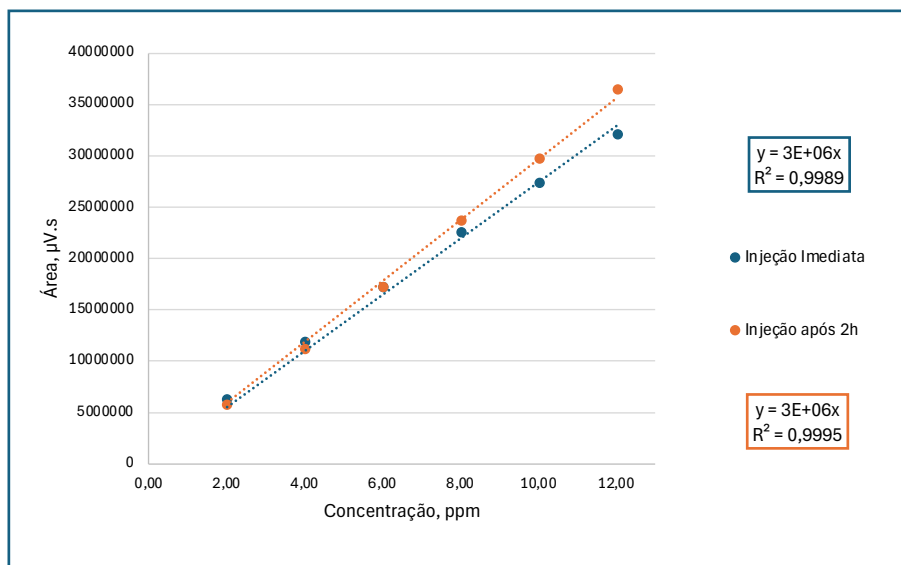


Figura 4.38 - DBAD - Área Vs. Conc. - Impacto do tempo entre a preparação e a injeção das amostras

Ambas as curvas exibem coeficientes de determinação superiores a 0,99 ($R^2 = 0,9989$ e $R^2 = 0,9995$, respectivamente). Observa-se, no entanto, que as amostras injetadas após 2 horas apresentam sistematicamente áreas de pico ligeiramente superiores às injetadas de forma imediata. Esta diferença, embora subtil, pode dever-se a uma maior estabilização do analito com o tempo ou a uma evaporação parcial do solvente (levando a um aumento da concentração efetiva). Apesar disso, a similaridade entre os declives e a obtenção de linearidade indicam que o método permanece confiável. Ainda assim, recomenda-se a padronização do tempo entre a preparação e a injeção, de modo a garantir a consistência e comparabilidade dos resultados analíticos.

4.4.1.4 Ordem de Injeção das Amostras

Novamente, verifica-se que a ordem de injeção das amostras (em concentração crescente, em concentração decrescente ou aleatoriamente) continua a ter impacto na obtenção de linhas de ajuste polinomiais ao invés de lineares.

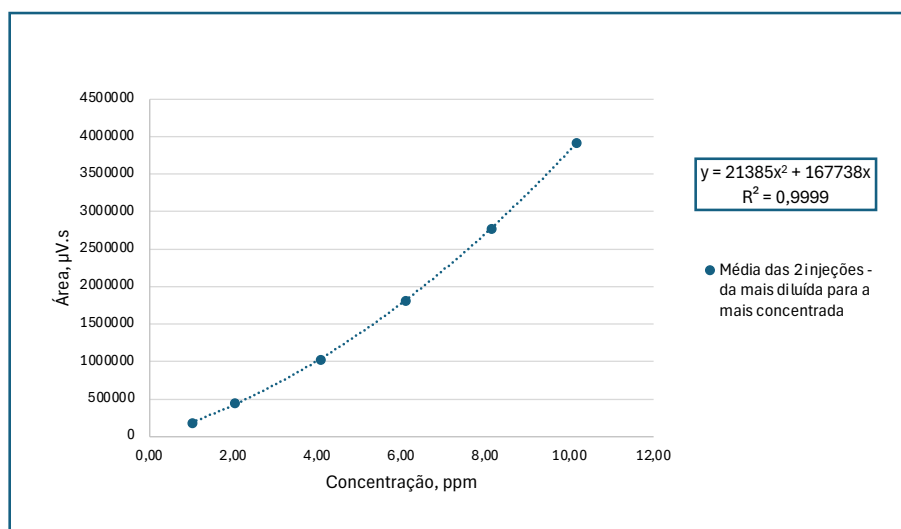


Figura 4.39 - Área Vs. Vol.ad. DBAD – Injeção das amostras sem diluentes intercalados

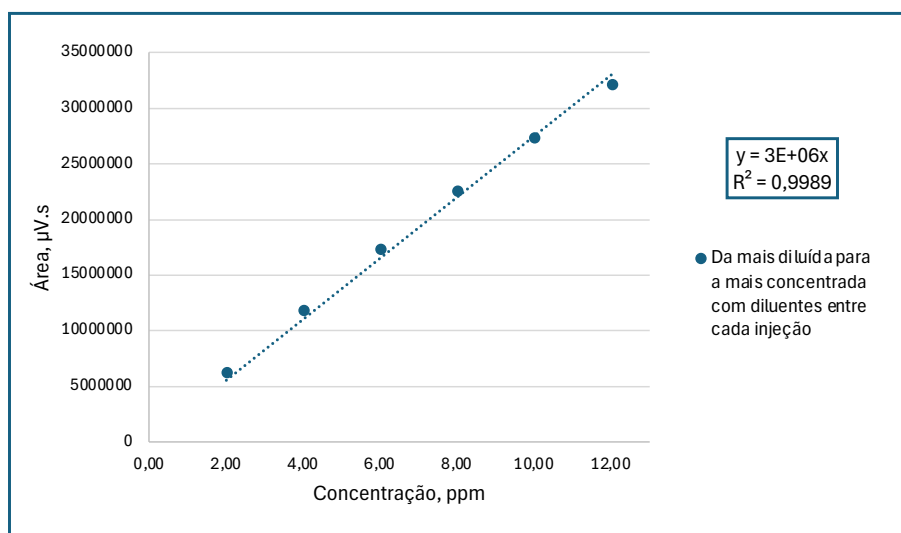


Figura 4.40 - Área Vs. Vol.ad. DBAD – Injeção das amostras com diluentes intercalados

As figuras que se seguem representam linearidades com injeções por ordem crescente de concentração de analito, sendo que as da figura 4.39 correspondem a injeções de forma sucessiva e as da figura 4.40 intercaladas com a injeção de um diluente.

A tendência polinomial observada de forma consistente em todos os compostos analisados indica que a sua origem está associada ao funcionamento do próprio equipamento cromatográfico, e não às propriedades físico-químicas de um composto específico.

A eliminação desta tendência ao intercalar injeções de amostras com diluentes sugere uma lavagem insuficiente da agulha do sistema. Em condições ideais, este tipo de contaminação cruzada não deveria ocorrer, o que reforça a hipótese de que a limpeza automática da agulha não está a ser suficientemente eficaz. A injeção do diluente, ao atuar como uma lavagem adicional, serve como uma etapa de mitigação, reduzindo os resíduos de analito da amostra anterior e, consequentemente, o desvio na resposta analítica.

A elevada sensibilidade do detetor utilizado, superior à de detetores tradicionais, pode contribuir para a amplificação deste efeito, tornando mais evidente qualquer resíduo deixado pela amostra anterior.

4.4.1.5 Voltagem do Cone (*Cone Voltage*)

A voltagem do cone é um parâmetro crítico que influencia a eficiência da ionização e a estabilidade dos iões gerados na interface entre a fonte de ionização ESI e o detetor de massa. Este potencial elétrico é aplicado entre o capilar e o orifício de entrada do cone, controlando a energia com que os iões entram no sistema.

A alteração da voltagem do cone pode ter efeitos significativos no espectro obtido: valores baixos tendem a preservar os iões moleculares intactos, favorecendo a detecção do ião precursor, enquanto valores mais elevados promovem a fragmentação na fonte, resultando na formação de outros iões. Voltagens excessivamente altas podem levar à perda de sinal do analito de interesse ou à formação de fragmentos não específicos, comprometendo a sensibilidade e a seletividade da análise.

Assim, a otimização da voltagem do cone é essencial para equilibrar a estabilidade dos iões e a sensibilidade da detecção, dependendo do objetivo analítico pretendido.

Nos diversos ensaios realizados, o valor fixado para a voltagem do cone foi de 15 V. Contudo, observou-se que, para além da quantidade vestigial de DBAD presente na amostra de 7-HT, é também detetado, em simultâneo, um fragmento da própria molécula de 7-HT com uma razão m/z idêntica à do ião protonado de DBAD. Tal não permite uma distinção inequívoca entre os sinais no cromatograma. Perante esta limitação, torna-se necessário tentar reduzir a voltagem do cone com o objetivo de minimizar a fragmentação na fonte da molécula de 7-HT, prevenindo assim a formação do fragmento em questão e permitindo uma identificação mais precisa do DBAD residual.

Para isso, testaram-se três voltagens do cone distintas (5, 10 e 15 V) para uma amostra com e sem adição de solução de DBAD (*spiked*). Estes resultados encontram-se apresentados na figura 4.41.

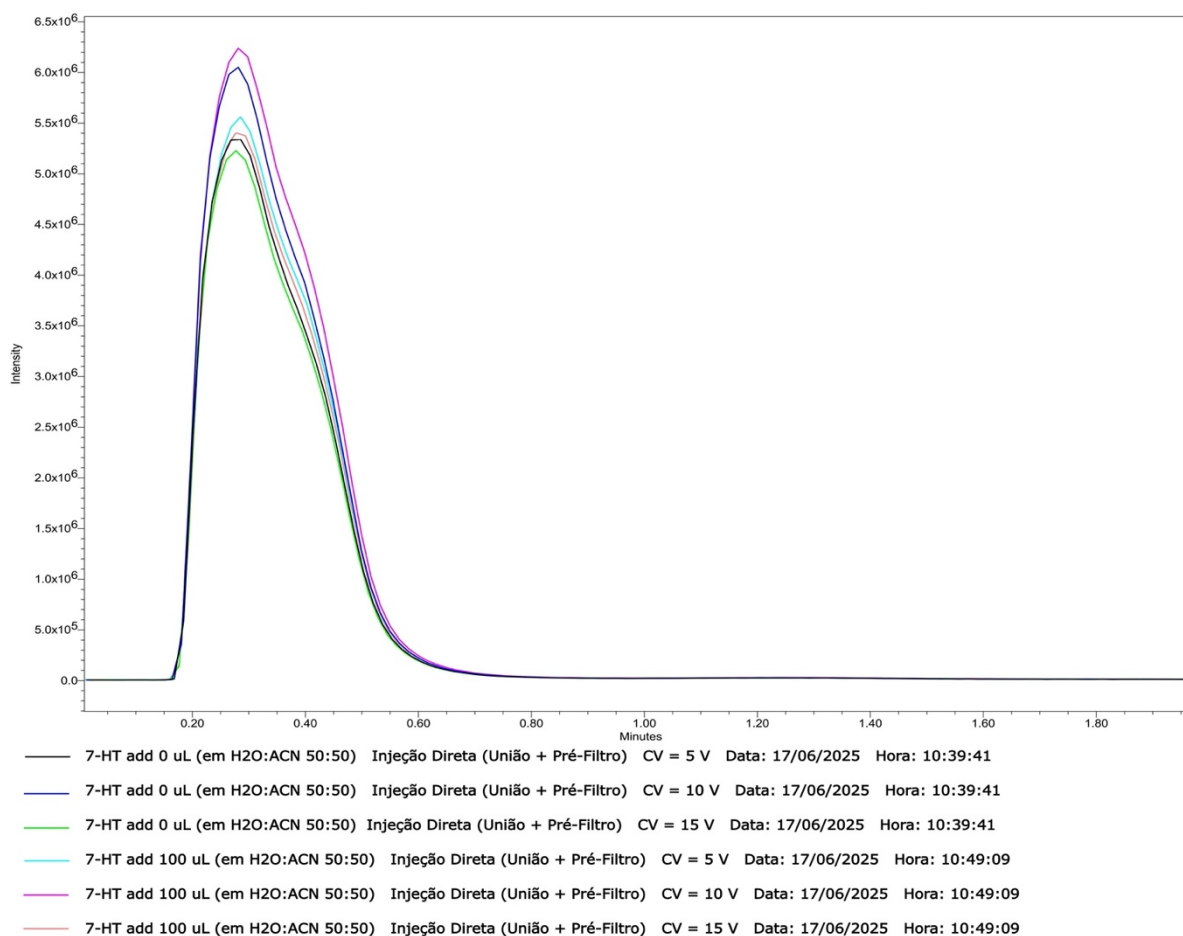


Figura 4.41 - Espetro - DBAD - Impacto da voltagem do cone ("Cone Voltage")

Tal como é possível constatar através da análise da figura anterior, a voltagem do cone de 10 V potencia a intensidade do sinal, tanto para a amostra sem contaminação, como para a amostra com contaminação. No entanto, as alterações introduzidas neste parâmetro não resultaram em diferenças significativas no perfil do pico observado, na medida em que, com esta variação, se pretendia detetar apenas o DBAD vestigial presente no 7-HT através da não fragmentação da molécula. Tal resultado indica que não é possível evitar a formação do fragmento resultante da molécula de 7-HT com razão m/z 150, o que compromete a seletividade da deteção e impossibilita a distinção clara entre este fragmento e o DBAD vestigial.

4.4.1.6 Efeito Matriz

A partir da mesma solução-mãe de DBAD, traçaram-se duas linearidades em diferentes matrizes: a laranja, que corresponde ao DBAD adicionado a soluções cloridrato de minociclina; e a azul, que corresponde ao DBAD adicionado à solução de ACN:H₂O (50:50), tal como mostra a figura 4.42.

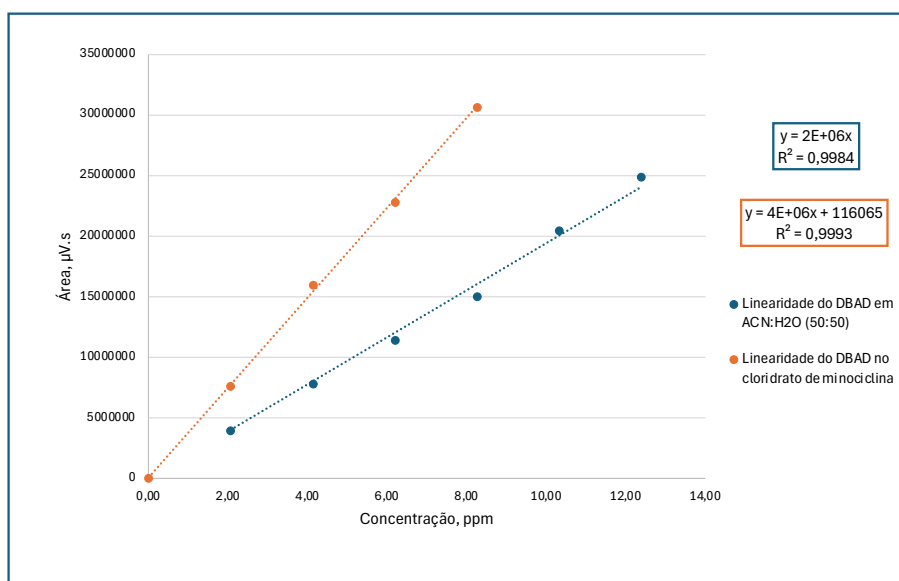


Figura 4.42 - Representação gráfica do efeito matriz - DBAD

Mais uma vez, verifica-se a presença do efeito matriz, uma vez que as retas de calibração obtidas não são paralelas entre si. Logo, recorre-se ao método de adição padrão em vez do método de padrão externo para compensar as interferências da matriz e garantir uma quantificação mais exata do DBAD no produto em questão.

4.4.2 Pré-Validação do Método

Com base no estudo do impacto das alterações dos parâmetros analíticos descritos, definiu-se o método analítico para este composto, apresentado na tabela 4.20.

Tabela 4.20 - Condições cromatográficas do método analítico do DBAD

Parâmetros	Condições
Coluna	Injeção direta + pré-filtro
Volume de Injeção	10 μ L
Fluxo	0,5 mL/min
Modo de Eluição	Isocrático
Tempo de Corrida	2 min
Temperatura da Coluna	27 °C
Temperatura do Injetor Automático	10 °C
Fase Móvel	H ₂ O:ACN:MeOH + Ác. Fórmico, 70:15:15 + 0,04% (v/v)
Diluyente	ACN:H ₂ O (50:50)
Voltagem do Cone	CV = 20 V
Intervalo MS Scan	30-300 Da
Tipo de Scan	SIR 150 Da
ESI	Positivo

4.4.2.1 Especificidade/Seletividade

Para averiguar a seletividade do método, recorre-se ao espetro de massas, na ionização positiva, de uma amostra de 7-HT contaminada com DBAD apresentado (figura 4.43 a)) e ao de uma amostra de diluente (figura 4.43 b)).

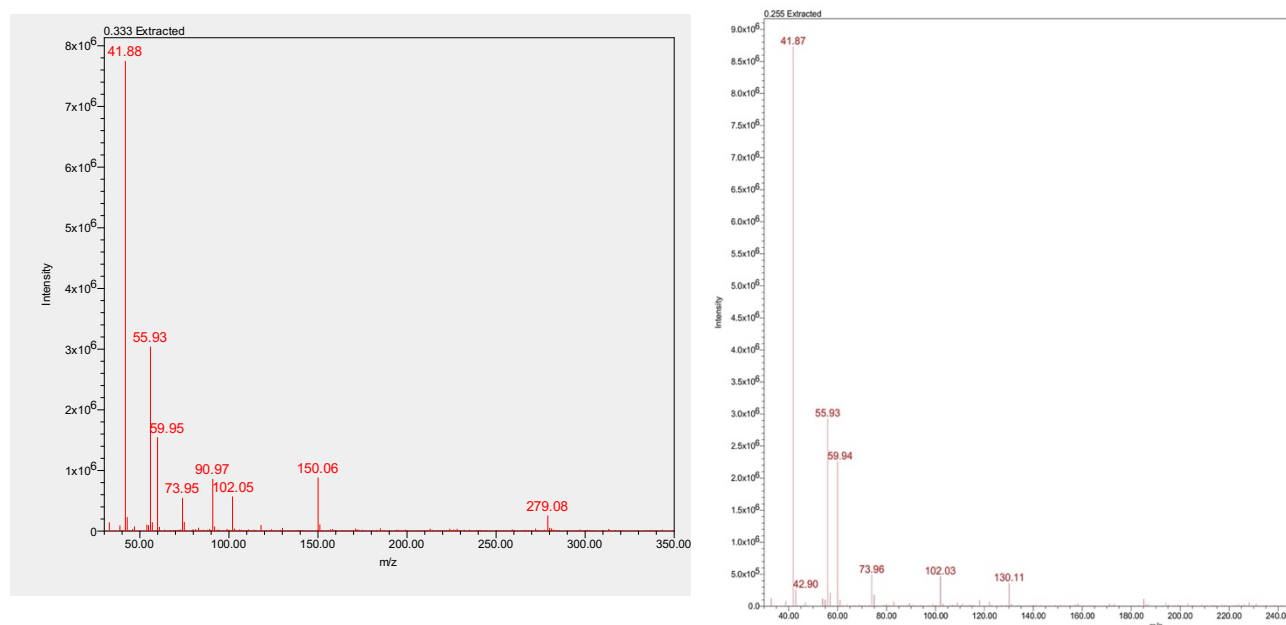


Figura 4.43 - Varrimento de massas para amostra de produto contaminada com DBAD a) e de diluente b)

Apesar de a razão m/z 150,06 ser bem visível, corresponder ao valor expectável e não se registar no diluente, a elevada intensidade deste pico demonstra que não se trata de uma impureza residual no 7-HT, conforme inicialmente previsto. Tal como referido anteriormente, existe um fragmento deste composto que apresenta a mesma razão m/z , o que confirma que o método não é específico para a quantificação de DBAD no 7-HT. Assim, a quantificação de DBAD apenas poderá ser realizada no cloridrato de minociclina, sendo que só faz sentido validar o método para este produto.

4.4.2.2 Linearidade

Para avaliar a linearidade do método, foram preparadas seis soluções a partir de uma mesma solução-mãe, no caso do DBAD no 7-HT e cinco soluções no caso do DBAD no cloridrato de minociclina, sendo que cada uma delas foi injetada duas vezes. Embora o método não seja específico para a quantificação do analito no 7-HT, optou-se por apresentar que, ainda assim, é possível traçar uma linearidade. A partir das tabelas 4.21 e 4.22, construíram-se os gráficos da área de integração do pico em função do volume adicionado, que constam nas figuras 4.44 e 4.45, bem como o respetivo ajuste linear.

Tabela 4.21 - Linearidade - DBAD no 7-HT

Concentração do adicionado, ppm	0	2,01	4,01	6,02	8,02	10,03
Volume Adicionado, μL	0	100	200	300	400	500
Fator de Diluição	0	10 000	5 000	3 333	2 500	2 000
Média das áreas, $\mu V.s$	70 991 940	78 898 236	87 142 705	96 614 451	105 460 529	112 666 180

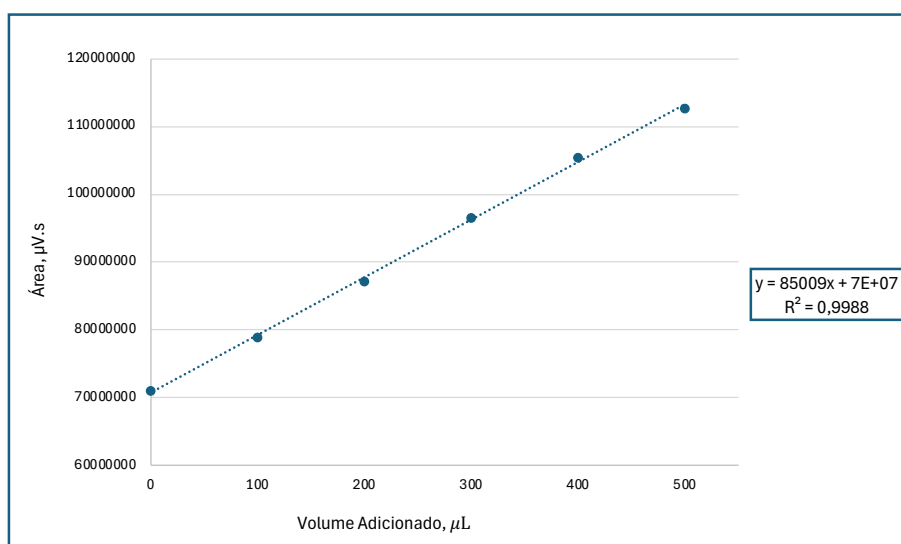


Figura 4.44 - Linearidade - DBAD no 7-HT

Tabela 4.22 - Linearidade - DBAD no Cloridrato de Minociclina

Concentração do adicionado, ppm	0	2,07	4,13	6,20	8,26
Volume Adicionado, μL	0	100	200	300	400
Fator de Diluição	0	10 000	5 000	3 333	2 500
Média das áreas, $\mu V.s$	0	7 619 338	15 978 708	22 799 338	30 637 056

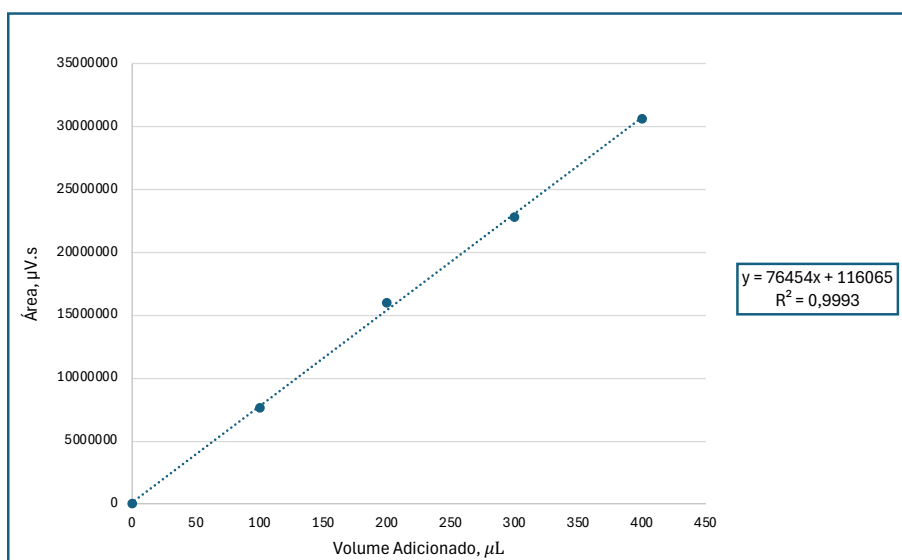


Figura 4.45 - Linearidade - DBAD no cloridrato de minociclina

Como o coeficiente de correlação é superior a 0,99 para o ajuste linear, conclui-se que o método tem potencial para gerar valores de áreas de integração dos picos diretamente proporcionais à concentração de analito ou volume adicionado do mesmo. No entanto, para confirmar a linearidade e como o ajuste polinomial também resulta num coeficiente superior a 0,99, recorre-se a outros testes estatísticos, como a análise de resíduos e o teste de Mandel.

Análise de Resíduos:

A representação gráfica dos resíduos em função da concentração encontra-se apresentada na figura 4.46. No apêndice C.2 estão detalhados os cálculos feitos.

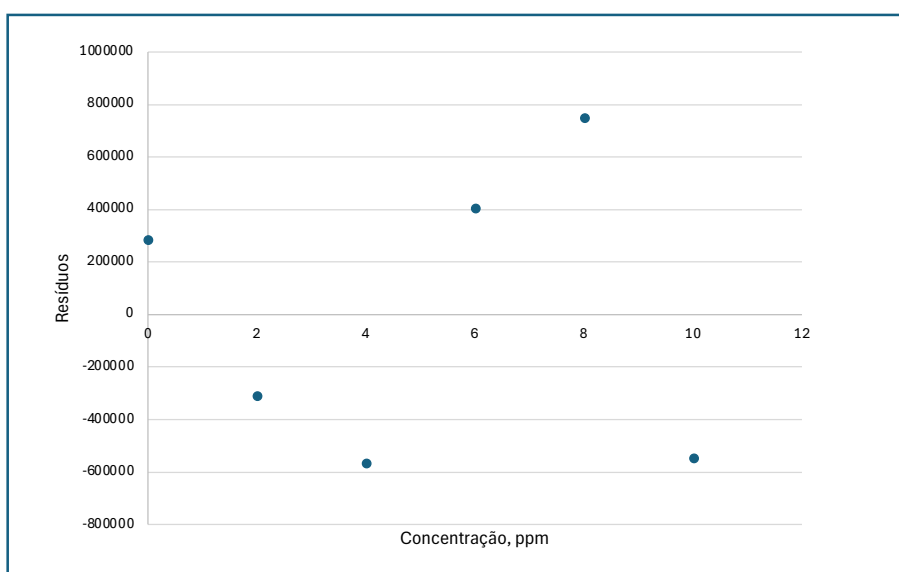


Figura 4.46 - Análise de Resíduos - DBAD no 7-HT

Tal como se pode constatar a partir da figura anterior, os pontos distribuem-se de aleatoriamente, confirmando a linearidade do método. A subjetividade associada a uma análise gráfica dos resíduos faz com seja aconselhável recorrer também ao teste de Mandel.

Teste de Mandel:

Determinaram-se os parâmetros necessários ao teste de Mandel, de acordo com as equações 3.13 a 3.16, encontrando-se os resultados na tabela 4.23. No apêndice C.2 estão detalhados os cálculos feitos.

Tabela 4.23 - Parâmetros do teste de Mandel - DBAD no 7-HT

Parâmetro	Resultado
$S_{y/x}$	616 660
S_{y2}	1 154 974
DS^2	$-2,48 \times 10^{12}$
PG	-1,86
F (5%, 1, 3)	10,1

Ao analisar a tabela anterior, tem-se que $PG \leq F$, logo a gama de trabalho selecionada está compreendida numa zona de linearidade.

4.4.2.3 Precisão

Repetibilidade

Na tabela 4.24 estão apresentadas as áreas obtidas para cada uma das três injeções consecutivas e para cada amostra de concentração distinta (alta, média e baixa) e, ainda, o valor de desvio padrão relativo (RSD%) correspondente.

Tabela 4.24 - Repetibilidade do método do DBAD no cloridrato de minociclina

Concentração do contaminado	Área ($\mu V.s$) Injeção 1	Área ($\mu V.s$) Injeção 2	Área ($\mu V.s$) Injeção 3	RSD %
Baixa (4,1 ppm)	16 071 170	15 886 245	15 736 739	0,82
Média (6,2 ppm)	23 043 319	22 555 357	22 332 913	1,51
Alta (8,3 ppm)	30 764 096	30 510 016	30 489 125	0,59

Os RSD % obtidos para as diferentes concentrações são inferiores ao limite definido como limiar da repetibilidade (2%), verificando-se a repetibilidade do método. [59]

O gráfico da figura 4.47 ilustra a repetibilidade que se verifica a partir de duas injeções consecutivas no caso do método do DBAD aplicado ao produto cloridrato de minociclina.

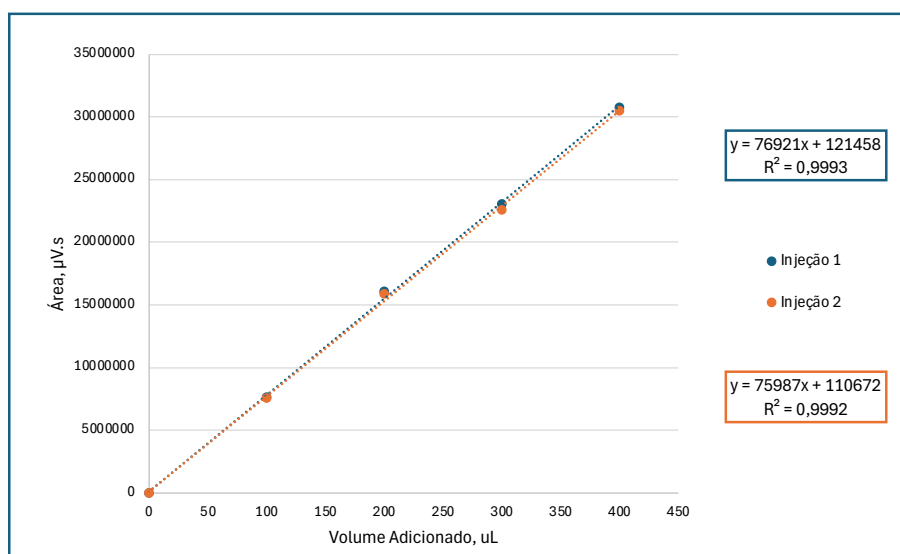


Figura 4.47 - Repetibilidade de linearidade do DBAD no Cloridrato de Minociclina

Precisão Intermédia

A tabela 4.25 apresenta os resultados da avaliação da precisão intermédia do método analítico desenvolvido para o DBAD, com base em análises realizadas em dois dias distintos e para três concentrações diferentes (4,1, 6,2 e 8,2 ppm).

Tabela 4.25 - Precisão Intermédia do método do DBAD no cloridrato de minociclina

Concentração do adicionado	Dias	Área (µV.s) Média das Injeções	RSD %
4,1 ppm	Dia 1	1 029 685	4,37
	Dia 2	967 975	
6,2 ppm	Dia 1	1 818 934	5,02
	Dia 2	1 953 015	
8,2 ppm	Dia 1	2 981 954	4,98
	Dia 2	2 778 932	

De acordo com as diretrizes da ICH Q2(R1), considera-se que a precisão intermédia é aceitável quando o RSD é inferior ou igual a 5% para métodos de quantificação em níveis moderados a altos. Assim, os resultados obtidos de RSD % obtidos demonstram que o método é reprodutível em dias distintos, cumprindo os critérios estabelecidos e comprovando a confiabilidade do procedimento analítico para quantificação do DBAD. [59]

Reprodutibilidade

Como o estudo da reprodutibilidade engloba uma variabilidade dos resultados interlaboratorial e interanalista, este parâmetro não foi averiguado.

4.4.2.4 Limites de Detecção e Quantificação

Na tabela 4.26 são apresentados os resultados obtidos de LoD e LoQ no caso do método do DBAD aplicado à quantificação de cloridrato de minociclina. Foram utilizadas as equações 3.10 e 3.11 presentes na subsecção 3.7.3.

Tabela 4.26 - Limites de Detecção e Quantificação - DBAD

Produtos	Cloridrato de Minociclina
Erro padrão da regressão	384 631
Declive	3 813 121
LoD	0,33 ppm
LoQ	1,01 ppm

Os valores de LoD (0,33 ppm) e LoQ (1,01 ppm) evidenciam, respetivamente, os limites mínimos para detecção e quantificação a partir dos quais é confiável detetar e quantificar, respetivamente, o DBAD no cloridrato de minociclina. Estes resultados demonstram que o método apresenta sensibilidade compatível com os requisitos para análise de traços do produto, sendo adequado para aplicações em estudos farmacêuticos.

4.4.3 Quantificação pelo Método de Adição Padrão

No que respeita ao composto DBAD, não foi possível proceder à sua quantificação no intermediário 7-HT, uma vez que a razão massa/carga (m/z) de 150, atribuída ao DBAD vestigial, é também partilhada por um fragmento da própria molécula de 7-HT, gerado durante o processo de ionização. Esta coincidência de m/z compromete a seletividade da detecção, impedindo a distinção clara entre o DBAD residual e os fragmentos naturais do 7-HT. Assim, qualquer sinal detetado neste intervalo não pode ser atribuído exclusivamente ao DBAD, inviabilizando a sua quantificação precisa nesta matriz com os parâmetros atualmente definidos.

Por último, procede-se à quantificação do DBAD no cloridrato de minociclina com recurso à figura 4.48. O ponto laranja diz respeito ao zero da função.

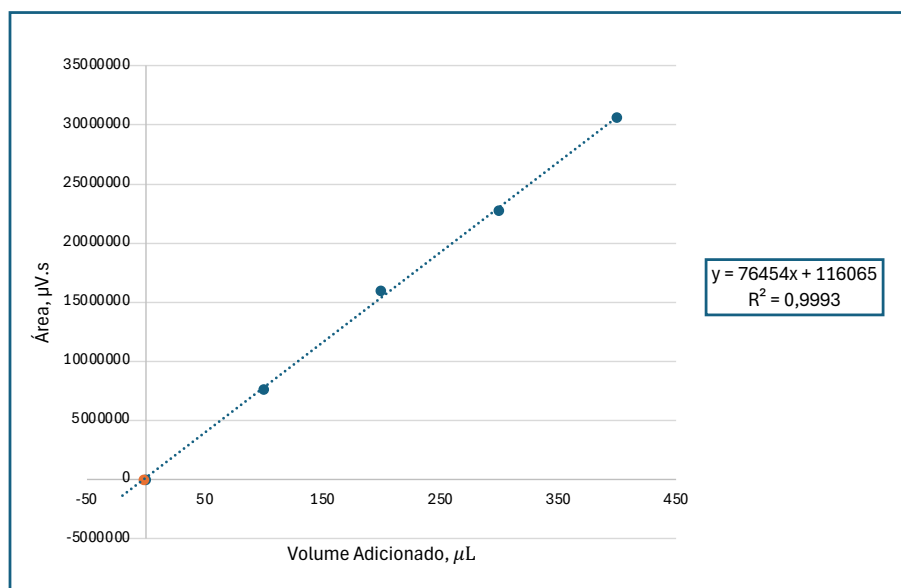


Figura 4.48 - Método de Adição Padrão – Quantificação de DBAD no Cloridrato de Minociclina

Na tabela 4.27 encontram-se apresentados os parâmetros calculados para a quantificação de DBAD no cloridrato de minociclina.

Tabela 4.27 - Quantificação do DBAD no Cloridrato de Minociclina

Parâmetros	Cloridrato de Minociclina
X (y=0), µL	- 1,52
DBAD em 9 mL de solução de produto, mg	0,000628
DBAD em 100 mL de solução de produto, mg	0,00349
% (m DBAD/m Cloridrato de Minociclina)	0,0069 (<LoQ)

Pela análise da tabela anterior, constata-se que a % m/m de DBAD no cloridrato de minociclina calculada (0,0069) está muito abaixo da especificação máxima permitida de 0,1% (m/m), atendendo aos critérios de qualidade estabelecidos. É importante referir que estes valores se encontram abaixo do limite de quantificação do método e, por isso, devem ser considerados apenas como aproximados. Nessa faixa de concentração, a variabilidade analítica é maior, o que reduz a confiabilidade absoluta dos resultados, embora não comprometa a conclusão de que os teores residuais de DBAD são baixos.

CONCLUSÃO E PROPOSTAS DE TRABALHO FUTURO

Os resultados obtidos ao longo deste trabalho demonstraram o potencial da técnica UHPLC-MS na detecção e quantificação de impurezas, nomeadamente o ácido oxálico, o EDTA e o DBAD em matrizes químicas complexas. Já em relação aos cloretos de alquila, não foi possível analisá-los por ESI-MS. Verificou-se que, com a otimização dos parâmetros analíticos, como a composição da fase móvel e do diluente, o tempo entre a preparação e a injeção e a presença de coluna cromatográfica, foi possível desenvolver métodos analíticos com respostas analíticas consistentes e reprodutíveis, mesmo para compostos com características químicas muito distintas.

Apesar de não ter sido realizada uma validação completa dos métodos analíticos, os ensaios de pré-validação efetuados, centrados em parâmetros como a especificidade, a linearidade, a precisão e os limites de detecção e quantificação, indicam que os métodos possuem potencial para serem implementados em contextos reais de controlo de qualidade e investigação, em particular na indústria farmacêutica, na qual a detecção de impurezas em níveis vestigiais é crítica para garantir a conformidade regulatória e a segurança dos produtos finais.

A aplicação do método de adição padrão revelou-se eficaz para compensar efeitos-matriz existentes, sendo particularmente relevante na quantificação de impurezas presentes em baixa concentração em amostras complexas ou provenientes de processos de fabrico de fármacos. A análise da linearidade da resposta dos analitos permitiu identificar intervalos de concentração apropriados para uma quantificação precisa, contribuindo para a fiabilidade do método.

Outro aspeto relevante observado ao longo deste trabalho prende-se com a tendência de ionização dos analitos em função do pH da fase móvel. Verificou-se que compostos com tendência a protonar, como o EDTA, apresentam melhor resposta analítica em fases móveis ácidas. Por outro lado, compostos com tendência a desprotonar, como o ácido oxálico, beneficiam de fases móveis não tão ácidas. Esta relação entre as propriedades ácido-base dos analitos e o pH da fase móvel é fundamental para otimizar a sensibilidade do método e deve ser cuidadosamente considerada no desenvolvimento de métodos em LC-MS.

Outro fator que se revelou crítico para a fiabilidade dos resultados foi o tempo decorrido entre a preparação das amostras e a injeção das mesmas, uma vez que certos compostos podem sofrer degradação ou reagir com o material dos *vials* ao longo do tempo. Em contrapartida, pode verificar-se que este tempo de repouso estabiliza a resposta. Assim, torna-se evidente a importância de estudar e controlar este parâmetro, estabelecendo um intervalo de tempo ideal

entre a preparação e a análise, garantindo a reprodutibilidade dos resultados e prevenindo alterações que comprometam a exatidão da quantificação.

A presença de coluna cromatográfica mostrou-se igualmente determinante no comportamento analítico dos compostos estudados. A interação entre o analito e a fase estacionária da coluna pode afetar significativamente a intensidade da resposta, uma vez que influencia o tempo de retenção, a forma do pico e o nível de separação face a potenciais interferentes da matriz. Por outro lado, para compostos como o EDTA, observou-se uma diminuição da resposta analítica, provavelmente devido à eluição precoce. Nestes casos, a passagem rápida do analito para a fonte de ionização pode reduzir a eficiência de ionização, comprometendo a formação de iões detetáveis. Assim, a seleção criteriosa da coluna, tendo em conta as características do analito é essencial para maximizar o desempenho do método.

Embora os objetivos desta dissertação tenham sido em grande parte cumpridos, a investigação realizada abre caminho para diversas linhas de estudo futuro. Em primeiro lugar, recomenda-se a validação completa dos métodos desenvolvidos, incluindo estudos de exatidão e robustez, de forma a consolidar a aplicabilidade dos métodos desenvolvidos.

Na sequência do impacto da ordem de injeção e da injeção de um diluente entre as injeções de cada amostra nos resultados obtidos, seria relevante variar a composição da solução de lavagem da agulha do injetor automático, já que esta pode influenciar a remoção eficaz de resíduos de amostras anteriores, sendo determinante na redução de efeitos de *carryover*.

Adicionalmente, seria pertinente explorar a utilização de diferentes tipos de colunas cromatográficas, de forma a entender como estas afetam a capacidade de deteção de compostos com diferentes polaridades, massas moleculares e complexidades estruturais. A variação da temperatura da coluna cromatográfica poderia ser igualmente interessante, uma vez que esta pode influenciar a eficiência da separação e a sensibilidade do método analítico.

Para além destes aspetos, seria igualmente relevante aprofundar mais o estudo de outras classes de impurezas críticas no contexto da síntese de API's, como os compostos genotóxicos e mutagénicos, cujo controlo rigoroso é fundamental devido ao seu potencial impacto na segurança do paciente, e as substâncias com elevada persistência ambiental, que levantam preocupações acrescidas em termos de sustentabilidade e regulamentação. A inclusão destas categorias de impurezas não só aumentaria a abrangência da avaliação analítica, como também alinharia a investigação com as exigências atuais das autoridades regulatórias e com as boas práticas de desenvolvimento sustentável na indústria farmacêutica.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Apifarma, «Anos 1960: Desenvolvimento, exportação e esboço de reorganização». Acedido: 6 de Junho de 2025. Disponível em: <https://apifarma.pt/timeline/>
- [2] L. Pinto, «Grupo foi fundado por Sebastião Alves em 1963 | Empresas | PÚBLICO». Acedido: 6 de Junho de 2025. Disponível em: <https://www.publico.pt/2016/09/07/economia/noticia/o-grupo-fundado-por-sebastiao-alves-1743377>
- [3] Suanfarma, «Cipan by Suanfarma | Leaders in Pharmaceutical Manufacturing». Acedido: 6 de Junho de 2025. Disponível em: <https://www.suanfarma.com/cipan/>
- [4] APQuímica, «Cipan Companhia Produtora de Antibióticos - Diretório de Empresas Industriais». Acedido: 6 de Junho de 2025. Disponível em: <https://www.portal-apquimica.pt/pt/diretorio/empresas-industriais/cipan-companhia-produtora-de-antibioticos-sa>
- [5] M. Dong, «The Essence of Modern HPLC: Advantages, Limitations, Fundamentals, and Opportunities», *LCGC North America*, vol. 31, n. 6, pp. 472–479, 2013, Acedido: 8 de Julho de 2025. Disponível em: <https://www.chromatographyonline.com/view/essence-modern-hplc-advantages-limitations-fundamentals-and-opportunities>
- [6] «Chelating Agents: Properties, Types, Applications». Acedido: 9 de Junho de 2025. Disponível em: <https://scienceinfo.com/chelating-agents-properties-applications/>
- [7] «Chelating Agent». Acedido: 9 de Junho de 2025. Disponível em: <https://www.corrosionpedia.com/definition/254/chelating-agent>
- [8] Cipan, «C290RL18176_1», 2025.
- [9] Cipan, «C330ET05010», 2023.
- [10] Cipan, «C290RL05125», 2023.
- [11] A. K. Palakurthi e T. Dongala, «HPLC-UV Method Development for the Determination of EDTA in Oxycodone HCl Oral Liquids with Derivatization Technique. Robustness by Design of Experiments Approach», *Analytical Chemistry Letters*, vol. 9, n. 5, pp. 594–607, 2019, doi: 10.1080/22297928.2019.1674186.

- [12] B. Misiewicz, D. Mencer, W. Terzaghi, e A. L. VanWert, «Analytical Methods for Oxalate Quantification: The Ubiquitous Organic Anion», 1 de Abril de 2023, *MDPI*. doi: 10.3390/molecules28073206.
- [13] K. Samuel Barnabas *et al.*, «Trace level determination of t-butyl alcohol and t-butyl chloride by GC in dolasetron mesylate», Jan. 2019. doi: <https://doi.org/10.5281/ZENODO.5653506>.
- [14] Cipan, «C395ET05001», 2025.
- [15] «Chromatography - Chemistry LibreTexts». Acedido: 9 de Junho de 2025. Disponível em: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Instrumentation_and_Analysis/Chromatography](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumentation_and_Analysis/Chromatography)
- [16] «EUROPEAN PHARMACOPOEIA 6.0 2.2.46. Chromatographic separation techniques».
- [17] USP, «United States Pharmacopeia 36-NF 31 Chromatography», 2013.
- [18] «What is Chromatography and How Does It Work?» Acedido: 9 de Junho de 2025. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/blog/ask-a-scientist/what-is-chromatography/>
- [19] «Liquid Chromatography - Chemistry LibreTexts». Acedido: 9 de Junho de 2025. Disponível em: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Instrumentation_and_Analysis/Chromatography/Liquid_Chromatography](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumentation_and_Analysis/Chromatography/Liquid_Chromatography)
- [20] «What Is Liquid Chromatography? Principles, Techniques, & Applications». Acedido: 9 de Junho de 2025. Disponível em: <https://www.excedr.com/blog/liquid-chromatography-principles-techniques-applications>
- [21] «Difference between conventional chromatography and HPLC. | PharmaTutor». Acedido: 9 de Junho de 2025. Disponível em: <https://www.pharmatutor.org/pharma-analysis/difference-between-conventional-chromatography-and-hplc>
- [22] L. Nováková, P. Svoboda, e J. Pavlík, «Ultra-high performance liquid chromatography», *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation: Second Edition*, vol. 1, pp. 719–769, Jan. 2017, doi: 10.1016/B978-0-12-805393-5.00029-4.
- [23] J.C. Arsenault e P.D. McDonald, «Beginners Guide to Liquid Chromatography», 2009.
- [24] «Partition Chromatography: Definition, Principle, Procedure, Types, Application». Acedido: 9 de Junho de 2025. Disponível em: <https://scienceinfo.com/partition-chromatography-principle-procedure-types-application/>
- [25] F. Holler, S. Crouch, D. Skoog, e D. West, *FUNDAMENTALS OF ANALYTICAL CHEMISTRY*, 9.^a ed. Finch, Mary, 2013.
- [26] M. T. Gilbert, «Equipment», em *High Performance Liquid Chromatography*, 1st ed., Butterworth-Heinemann, Ed., 1987.
- [27] «analise-quimica-quantitativa-9nbsped-9788521634515_compress».
- [28] «HPLC Separation Modes - Stationary Phase in HPLC | Waters». Acedido: 25 de Junho de 2025. Disponível em:

- <https://www.waters.com/nextgen/us/en/education/primers/beginner-s-guide-to-liquid-chromatography/hplc-separation-modes.html?srsId=Afm-BOoqgv35T9VIRAnzDtt1yezwxqnQybPgSn2cQrD4Z5IvBT6PErFoa>
- [29] «Normal Phase HPLC Column and Reverse Phase HPLC Column - Hawach». Acedido: 25 de Junho de 2025. Disponível em: <https://www.hawach.com/news/normal-phase-hplc-column-and-reverse-phase-hplc-column.html>
- [30] V. Ganesh, P. Poorna Basuri, K. Sahini, e C. N. Nalini, «Retention behaviour of analytes in reversed-phase high-performance liquid chromatography—A review», 1 de Julho de 2023, *John Wiley and Sons Ltd.* doi: 10.1002/bmc.5482.
- [31] «Solvents and Caveats for LC-MS | Waters». Acedido: 17 de Julho de 2025. Disponível em: https://www.waters.com/nextgen/th/en/education/primers/the-mass-spectrometry-primer/solvents-and-caveats-for-lcms.html?utm_source=chatgpt.com
- [32] «Introduction of LC, HPLC, UPLC, MS and LC-MS and Flow Control Techniques- Part II». Acedido: 10 de Julho de 2025. [Em linha]. Disponível em: <https://www.auro-raprosoci.com/Introduction-of-LC-HPLC-UPLC-MS-and-LC-MS-and-Flow-Control-Techniques-Part-II>
- [33] «Binary vs. Quaternary Pumps: High Pressure Mixing vs. Low Pressure Mixing - Waters Blog». Acedido: 9 de Junho de 2025. Disponível em: https://www.waters.com/blog/binary-vs-quaternary-high-pressure-mixing-vs-low-pressure-mixing/?srsId=AfmBOorj2rnC7OHDN77V3ib8g96FFhYwM-gAzGc5KiTXD7_v53VjFZ33r
- [34] «How Does High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Work? | Waters». Acedido: 9 de Junho de 2025. Disponível em: <https://www.waters.com/nextgen/us/en/education/primers/beginner-s-guide-to-liquid-chromatography/how-does-high-performance-liquid-chromatography-work.html>
- [35] L. S. Ettre, «Chromatography: the Separation Technique of the 20th Century Key Words Chromatography Centennial review Evolution in the 20th Century», Jan. 2000.
- [36] I. M. Bird, «High performance liquid chromatography: principles and clinical applications», Set. 1989.
- [37] E. Haghedooren, L. Peeters, S. Dragovic, J. Hoogmartens, e E. Adams, «Silica-based monolithic columns versus conventional particle-packed columns for liquid chromatographic analysis of tetracycline, oxytetracycline and chlortetracycline», *Talanta*, vol. 78, n. 3, pp. 665–671, Mai. 2009, doi: 10.1016/j.talanta.2008.12.024.
- [38] J. Dolan, «HPLC Columns A Guide to HPLC and LC-MS Buffer Selection». Disponível em: www.ace-hplc.com
- [39] «LC-MS Introduction | CHROMacademy». Acedido: 9 de Junho de 2025. Disponível em: <https://www.chromacademy.com/channels/lc-ms/principles/lc-ms-introduction/>
- [40] «HPLC Basics | Thermo Fisher Scientific - PT». Acedido: 9 de Junho de 2025. Disponível em:

- https://www.thermofisher.com/pt/en/home/industrial/chromatography/chromatography-learning-center/liquid-chromatography-information/hplc-basics.html?erpType=Global_E1
- [41] «High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Basics». Acedido: 9 de Junho de 2025. Disponível em: <https://www.ssi.shimadzu.com/service-support/faq/liquid-chromatography/knowledge-base/hplc-basics/index.html>
 - [42] M. Sargent *et al.*, *Guide to achieving reliable quantitative LC-MS measurements RSC Analytical Methods Committee First Edition 2013 Editor*. 2013.
 - [43] «LC-MS – What Is LC-MS, LC-MS Analysis and LC-MS/MS | Technology Networks». Acedido: 25 de Junho de 2025. Disponível em: <https://www.technology-networks.com/analysis/articles/lc-ms-what-is-lc-ms-lc-ms-analysis-and-lc-msms-348238>
 - [44] E. Hoffmann e V. Stroobant, *Mass Spectrometry Principles and Applications*. England, 2007.
 - [45] «Basics of LC/MS», 1998.
 - [46] «Métodos comuns de ionização | Waters». Acedido: 9 de Junho de 2025. Disponível em: <https://www.waters.com/nextgen/pt/pt/education/primers/the-mass-spectrometry-primer/common-ionization.html?srsId=AfmBOor2TODNwyrQYjLo3yGFTO-35pPgkFg7ucw8uea294fWLzNUn9QC>
 - [47] J. Pitt, «LC-MS princípios», *Clin Biochem Rev*, vol. 30, Fev. 2009.
 - [48] C. Ho *et al.*, «Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications», Hong Kong, Fev. 2003.
 - [49] «Interfaces for LC-MS : SHIMADZU (Shimadzu Corporation)». Acedido: 9 de Junho de 2025. Disponível em: https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/basics_of_lcms/interfaces_for_lcms.html#section2
 - [50] «LC-MS – What Is LC-MS, LC-MS Analysis and LC-MS/MS | Technology Networks». Acedido: 9 de Junho de 2025. Disponível em: <https://www.technology-networks.com/analysis/articles/lc-ms-what-is-lc-ms-lc-ms-analysis-and-lc-msms-348238>
 - [51] Waters Corporation, «Introduction to LCMS - Qda Detector», 2022.
 - [52] Steve Silvester, «Mobile Phase Ph and Organic Modifier in Reversed-Phase LC–ESI-MS Bioanalytical Methods: Assessment of Sensitivity, Chromatography and Correlation of Retention Time with In Silico Logd Predictions», *Bioanalysis*, vol. 5, n. 22, pp. 2753–2770, 2013.
 - [53] «European Pharmacopeia 7.0 2.2.46. Chromatographic separation techniques», 2013.
 - [54] «Validation of Chromatographic Methods», 1994.
 - [55] Crawford Scientific, «The Theory of HPLC Chromatographic Parameters». Disponível em: www.chromacademy.com
 - [56] Lena. Ohannesian e A. J. . Streeter, *Handbook of pharmaceutical analysis*. Marcel Dekker, 2002.

- [57] Bose Anirbandeep, «HPLC Calibration Process Parameters in Terms of System Suitability Test», *Austin Publishing Group*, vol. 1, n. 2, Out. 2014, Disponível em: www.austinpublishinggroup.com
- [58] RELACRE, «Guia Relacre 13 Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química», Lisboa, Fev. 2000.
- [59] ICH, «VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1)», 1994.
- [60] The United States Pharmacopeia, «Validation of Compendial Procedures USP 39», 2016.
- [61] P. Kościelniak, «Calibration methods in qualitative analysis», 1 de Maio de 2022, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.trac.2022.116587.
- [62] «1.5: Calibration of Instrumental Methods - Chemistry LibreTexts». Acedido: 9 de Junho de 2025. [Em linha]. Disponível em: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis_\(LibreTexts\)/01%3A_Introduction/1.05%3A_Calibration_of_Instrumental_Methods](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis_(LibreTexts)/01%3A_Introduction/1.05%3A_Calibration_of_Instrumental_Methods)
- [63] «External Standard Method vs. Internal Standard Method - What's the Difference? | This vs. That». Acedido: 9 de Junho de 2025. Disponível em: <https://thisvsthat.io/external-standard-method-vs-internal-standard-method>
- [64] «Standard Addition Procedure in Analytical Chemistry - Alpha Measure». Acedido: 9 de Junho de 2025. [Em linha]. Disponível em: <https://alpha-measure.com/standard-addition-method/>
- [65] «Standard Addition Method - Chemistry LibreTexts». Acedido: 9 de Junho de 2025. Disponível em: [https://chem.libretexts.org/Ancillary_Materials/Worksheets/Worksheets%3A_Analytical_Chemistry_II/Calibration_Methods_\(Gonzalez\)/02_Standard_Addition_Method](https://chem.libretexts.org/Ancillary_Materials/Worksheets/Worksheets%3A_Analytical_Chemistry_II/Calibration_Methods_(Gonzalez)/02_Standard_Addition_Method)
- [66] «Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA) - StatPearls - NCBI Bookshelf». Acedido: 18 de Junho de 2025. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK565883/>
- [67] «Ethylenediaminetetraacetic acid | 60-00-4». Acedido: 18 de Junho de 2025. [Em linha]. Disponível em: https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB9853940.htm
- [68] «Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) – kapillarelektrophorese.eu». Acedido: 18 de Junho de 2025. [Em linha]. Disponível em: <https://kapillarelektrophorese.eu/applikationen/ethylenediaminetetraacetic-acid-edta/>
- [69] «Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA) - StatPearls - NCBI Bookshelf». Acedido: 18 de Junho de 2025. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK565883/>
- [70] B. Narola, A. S. Singh, M. Mitra, P. R. Santhakumar, e T. G. Chandrashekhar, «A validated reverse phase HPLC method for the determination of disodium EDTA in meropenem drug substance with UV-detection using precolumn derivatization technique», *Anal Chem Insights*, vol. 6, n. 1, pp. 7–14, 2011, doi: 10.4137/ACI.S5953.
- [71] P. Kuran, D. Pilnaj, M. Dzurkova, e M. Smaha, «Method Development for Determination of EDTA in Water by Using Traditional Split/Splitless Injector-Comparing External and Internal Standard Methods of Quantification», em *IOP Conference Series: Earth and*

- Environmental Science*, Institute of Physics Publishing, Mar. 2019. doi: 10.1088/1755-1315/221/1/012126.
- [72] «Oxalic Acid | (COOH)₂ | CID 971 - PubChem». Acedido: 18 de Junho de 2025. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Oxalic-acid#section=Disso-ciation-Constants>
- [73] «Oxalic acid | 144-62-7». Acedido: 18 de Junho de 2025. Disponível em: https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB0323998.htm
- [74] Y. Kazakevich e R. Lobritto, «HPLC FOR PHARMACEUTICAL SCIENTISTS Edited by».
- [75] W. Niessen, «Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Third Edition».
- [76] «Oxalic Acid | (COOH)₂ | CID 971 - PubChem». Acedido: 18 de Junho de 2025. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Oxalic-Acid>
- [77] P. G. de Souza *et al.*, «Evaluation of oxalic acid extraction and quantification methods in the different purslane (*Portulaca oleracea* L.) matrices and spinach (*Spinacea oleracea*)», *MethodsX*, vol. 13, Dez. 2024, doi: 10.1016/j.mex.2024.102863.
- [78] «tert-BUTYL CHLORIDE | C₄H₉Cl | CID 10486 - PubChem». Acedido: 18 de Junho de 2025. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/tert-BUTYL-CHLORIDE>
- [79] «tert-Butyl chloride - Wikipedia». Acedido: 18 de Junho de 2025. Disponível em: https://en.wikipedia.org/wiki/Tert-Butyl_chloride
- [80] «tert-butyl chloride | C₄H₉Cl». Acedido: 18 de Junho de 2025. Disponível em: <https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.10054.html>
- [81] Global Safety Management, «Safety Data Sheet - Tert-Butyl Chloride», em *Safety Data Sheet*, 2015. Disponível em: www.gsmsds.com
- [82] «Dibenzyl azodicarboxylate | C₁₆H₁₄N₂O₄ | CID 5387121 - PubChem». Acedido: 18 de Junho de 2025. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dibenzyl-azodicarboxylate>
- [83] ChemicalBook, «Chemical Safety Data Sheet MSDS/SDS - Dibenzyl Azodicarboxylate», em *Chemical Safety Data Sheet MSDS/SDS*, 2025.
- [84] Cipan, «C230IT02132», 2019.
- [85] S. V Yefimov, «Rapid qualitative and quantitative HPLC/MS analysis of ethylenediaminetetraacetic acid in a pharmaceutical product without prior sample preparation», *J Pharm Pharmacogn Res*, vol. 8, n. 4, pp. 299–307, Mar. 2020. Disponível em: <http://jppres.com/jppres>
- [86] «Filtration Techniques in Sample Preparation | Phenomenex». Acedido: 18 de Junho de 2025. Disponível em: <https://www.phenomenex.com/knowledge-center/spe-knowledge-center/filtration-techniques>
- [87] «Avoid Syringe Filter Mistakes | KNAUER Lab Tips». Acedido: 18 de Junho de 2025. Disponível em: <https://store.knauer.net/blog/knauer-blog-7/avoiding-common-syringe-filter-mistakes-109>

- [88] D. Moreno-González, J. Alcántara-Durán, B. Gilbert-López, J. F. García-Reyes, e A. Molina-Díaz, «Matrix-effect free quantitative liquid chromatography mass spectrometry analysis in complex matrices using nanoflow liquid chromatography with integrated emitter tip and high dilution factors», *J Chromatogr A*, vol. 1519, pp. 110–120, Out. 2017, doi: 10.1016/j.chroma.2017.09.006.
- [89] E. Chambers, D. M. Wagrowski-Diehl, Z. Lu, e J. R. Mazzeo, «Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses», *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, vol. 852, n. 1–2, pp. 22–34, Jun. 2007, doi: 10.1016/j.jchromb.2006.12.030.
- [90] C. E. Cagnasso, L. B. López, V. G. Rodríguez, e M. E. Valencia, «Development and validation of a method for the determination of EDTA in non-alcoholic drinks by HPLC», *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 20, n. 3–4, pp. 248–251, Mai. 2007, doi: 10.1016/j.jfca.2006.05.008.
- [91] G. A. Biltekin, A. Akdoğan, M. Soylak, e Ü. Divrikli, «Validation of an HPLC-UV Method for Simultaneous Analysis of Ascorbic and Oxalic Acids in Beverages», *Akademik Gıda*, vol. 22, n. 4, pp. 273–281, Dez. 2024, doi: 10.24323/akademik-gida.1609556.

APÊNDICE - EDTA

Neste apêndice estão presentes, não só as tabelas de apoio às linearidades traçadas para o EDTA na oxitetraciclina dihidratada, como também os cálculos de apoio às quantificações deste analito no produto em estudo.

A.1 Linearidade - EDTA

Nesta subsecção do apêndice A constam as tabelas de apoio utilizadas na construção das linearidades do EDTA nos três lotes de oxitetraciclina dihidratada analisados para posterior quantificação pelo método de adição padrão.

Tabela A 1 - Características da amostra de EDTA

Massa Molar EDTA Dissódico Dihidratado, g/mol	372,2
Massa Molar EDTA, g/mol	292,2
Fator de Correção da Massa, %	78,51
Pureza, %	99,94

Tabela A 2 - Características da solução de EDTA

Massa EDTA Dissódico Dihidratado, mg	20,86
Massa Equivalente de EDTA, mg	12,14
Volume de Solução, mL	250,0
Concentração, mg/mL	0,0485
Concentração, ppm	48,56

Tabela A 3 - Características da solução de oxitetraciclina dihidratada G002

Massa oxitetraciclina dihidratada G002, mg	104,2
Volume de Solução, mL	100,0
Concentração, mg/mL	1,04
Concentração, ppm	1042

Tabela A 4 - Linearidade (Área Vs. Conc.) do método do EDTA – Oxitetraciclina dihidratada G002

Volume do balão, mL	10	10	10	10	10	10	10	10
Volume adicionado de solução EDTA, μL	0	25	50	100	150	200	250	300
Diluição do volume adicionado	0	100 000	50 000	25 000	16 667	12 500	10 000	8 333
Concentração do adicionado, ppm	0	0,12	0,24	0,49	0,73	0,97	1,21	1,46
Área da integração, $\mu\text{V.s}$	123 368	259 234	476 809	782 182	1 094 398	1 404 513	1 843 481	2 124 033
	116 022	284 745	446 710	771 016	1 083 105	1 423 979	1 819 014	2 109 958
	114 361	161 882	451 992	760 980	1 088 196	1 411 128	1 811 814	2 129 174
Média, $\mu\text{V.s}$	119 695	271 990	461 760	776 599	1 088 752	1 414 246	1 831 248	2 116 996
Desvio Padrão, $\mu\text{V.s}$	5 194	18 039	21 283	7 896	7 985	13 765	17 301	9 953
RSD, %	4,34	6,63	4,61	1,02	0,73	0,97	0,94	0,47

Tabela A 6 - Características da solução de oxitetraciclina dihidratada G003

Massa oxitetraciclina dihidratada G003, mg	102,8
Volume de Solução, mL	100,0
Concentração, mg/mL	1,03
Concentração, ppm	1028

Tabela A 5 - Linearidade (Área Vs. Conc.) do método do EDTA – Oxitetraciclina dihidratada G003

Volume do balão, mL	10	10	10	10	10	10	10	10
Volume adicionado de solução EDTA, μL	0	25	50	100	150	200	250	300
Diluição do volume adicionado	0	100 000	50 000	25 000	16 667	12 500	10 000	8 333
Concentração do adicionado, ppm	0	0,12	0,24	0,49	0,73	0,97	1,21	1,46
Área da integração, $\mu\text{V.s}$	140 754	286 992	492 139	977 897	1 474 078	2 060 743	2 423 907	3 087 160
	135 493	281 056	485 171	967 739	1 458 532	2 124 035	2 394 867	3 016 665
	138 426	277 785	471 708	966 536	1 442 619	2 118 748	2 456 542	3 035 653
Média, $\mu\text{V.s}$	138 124	284 024	488 655	972 818	1 466 305	2 092 389	2 409 387	3 051 913
Desvio Padrão, $\mu\text{V.s}$	3 720	4 197	4 927	7 183	10 993	44 754	20 534	49 847
RSD, %	2,69	1,48	1,01	0,74	0,75	2,14	0,85	1,63

Tabela A 7 - Características da solução de Oxitetraciclina dihidratada G004

Massa oxitetraciclina dihidratada G004, mg	102,8
Volume de Solução, mL	100,0
Concentração, mg/mL	1,03
Concentração, ppm	1028

Tabela A 8 - Linearidade (Área Vs. Conc.) do método do EDTA – Oxitetraclina dihidratada G004

Volume do balão, mL	10	10	10	10	10	10	10	10
Volume adicionado de solução EDTA, μL	0	25	50	100	150	200	250	300
Diluição do volume adicionado	0	100 000	50 000	25 000	16 667	12 500	10 000	8 333
Concentração do adicionado, ppm	0	0,12	0,24	0,49	0,73	0,97	1,21	1,46
Área da integração, $\mu\text{V.s}$	134 054	250 449	422 997	860 977	1 393 927	1 838 241	2 329 248	2 776 683
Média, $\mu\text{V.s}$	142 175	246 814	419 336	863 420	1 386 899	1 855 114	2 318 557	2 773 934
Desvio Padrão, $\mu\text{V.s}$	144 322	252 008	417 321	866 457	1 380 470	1 850 142	2 288 605	2 876 109
RSD, %	138 115	248 632	421 167	862 199	1 390 413	1 846 678	2 323 903	2 775 309
	5 742	2 570	2 589	1 727	4 970	11 931	7 560	1 944
	4,16	1,03	0,61	0,20	0,36	0,65	0,33	0,07

A.2 Análise de Resíduos e Teste de Mandel – EDTA

Nesta subsecção do apêndice A estão apresentadas as tabelas de apoio utilizadas aquando da realização da análise de resíduos e do teste de Mandel.

Tabela A 9 - Cálculo dos Resíduos - Método do EDTA

Volume Adicionado, μL	0	25	50	100	150	200	250	300
y Médio	119 695	271 990	461 760	776 599	1 088 752	1 414 246	1 831 248	2 116 996
y Estimado	109 694	277 222	444 749	779 804	1 114 859	1 449 914	1 784 969	2 120 024
Resíduos	10 001	-5 232	17 011	-3 205	-26 108	-35 668	46 279	-3 029

Tabela A 10 - Teste de Mandel - EDTA

Volume spiked de solução EDTA, μL	0	25	50	100	150	200	250	300
y Médio	119 695	271 990	461 760	776 599	1 088 752	1 414 246	1 831 248	2 116 996
y Estimado Linear	109 694	277 222	444 749	779 804	1 114 859	1 449 914	1 784 969	2 120 024
y Estimado Polinomial	121 729	281 807	443 278	770 393	1 103 076	1 441 325	1 785 142	2 134 525
Resíduos Linear	10 001	-5 232	17 011	-3 205	-26 108	-35 668	46 279	-3 029
Resíduos Polinomial	-2 034	-9 818	18 482	6 206	-14 324	-27 079	46 106	-17 530
Desvio Padrão Linear					27 482			
Desvio Padrão Polinomial					27 757			
DS^2					679 579 706			
PG					0,882			
F (5%, 1, 5)					6,61			

A.3 Quantificação de EDTA

Nesta subsecção do apêndice A são apresentados com maior detalhe os cálculos feitos para quantificar o EDTA nos diferentes lotes de oxitetraclina.

Oxitetraclina Dihidratada G002

$$0 = 6712,2x + 106050 \Leftrightarrow x = -15,80, \text{aplicando módulo, } 15,80 \mu\text{l}$$

$$\text{mg EDTA em 9 ml de solução de oxi} = \frac{16,37}{250} \times 0,0158 = 0,001 \text{ mg}$$

$$\text{mg EDTA nos 100 ml de solução de oxi preparada} = \frac{100 \times 0,001}{9} = 0,011 \text{ mg}$$

$$\% m/m \left(\text{EDTA} / \text{Oxi. Dihid.} \right) = \frac{0,011}{104,170} * 100 = 0,011\%$$

Oxitetraciclina Dihidratada G003

$$0 = 9825,5x + 42828 \Leftrightarrow x = -4,36, \text{aplicando módulo, } 4,36 \mu\text{l}$$

$$\text{mg EDTA em 9 ml de solução de oxi} = \frac{16,37}{250} \times 0,00436 = 0,0003 \text{ mg}$$

$$\text{mg EDTA nos 100 ml de solução de oxi preparada} = \frac{100 \times 0,0003}{9} = 0,003 \text{ mg}$$

$$\% \text{ m/m} \left(\text{EDTA} / \text{Oxi. Dihid.} \right) = \frac{0,003}{104,86} * 100 = 0,003\%$$

Oxitetraciclina Dihidratada G004

$$0 = 9133,7x + 26335 \Leftrightarrow x = -2,88, \text{aplicando módulo, } 2,88 \mu\text{l}$$

$$\text{mg EDTA em 9 ml de solução de oxi} = \frac{16,37}{250} \times 0,00288 = 0,0002 \text{ mg}$$

$$\text{mg EDTA nos 100 ml de solução de oxi preparada} = \frac{100 \times 0,0002}{9} = 0,002 \text{ mg}$$

$$\% \text{ m/m} \left(\text{EDTA} / \text{Oxi. Dihid.} \right) = \frac{0,002}{102,79} * 100 = 0,002\%$$

APÊNDICE – ÁCIDO OXÁLICO

Neste apêndice estão presentes as tabelas de apoio às linearidades traçadas para o ácido oxálico na oxitetraciclina dihidratada e na oxitetraciclina base, como também os cálculos de apoio às quantificações deste analito no produto em estudo.

B.1 Linearidade – Ácido Oxálico

Nesta subsecção do apêndice B encontram-se as tabelas de apoio utilizadas na construção das linearidades do ácido oxálico nos dois lotes de oxitetraciclina dihidratada analisados e na oxitetraciclina base para posterior quantificação pelo método de adição padrão.

Tabela B 1 – Características da amostra de ácido oxálico

Massa Molar Ácido Oxálico Dihidratado, g/mol	126,1
Massa Molar Ácido Oxálico, g/mol	90,03
Fator de Correção da Massa, %	71,39
Pureza, %	100,9

Tabela B 2 - Características da solução de ácido oxálico

Massa Ácido Oxálico Dihidratado, mg	21,44
Massa Equivalente de Ácido Oxálico, mg	15,44
Volume de Solução, mL	250,0
Concentração, mg/mL	0,062
Concentração, ppm	61,77

Tabela B 3 - Características da solução de oxitetraciclina base

Massa oxitetraciclina base, mg	200,3
Volume de Solução, mL	200,0
Concentração, mg/mL	1,000
Concentração, ppm	1001

Tabela B 4 - Linearidade (Área Vs. Conc.) do método do ácido oxálico - oxitetraciclina base

Volume do balão, mL	10	10	10	10	10	10	10
Volume spiked de solução Ácido Oxálico, μ L	0	50	150	200	300	500	800
Volume spiked de solução Ácido Oxálico, mL	0	0,05	0,15	0,2	0,3	0,5	0,8
Diluição do spiked	0	50 000	16 667	12 500	8 333	5 000	3 125
Concentração do spiked, mg/mL	0	0,00031	0,00093	0,0012	0,0019	0,0031	0,0049
Concentração do spiked, ppm	0	0,31	0,93	1,24	1,85	3,09	4,94
Área da integração, μ V.s	5 007	21 535	62 409	75 592	125 199	188 943	277 840
Média, μ V.s	5 465	20 949	60 160	74 912	126 959	186 382	280 256
Desvio Padrão, μ V.s	5 236	21 242	61 285	75 252	126 079	187 663	279 048
RSD, %	324	414	1 590	481	1 245	1 811	1 708
	6,19	1,95	2,59	0,64	0,99	0,96	0,61

Tabela B 5 - Características da solução 2 de ácido oxálico

Massa Ácido Oxálico Dihidratado, mg	16,86
Massa Equivalente de Ácido Oxálico, mg	12,14
Volume de Solução, mL	200,0
Concentração, mg/mL	0,061
Concentração, ppm	60,72

Tabela B 6 - Características da solução de oxitetraciclina dihidratada G002

Massa oxitetraciclina dihidratada G002, mg	100,6
Volume de Solução, mL	100,0
Concentração, mg/mL	1,01
Concentração, ppm	1006

Tabela B 7 - Linearidade (Área Vs. Conc.) do método do ácido oxálico - Oxitetraciclina dihidratada G002

Volume do balão, mL	10	10	10	10	10	10	10
Volume adicionado de solução Ácido Oxálico, μ L	0	100	150	200	250	300	350
Diluição do volume adicionado	0	20 000	13 333	10 000	8 000	6 667	5 714
Concentração do adicionado, ppm	0	0,61	0,91	1,21	1,52	1,82	2,13
Área da integração, μ V.s	2 232	26 851	33 855	46 988	61 356	71 777	86 249
Média, μ V.s	2 056	27 960	32 254	46 746	63 655	73 254	92 670
Desvio Padrão, μ V.s	2 144	27 406	33 055	46 867	62 506	72 516	89 460
RSD, %	124	784	1 132	171	1 626	1 044	4 540
	5,80	2,86	3,42	0,37	2,60	1,44	5,08

Tabela B 8 - Características da solução de oxitetraciclina dihidratada G004

Massa oxitetraciclina dihidratada G004, mg	100,69
Volume de Solução, mL	100
Concentração, mg/mL	1,01
Concentração, ppm	1006,9

Tabela B 9 - Linearidade (Área Vs. Conc.) do método do ácido oxálico - Oxitetraciclina dihidratada G004

Volume do balão, mL	10	10	10	10	10	10	10
Volume adicionado de solução Ácido Oxálico, μL	0	100	150	200	250	300	350
Diluição do volume adicionado	0	20 000	13 333	10 000	8 000	6 667	5 714
Concentração do adicionado, ppm	0	0,61	0,91	1,21	1,52	1,82	2,13
Área da integração, $\mu\text{V.s}$	2 380	24 250	34 977	44 668	61 399	72 417	80 318
Média, $\mu\text{V.s}$	2 384	24 640	36 523	46 595	58 581	69 797	82 931
Desvio Padrão, $\mu\text{V.s}$	2 382	24 445	35 750	45 632	59 990	71 107	81 625
RSD, %	3	276	1 093	1 363	1 993	1 853	1 848
	0,12	1,13	3,06	2,99	3,32	2,61	2,26

B.2 Análise de Resíduos e Teste de Mandel – Ácido Oxálico

Nesta subsecção do apêndice B estão apresentadas as tabelas de apoio utilizadas aquando da realização da análise de resíduos e do teste de Mandel.

Tabela B 10 - Cálculo dos resíduos – Ácido Oxálico

Concentração do adicionado, ppm	0,62	1,24	1,85	2,47	3,09	3,71
y Médio	71 490	137 243	213 387	297 599	344 086	446 368
y Estimado	72 255	144 509	216 764	289 019	361 274	433 528
Resíduos	-765	-7 266	-3 377	8 580	-17 188	12 839

Tabela B 11 - Teste de Mandel - Ácido Oxálico

Volume adicionado de solução Ácido Oxálico, μL	0,62	1,24	1,85	2,47	3,09	3,71
y Médio	71 490	137 243	213 387	297 599	344 086	446 368
y Estimado Linear	72 255	144 509	216 764	289 019	361 274	433 528
y Estimado Polinomial	69 195	139 981	212 358	286 326	361 884	439 032
Resíduos Linear	-765	-7 266	-3 377	8 580	-17 188	12 839
Resíduos Polinomial	2 295	-2 738	1 029	11 273	-17 798	7 335
Desvio Padrão Linear				12 234		
Desvio Padrão Polinomial				13 057		
DS ²				87 197 450		
PG				0,51		
F (5%, 1, 3)				10,13		

B.3 Quantificação de Ácido Oxálico

Nesta subsecção do apêndice B são apresentados com maior detalhe os cálculos feitos para quantificar o ácido oxálico nos diferentes lotes de oxitetraciclina dihidratada e base.

Oxitetraciclina Base 2000322

$$0 = 346,84x + 8874,2 \Leftrightarrow x = -25,59, \text{aplicando módulo, } 25,59 \mu\text{l}$$

$$\text{mg ácido oxálico em 9 ml de solução de oxi} = \frac{15,44}{250} \times 0,02559 = 0,00158 \text{ mg}$$

$$\text{mg ácido oxálico nos 100 ml de solução de oxi preparada} = \frac{200 \times 0,00158}{9} = 0,03511 \text{ mg}$$

$$\% \text{ m/m (ácido oxálico/Oxi. Base.)} = \frac{0,03511}{200,28} * 100 = 0,018\%$$

Oxitetraciclina Dihidratada G002

$$0 = 245,1x + 437,34 \Leftrightarrow x = -1,78, \text{aplicando módulo, } 1,78 \mu\text{l}$$

$$\text{mg ácido oxálico em 9 ml de solução de oxi} = \frac{12,14}{200} \times 0,00178 = 0,000108 \text{ mg}$$

$$\text{mg ácido oxálico nos 100 ml de solução de oxi preparada} = \frac{200 \times 0,000108}{9} = 0,0024 \text{ mg}$$

$$\% \text{ m/m (ácido oxálico/Oxi. Dihid.)} = \frac{0,0024}{100,63} * 100 = 0,0024\%$$

Oxitetraciclina Dihidratada G004

$$0 = 228,79x + 1722,4 \Leftrightarrow x = -7,53, \text{aplicando módulo, } 7,53 \mu\text{l}$$

$$\text{mg ácido oxálico em 9 ml de solução de oxi} = \frac{12,14}{100} \times 0,00753 = 0,00046 \text{ mg}$$

$$\text{mg ácido oxálico nos 100 ml de solução de oxi preparada} = \frac{100 \times 0,00046}{9} = 0,00508 \text{ mg}$$

$$\% \text{ m/m (ácido oxálico/Oxi. Dihid.)} = \frac{0,00508}{100,69} * 100 = 0,00505\%$$

APÊNDICE – DBAD

Neste apêndice estão presentes as tabelas de apoio às linearidades traçadas para o DBAD no 7-HT e no cloridrato de minociclina, como também os cálculos de apoio às quantificações deste analito no produto em estudo.

C.1 Linearidade – DBAD

Nesta subsecção do apêndice C encontram-se as tabelas de apoio utilizadas na construção das linearidades do DBAD nos produtos em estudo, o 7-HT e o cloridrato de minociclina.

Tabela C 1 - Características da amostra de DBAD

Massa de DBAD, mg	20,05
Volume de Solução, mL	100,0
Concentração, mg/mL	0,201
Concentração, ppm	200,5

DBAD no 7-HT

Tabela C 2 - Linearidade (Área vs. Conc.) do método do DBAD - 7-HT

Volume do balão, mL	10	10	10	10	10	10
Volume adicionado de solução DBAD, µL	0	100	200	300	400	500
Diluição do volume adicionado	0	10 000	5 000	3 333	2 500	2 000
Concentração do volume adicionado, ppm	0	2,01	4,01	6,02	8,02	10,03
Área da integração, µV.s	72 053 516	78 592 507	86 995 264	96 483 868	105 943 884	112 636 524
Média, µV.s	69 930 364	79 203 964	87 290 145	96 745 033	104 977 173	112 695 835
Desvio Padrão, µV.s	70 991 940	78 898 236	87 142 705	96 614 451	105 460 529	112 666 180
RSD, %	1 501 295	432 365	208 512	184 672	683 568	41 939
	2,11	0,55	0,24	0,19	0,65	0,04

DBAD no Cloridrato de Minociclina

Tabela C 3 - Características da solução de cloridrato de minociclina

Massa Cloridrato de Minociclina, mg	50,35
Volume de Solução, mL	50,00
Concentração, mg/mL	1,01
Concentração, ppm	1007

Tabela C 4 - Linearidade (Área Vs. Conc.) do método do DBAD - Cloridrato de Minociclina

Volume do balão, mL	10	10	10	10	10
Volume adicionado de solução DBAD, μL	0	100	200	300	400
Diluição do volume adicionado	0	10 000	5 000	3 333	2 500
Concentração do adicionado, ppm	0	2,07	4,13	6,20	8,26
Área da integração, $\mu\text{V.s}$	0	7 650 109	16 071 170	23 043 319	30 764 096
Média, $\mu\text{V.s}$	0	7 588 566	15 886 245	22 555 357	30 510 016
Desvio Padrão, $\mu\text{V.s}$	0	7 619 338	15 978 708	22 799 338	30 637 056
RSD, %	0	43 517	130 762	345 041	179 662
	0	0,57	0,82	1,51	0,59

C.2 Análise de Resíduos e Teste de Mandel – DBAD

Nesta subsecção do apêndice C estão apresentadas as tabelas de apoio utilizadas aquando da realização da análise de resíduos e do teste de Mandel.

Tabela C 5 - Cálculo dos resíduos - DBAD

Volume Adicionado de Solução DBAD, μL	0	100	200	300	400	500
y Médio	70 991 940	78 898 236	87 142 705	96 614 451	105 460 529	112 666 180
y Estimado	70 710 210	79 211 110	87 712 010	96 212 910	104 713 810	113 214 710
Resíduos	281 730	-312 874	-569 305	401 541	746 719	-548 530

Tabela C 6 - Teste de Mandel - DBAD

Volume Adicionado de Solução DBAD, μL	0	100	200	300	400	500
y Médio	70 991 940	78 898 236	87 142 705	96 614 451	105 460 529	112 666 180
y Estimado Linear	70 710 210	79 211 110	87 712 010	96 212 910	104 713 810	113 214 710
y Estimado Polinomial	70 000 000	78 579 215	87 119 260	95 620 135	104 081 840	112 504 375
Resíduos Linear	281 730	-312 874	-569 305	401 541	746 719	-548 530
Resíduos Polinomial	991 940	319 021	23 445	994 316	1 378 689	161 805
Desvio Padrão Linear				616 660		
Desvio Padrão Polinomial				1 154 974		
DS ²				-2 480 814 679 176		
PG				-1,86		
F (5%, 1, 3)				10,13		

C.3 Quantificação de DBAD

Nesta subsecção do apêndice C são apresentados com maior detalhe os cálculos feitos para quantificar o DBAD no cloridrato de minociclina.

$$0 = 76454x + 116065 \Leftrightarrow x = -1,52, \text{aplicando módulo, } 1,52 \mu\text{l}$$

$$\text{mg DBAD em 9 ml de solução de cloridrato de minociclina} = \frac{20,65}{50} \times 0,00152 = 0,000628 \text{ mg}$$

$$\text{mg DBAD nos 50 ml de solução de cloridrato de minociclina preparada} = \frac{50 \times 0,000628}{9} = 0,00349 \text{ mg}$$

$$\% \text{ m/m (DBAD/Cloridrato de Minociclina)} = \frac{0,00349}{50,35} * 100 = 0,0069\%$$



2025

MARIANA MACHADO

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS EM UHPLC-MS PARA
QUANTIFICAÇÃO DE IMPUREZAS EM SUBSTÂNCIAS FARMACÊUTICAS